



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA SERÍN
PROTEASA EN *Trichomonas vaginalis***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A
QFB. PABLO A. HERNÁNDEZ ROMANO

DIRECTORA DE TESIS
DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR

MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 SE DESARROLLÓ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS EN LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO BAJO LA ASESORÍA DE LA DOCTORA MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR Y FORMARON PARTE DEL COMITÉ TUTOR LOS DOCTORES DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN Y ROSSANA ARROYO VERÁSTEGUI.


PDCB/grad/024/Jur/2010

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 259ª del 21 de abril del 2010, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **PABLO AUGURIO HERNÁNDEZ ROMANO**, con número de cuenta **98547412**, con la tesis titulada **"CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA SERÍN PROTESA EN *Trichomonas vaginalis*"**, dirigida por la Dra. María Imelda López Villaseñor.

Presidente:	Dr.	Abraham Landa Piedra
Vocal:	Dra.	Bertha González Pedrajo
Vocal:	Dr.	Pedro Ostoa Saloma
Vocal:	Dra.	Patricia Talamás Rohana
Secretario:	Dra.	María Imelda López Villaseñor

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Ciudad Universitaria, a 21 de abril del 2010



DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
RESPONSABLE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS



DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
COORDINADOR DEL PROGRAMA

C.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM
Tutora Dra. María Imelda López Villaseñor
Coordinación de PDCB

FMM/RCC/aap

DEDICATORIA

ESTA TESIS LA DEDICO A MIS PADRES POR DARNOS

UNA VIDA LLENA DE AMOR Y FELICIDAD

LA DEDICO A NAY Y A PABLITO POR HACER QUE CADA

DIA VALGA LA PENA VIVIRLO

A MIS HERMANOS POR TODO SU APOYO Y POR SU

COMPañÍA DE TODA LA VIDA

A MI SUEGRA VICTORIA POR QUE SIN SU APOYO NO

HABRIAMOS LLEGADO HASTA AQUÍ

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por formarme como Químico y posteriormente darme la oportunidad de estudiar un posgrado y en cuyo seno pasé una de las mejores etapas de mi vida.
- A la Doctora Imelda López Villaseñor por su paciencia, apoyo y conocimientos, pero sobre todo por forjarme como investigador.
- A los miembros de mi comité tutor: Doctora Rossana Arroyo y Doctor Diego González Halphen, por su disposición y tiempo para discutir los resultados en cada examen tutorial.
- A la Bióloga Lorena López Griego por su apoyo al inicio del doctorado.
- A mis compañeros de laboratorio, Vanessa, Ana y Bernardo por su compañía y hacer agradable el trabajo en el laboratorio.
- Al Doctor Roberto Hernández Fernández y a su grupo de trabajo por sus consejos en cada seminario.
- Al CONACyT por la beca de Doctorado (No. de Registro 189046).
- A la DGEP por la beca complementaria de Doctorado.
- A los Doctores asignados como Jurado por el tiempo dedicado a la revisión de esta Tesis

ÍNDICE

Resumen	4
Abstract	7
Abreviaturas	9
I. Introducción	12
I.1. Generalidades	12
I.2. Epidemiología	12
I.3. Cuadro clínico	14
I.4. Tratamiento y prevención	14
I.5. Diagnóstico	15
I.6. Biología de <i>Trichomonas vaginalis</i>	17
I.7. Regulación de la expresión génica en <i>T. vaginalis</i>	21
I.8. Patogenicidad	23
II. Antecedentes	28
II.1. Proteasas	28
II.2. Clasificación de proteasas	29

II.2.1. Clasificación de proteasas por la reacción que catalizan	29
II.2.2. Clasificación de proteasas por el tipo catalítico	31
II.2.3. Clasificación por la relación evolutiva entre las proteasas	31
II.3. Proteasas de serina	33
II.4. Familia S8A de las subtilisinas (Clan SB)	37
II.5. Subtilisinas en protozoarios parásitos	41
II.6. Proteasas en <i>Trichomonas vaginalis</i>	42
III. Antecedentes directos	45
IV. Justificación	49
V. Hipótesis	50
VI. Objetivos	51
VII. Materiales y métodos	52
VIII. Resultados	82
VIII.1. Secuencia completa del gen <i>sub1</i>	82
VIII.2. Expresión de <i>sub1</i>	85
VIII.3. Determinación del sitio de inicio de la transcripción y 3'UTR de <i>sub1</i>	86

VIII.4. Efecto de la concentración del hierro y del contacto con células en la expresión de <i>sub1</i>	95
VIII.5. Identificación y localización celular de SUB1	99
VIII.6. Actividad bioquímica de proteasas de serina	105
VIII.7. Análisis filogenético de SUB1	111
VIII.8. Análisis bioinformático de las subtilisinas reportadas en el genoma de <i>T. vaginalis</i>	112
IX. Discusión	115
X. Referencias	126
XI. Apéndice	135
XII. Artículo	141

I. INTRODUCCIÓN

I.1. GENERALIDADES

Trichomonas vaginalis es un protozoo flagelado, responsable de una de las infecciones de transmisión sexual más comunes en humanos, la tricomonosis. 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* la hizo Donné en 1836, sin embargo este parásito no fue estudiado con más detalle sino hasta el siglo XX.

T. vaginalis sólo 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 tricomonosis 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 cuatro flagelos que forman un penacho, un flagelo recurrente adosado a la membrana plasmática y un axostilo. Su reproducción se lleva a cabo por fisión binaria longitudinal.

I.2. EPIDEMIOLOGÍA

La tricomonosis es la enfermedad de transmisión sexual no viral más común en el mundo. A nivel mundial se estima que aparecen cerca de 174 millones de casos cada año, comparado con la prevalencia global de 92 millones de casos de *Chlamydia*

trachomatis y 62 millones de casos de *Neisseria gonorrhoeae*. Más de un tercio de las infecciones en mujeres y la mayoría de las infecciones en hombres cursan de manera asintomática por lo que los datos epidemiológicos están subestimados [1].

Utilizando una combinación de preparaciones en fresco y PCR, se encontró una prevalencia de 20.8% y 12.2% en hombres sintomáticos y asintomáticos respectivamente. Estos resultados indican que la tricomonosis no debe ser considerada una enfermedad sólo de mujeres [2].

En México la tricomonosis se encuentra entre las primeras causas de morbilidad. La frecuencia de esta enfermedad presenta una fluctuación en su incidencia que va desde una tasa en población general de 118.08 por 100, 000 habitantes en 1994 hasta 183.42 en el 2003 (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, SS, México).

En relación a las mujeres infectadas durante el embarazo, la tricomonosis 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 [3, 4].

En cuanto a la infección por el VIH hay evidencia epidemiológica que indica la mayor transmisibilidad de ese virus en personas que padecen tricomonosis. Algunos de los mecanismos propuestos para este incremento son la respuesta inflamatoria que lleva al reclutamiento de linfocitos CD4 y macrófagos en la mucosa vaginal y en el cérvix, así como el incremento de la carga viral tanto en semen como en la cavidad vaginal de individuos con tricomonosis [1, 5-11]. Aunque se ha propuesto una relación

entre la tricomonosis y el riesgo de desarrollar cáncer de próstata, hasta el momento esta relación no está clara [12, 13].

1.3. CUADRO CLÍNICO

Los síntomas clásicos de la tricomonosis en mujeres son leucorrea amarillo-verdosa debido a infiltración leucocitaria (la consistencia de la descarga varía de paciente a paciente de delgada y escasa a espesa y abundante con valores de pH usualmente mayores a 6), prurito, disuria, dispareunia, eritema de la mucosa vaginal y lesiones hemorrágicas puntiformes que dan al cérvix apariencia de fresa. Estos no se observan en todos los casos, lo que lleva a que las mujeres sean tratadas empíricamente para infecciones bacterianas y por levaduras. La mayoría de los hombres que tienen contacto sexual con una mujer con tricomonosis pueden ser completamente asintomáticos o sólo presentar una leve disuria o uretritis. Se ha reportado que el parásito es capaz de alojarse en la próstata [14-16].

1.4. 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 2 g, 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 tricomona; el parásito primero interna el fármaco por difusión y lo metaboliza en los

hidrogenosomas reduciendo el grupo nitro por medio de la piruvato: ferredoxin oxidoreductasa. Este proceso 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. 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 [17, 18].

I.5. DIAGNÓSTICO

La incidencia de *T. vaginalis* en varias partes del mundo es relativamente desconocida, ya que la enfermedad no puede ser diagnosticada o es mal diagnosticada en la práctica clínica debido a que su compleja sintomatología puede sobrelaparse con otras causas de vaginitis; y por que los métodos convencionales de diagnóstico no están disponibles en algunas ocasiones. El éxito de una prueba diagnóstica para *Trichomonas vaginalis* depende de la apropiada recolección de la muestra, sin embargo esta es colectada únicamente cuando se considera un diagnóstico [14].

Tradicionalmente el método más accesible para el diagnóstico de *T. vaginalis* es la observación microscópica directa de la secreción vaginal, uretral o prostática suspendida en solución salina; se utiliza para buscar células del parásito en forma de pera o redondeadas con un movimiento flagelar distintivo, así como polimorfonucleares, teniendo una sensibilidad del 38-82%. El resultado de esta estrategia depende del tamaño del inóculo, ya que la probabilidad de observar

parásitos cuando se encuentran en cantidad menor a 1×10^4 parásitos/ml es muy baja [14, 19, 20].

El cultivo celular ha sido la prueba de oro para el diagnóstico de *T. vaginalis*. Se requiere un inóculo de 1×10^2 parásitos/ml, con la desventaja de que los cultivos deben estar de 2 a 7 días en incubación y durante ese tiempo los pacientes continúan transmitiendo la infección. La contaminación con bacterias es el mayor problema, incluso en medios de cultivo con antibióticos para eliminar la flora normal. A veces se requiere el pase del cultivo después de 2 ó 3 días para reducir la contaminación bacteriana e identificar definitivamente a *T. vaginalis*. Algunos medios de cultivo disponibles hoy en día incluyen el Diamond's Trichosel e InPouch. La sensibilidad de estos medios selectivos es del 85-87% [21].

La US Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado otras dos pruebas para la tricomonosis en mujeres. La prueba rápida para *Trichomonas* OSOM (Genzyme Diagnostics) es una inmunocromatografía de flujo capilar que provee resultados en aproximadamente 10 minutos. El Affirm VP III (Becton Dickinson) es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos que detecta *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* y *Candida albicans*, y provee resultados en aproximadamente 45 minutos. Estas pruebas tienen una sensibilidad mayor al 83% y una especificidad mayor al 97%.

Debido a que la mayoría de los hombres infectados son portadores asintomáticos, el diagnóstico de *T. vaginalis* no se realiza en hombres y el compañero sexual se trata con metronidazol al mismo tiempo que la mujer es tratada con el antiparasitario. En el pequeño número de hombres que son sintomáticos se lleva a

cabo el cultivo de frotis uretral, de la primera orina y de semen, que tienen una sensibilidad del 80, 68 y 67% respectivamente [14, 21].

Otras técnicas de diagnóstico como ELISA, hibridación *in situ* y pruebas con anticuerpos fluorescentes tienen entre 70 y 90% de sensibilidad. La reacción de PCR ha sido probada para la aplicación en el diagnóstico y tiene una sensibilidad cercana al 100% [22, 23].

I.6. BIOLOGÍA DE Trichomonas vaginalis

El protista amitocondriado *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, organelos con doble membrana encargados de la producción de energía en este parásito, como las mitocondrias, los hidrogenosomas también generan ATP a través del metabolismo del piruvato, aunque utilizan una ruta anaerobia ausente en las mitocondrias, la cual resulta en la producción de hidrógeno molecular. Los hidrogenosomas carecen de DNA, se dividen de manera autónoma por fisión binaria e importan proteínas postraduccionalmente [24, 25].

Estudios filogenéticos basados en la secuencia de RNAr de la subunidad pequeña muestran que *T. vaginalis* divergieron en la base del árbol de los eucariontes [25-28]. El análisis filogenético de secuencias de DNA de la gliceraldehído-3-fosfato

deshidrogenasa [29], el factor de elongación alfa-1 [30], la DNA polimerasa [31], la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato [32], proteínas de choque térmico, y la valil-RNA sintetasa [33], apoyan un punto de divergencia temprano de las tricomonas en la rama de los eucariontes. En un nuevo sistema de clasificación filogenética igualitario, que toma en cuenta la secuencia recién liberada del genoma de *T. vaginalis* y características morfológicas compartidas con otros protozoarios, se considera a *T. vaginalis* como un protozoo evolucionado y especializado para sobrevivir en su ambiente [34].

T. vaginalis está rodeado por una membrana plasmática de 9-10 nm de grosor, semejante a las membranas de eucariontes superiores. Este parásito carece de las vías metabólicas para la síntesis y transformación de lípidos y para la síntesis de colesterol, por lo que los lípidos los obtienen de las células que lisa y fagocita. Los lípidos de la membrana son de tres tipos: neutros (30%), fosfolípidos (65%) y glicolípidos (5%) [25].

Trichomonas vaginalis no contiene mitocondrias ni peroxisomas, pero posee un 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 complejo. Mediante la formación de canales pinocíticos en cualquier parte de su superficie, la tricomona 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 [35, 36].

El citoesqueleto de *T. vaginalis* consiste en un complicado sistema de microtúbulos que se clasifican de acuerdo a su posición como axostilares, flagelares o mitóticos y que forman estructuras muy particulares como el axostilo, la costa y la pelta. Cuatro flagelos anteriores se originan en el complejo cinetosomal anterior y un flagelo recurrente adosado a la membrana ondulante también parte del complejo cinetosomal anterior (Figura 1). 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, sirve de apoyo aún cuando no existe conexión física entre ellas y está constituida por proteínas contráctiles que participan en el movimiento de los parásitos.

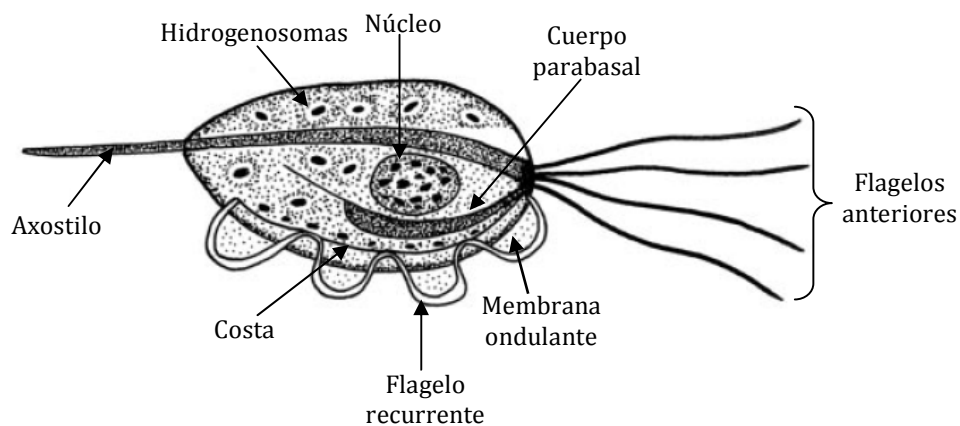


Figura 1. Representación esquemática de *Trichomonas vaginalis*.

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 pseudópodos. 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 (Espinosa y López-Villaseñor, datos no publicados) [37, 38].

El núcleo de *T. vaginalis* mide 4x5 μm , es 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.

Recientemente se liberó la secuencia del genoma de *T. vaginalis*. En este estudio se estimó que el tamaño total del genoma es de aproximadamente 160 Mb. Se identificaron aproximadamente 60,000 genes que codifican para proteínas y únicamente 65 genes con intrones. Aproximadamente 65% del genoma son secuencias repetidas, el contenido del DNA es rico en A+T, con un contenido de G+C del 32.7% [39]. Típicamente los núcleos contienen un nucléolo esférico pequeño, rodeado de un área libre de cromatina que se distribuye en gránulos relativamente pequeños [40].

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 [38]. Se han identificado seis cromosomas en *T. vaginalis*. El contenido de DNA por célula es aproximadamente de 81 fg [39, 41].

El ciclo celular de *T. vaginalis* presenta las fases M, G1, S y G2 con un periodo G2 dominante. Se ha identificado 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 perteneciente a la familia de las proteína-cinasas CDC2/28 [42]. El parásito posee dos centros organizadores de microtúbulos (MTOC) (atractóforos asociados a los cinetosomas), de donde salen dos haces de microtúbulos extranucleares que 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 [43, 44]. 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.

1.7. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

A pesar del progreso alcanzado en la comprensión de los mecanismos bioquímicos involucrados en la transcripción en eucariontes superiores, se conoce poco acerca de los mecanismos de regulación de la expresión génica en *T. vaginalis*. No se ha reportado una caja TATA típica en la posición -25 a -30 de algunos genes estudiados. En lugar de ésta, se ha reportado la presencia de un elemento iniciador en la región promotora de los genes de *T. vaginalis*: una secuencia muy conservada en la región 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. Se conoce que el iniciador es reconocido por una proteína de 39 kDa (IBP39: initiator binding protein). La región C terminal de IBP39 interactúa con el CTD de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II de *T. vaginalis* reclutándola para de esta manera iniciar la transcripción [45-49].

En la región 3' no traducida se ha propuesto la secuencia UAAA como señal de poliadenilación en los precursores de RNAm; la secuencia $Py^1(A)_{0-3}AAUU$ como sitio de corte para la poliadenilación de RNAm en *T. vaginalis* y un elemento rico en U's de 15-17 pb rio abajo de la señal de procesamiento [50]. 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 poli A. Dos de ellos presentan un elemento rico en AU (AURE) AUUUA o UUAUUUAU el cual confiere inestabilidad a los RNAm [51, 52]. 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.

Se ha encontrado que algunos genes de *T. vaginalis* son regulados por hierro. Para el gen *ap65-1* se ha descrito que la regulación por hierro es a nivel transcripcional por medio de la unión de proteínas tipo Myb en la región 5' del gen. Hasta el momento se han descrito tres proteínas tipo Myb en *T. vaginalis* [53-56].

También se ha reportado la presencia de elementos de respuesta a hierro (IRE's) en el 5'UTR del mensajero de *tvcp4*, cuya regulación es a nivel de síntesis de la proteína [57].

Las proteínas hidrogenosomales de *T. vaginalis* están codificadas en el núcleo como pre-proteínas con una secuencia líder de 5-15 aminoácidos MLSASSNFARN↓,

ausente en las proteínas maduras [58]. Se postula que esta secuencia líder se utiliza para la translocación de las proteínas del citoplasma a los hidrogenosomas [59], posiblemente ayudados por las proteínas de choque térmico Hsp 10, Hsp 60 y Hsp 70 [60]. Utilizando como modelo la molécula de tubulina del axostilo y del huso mitótico, se ha demostrado que las principales modificaciones post-traduccionales que se llevan a cabo en *T. vaginalis* son acetilación y glutaminación. Estas modificaciones se llevan a cabo después del ensamblaje de las estructuras microtubulares [61].

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 como a las células del epitelio vaginal es mediada a través de al menos cinco proteínas de adhesión de 120, 65, 51, 33 y 23 kDa llamadas adhesinas (AP120, AP65, AP51, AP33 y AP23). La expresión de estas adhesinas parece estar regulada por hierro además de que requieren la actividad proteolítica superficial de *T. vaginalis* para facilitar la unión a las células [52, 62, 63]. 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 está acompañada de un incremento en la síntesis de las adhesinas AP33 y AP23 (Figura 2). La capacidad para 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 en una extensa interdigitación y formación de microcanales [64].

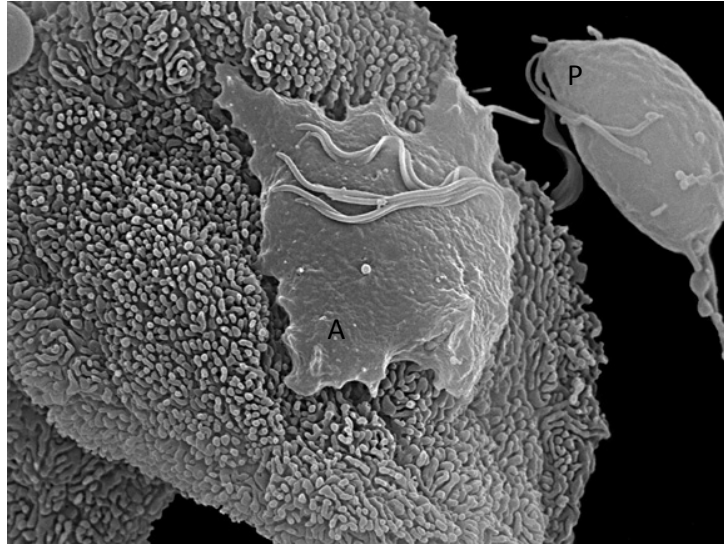


Figura 2. Adhesión de *T. vaginalis* a células del epitelio vaginal. Se observa el cambio de la forma piriforme (P) a la forma ameboide (A). Fotografía: Antonio Pereira-Neves y Marlene Benchimol, Universidad de Santa Ursula, Rio de Janeiro, Brasil.

Utilizando una variedad de técnicas de microscopía electrónica se han observado extensas fusiones de la membrana plasmática entre *T. vaginalis* y células del epitelio vaginal [65]. Aunque son eventos inducidos a través de diferentes señales, tanto el cambio morfológico como la inducción de adhesinas pueden resultar en una mayor adherencia del parásito a la célula huésped y por lo tanto proveer de ventajas en un ambiente constantemente bañado por secreciones.

Algunos factores de virulencia secretados por *T. vaginalis* incluyen un factor de separación celular, dos cisteín proteasas (30 y 60 kDa) aisladas de filtrados libres de células y una hemolisina [66-70]. El factor de separación celular es una glicoproteína de 200 kDa ácido lábil que causa la separación de las monocapas celulares y cuya

producción se ha correlacionado con la presentación clínica de la enfermedad [66, 70]. 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.

Se considera que la hemólisis por parte de *T. vaginalis* es el resultado del contacto directo del parásito con eritrocitos. Se han identificado dos adhesinas (42 y 140 kDa) que participan en la adherencia al eritrocito. Se ha propuesto que el proceso de hemólisis por parte de *T. vaginalis* se lleva a cabo en tres pasos [71]:

- 1.- Reconocimiento específico del eritrocito y unión del parásito.
- 2.- Liberación de una 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.

Se ha demostrado que el filtrado de *T. vaginalis* ejerce un efecto hemolítico en eritrocitos. Se cree que el grado de hemólisis está influenciado por el pH, la presencia de una fuente de energía y la temperatura, así como por la participación de proteasas y proteínas formadoras de poros [69, 71, 72]

Otros mecanismos de patogenicidad de *T. vaginalis* que están siendo explorados incluyen la presencia de proteínas de estrés oxidativo e interacciones *in vitro* entre *T. vaginalis* y la microflora vaginal. Las proteínas de estrés oxidativo pueden proveer alguna protección para el parásito contra los productos metabólicos de neutrófilos polimorfonucleares, que son las células reactivas predominantes durante la infección [17].

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 tricomonosis ocurre una disminución en la población de lactobacilos. La respuesta inmune celular y humoral es evidente en pacientes con tricomonosis, 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 y hemolíticas [69, 73]. Todas las subclases de inmunoglobulinas son susceptibles a las proteasas de cisteína de las tricomonas [74]. De manera similar, los parásitos son resistentes a la lisis mediada por complemento por la acción de una de las proteasas de cisteína más pequeñas inducida por altas concentraciones de hierro. Las proteasas degradan el C3 depositado en la superficie de *T. vaginalis* [75]. El inhibidor de proteasas de secreción leucocitaria (IPSL) es otro factor de protección de las superficies mucosas, sin embargo las proteasas de las tricomonas 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 tricomonas pueden también ser responsables de incrementar el riesgo de la adquisición del VIH en mujeres con tricomonosis.

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

II. ANTECEDENTES

II.1. PROTEASAS

Las enzimas proteolíticas actúan como efectores positivos o negativos de numerosos procesos biológicos, tanto para la degradación no específica de proteínas como para procesar selectivamente agentes que controlan eventos fisiológicos. Las proteasas ó proteinasas 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 alrededor de 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 candidatos para la creación de vacunas [76,77].

Antes de hidrolizar los enlaces peptídicos, una proteasa debe unir 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 tanto del sitio activo como del sustrato. Aunque durante la catálisis un sólo enlace peptídico es

cortado, los aminoácidos adyacentes al sitio de corte son críticos para la especificidad de una enzima. Por otra parte, 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 [76].

II.2. 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.- La relación evolutiva entre las proteasas.

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.2.1 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 solamente cerca del final de la cadena polipeptídica. Aquellas peptidasas que actúan en los extremos

amino (N) terminales pueden liberar un sólo 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 sólo residuo de aminoácido o un dipéptido (carboxipeptidasas y peptidil-dipeptidasas, respectivamente). Otras exopeptidasas son específicas para dipéptidos (dipeptidasas), o remueven residuos terminales que son sustituidos, ciclizados, o unidos por enlaces isopeptídicos (uniones peptídicas diferentes a los grupos α -carboxilo y α -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 α -amino y α -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 α -amino ó α -carboxilo.

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

Una exopeptidasa es comunmente 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 éste puede formar un calificativo.

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", "papaína", "termopsina" y "pitrilisina" pueden servir muy bien, aunque

estos nombres llevan poca o ninguna información acerca de las enzimas ya que se relacionan con su precursor, más que con la reacción enzimática misma.

II.2.2. CLASIFICACIÓN DE PROTEASAS POR EL TIPO CATALÍTICO

Cinco clases de enzimas proteolíticas son reconocidas con base en el mecanismo catalítico: proteasas tipo Aspártico, Cisteína, Metalo, Treonina y Serina. Con el advenimiento de la secuenciación de genomas, este sistema de clasificación se ha expandido por la necesidad de abarcar la diversidad en el repertorio catalítico encontrado en la naturaleza.

Las peptidasas de tipo serina tienen un centro activo de serina involucrado en el proceso catalítico; las peptidasas de tipo cisteína 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 mientras que las metalopeptidasas utilizan un ión metálico (comúnmente zinc) en el mecanismo catalítico.

II.2.3. CLASIFICACIÓN POR LA RELACIÓN EVOLUTIVA ENTRE LAS PROTEASAS

Barret y Rawlings han desarrollado un esquema de clasificación basado en similitudes estadísticamente significativas en la secuencia y estructura de todas las enzimas proteolíticas conocidas, la base de datos MEROPS [77]. El sistema de clasificación divide a las peptidasas en clanes basados en el mecanismo catalítico y en familias con base en un ancestro común. Hasta el momento cerca de 66,000

secuencias de peptidasas han sido clasificadas en 50 clanes y 184 familias (MEROPS release 7.90).

El término “clan” describe un grupo de familias que tienen un ancestro común. Los indicadores de relaciones distantes están dados principalmente por el orden lineal de los residuos del sitio catalítico, por los grupos de aminoácidos conservados alrededor de los residuos catalíticos, y por 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. 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.

Los efectos producidos por inhibidores de proteasas 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.

En cuanto a la nomenclatura de 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. Para asignar el nombre de la familia, el miembro fundador proporciona el sistema para la numeración de los residuos de aminoácidos, esencial en las comparaciones posteriores de estructuras moleculares dentro de la familia. El sistema de familias propuesto con base en la estructura primaria 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 tan tempranamente que no es posible establecer una relación por comparación de las estructuras primarias.

II.3. PROTEASAS DE SERINA

Debido a que el proyecto de doctorado se centra en el estudio de una proteasa de serina de la familia de las subtilisinas (clan SB, familia S8A), a continuación se hará una descripción más detallada de este tipo de proteasas.

Las proteasas que dependen de un residuo de serina para su actividad catalítica son muy numerosas e incluyen exopeptidasas, endopeptidasas, oligopeptidasas, y omegapeptidasas. Se han reportado cerca de 26,000 proteasas de serina que se agrupan 13 clanes y 40 familias (Tabla I). En general, se conocen modelos estructurales únicamente para los miembros representativos de cada familia de enzimas.

Las proteasas de serina están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran en todos los reinos de la vida celular así como en muchos genomas virales. Sin embargo, existen diferencias significativas en la distribución de cada clan a través de las especies. Por ejemplo, las proteasas del clan PA están más representadas en

eucariontes, pero son raras en procariotes y en plantas están limitadas al recambio de proteínas, mientras que los vertebrados poseen un arreglo de proteasas del clan SA responsables de una amplia variedad de procesos extracelulares. Los clanes SB y SC están más representados en procariotes, arqueas, plantas y hongos. Muchas proteasas de serina son endopeptidasas donde la hidrólisis ocurre en el medio de la cadena polipeptídica. Sin embargo, algunas familias de exopeptidasas que han sido descritas remueven uno o más aminoácidos del término de un polipéptido.

Tabla I. Diversidad de estructuras de proteasas de serina y mecanismos catalíticos.

Clan	Familias	Miembro representativo	Plegamiento	Residuos catalíticos	#	Especificidad primaria
PA	12*	Tripsina	β -barril	H, D, S	195	A, D, F, G, K, Q, R, W, Y
SB	2	Subtilisina, sedolisina	Sandwich de 3 hojas β	D, H, S	221	F, W, Y
SC	2	Prolil Oligopeptidasa	α/β hidrolasa	S, D, H	554	G, P
SE	6	D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa	Paquete de α -helices	S, K	62	D-A
SF	3	Proteasa LexA	Todo β	S, K/H	119	A
SH	2	Citomegalovirus ensamblina	α/β barril	H, S, H	132	A
SJ	1	Proteasa Lon	$\alpha + \beta$	S, K	679	K, L, M, R, S
SK	2	Proteasa Clp	$\alpha\beta$	S, H, D	97	A
SP	3	Nucleoporina	Todo β	H, S	na	F
SQ	1	Aminopeptidasa DmpA	Sandwich de 4 hojas	S	250	A, G, K, R
SR	1	Lactoferrina	Sandwich de 3 hojas β	K, S	259	K, R
SS	14	L, D-Carboxipeptidasa	Hoja β +barril β	S, E, H	115	K
ST	5	Romboide	Barril α	H, S	201	D, E

#: Posición del residuo de serina (Nucleófilo). *Se han descrito siete familias adicionales en el clan PA de origen viral que utilizan como nucleófilo Cys para la hidrólisis del enlace peptídico. Especificidad primaria: Residuo en el que se lleva a cabo el rompimiento del enlace peptídico. Tomada y modificada de M.J. Page y E. Di Cera 2008.

Cerca de un tercio de todas las enzimas proteolíticas conocidas son proteasas de serina. El nombre de la familia proviene del residuo de serina que sirve como nucleófilo en el sitio activo de la enzima, el cual ataca la carga parcial positiva del

grupo carbonilo del péptido sustrato para formar un intermediario acil-enzima. La nucleofilicidad de la serina catalítica es típicamente dependiente de la triada catalítica Aspartato (electrófilo), Histidina (base) y Serina (nucleófilo), comunmente referido como el sistema de retroalimentación de carga. La triada fue identificada por primera vez por Blow hace aproximadamente 30 años en la estructura de la quimiotripsina (Figura 3).

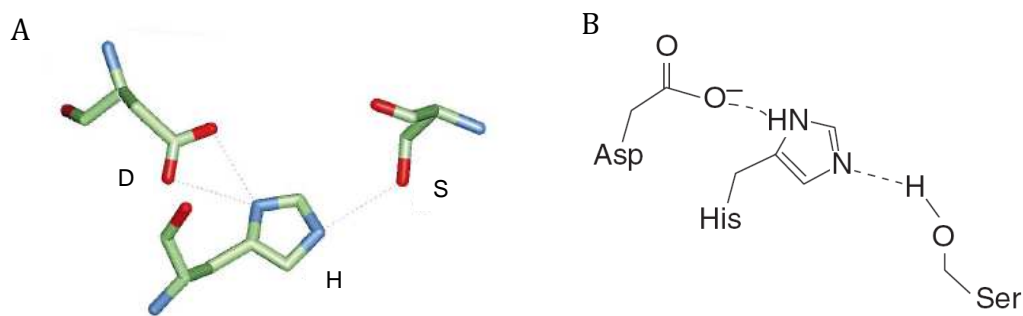


Figura 3. Triada catalítica de las proteasas de serina de los clanes PA, SB y SC. Panel A: Representación tridimensional de la triada catalítica D: Asp, H: His y S: Ser. Panel B: Representación esquemática de la triada catalítica. Tomada y modificada de Dodson G. y Wlodawer A. 1998.

Aunque existen cuatro conformaciones tridimensionales diferentes de proteasas de serina que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos y que sugieren 4 orígenes evolutivos (por ejemplo tripsina, subtilisina, prolil oligopeptidasa y la proteasa ClpP), la conformación de los aminoácidos de la triada catalítica es idéntica en todas las proteasas de serina [78].

Muchas proteasas de serina emplean un mecanismo de diada catalítica con una lisina o una histidina pareada con la serina catalítica. Otras proteasas de serina median la catálisis vía nuevas triadas de residuos, así como pares de residuos de histidinas combinados con la serina catalítica [78]. Las proteasas de serina de los

clanes PA, SB y SC llevan a cabo el rompimiento del enlace peptídico mediante el mecanismo que se ilustra en la figura 4.

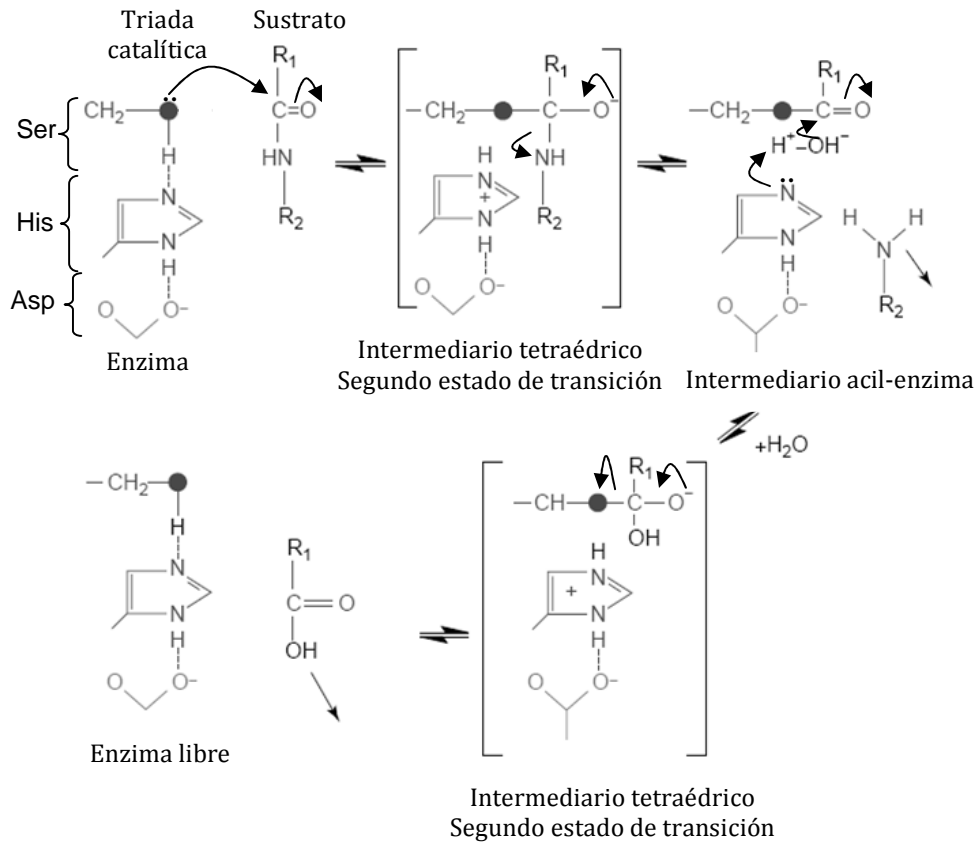


Figura 4. Mecanismo de reacción mediante el cual las proteasas de serina llevan a cabo el rompimiento del enlace peptídico. Las flechas indican el movimiento de pares de electrones. Tomada y modificada de Dodson G. y Wlodawer A. 1998.

La conservación de residuos de glicina en las vecindades del residuo catalítico de serina en las primeras proteasas de serina secuenciadas, para formar el motivo Gly-Xaa-Ser-Yaa-Gly llevó a especular que este motivo se debe encontrar en todas las proteasas de serina. Aunque es verdad que muchas de las familias muestran residuos de glicina conservados cerca de la serina esencial, las posiciones de éstas son variables.

Las proteasas de serina 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 proteasas de serina, junto con 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 [79].

II.4. FAMILIA S8A DE LAS SUBTILISINAS (Clan SB)

Las proteasas de serina del clan SB, también conocido como la superfamilia de la subtilisina, están ampliamente extendidas y es la segunda familia más grande de proteasas de serina que se ha identificado después de la familia de la quimiotripsina. Sus miembros principalmente se encuentran en eubacterias, arqueobacterias, eucariontes y virus, con pocos representantes en los genomas de animales. Sin embargo, estas proteínas convertidas son vitales para el procesamiento de proteínas en los metazoarios. El arquetipo del clan SB es la subtilisina, originalmente descubierta en la bacteria gram positiva *Bacillus subtilis* y fue una de las primeras proteínas cuya estructura cristalográfica fue determinada. La estructura secundaria y terciaria en las subtilisinas es muy conservada, plegándose como un sándwich de 7 hojas β entre dos capas de hélices α (Figura 5).

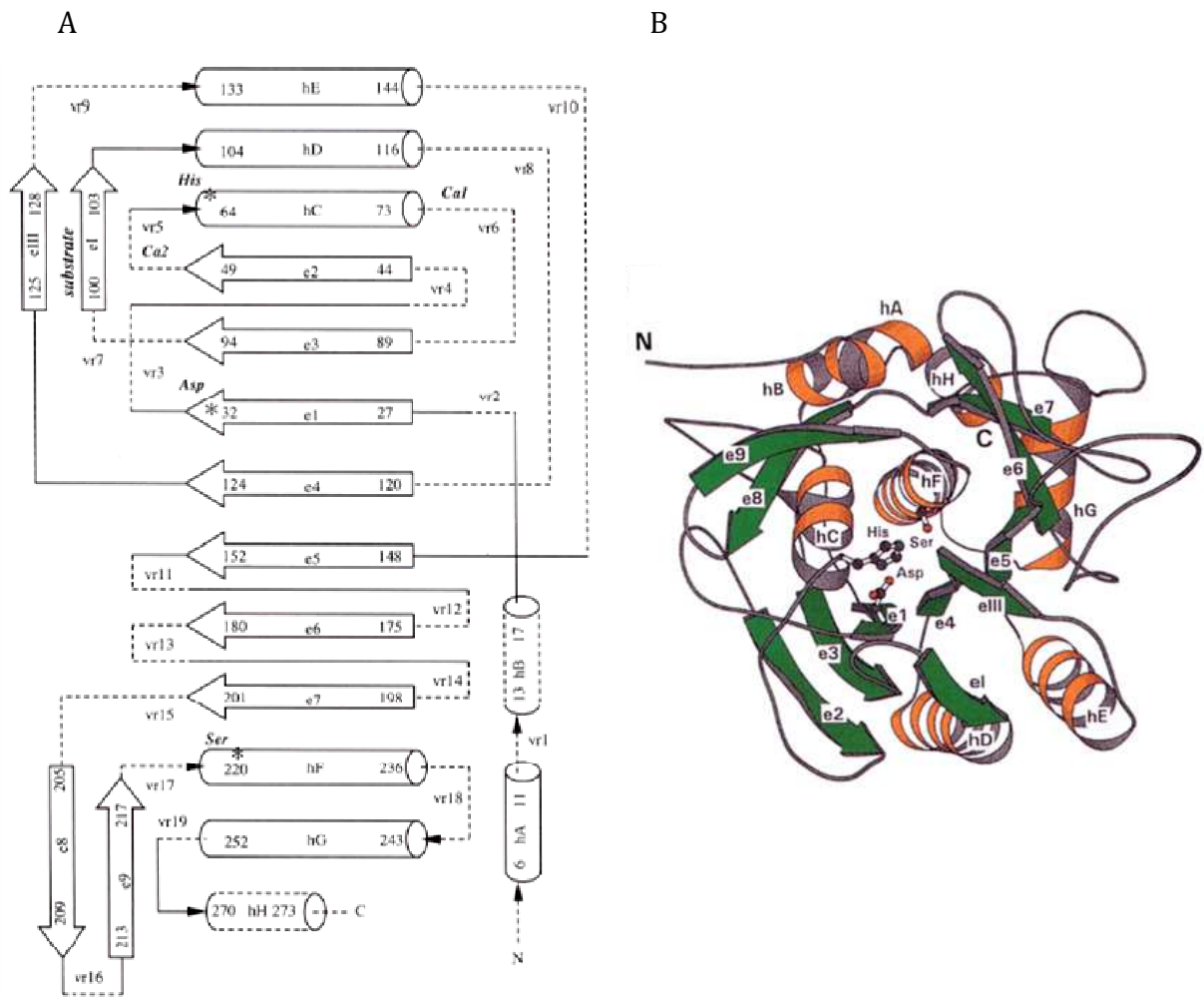


Figura 5. Estructura de las subtilisinas. Panel A: Representación esquemática de la estructura secundaria de las subtilisinas, las hélices α se muestran como cilindros y las hojas β como flechas. Las líneas sólidas indican regiones más conservadas en todas las subtilisinas (scrs), las líneas punteadas las regiones variables (vrs), también se muestran los sitios de unión a calcio (Ca1 y Ca2), los residuos catalíticos (*) y la región de unión a sustrato (entre las hojas eI y eIII). Panel B: Representación de listones de la estructura terciaria de la subtilisina, los residuos catalíticos están en conformación de bastones. Tomada de Siezen and Leunissen, 1997.

Se han determinado las estructuras cristalográficas para algunos miembros de la familia de subtilisinas y se ha observado una triada catalítica (Asp/His/Ser) compuesta de los mismos residuos y en una disposición geométrica idéntica a la que se encuentran en las proteasas del clan PA. Sin embargo el orden de estos residuos es

diferente en la familia de las subtilisinas y las estructuras tridimensionales no muestran semejanza con la quimiotripsina, ya que la subtilisina y la quimiotripsina no están relacionadas evolutivamente. 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')).

En las subtilisinas el sitio activo consta de cuatro subsitios principales: S1, S2, S3 y S4 (Figura 6). Los subsitios con cavidades más prominentes son los S1 y S4. El subsitio S1 es un surco largo y elongado, este subsitio muestra preferencia por los residuos de cadenas laterales hidrofóbicas y no ligados a hojas β , y puede aceptar también residuos con cadenas laterales básicas. El subsitio S2 es un hueco pequeño que puede acomodar residuos de alanina. El subsitio S3 puede acomodar cualquier residuo. El subsitio S4 es un bolsillo hidrofóbico y acomoda preferentemente residuos con cadenas laterales hidrofóbicas [79, 80].

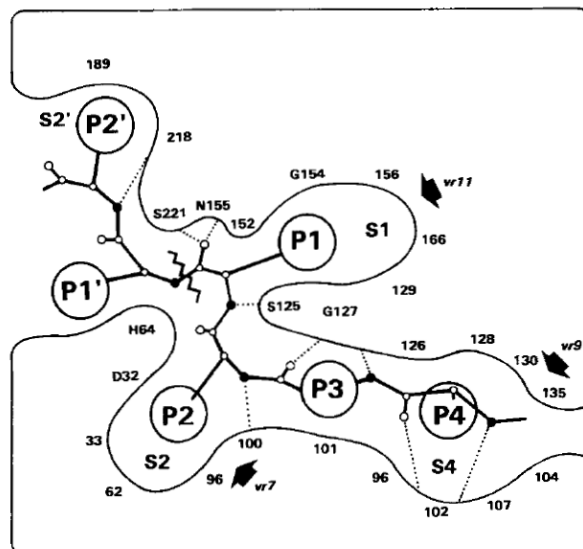


Figura 6. Representación esquemática del sitio activo de las subtilisinas unido a un sustrato. Se muestran los subsitios S1, S2, S3 y S4 y las posiciones P1, P2, P3, y P4 del sustrato. Los residuos de la triada catalítica (Asp-32, His-64 y la Ser-221), el residuo de asparagina que estabiliza el agujero de

oxianión (Asp-155) y las posiciones de los residuos de la enzima que pueden interactuar con el sustrato también se muestran. Tomada de Siezen and Leunissen, 1997.

El clan SB puede dividirse en seis subfamilias: Subtilisina, Termitasa, Proteinasa K, Lantibióticos, Kexina y Pirolisina, basadas en la homología dentro del dominio catalítico [81].

Muchas subtilisinas tienen una estructura de multidominio, consistente en un péptido señal ó péptido pre (para la translocación a la membrana celular), un péptido de activación o péptido pro (para la maduración por procesamiento autoproteolítico y como chaperona intramolecular), el dominio de proteasa y frecuentemente uno o más dominios que pueden estar involucrados en la interacción con otras proteínas. Las subtilasas que carecen de péptido señal suelen permanecer dentro de la célula, y muchas suelen participar en la maduración intracelular de otras proteínas y péptidos. Las subtilasas extracelulares pueden permanecer en la membrana plasmática si poseen dominios adicionales como hélices transmembranales o dominios de anclaje de GPI [82].

Las funciones de las proteasas del clan SB están orientadas a nutrición y roles selectos en el procesamiento de otras proteínas. En procariotes, las subtilasas son conocidas como proteasas de maduración para bacteriocinas como los lantibióticos, adhesinas extracelulares como la hemaglutinina filamentosa y enzimas para la germinación de esporas [82].

II.5. SUBTILISINAS EN PROTOZOARIOS PARÁSITOS

Además de su papel en la fisiología y metabolismo de los organismos, se ha reportado que las subtilisinas también pueden ser importantes factores de virulencia en los protozoarios parásitos en los que se han identificado, como en los apicomplexa (*Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*) [83, 84].

En *P. falciparum* se han descrito dos subtilisinas: PfSUB1 y PfSUB2. Se ha propuesto que PfSUB1 es un factor de virulencia importante para *P. falciparum*, ya que parásitos tratados con anti-PfSUB1 son incapaces de infectar células, además de que se ha reportado que procesa otras enzimas necesarias para que se dé una invasión exitosa. En cuanto a PfSUB2, que parece ser importante durante el ciclo sanguíneo del parásito, se ha propuesto que podría estar procesando proteínas de superficie como MSP1 (merozoite surface protein 1) y AMA-1 (apical membrane antigen 1). PfSUB1 y PfSUB2 se localizan en los gránulos densos cercanos a la región apical del parásito [83-86].

En *Toxoplasma gondii* también se han reportado dos subtilisinas, TgSUB1 y TgSUB2. TgSUB1 se localiza en los micronemas y se ha propuesto que podría procesar proteínas micronemales o proteínas presentes en la membrana de la célula hospedera. TgSUB2 se localiza en las roptrias y se ha propuesto que es la encargada de procesar a las proteínas roptriales ROP1, ROP2 y ROP3. Al parecer, TgSUB2 tiene otros papeles además del procesamiento de proteínas roptriales, ya que su disrupción es letal para *T. gondii*, [87-89].

Otros parásitos del género apicomplexa en donde se han reportado subtilisinas que son importantes para la invasión y para el procesamiento de proteínas son

Babesia divergens (BdSUB1), cuya subtilisina es secretada al medio extracelular durante la invasión y *Cryptosporidium parvum*, donde CpSUB1 se localiza en la región apical de esporozoítos y merozoítos, y procesa a la glicoproteína llamada gp40/15 importante para la invasión de células.

En el sobrenadante de cultivos de *Acanthamoeba healyi*, amiba de vida libre causante de la encefalitis granulomatosa amebode, se identificó una subtilisina (AhSUB) capaz de degradar proteínas de la matriz extracelular. De manera interesante la expresión de esta subtilisina es mayor en aislados más virulentos [90].

II.6. 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 algunas de estas enzimas. La mayoría de las proteasas identificadas por medio de zimogramas son de tipo cisteína, que difieren a su vez en la especificidad de su sustrato. Durante un cultivo axénico *in vitro*, *T. vaginalis* libera grandes cantidades de proteasas 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 [91, 92].

Se han reportado proteasas de cisteína (CP's) de 69, 65, 49, 39, 30, 35, 32 y 30 kDa [92-96]. Estudios previos con inhibidores de cisteín proteasas N- α -p-tosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK) y leupeptina muestran que es necesaria la acción de las proteasas sobre la superficie del parásito antes de que éste pueda unirse a la célula

hospedera [62]. Existe evidencia experimental que sugiere que las proteasas de cisteína CP65, CP39 y CP30 están involucradas en la citoadherencia y citotoxicidad del parásito a las células de epitelio vaginal [92-95], además se ha identificado a la CP30 en secreciones vaginales [92], y se ha observado que su secreción al medio de cultivo es dependiente de las concentraciones de hierro, de suero en el medio y de la presencia de células blanco [95].

Además de la CP30 se ha reportado otra proteasa de cisteína de igual peso molecular, que es capaz de degradar inmunoglobulinas de tipo IgA séricas, IgG séricas, IgA secretorias que inhiben la adherencia de bacterias y parásitos a la mucosa y a las células epiteliales, y también es capaz de degradar la hemoglobina [74]. Esta proteasa presenta actividad óptima a pH de 6; se ha propuesto que esta proteasa puede conferir resistencia 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.

Se ha observado que la CP65 localizada tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma del parásito, es capaz de degradar el colágeno IV y la fibronectina, proteínas presentes en la lámina basal del epitelio que se encuentra entre la vagina y el cérvix lo que puede contribuir al parto prematuro en mujeres embarazadas. 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 pueda estar involucrada en la citotoxicidad del parásito [93].

Además de las proteasas de tipo cisteína, en *T. vaginalis* se han descrito tres proteasas de tipo metalo, una de las cuales podría estar involucrada en el procesamiento de proteínas hidrogenosomales [97, 98].

RESUMEN

Trichomonas vaginalis es un protozoario parásito flagelado responsable de una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes en humanos, la tricomonosis, que afecta tanto a hombres como a mujeres. En *T. vaginalis* las proteasas son uno de los principales factores de patogenicidad, de las cuales se han caracterizado principalmente de tipo cisteína. Se ha reportado que las proteasas de cisteína participan en la evasión de la respuesta inmune, en la adherencia y citotoxicidad del parásito hacia las células del hospedero. Además de las proteasas de tipo cisteína, únicamente se ha caracterizado una proteasa de tipo metalo que posiblemente esté involucrada en el procesamiento de proteínas hidrogenosomales. Sin embargo, hasta el momento no se tienen reportes experimentales de proteasas de tipo serina en *T. vaginalis*, sólo se ha propuesto su existencia mediante análisis *in silico* de la secuencia del genoma de este parásito.

En nuestro grupo de trabajo se aisló una clona genómica de *T. vaginalis* que contenía un marco de lectura abierto con homología a proteasas de serina de la familia de las subtilisinas. A este gen se le denominó *sub1*. En la secuencia deducida de aminoácidos de SUB1 se identificaron los tres dominios (**DSG**, **HGTH** y **GTS**), que contienen los aminoácidos de la triada catalítica: Aspartato (**D**), Histidina (**H**) y Serina (**S**). Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos deducida, sugieren que SUB1 se sintetiza como zimógeno, que comprende un péptido pre o péptido señal, un péptido pro o péptido de activación y una probable región transmembranal cerca del carboxilo terminal.

Por otro lado, análisis tipo Southern blot con DNA genómico revelaron que *sub1* es un gen único. Con respecto a su expresión, los datos obtenidos sugieren que su transcrito es poco abundante ya que el transcrito no pudo ser detectado por ensayos tipo northern blot y sólo fue posible detectarlo mediante ensayos de protección a ribonucleasas y por ensayos de reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa (RT-PCR). Ensayos de RT-PCR semicuantitativos sugieren que este gen está regulado positivamente por hierro y por contacto del parásito con células HeLa o DU145.

En ensayos de western blot llevados a cabo con lisados totales de *T. vaginalis* y con un anticuerpo anti-SUB1, el anticuerpo reconoció una banda de aproximadamente 82 kDa, que se aproxima a el peso molecular teórico de la proteasa madura. Ensayos de inmunolocalización con este mismo anticuerpo revelaron la localización de SUB1 en la membrana plasmática y en vesículas citoplásmicas.

En ensayos de actividad llevados a cabo con extractos totales de *T. vaginalis*, se observó una banda de actividad de aproximadamente 82 kDa resistente a el inhibidor de proteasas de cisteína E64 y sensible al inhibidor de proteasas de serina pefabloc (AEBSF), que posiblemente corresponda a la actividad de SUB1.

En este trabajo también se analizaron los 33 genes reportados como proteasas de serina de la familia de las subtilisinas reportadas en la base de datos del genoma de *T. vaginalis* (TrichDB). En este análisis se encontró que únicamente 21 de los 33 genes reportados como subtilisinas tienen los tres aminoácidos de la triada catalítica y el dominio S8A completo.

Se desconoce la función de SUB1 en *T. vaginalis*. Sin embargo, con base en el análisis *in silico*, localización y aumento en su expresión al contacto con células, se propone que SUB1 puede participar en eventos de citoadherencia a la célula huésped o como una proteasa procesadora de proteínas y antígenos de superficie.

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is a protozoan parasite of the urogenital tract. This parasite is the causal agent of Trichomonosis, a sexually transmitted disease. Proteinases are important virulence factors in this parasite and cysteine proteinases have been involved in the evasion of the immune response, cytoadherence and cytotoxicity. A metallo proteinase probably involved in the processing of hydrogenosomal proteins has been reported. So far, no serine proteinases have been experimentally identified in this parasite. The only serine proteinases reported have been identified by in silico analyses of the *T. vaginalis* genome.

In our laboratory, an open reading frame (ORF) has been identified with homology to serine proteinases belonging to the subtilisin family, here called *sub1*. In the deduced amino acid sequence of SUB1 we identified the domains **DSG**, **HGTH** and **GTS** characteristics of subtilisins. These domains contain the amino acids of the catalytic triad: aspartate (**D**), histidine (**H**) and serine (**S**). *In silico* analyses of the amino acid sequence identified a putative signal peptide, a putative pro-peptide and one possible transmembranal region near the carboxy terminal region.

Southern blot analyses on genomic DNA reveal that *sub1* is a single copy gene. Analyses by northern blot and RT-PCR suggest that the mRNA of this gene is in low abundance since the transcript could only be detected by RT-PCR or RPA. Semi-quantitative RT-PCR assays suggest that *sub1* gene is positively regulated both by iron and by cell contact.

In western blot analyses, with total trophozoite lysates, an anti-SUB1 antibody recognized a protein of ~82 kDa. This band is in good agreement with the theoretical

molecular weight of mature SUB1. Immunolocalization assays locate SUB1 in the plasmatic membrane and in cytoplasmic vesicles.

Gel activity assays with total *T. vaginalis* extracts showed an activity band of ~82 kDa resistant to the cysteine proteinase inhibitor E64 and sensitive to the serine proteinase inhibitor pefabloc (AEBSF). This band could correspond to SUB1 activity.

Although the function of SUB1 in *T. vaginalis* is unknown, based in the *in silico* analyses, the localization and the increased expression of *sub1* in parasites with cell contact, it is possible that SUB1 have a role in the cytoadherence process or processing surface proteins of *T. vaginalis*.

In this work the 33 genes reported as subtilisin-like serine proteases in the *T. vaginalis* genome database (TrichDB) were also analyzed. We found that only 21 of the 33 reported genes have the complete catalytic triad and the complete S8A domain characteristic of subtilisin-like serine proteases.

ABREVIATURAS

3'RACE: Amplificación rápida de los extremos 3' del cDNA

5'RACE: Amplificación rápida de los extremos 5' del cDNA

DNA: Ácido desoxirribonucleico

AEBSF: Clorhidrato de fluoruro de benzenosulfonil (2-aminoetil)

RNA_m: Ácido ribonucleico mensajero

RNA_r: Ácido ribonucleico ribosomal

RNA_t: Ácido ribonucleico de transferencia

ATP: Adenosina trifosfato

AURE: Elementos ricos en adenina y uracilo

BSA: Albúmina sérica bovina

cDNA: DNA complementario al RNA mensajero

CP: Proteasa de cisteína

CR: Cistrón ribosomal

CTD: Dominio carboxilo terminal

CTP: Citosina trifosfato

DEPC: Dietil pirocarbonato

DMEM: Medio esencial mínimo Dulbecco

DTT: Ditionitrosol

E64: L-trans-epoxisuccinil- leucilamida-(4-guanidino)-butano

EGF: Factor de crecimiento epidermal

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

FDA: Food and Drug Administration

GTP: Guanosina trifosfato

Inr: Iniciador para la transcripción en *T. vaginalis*

IPSL: Inhibidor de proteasas de secreción leucocitaria

IRE: Elemento de respuesta a hierro

LB: Medio Luria-Bertani

MOPS: Ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico

MTOC: Centros organizadores de microtúbulos

ORF: Marco de lectura abierto

PA: Dominio asociado a proteasas

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: Amortiguador de fosfatos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PS: Péptido sintético

RE: Retículo endoplásmico

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa

SC: Suero de caballo

SDS: Dodecilsulfato sódico

SRP: Partícula de reconocimiento del péptido señal

SRP-R: Receptor de la patícula de reconocimiento del péptido señal

SSC: Amortiguador salino de citrato sódico

TAE: Amortiguador tris-ácido acético-ácido etilendiamino tetraacético

TBE: Amortiguador tris-ácido bórico-ácido etilendiamino tetraacético

TE: Amortiguador tris- ácido etilendiamino tetraacético

TIGR: The Institute of Genomic Research

TLCK: N- α -Tosil-L-Lisina-Clorometil-Cetona

TYM: Medio triptona-extracto de levadura-maltosa

UTP: Uracilo trifosfato

UTR: Región transcrita no traducida

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

III. ANTECEDENTES DIRECTOS

Los antecedentes directos del trabajo que aquí se presenta se encuentran en la tesis de licenciatura “Identificación de una serín proteasa en *Trichomonas vaginalis*” (Pablo A. Hernández Romano, Facultad de Química, UNAM). En la región 3’ de una clona genómica de actina aislada en nuestro laboratorio, se identificó un marco de lectura abierto incompleto con homología a proteasas de serina. Debido a que la secuencia del genoma de *T. vaginalis* no estaba disponible y a que en este parásito no se han reportado proteasas del tipo serina, se procedió a la caracterización de este gen.

Mediante un análisis de tipo Southern blot llevado a cabo con DNA genómico de *T. vaginalis* digerido con distintas enzimas de restricción y una sonda homóloga de 1,584 pb correspondiente a la región 5’ del gen de la proteasa de serina, se determinó que este gen era un gen único ya que el patrón de bandas observado coincide con el esperado (Figura 7). En el carril 1, que es la digestión con *EcoRI*, se observó 1 sola banda de una longitud aproximada de ~5,000 pb, que corresponde al tamaño de la clona genómica de actina en la cual se identificó este gen.

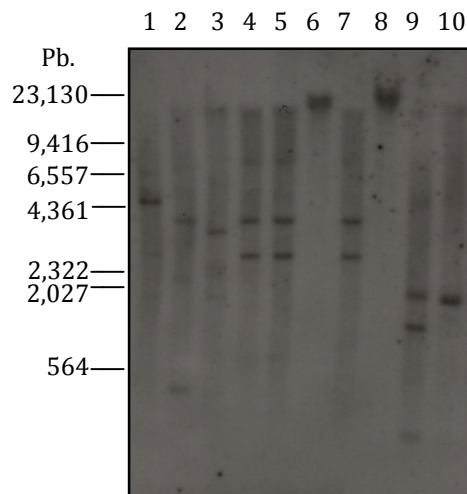


Figura 7. Número de copias de *sub1* en el genoma de *T. vaginalis*. Carriles: 1: DNA genómico de *T. vaginalis* digerido con *Eco* RI, 2: DNA genómico de *T. vaginalis* digerido con *Eco* RV, 3: DNA genómico de *T. vaginalis* digerido con *Cla* I, 4: DNA genómico de *T. vaginalis* digerido con *Bgl* II, 5: DNA genómico de *T. vaginalis* digerido con *Bgl* II/ *Pst* I, 6: DNA genómico de *T. vaginalis* digerido con *Pst* I, 7: DNA genómico de *T. vaginalis* digerido con *Bgl* II y *Bam* HI, 8: DNA genómico de *T. vaginalis* digerido con *Bam* HI, 9: DNA genómico de *T. vaginalis* digerido con *Bgl* II y *Hind* III, 10: DNA genómico de *T. vaginalis* digerido con *Hind* III.

En un principio se tenían secuenciadas 1,663 pb del ORF correspondiente a la proteasa de serina provenientes de la clona genómica de actina, posteriormente mediante la realización de una biblioteca genómica parcial con las enzimas *Hind*III y *Bgl*III, se lograron secuenciar 665 pb adicionales, en total al inicio del proyecto de doctorado se tenían secuenciadas 2,328 pb del ORF de la proteasa de serina (Figura 8), sin embargo aún no se lograba secuenciar el gen completo. Además, en la región 5' se identificaron dos posibles secuencias promotoras de acuerdo con las propuestas por Johnson y col (YYAWWYY, donde Y= T/C y W= T/A) [48] y dos codones de inicio de la traducción (ATG) en fase (Figura 8).

```

1      tttgttgata tactatgaat tattgtaaca ataataacctg catttattaa ttttgcctttt
61     gtgcgagtaa agtaatatat taataagccg aatgggatca tggcaatcct tctgttttgt
121    tcatctttcca aaaacgtaag gagcatccct aaaagatcaa agatggccat tttttaatftt
181    ttttttctaa atttgtttga caaaaATGTT TTTTCATCTGT TTTCTCTTCA TTGAAGCAAT
241    TTCACTTGAA ATTTCTAAGG AAGATATACG TAAATCAAGA TATGAAAAGTA GATATCCTGA
301    TTCAAATCAA TATTTCAATG GTTATTACAA AGATTTTACT TCGAAAACGA ATATGCATGA
361    TAGAACATCA AGTGAAATCC GACAAATCAC AGACATTTCT AACTATATAA TCCACACAAC
421    ACAAGAGTTT CAATTTCCAA AAGATATCAC ATTTTCAAAA CTGCATGGAA CATATATATTT
481    CATTCACGAC GCTTCAAAA CCCAAATCAA TTCAATTCAA AGCAACTCCA ATGTGATTTT
541    AGTTGAAAAA GCTTCACAAA TCCGTTTGA TACAAGATT GAAGCCGGAT TCATGGAAAA
601    TGGGAATTTA GATTTAACAT AAAAAATGG CTACTTATGG TCATTACGTT CGACAAAACCT
661    TACAGGAAAA GGTGAAATTA TTGCTTTGGC AGATTCAGGA ATCGATTATA GGCATCCAAT
721    GCTCAATGAC TCATCACGAC AATTAATTAA TAACACTCTT GACCTCAATC AACGAAAAAT
781    CGTTTATTAT GATTCATGGA AAGATTTTTA TGACTATATC CCAGGCCACG GCACACATAC
841    AGCAGGTATT ATAGCAGGGA AATCAGAATG CCGTAATATT TTACCTCTTT ACGATGGTAT
901    TGCACCTGAA TCAAAATTAT ATTTCTAGA TATGGCCAAA GGTGACAATA AAATGCTTTT
961    TGACGACTTT GATAAAGATA AATTTGTTCA GTCGTTGAAA GATCTCAATA TTGGCAGTAC
1021   TTCGAACAGT TGGGGTTCAA ATGAAATAGA TTACACATCT ACAATGACAG ATATCTATGA
1081   CAACCTCGCA TATAATAACC CAGACATTTT ATTTGTTTTT GCAGCCGGAA ACAGCGAAAA
1141   ATCATGGACA ATTGACAGTC CTTCTTCAGG AAAAAACATT TTTTGTGTTG GAGCAACTGA
1201   TGGAAGTCCA GGTCAAATGA TGGGAGAAGC ATCAACACCA CAGATCGAAA TATCAGGTAC
1261   AAAGATTGAT TTGTTGCAAT CTTCTTGGTC AACAAATTTA TTTAATCAAT TAAATAAGGA
1321   AGAACCATTA TTTAATGTTG CAAAGCCTGT TTATGTTACA TCTAATGATA ATACATGTGA
1381   TTCTATCAAA CAAATCCTTG AAAATGAACA AACAAAAATA TTAATTTTGA AATCATTACC
1441   AGATTGCAAC AAAATGAGTA AACAGTACT TGCAACATTA TCTGATGATG ATTTCCAGTT
1501   AATTTCTCAA TCTTCATCTG CAAATTCAC AATGAAATTA AGTGATTTTT CATATGAAAA
1561   AGCAAATTTT GCAAGTGTG GTCACGATA TTCAGGAATC TTGAAAACAG ACATATCAGC
1621   ACCAGCGGTC ATCACAGGTG CTCCTTTCATA TGGAAATTC GAAACAGCAG AAAGAAAATG
1681   TGATTTTTCA AGTCTTTCAC AGTTCACAGG AACATCAGAG TCAACACCAA TTATTTTCAGG
1741   ATTTTCAAGT CTTTACGTC AACATTTTCG ATCAAAGGA GTTACTCCTT CATCTTCTTT
1801   ACTTAAATCA TTAATTATTT CATCAACAAA ATCAAATAAA AGAGATTTAA ATACAGGTTT
1861   TGGAAATCCA CGATTAGATT GTGCAATTAA ATCATCATAT TCAGATCGTG TTTTAAATCAA
1921   AGGAAATCAA CATTTATATT GTGAATTTTC TAGTCAAACA GGAGACATAT CAGCATCAAT
1981   TTCATGGTTA GATCCATGT TATCAGTGA TATTGCTTAT CCATTACTTG CAGATTTATC
2041   TATTTTCATT GAATCACCAA CAGGAAAAGT TTATCAAGAA GAATTCGGAA ATTCATTTT
2101   GACAACAAAC AAAAAGATCA GTGTTACAAG TGAAACTTAT GAAGGTACAT GGAAACTTCA
2161   TGTATATCAGT TCTCGTTTCG AAGGTAATGT TTCATTTTCA TGTTCATTT CTAATTACAT
2221   GTCAGAAAAA CTTGAAATTTG CTGAAGAAAC CGAAAAATGT TTATCCGATT GTTCATGCAA
2281   CAAAGGTATC TGTGAATGTC CATCAGATAA GACAGATCAT CTTTGTTCAA CAAATTCAG
2341   AGATATTTCT AATTCAGGTG CATTTGTTGG TCAAGGCCAA TATGTTTTTC GTGCACGAGT
2401   TCCTAATATT GACAAACCAC GAATTGATGT TTCATTCAA GGATATTCTA ATGTTTATCT
2461   TATCAAAGGT ATTTCTAATC AACCAAGTGA CAGTTTCACA TCACTTTTAT TCCGAAACAA
2521   AGAGACAAAG CTT

```

Figura 8. Secuencia nucleotídica parcial del gen de la proteasa de serina, la región codificadora se muestra en mayúsculas y la región 5' intergénica en minúsculas. En negritas se encuentran los dos posibles ATG's para el inicio de la traducción y subrayados los dos posibles promotores para el inicio de la transcripción.

A pesar de que el gen de la proteasa de serina tenía todo lo necesario para ser un gen funcional, no se sabía si este gen se expresaba ya que por medio de experimentos de tipo northern blot no se había logrado detectar el mensajero (Figura 9). En la figura 9 se observa en el carril 1 RNA total de *T. vaginalis* teñido con bromuro de etidio observándose claramente los RNA ribosomales, en el carril número 3 la

membrana se hibridó con una sonda de actina observándose la señal de hibridación esperada (~1.3kb) lo que indica que la ausencia de señal de hibridación en el carril 2, en la que se utilizó como sonda el gen de la proteasa de serina, no se debe a la degradación del RNA.

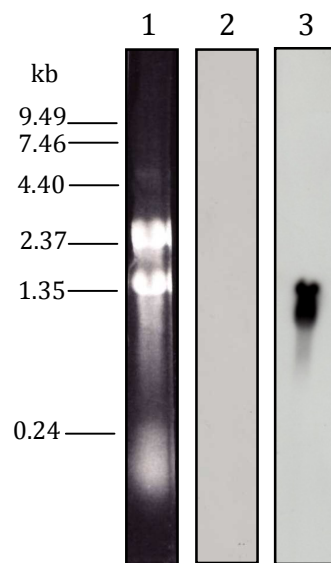


Figura 9. Expresión de *sub1*. Ensayo de northern blot para detectar el mensajero de *sub1*. Carril 1: RNA total de *T. vaginalis* teñido con bromuro de etidio; Carril 2: northern blot de *sub1*; Carril 3: northern blot de actina (control +).

Debido a que el estudio de las proteasas de serina en *T. vaginalis* es un campo poco estudiado, y a que en particular el estudio de la proteasa de serina reportada por nuestro grupo de trabajo presentaba todavía varias interrogantes, en el proyecto de doctorado se llevó a cabo la caracterización celular y molecular de la proteasa de serina a la que se le denominó *sub1*.

IV. JUSTIFICACIÓN

En *T. vaginalis* las proteasas juegan un papel muy importante para el establecimiento de la parasitosis. En este parásito se han descrito hasta el momento proteasas de tipo cisteína relacionadas con la evasión de la respuesta inmune así como en la citoadherencia y citotoxicidad del parásito hacia la célula hospedera. Hasta el momento no hay evidencia experimental de proteasas de tipo serina en este parásito, sólo las identificadas *in silico* en el proyecto del genoma de *T. vaginalis*.

En otros protozoarios parásitos se ha reportado que las proteasas de serina juegan un papel importante como factores de patogenicidad y reguladores de la actividad de otras proteasas. El estudio de las proteasas de serina en *T. vaginalis* permitirá ampliar el conocimiento sobre la biología de este parásito y conocer el posible papel de las proteasas de serina cuyas propiedades bioquímicas distintas a las proteasas de tipo cisteína le permitirían al parásito degradar una gama más amplia de sustratos.

V. HIPÓTESIS

Trichomonas vaginalis expresa una proteasa de serina de la familia de las subtilisinas (SUB1), cuyas propiedades estructurales la localizarían en la membrana celular.

VI. OBJETIVOS

Objetivo General:

Llevar a cabo la caracterización molecular y celular de *sub1*.

Objetivos Particulares:

1. Obtener la secuencia completa del gen *sub1* de *T. vaginalis*.
2. Determinar la expresión de *sub1* en *T. vaginalis*.
3. Determinar el sitio de inicio de la transcripción para *sub1* en la región 3' UTR del mRNA.
4. Evaluar la expresión de *sub1* en distintas condiciones (Condiciones de alto y bajo hierro y en contacto con células HeLa y DU145).
5. Obtener un anticuerpo contra SUB1.
6. Determinar la localización celular de SUB1.
7. Determinar la actividad de SUB1.
8. Llevar a cabo un análisis in silico de las subtilisinas reportadas en el genoma de *T. vaginalis*.

IV. JUSTIFICACIÓN

En *T. vaginalis* las proteasas juegan un papel muy importante para el establecimiento de la parasitosis. En este parásito se han descrito hasta el momento proteasas de tipo cisteína relacionadas con la evasión de la respuesta inmune así como en la citoadherencia y citotoxicidad del parásito hacia la célula hospedera. Hasta el momento no hay evidencia experimental de proteasas de tipo serina en este parásito, sólo las identificadas *in silico* en el proyecto del genoma de *T. vaginalis*.

En otros protozoarios parásitos se ha reportado que las proteasas de serina juegan un papel importante como factores de patogenicidad y reguladores de la actividad de otras proteasas. El estudio de las proteasas de serina en *T. vaginalis* permitirá ampliar el conocimiento sobre la biología de este parásito y conocer el posible papel de las proteasas de serina cuyas propiedades bioquímicas distintas a las proteasas de tipo cisteína le permitirían al parásito degradar una gama más amplia de sustratos.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1. CULTIVO DE *Trichomonas vaginalis*

El aislado fresco de *T. vaginalis* CNCD147 se cultivó en medio TYM suplementado con 10% de suero inactivado de caballo (SC) durante 24 horas a 37 °C en tubos de vidrio con rosca para su pase diario, inoculando con aproximadamente 1.5×10^6 parásitos.

Para cultivos masivos se utilizaron botellas de cultivo NUNC de 50 ml con 30 ml de TYM-SC inoculados con aproximadamente 7×10^6 parásitos y botellas NUNC de 260 ml con 50 ml de TYM-SC inoculados con aproximadamente 9×10^6 parásitos.

Para los cultivos suplementados con alto hierro y cultivos con bajo hierro, el medio TYM se suplementó con sulfato de amonio ferroso a una concentración final de 250 μ M y 2-2 dipirilo a 150 μ M respectivamente [87].

VII.2. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

Para la extracción de DNA genómico, se utiliza un cultivo en caja de 50 ml de *T. vaginalis* en fase logarítmica ($1.6-2 \times 10^6$ cel/ml). El volumen total del cultivo se divide en dos tubos Nalgene de 50 ml y se procesan independientemente de la siguiente manera:

- 1.- Cada tubo Nalgene se centrifuga a 3,000 rpm durante 10 minutos, a 4 °C en un rotor Sorvall SS34.

- 2.- Se decanta el sobrenadante cuidadosamente y se coloca en un recipiente de desechos que será esterilizado posteriormente.
- 3.- El botón de células se lava con 20 ml de PBS pH 7.4, se resuspenden nuevamente en PBS y se vuelven a centrifugar en la misma forma que en el inciso 1.
- 4.- Se decanta la solución de lavado y el botón de células se resuspende en 2 ml de PBS.
- 5.- En dos tubos eppendorf de 1.5 ml, se coloca 1 ml de células resuspendidas en el inciso anterior y se centrifugan a 14,000 rpm durante 1 minuto en una microcentrífuga.
- 6.- Decantar el sobrenadante y resuspender el botón con el líquido que sobra (20 µl).
- 7.- Agregar 300 µl de amortiguador de extracción (ver apéndice) y 300 µl de fenol. 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 DNA.
- 8.- 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.
- 9.- Se transfiere la fase superior cuidadosamente a otro tubo eppendorf con 500 µl de cloroformo, se agita y se centrifuga en la misma forma.
- 10.- 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.

- 11.- Centrifugar el tubo eppendorf con el DNA precipitado en una microcentrífuga a velocidad máxima durante 15 minutos.
- 12.- 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.
- 13.- Se quita el exceso de etanol con una micropipeta y se deja secar el botón de DNA durante 15 minutos aproximadamente, hasta que el botón quede transparente.
- 14.- El botón de DNA se resuspende en 50 µl de TE.
- 15.- Se agregan 0.5 µl de RNAsa (GIBCO) (20 µg/ml) y se deja a 37 °C durante 30 minutos.
- 16.- El DNA se guarda a -20 °C.

VII.3. OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DE sub1

Para obtener el extremo 3' faltante del gen *sub1*, se llevó a cabo una búsqueda tipo BLAST en la base de datos que contiene el genoma de *T. vaginalis* (The Institute for Genomic Research, www.tigr.org) utilizando como molde la secuencia obtenida de la clona genómica de actina obtenida anteriormente. Esta búsqueda arrojó como resultado el contig número 83372 que contenía la secuencia de interés. La secuencia del TIGR se utilizó como molde para el diseño de oligonucleótidos para llevar a cabo la amplificación por PCR del fragmento faltante del gen *sub1* a partir del DNA genómico.

VII.3.1. Condiciones del PCR

Para amplificar el extremo 3' del gen *sub1*, se diseñaron los oligonucleótidos sentido 8Agact24 y 92sepr21, utilizando como molde la secuencia proveniente de la

clona genómica de actina *T. vaginalis*, y los oligonucleótidos antisentido SPCR1 y SPCOR2 utilizando como templado el contig 83372 obtenido de la base de datos del TIGR. La región 3' de *sub1* se amplificó utilizando DNA genómico del aislado CNCD147 de *T. vaginalis*. Se llevó a cabo un primer PCR con una temperatura de alineamiento de 34°C utilizando los oligonucleótidos 8Agact24 y SPCR1, posteriormente se llevo a cabo un PCR anidado utilizando los oligonucleotidos 92sepr21 y SPCOR2 y una temperatura de alinamiento de 45°C.

Programa de PCR utilizado para amplificar el extremo 3' de *sub1*.

<i>Paso.</i>	<i>Tiempo.</i>	Temperatura.
1	10'	92°C
2	1'	92°C
3	1'	34 ó 45 °C
4	2'	72°C
5	30 ciclos (pasos 2-4).	
6	1'	92°C
7	1'	34 ó 45 °C
8	5'	72°C
9	END.	

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl para la muestra con DNA genómico y 25 µl para el control de amplificación de la reacción. Adicionando los reactivos en el siguiente orden y en las cantidades indicadas.

Solución.	Muestra.	Control.
1.- H ₂ Obd Estéril para PCR.	24 µl	14.5 µl
2.- Amortiguador para PCR 10X.	5 µl	2.5 µl
3.- MgCl ₂ 25 Mm (3mM final).	6 µl	3 µl
4.- dNTP's 100mM (10mM c/u).	3 µl	1.5 µl
5.- DNA genómico	5 µl	-
6.- Oligo Forward (200 ng/µl).	3 µl	1.5 µl
7.- Oligo Reverse (200 ng/µl).	3 µl	1.5 µl
Total	50 µl	25 µl
Aceite mineral	100 µl	100 µl

En el minuto 9 del primer ciclo adicionar 1 μl (5 U) a la muestra y 0.5 μl (2.5 U) al control de la polimerasa recombinante Pfu (Altaenzymes recombinant Pfu DNA polymerase 5 U/ μl).

VII.3.2 CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR EN EL VECTOR pCR-BLUNT II-TOPO

El producto de amplificación del PCR anidado, se corrió en un gel preparativo de agarosa al 0.8% en TAE 1X. La banda de interés (1,385 pb) se cortó y se purificó. Posteriormente la banda purificada se clonó en el vector pCR-BLUNT II-TOPO (Invitrogen) de la siguiente manera:

1.- Se prepara la mezcla de reacción para ligar el producto de PCR en el vector pCR-BLUNT II-TOPO.

-2 μl de producto de PCR purificado (~500 ng)

-0.5 μl de Dilute Salt Solution (5 μl de Salt solution (Invitrogen))

-0.5 μl de vector pCR-BLUNT II-TOPO (Invitrogen).

2.- Mezclar ligeramente la reacción de ligación e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.

3.- Adicionar 2 μl de reacción de ligación a un tubo de células electrocompetentes (50 μl 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 μl de medio SOC a temperatura ambiente.

- 6.- Transferir las células electroporadas (300 μ l) a un tubo falcon estéril.
- 7.- Incubar las células a 37 °C por 1 hora para permitir la expresión de los genes de resistencia al antibiótico.
- 8.- Platear 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.

VII.3.3. TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN

Para llevar a cabo la transformación de bacterias por electroporación, se procedió de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se colocan en hielo la cámara y las celdas de electroporación.
2. Se coloca en hielo la reacción de ligación y se descongelan las células electrocompetentes en hielo.
- 3.- Se mezcla al mitad del volumen de la reacción de ligación (1.5 μ l) con las células electrocompetentes.
4. La mezcla se pasa a la celda de electroporación, asegurándose de tocar los dos polos.
5. Se coloca la celda en la cámara de electroporación y se conecta a la fuente de poder.
6. Se carga a 2.46 kV.
7. Se presiona el gatillo para electroporar células electrocompetentes.
8. Inmediatamente después de llevar a cabo la electroporación se adiciona 1 ml de medio SOC y se mezcla por pipeteo.

9.- Se incuban las células recién electroporadas por 1 hora a 37 °C para su recuperación y expresión de genes de resistencia al antibiótico.

10.- Platear en cajas de LB+ el antibiótico adecuado (1/10 y 9/10).

11.- Incubar O/N.

VII.3.4 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO (MINIPREPARACIÓN)

Una vez llevada a cabo la clonación del producto de PCR conteniendo la región 3' del gen *sub1* en el vector pCR-BLUNT II-TOPO, se procedió a la extracción de DNA siguiendo del protocolo que se describe a continuación:

1.- La cepa de *Escherichia coli* que contiene el plásmido de interés se creció durante toda la noche a 37 °C en un baño con agitación constante en 3 ml de LB + Kanamicina (50 µg/ml).

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 (ver apéndice) enfriada en hielo agitando en vortex.

6.- Adicionar 200 µl de solución II (ver apéndice) 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 (ver apéndice) 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 DNA 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 DNA con 2 volúmenes de etanol (1,000 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 en 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.

Una vez extraído el DNA plasmídico, las clonas seleccionadas se mandaron secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas. La secuencia obtenida se ensambló a las 2,326 pb que ya teníamos secuenciadas.

VII.4. EXPRESIÓN DE *sub1*

Para determinar la expresión de *sub1* se llevaron a cabo análisis de northern blots, de RT-PCR y RPA. En todos los casos la extracción de RNA total de *T. vaginalis* se llevó a cabo de la siguiente manera:

VII.4.1. EXTRACCIÓN DE RNA DE *Trichomonas vaginalis*

- 1.- A partir de un cultivo de *T. vaginalis* de 50 ml en fase logarítmica, se toman 8.5×10^6 parásitos para hacer la extracción de RNA, los cuales se centrifugan a 3,000 rpm durante 20 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, (12,000 x g), 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 RNA 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 RNA frecuentemente es invisible antes de centrifugar; se forma un botón parecido a un gel).
- 9.- Quitar el sobrenadante y lavar el botón de RNA con 1 ml de etanol/agua al 75% en agua DEPC (agua bidestilada tratada con DEPC) (SIGMA).
- 10.- Mezclar la muestra en vortex y centrifugar a 10,000 rpm, (7, 500 xg), durante 5 minutos a 4 °C, (2-8 °C).
- 11.- Eliminar el sobrenadante y secar al botón de RNA. Disolver el RNA en 10 µl de agua DEPC.
- 12.- Verificar la integridad y cuantificar el RNA obtenido mediante un gel de agarosa 0.8%.
- 13.- Al descongelar el RNA no se debe agitar en vortex y para resuspender la pastilla de RNA 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 RNA + 4 µl de H₂O + 2 µl de amortiguador 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 junto con los marcadores de peso molecular específicos para RNA (hay marcadores de alto peso molecular y de bajo peso molecular).

VII.4.2. NORTHERN BLOT

Se preparó un gel de agarosa al 1% (14 x 11 cm) utilizando material horneado y esterilizado. Se pesa 1 gr de agarosa y se coloca en el vaso de precipitados, se

adicionan 73 ml de H₂O-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 10 ml de amortiguador 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 H₂O-DEPC.

-2.72 µl de Formaldehído.

-6.8 µl de Formamida.

-3 µl de RNA + 0.5 µl de H₂O-DEPC.

Las muestras y los marcadores de peso molecular altos (0.24-9.5 Kb) y bajos (0.16-1.77 Kb) (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 amortiguador de carga para RNA 6X y 4 µl a los marcadores de peso molecular. En el gel se cargan 8 µl de marcadores de peso molecular y 20 µl de cada muestra, por duplicado ya que la mitad del gel se tiñe y la otra mitad se utiliza para hacer la transferencia.

El gel se corre durante 3 horas a 80 volts con amortiguador MOPS/EDTA 1X, cambiando cada hora el amortiguador de corrida de un lado a otro de la cámara.

Una vez que se termina de correr el gel se coloca en un 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 solución 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 whatman a temperatura ambiente y luego se fija en una cámara UV a 12,000 μ J. Esta membrana está lista para ser hibridada con una sonda radiactiva.

VII.4.3. PROTOCOLO PARA PREPARAR LA SONDA RADIATIVA

- 1.- El DNA que va a ser marcado se diluye a una concentración de aproximadamente 50 ng en 45 μ l de agua estéril o 10 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA (amortiguador TE) (el volumen no debe exceder los 45 μ l).
- 2.- Desnaturalizar la muestra de DNA 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 DNA 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 μ l de Redivue [32 P] dCTP (Amersham) y mezclar pipeteando 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 μ l de 0.2 M EDTA.

9.- Adicionar 50 μ l de T.E. 10-0.2 mM.

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 3 N (10 μ l).

- Incubar 5' a temperatura ambiente.

- Transferir a hielo+agua.

- Agregar 0.1 volúmenes de HCl 3 N (10 μ l).

- Agregar 0.05 volúmenes de Tris 1 M pH 7.4 (5 μ l).

- Mantener en hielo.

13.- Agregar la sonda desnaturalizada a la solución de hibridación.

VII.4.4. PRE-HIBRIDACIÓN DE LA MEMBRANA

Después de fijada la membrana, esta se prehibrida por lo menos 2 horas en aproximadamente 15 ml de solución de pre-hibridación (ver apéndice), a 42° C en el horno de hibridación.

VII.4.5. HIBRIDACIÓN DE LA MEMBRANA

- 1.- Se mide cuánta solución de prehibridación absorbió la membrana y se desecha el resto.
- 2.- Se agrega al tubo con la membrana de 10-15 ml de solución de hibridación fresca conteniendo la sonda radiactiva desnaturalizada.
- 3.-La sonda se hibrida durante $2 \text{ Cot } \frac{1}{2}$ a 42 °C con base en la siguiente ecuación:

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

Donde:

X= Peso de la sonda en μg .

Y= Tamaño de la sonda en Kb.

Z= Volumen de hibridación.

VI.4.6. LAVADO DE LA MEMBRANA

- 1.- La membrana se lava con 2X SSC/0.5% de SDS. Los primeros lavados se hacen a temperatura ambiente y después se aumenta la temperatura paulatinamente revisando la membrana tras cada lavado.

2.- Posteriormente se envuelve la membrana en plástico Egga Pack y se expone a película de rayos X (Hyperfilm, Amersham) con pantalla intensificadora.

VII.4.7. RT-PCR

Para la síntesis de cDNA se utilizaron 3 μg de RNA total de *T. vaginalis* cuantificado en un espectrómetro Ultrospec 3100 pro (Amersham Pharmacia Biotech) y la transcriptasa reversa Superscript III RNase H-(Invitrogen) siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

1. En un tubo de microcentrifuga se colocan los siguientes reactivos:

- Oligo AP (200 ng/ μl)	1 μl
- dNTP's (10 mM)	0.5 μl
- RNA total de <i>T. vaginalis</i>	3 μg
- H2O DEPC	c.b.p. 7 μl

2. En un tubo de PCR se colocan los siguientes reactivos:

- First Strand Buffer	2 μl
- DTT 0.1M	0.5 μl
- Superscript III (adicional en el paso 3)	0.5 μl

3. El programa utilizado en el termociclador para la síntesis de cDNA fue el siguiente:

Paso	Tiempo	Temperatura
1	5'	65 °C
2	15'	45 °C
3	20'	45 °C
4	30'	55 °C
5	15'	70 °C
6	25'	37 °C

4. El tubo de centrifuga se coloca en el termociclador y se deja ahí durante el primer paso del programa (5 min a 65 °C).
5. Al finalizar el primer paso, sacar el tubo de microcentrífuga y colocarlo en hielo por 1 minuto, al mismo tiempo colocar el tubo de PCR en el termociclador. Una vez transcurrido el minuto colocar el contenido del tubo de microcentrífuga en el tubo de PCR con ayuda de una micropipeta.
6. Al iniciar el paso 5 se adiciona 1 µl de RNasa H (Invitrogen) para la degradación del RNA.
7. Una vez sintetizado el cDNA se llevaron a cabo reacciones de PCR como se describió en el el protocolo VI.3.1 pero utilizando los oligonucleótido SEPR23 y REJASEPR1 y a una temperatura de alineamiento de 55 °C, utilizando como templado el cDNA y RNA total de *T. vaginalis* para detectar DNA genómico contaminante.
8. El producto de PCR de 284 pb se analizó en un gel de agarosa al 1.5% an TBE 1X.

VII.5. DETERMINACIÓN DEL SITIO DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DE SUB1 Y AMPLIFICACIÓN RÁPIDA DE EXTREMOS 3'(3' RACE)

En la región 5' de *sub1* se encontraron dos posibles iniciadores (Inr's) CTAAATT (posición 507) y TTAATTC (posición 656) y dos posibles ATG's para el inicio de la traducción los cuales están en fase. Para determinar a partir de cual de los dos iniciadores se estaba transcribiendo este gen, se diseñó un ensayo de protección a ribonucleasas (RPA). Como control se utilizó el sitio de inicio de la transcripción del cistron ribosomal de *T. vaginalis* ya descrito [99].

VII.5.1. TRANSCRIPCIÓN *in vitro* (MAXIscript T7 kit; AMBION)

Para llevar a cabo el ensayo de protección a ribonucleasas se necesitó de una sonda de RNA antisentido a la región 5' de *sub1* marcada con (α - ^{32}P) UTP (Amersham Biosciences), la cual se obtuvo de la siguiente manera:

1. Se amplificó por PCR la región 5' de *sub1* que contiene los dos posibles Inr's (533 pb). La reacción de PCR se llevó a cabo con los oligonucleótidos T7SP (que contiene el promotor T7) y SP-100 a una temperatura de alineamiento de 50 °C y a 30 ciclos de amplificación.
2. El amplicón resultante se verificó en un gel de agarosa al 1%, en el cual se observó una banda del tamaño esperado.
3. Este producto de PCR se utilizó como templado para llevar a cabo la reacción de transcripción *in vitro* de la sonda de RNA complementaria a la región 5' del RNAm de *sub1*.
5. Antes de llevar a cabo la transcripción *in vitro* de la sonda de RNA marcada con (α - ^{32}P)UTP, se llevó a cabo una transcripción *in vitro* con nucleótidos no marcados y el producto se corrió en gel de poliacrilamida al 5%/ Urea 8 M.
4. Una vez que conocemos que el producto de PCR sirve como templado para la transcripción *in vitro* se lleva a cabo la reacción de transcripción *in vitro* con (α - ^{32}P)UTP. Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

Reactivo	Control + (CR)	<i>sub1</i>
H ₂ O DEPC	4.5 μl	3.5 μl
DNA templado (PCR)	1.5 μl	2.5 μl
Amortiguador de transcripción 10X	1 μl	1 μl

ATP 10 mM	0.5 μ l	0.5 μ l
CTP 10 mM	0.5 μ l	0.5 μ l
GTP 10 mM	0.5 μ l	0.5 μ l
UTP 12.5 μ M	1.3 μ l	1.3 μ l
(α - ³² P)UTP (25 μ Ci)	1.25 μ l	1.25 μ l
Enzyme Mix	1 μ l	1 μ l

5. Mezclar bien e incubar 10 minutos a 37 °C en el termoblock cubriendo con una caja de acrílico.
6. Adicionar a la mezcla 1 μ l de DNasa I, mezclar e incubar a 37 °C por 15 minutos en el termoblock.
7. Parar la reacción adicionando 0.5 μ l de EDTA 0.5 M.

VII.5.1.2. PURIFICACIÓN DE LA SONDA

La separación de la sonda de los nucleótidos no incorporados se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Adicionar 40 μ l de H₂O DEPC a la reacción de transcripción tratada con DNasa I.
2. Adicionar 5 μ l de acetato de amonio 5 M.
3. Adicionar 3 volúmenes de EtOH al 100% (150 μ l).
4. Incubar la mezcla a -70 °C por 30 min. en un contenedor de plomo.
5. Centrifugar 20 min a 4 °C a velocidad máxima.
6. Descartar el sobrenadante y lavar la pastilla con EtOH frío al 70% (150 μ l).
7. Repetir los pasos de 1-6 para remover completamente los nucleótidos no incorporados.

La purificación del transcrito se lleva a cabo de la siguiente manera:

1. Adicionar 50 µl de Amortiguador II de carga a la reacción de transcripción y calentar 3 min a 95 °C.
2. Cargar toda la muestra (dividir de acuerdo al volumen de cada pozo) en un gel desnaturante de poliacrilamida al 5%/ Urea 8 M y correr lo a 100 V hasta que el azul de bromofenol llegue al final del gel.
3. Después de la electroforesis cubrir el gel con egapack y exponerlo a una placa autorradiográfica.
4. Revelar la autorradiografía y utilizarla como guía para localizar la zona de migración de la sonda. Detrás de una placa de acrílico y con ayuda de un bisturí marcar y cortar la región de interés en el gel.
5. Colocar el fragmento de gel en un tubo eppendorf libre de RNasas con aproximadamente 50 µl de H₂O DEPC para su elución.

VII.5.2. ENSAYO DE PROTECCIÓN A RIBONUCLEASAS (RPA)

En el ensayo de protección a ribonucleasas se utilizó como control positivo el sitio de inicio de la transcripción del rRNA de *T. vaginalis* cuyo tamaño de la sonda es de 439 pb.

A continuación se muestra una tabla con las reacciones que se llevaron a cabo:

Reacción	Tubo	RNA	Sonda	Dilución de RNasa	H ₂ O
Sonda digerida	1	Levadura (2 µl)	sub1 (25 µl)	1:100	23 µl
	2	Levadura (2 µl)	CR* (25 µl)	1:100	23 µl
Sonda intacta	3	Levadura (2 µl)	sub1 (25 µl)		23 µl
	4	Levadura (2 µl)	CR (25 µl)		23 µl
Control + <i>sub1</i>	5	<i>T. vaginalis</i> (5 µl)	CR (25 µl)	1:100	20 µl
	6	<i>T. vaginalis</i> (5 µl)	sub1 (25 µl)	1:100	20 µl
	7	<i>T. vaginalis</i> (5 µl)	sub1 (25 µl)	1:1000	20 µl

*CR: Cistrón Ribosomal

Una vez hechas las mezclas de cada reacción se procedió como sigue:

1. Se coprecipitaron las muestras con su respectiva sonda adicionando:
 - 5 μ l (1/10) de acetato de amonio 5M
 - 125 μ l (2.5 vol) de etanol y mezclar
 - Precipitar a -20 °C por 15 minutos
2. Posteriormente se centrifugó a 4 °C por 15 min. a velocidad máxima, después se descartó el sobrenadante y las pastillas se dejaron secar por 5 min a temperatura ambiente.
- 3.- Se adicionaron 5 μ l de amortiguador de hibridación III a cada pastilla. Las pastillas se disolvieron pipeteando.
4. Las muestras se incubaron a 90-95 °C de 3 a 4 min.
5. Posteriormente se incubaron toda la noche a 42 °C en el horno de hibridación.
6. A la mañana siguiente se adicionaron 75 μ l de RNAsas en dilución 1:100 a los tubos 1, 2, 5, y 6, al tubo 7 se le adicionaron 75 μ l de RNAsas en dilución 1:1000. A los tubos 3 y 4 se les adicionaron 75 μ l de amortiguador de digestión III sin RNAsas
7. Se incubaron los tubos por 30 min a 37 °C.
8. Posteriormente se les adicionó 112.5 μ l de amortiguador de inactivación/precipitación con 2 μ l de RNA de levadura.
9. Incubar a -20 °C por 15 min.
10. Centrifugar 15 min a velocidad máxima y remover cuidadosamente el sobrenadante.
11. La pastilla se resuspendió en 10 μ l de amortiguador de carga II, incubando a 90-95 °C por 3 min y posteriormente colocándolos en hielo antes de cargarlos al gel.

12. Las muestras se corrieron en un gel de acrilamida al 4%/Urea 8M para detectar los fragmentos protegidos.

VII.5.3. AMPLIFICACIÓN RÁPIDA DE EXTREMOS 3' DE cDNA (3'RACE)

Para identificar el extremo 3' de *sub1* se llevó a cabo una amplificación rápida de extremos 3' (3' RACE). La síntesis de cDNA se realizó como se describe en el protocolo VI.4.7. Posteriormente el extremo 3' del cDNA se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos JASEPR22 y AUAPB y una temperatura de alineamiento de 44 °C. A partir de este primer amplificado se llevo a cabo un PCR semi-anidado con los oligonucleótidos SEPR23 y AUAPB a una temperatura de alineamiento de 48 °C. El producto de PCR se clonó en el vector pCR-BLUNT II-TOPO como se mencionó anteriormente, se seleccionaron 200 clonas para llevar a cabo un screening por hibridación en colonia y las clonas positivas se secuenciaron.

VII.5.3.1 HIBRIDACIÓN EN COLONIA

Para seleccionar las clonas que contenían el plásmido con el extremo 3' de *sub1*, se llevó a cabo un screening mediante hibridación en colonia utilizando como sonda homóloga un amplificado de PCR de 738 pb del extremo 3' de *sub1*, obtenido con los oligonucleótidos 92SEPR21 y REJASEPR1 a una temperatura de alineamiento de 46 °C y utilizando como templado el plásmido TOPOSP2M30 que contiene el gen *sub1* completo. La hibridación en colonia se llevó a cabo de la siguiente manera:

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 0.5 M NaCl 1.5 M.
 - Caja #3: Tris 0.5 M pH 7.4 NaCl 1.5 M.
 - Caja #4: Tris 0.5 M pH 7.4 NaCl 1.5 M.
 - 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.
6. Ya secas, las membranas se fijan en la cámara de luz UV a 12,000 μ J.
7. Después de fijarlas se procede a lavar las membranas con una solución de SSC 5X; SDS 0.5% y EDTA 1 mM, frotándolas suavemente para quitar los desechos celulares.
8. Una vez fijadas y lavadas, se prehibridan e hibridan con la sonda adecuada para realizar el escrutinio de las clonas positivas.

VII.6. CULTIVO DE PARÁSITOS EN ALTO Y BAJO HIERRO

Se prepara una solución de sulfato de amonio ferroso ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$) a una concentración 0.025 M esterilizado por autoclave y una solución de 2,2 dipirilo ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2$) a una concentración de 0.015 M esterilizado por filtración. Para el cultivo en alto hierro en una caja de 50 ml se colocaron 27 ml de medio TYM más 270 μl de la solución de sulfato de amonio ferroso (concentración final: 250 μM); para el cultivo en bajo hierro se prepara otra caja de 50 ml en la que se colocan 27 ml de medio TYM mas 270 μl de la solución de 2,2 dipirilo (concentración final: 150 μM), ambas cajas se dejan toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se les adicionan 3 ml de suero inactivado de caballo a cada caja y se inoculan 8×10^6 parásitos a la caja con alto hierro y con 40×10^6 parásitos la caja con bajo hierro. Se incuban durante 24 horas y se procede a la extacción de RNA.

VII.7. ENSAYOS DE CITOADHERENCIA Y CITOTOXICIDAD

Monocapas de células HeLa (células de cérvix) y células DU145 (células de próstata) se crecieron en medio DMEM (Dulbecco modified minimal essential médium) suplementado con 10% de suero inactivado de caballo y 10% de suero fetal bovino a 37 °C y 5% de CO_2 . Para los ensayos de citoadherencia, las células HeLa y DU145, se lavaron 3 veces con PBS y posteriormente se fijaron con glutaraldehído al 2% en PBS por 1 h a 37 °C. Después se bloquearon con glicina 0.2 M por 1 h a temperatura ambiente. Para los ensayos de citotoxicidad las monocapas celulares se lavaron 3 veces con PBS. Para ambos ensayos, 1.5×10^7 parásitos se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en medio de interacción DMEM:TYM (2:1) sin suero de

caballo, éstos se adicionaron a las monocapas celulares en relación 5:1 (parásito:célula). En los ensayos de citoadherencia los parásitos estuvieron en contacto con las células fijadas por 30 min, mientras que en los ensayos de citotoxicidad los parásitos estuvieron en contacto hasta la degradación de las monocapas celulares (~3.5 h).

VII.8. EXPRESIÓN DE *sub1* EN CONDICIONES DE ALTO Y BAJO HIERRO Y EN CONTACTO CON CÉLULAS HeLa Y DU145

Para evaluar la influencia del hierro y del contacto con células en la expresión de *sub1*, se extrajo RNA total de parásitos crecidos en alto y bajo hierro así como de los parásitos que estuvieron en contacto con células HeLa y DU145. Una vez extraído el RNA, se cuantificó y se llevó a cabo la síntesis de cDNA con 3 µg de RNA total de cada una de las condiciones. Posteriormente se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando como templado 0.4 µl de cDNA de cada condición y los oligonucleótidos SEPR23 y REJASEPR1 para amplificar un fragmento de 284 pb de *sub1* y los oligonucleótidos α-TUBF y α-TUBR para amplificar un fragmento de 370 pb del gen control de *α-tubulina*. Como control se llevaron a cabo reacciones de PCR con los mismos oligonucleótidos y con el RNA proveniente de las condiciones antes mencionadas pero sin llevar a cabo síntesis de cDNA, esto para detectar la presencia de DNA genómico contaminante. Para descartar que las reacciones de PCR se encontraran en la fase de meseta se llevó a cabo una cinética de reacciones de PCR a 15, 17, 19, 21, 23, 25 y 27 ciclos. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo a una temperatura de alineamiento de 55 °C.

Los amplificadores se analizaron en un gel de agarosa al 1.5 % en TBE 1X, posteriormente se realizó un análisis densitométrico con el software Quantity one de Bio-Rad, ajustando los valores con respecto a la expresión de *α-tubulina*.

VII.9. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA SUB1

Para la generación de anticuerpos contra SUB1 se optó por utilizar como antígeno un péptido sintético (PS) de 13 residuos (posiciones 484 a la 496 de SUB1) elegido con base en criterios de hidrofiliidad y localización en la superficie basados en el modelo estructural teórico de SUB1. El esquema de inmunización en ratones fue el siguiente:

1ª Semana: 300 µg de PS disuelto en agua inyectable (150 µl) + adyuvante completo de Freund (150 µl).

2ª Semana: 150 µg de PS disuelto en agua inyectable (150 µl) + adyuvante incompleto de Freund (150 µl)

3ª Semana: 150 µg de PS disuelto en 150 µl de agua inyectable

4ª Semana: 150 µg de PS disuelto en 150 µl de agua inyectable

5ª Semana: Descanso

6ª Semana: 1er Sangrado muestra.

7ª Semana: 75 µg de PS disueltos en 150 µl de agua inyectable

8ª Semana: 2º Sangrado muestra.

9ª Semana: Sacrificar si la respuesta es adecuada.

Todas las inmunizaciones fueron por vía intraperitoneal.

VII.10. DETECCIÓN DE SUB1 POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA(WESTERN BLOT)

La detección de SUB1 en lisados totales de *T. vaginalis* se llevó a cabo mediante un ensayo de inmunoelectrotransferencia utilizando el anticuerpo obtenido de los ratones inmunizados con el PS que abarca la región 484 a la 496 de SUB1. Como control negativo se utilizó suero pre-inmune de ratón y como control positivo un anticuerpo monoclonal contra α -*tubulina*. El ensayo de inmunoelectrotransferencia se realizó como se describe a continuación:

1. A partir de un cultivo en fase logarítmica de *T. vaginalis*, se tomaron 1.5×10^7 parásitos y se lavaron 3 veces con PBS.
2. Los parásitos se lisaron con 100 μ l de SDS al 10% y posteriormente se les adicionaron 400 μ l de amortiguador de carga para proteínas recién preparado.
3. La muestra se calentó a 75 °C por 10 min y posteriormente se colocó en hielo con agua antes de cargarla en el gel.
4. Posteriormente se cargaron 15 μ l de la muestra en un gel de acrilamida al 7%.
5. El gel se corrió a 30 mA (constante) en condiciones desnaturalizantes aproximadamente durante 3 horas a 4 °C.
6. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 150 mA durante 3 horas a 4 °C.
7. Se cortaron 3 tiras de la membrana y se bloquearon con leche descremada al 3% en PBS por 18 h a 4°C.

8. Posteriormente la membrana (lisados totales de *T. vaginalis*) se incubó con el suero pre-inmune e inmune en dilución 1:150 y con el anticuerpo anti α -tubulina en dilución 1:3000 en leche 1%/BSA 3% en PBS-Tween 0.05%.
9. Después de la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.05% por 10 min a temperatura ambiente.
10. Una vez lavadas, las tiras se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa) en dilución 1:50,000 en leche al 1%/BSA 3% en PBS-Tween 0.05% por 1 h a temperatura ambiente.
11. Después de la incubación con el anticuerpo secundario las membranas se lavaron nuevamente tres veces con PBS-Tween 0.05% por 10 min a temperatura ambiente.
12. Por último, las membranas se incubaron con el sustrato (peróxido de hidrógeno:luminol 1:1) por 5 minutos en la oscuridad.
13. Exponer a placa autorradiográfica y revelar.

VII.11. INMUNOFLUORESCENCIA

1. Parásitos en fase logarítmica de crecimiento (3×10^6 por muestra) se lavaron 3 veces con PBS centrifugando a 1,800 rpm.
2. Los parásitos se fijaron con paraformaldehído al 4% por 30 min a temperatura ambiente, después de la fijación se lavaron nuevamente por 5 min a temperatura ambiente.
3. Para permeabilizar, los parásitos se trataron con Tritón X-100 al 0.1% por 7 min a temperatura ambiente.
4. Lavar los parásitos permeabilizados con PBS por 5 min a temperatura ambiente.

5. Bloquear los parásitos con suero fetal bovino al 2%.
6. Incubar los parásitos por 1 h a temperatura ambiente en 100 μ l de anti-SUB1 y suero pre-inmune en dilución 1:100 en PBS.
7. Lavar con PBS por 5 min a temperatura ambiente.
8. Incubar los parásitos con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón acoplado a fluoresceína).
9. Lavar con PBS por 5 min a temperatura ambiente.
10. Observar al microscopio de epifluorescencia y confocal espectral de barrido laser.

Se llevaron a cabo controles con parásitos permeabilizados y no permeabilizados incubándolos sólo con el anticuerpo secundario y siguiendo el mismo protocolo.

VII.12. GELES DE ACTIVIDAD

1. Lavar 4×10^6 parásitos tres veces con PBS para cada condición que vaya a ser probada.
2. Lisar los parásitos con 30 μ l de SDS al 10% y adicionarle 30 μ l de amortiguador de carga.
3. Para el caso de las muestras tratadas con inhibidores, éstos se adicionan a la muestra y se incuban por 20 min a 4 °C. En caso de que se vaya a utilizar más de un inhibidor, primero se incuba por 20 min a 4 °C y posteriormente se incuba con el segundo inhibidor por otros 20 min. a 4 °C.
4. Cargar 15 μ l de muestra en un gel de poliacrilamida al 8% copolimerizado con gelatina al 0.3% en condiciones desnaturizantes.

5. Correr el gel a 150 V a 4 °C aproximadamente por 2 horas.
6. Después de la electroforesis renaturalizar las proteasas incubando el gel en Triton X-100 al 2.5% por 1 hora a temperatura ambiente.
7. Lavar el gel con agua.
8. Activar el gel en amortiguador TB a pH 7.4 (o al pH deseado) por 72 h a 37 °C
9. Después de la activación teñir el gel con azul de Coomasie y desteñirlo con metanol (15%): ácido acético (5%).
10. Las bandas de actividad se observan como zonas claras en un fondo azul.

*VII.13. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SUB1 Y DE LAS SUBTILISIN-LIKE SERINE PROTEASAS REPORTADAS EN EL GENOMA DE *T. vaginalis**

La secuencia deducida de aminoácidos de SUB1 y las subtilisinas reportadas en el genoma de *T. vaginalis* se analizaron con los programas signalP 3.0 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), para detectar posibles péptidos señales; TMHMM 2.0 software (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/), para detectar posibles regiones transmembranales; PHOBIOUS ([//phobious.sbc.su.se/](http://phobious.sbc.su.se/)), para la predicción combinada de péptido señal y regiones transmembranales. La gráfica de hidrofobicidad de SUB1 (ventana=7), mapas de genes y alineamientos se llevaron a cabo con el software Vector NTI 10.0 (Invitrogen). La secuencia deducida de aminoácidos de las subtilisinas reportadas en el genoma de *T. vaginalis* se analizaron en el programa Pfam (pfam.sanger.ac.uk/) para detectar dominios funcionales.

El modelo teórico de SUB1 se construyó utilizando el programa PHYRE (Protein Homology/analogy Recognition Engine, www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/). El

modelo obtenido se sometió a un reconocimiento de errores en la estructura mediante el programa ProSA ([//prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php](http://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php)) y un escaneo para sitios de unión a calcio mediante el programa WebFEATURE ([//feature.stanford.edu/webfeature/](http://feature.stanford.edu/webfeature/)). La imagen 3D y el potencial electrostático de superficie teórico de la proteína se generó con el sistema molecular de gráficas PyMOL v0.99 ([//pymol.org/](http://pymol.org/)). El árbol filogenético (Neighbor-Joining) se construyó con el software CLC sequence viewer 6.0 y secuencias de aminoácidos de subtilisinas de varios organismos obtenidas en la base de datos MEROPS (merops.sanger.ac.uk).

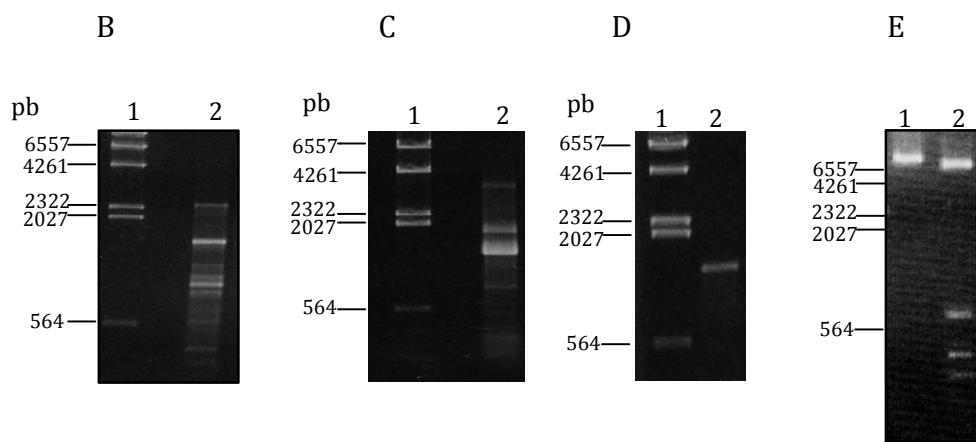
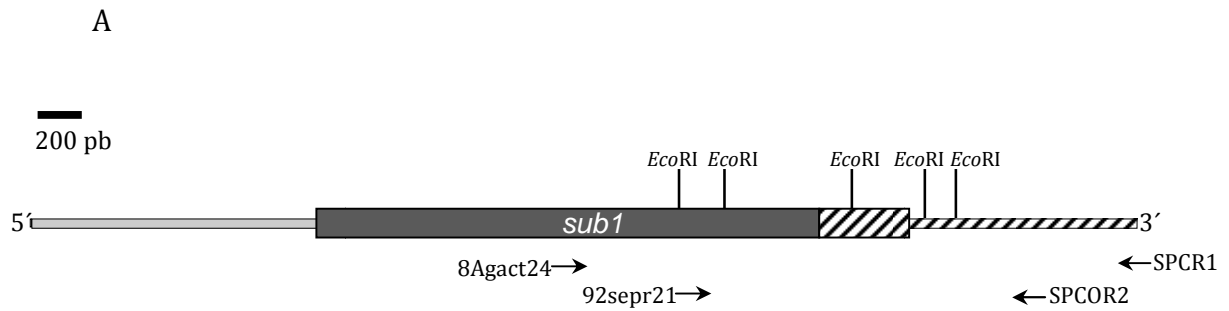
Tabla II. Oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
8Agact24	TCATTACCAGATTGCAAC
92sepr21	CCATTACTTGCAGATTTATC
SPCR1	CTAAGTAACCATATAGTTC
SPCOR2	ATTGCTCTATCACGAAGG
SEPR23	CTAATCAACCAAGTGACAGT
REJASEPR1	GATGTTGCTGTTGTGATATG
α TUBFOR	TGTCTCCGCTGCTGTCGC
α TUBREV	GCCACCATCTTCTTCTTC
T7SP	TTGTAATACGACTCACTATAGGGCCATGAATCCGGCTTCAAATC
SP-100	GCCGAATGGGATCATGGC
JASEPR22	GTATCTGTGAATGTCCATC
AUAPB	GGATCCGGCCACGCGTCGACTAGTAC
AP	GGCCAGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT

VIII. RESULTADOS

VIII.1. SECUENCIA COMPLETA DEL GEN *sub1*

Al inicio de este proyecto, únicamente se tenían secuenciadas 2,328 pb del gen *sub1*. Durante el desarrollo de esta tesis se liberó la secuencia del genoma de *T. vaginalis*[39]. Apoyándonos en esta base de datos se diseñaron los oligonucleótidos que nos permitieron amplificar y secuenciar el extremo 3' faltante de *sub1* en el aislado CNCD147. Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, para llevar a cabo la amplificación del extremo 3' de *sub1*, se llevó a cabo un primer PCR con los oligonucleótidos 8Agact24 y SPCR1 (Figura 10 panel B carril 2). Posteriormente se llevó a cabo un PCR anidado con los oligos 92sepr21 y SPCOR2 en el que se observó una banda mayoritaria del tamaño esperado de aproximadamente 1,400 pb (Figura 10 panel C carril 2). Esta banda se purificó (Figura 10 panel D carril 2) y se clonó en el vector pCR-BLUNT II-TOPO. Posteriormente se seleccionaron 12 clonas, se purificaron plásmidos y se les llevó a cabo un análisis de restricción con la enzima *EcoRI*, en la cual se esperaban fragmentos de 576 pb, 347 pb, 254 pb, 150 pb y 61 pb. De las 12 clonas seleccionadas, sólo en la clona 3'SPTOPO.11 se observaron los fragmentos de aproximadamente 576 pb, 347 pb y 254 pb esperados de la digestión con *EcoRI* los (Figura 10 panel E), los fragmentos de 150 pb y 61 pb fueron difíciles de observar. Esta clona se secuenció en ambas cadenas y en su secuencia se identificó el codón de término de la traducción del marco de lectura abierto de *sub1* (Figura 10 panel F).



F

```

1      tttgttgata tactatgaat tattgtaaca ataataacctg catttattaa ttttgcTTTT
61     gtgcgagtaa agtaatatat taataagccg aatgggatca tggcaatcct tctgTTTTgt
121    tcatcttcca aaaacgtaag gagcatccct aaaagatcaa agatggccat tttttaTTTT
181    ttttttctaaatttgTTTTga caaaaATGTT TTTCATCTGT TTTCTCTTCA TTGAAGCAAT
241    TTCACCTGAA ATTTCTAAGG AAGATATACG TAAATCAAGA TATGAAAAGTA GATATCCTGA
301    TTCAAATCAA TATTTCAATG GTTATTACAA AGATTTTACTTCGAAAACGA ATATGTCATGA
361    TAGAACATCA AGTGAAATCC GACAAATCAC AGACATTTCT AACTATATAA TCCACACAAC
421    ACAAGAGTTT CAATTTCCAA AAGATATCAC ATTTTCAAAA CTGCATGGAA CATATTATTT
481    CATTACAGAC GCTTCAAAAG CCCAAATCAA TTCAATTCAA AGCAACTCCA ATGTGATTTT
541    AGTTGAAAAA GCTTCACAAA TCCGTTTTGA TACAAGATTT GAAGCCGGAT TCATGGAAAA
601    TGGGAATTTA GATTTAACAT ATAAAAATGG CTACTTATGG TCATTACGTT CGACAACCT
661    TACAGGAAAA GGTGAAATTA TTGCTTTGGC AGATTCAGGA ATCGATTATA GGCATCCAAT
721    GCTCAATGAC TCATCACGAC AATTAATTA TAACACTCTT GACCTCAATC AACGAAAAAT
781    CGTTTATTAT GATTCATGGA AAGATTTTTA TGAATATATC CCAGGCCACG GCACACATAC
841    AGCAGGTATT ATAGCAGGGA AATCAGAATG CGGTAATATT TTACCTCTTT ACGATGGTAT
901    TGCACCTGAA TCAAAATTAT ATTTCTTAGA TATGGCCAAA GGTGACAATA AAATGCTTTT
961    TGACGACTTT GATAAAGATA AATTTGTTCA GTCGTTGAAA GATCTCAATA TTGGCATCAG
1021   TTCGAACAGT TGGGGTTCAA ATGAAATAGA TTACACATCT ACAATGACAG ATATCTATGA
1081   CAACCTCGCA TATAATAACC CAGACATTTT ATTTGTTTTT GCAGCCGGAA ACAGCGAAAA
1141   ATCATGGACA ATTGACAGTC CTCTTCAGG AAAAAACATT TTTTGTGTTG GAGCAACTGA
1201   TGGAACTCCA GGTCAAATGA TGGGAGAAGC ATCAACACCA CAGATCGAAA TATCAGGTAC
1261   AAAGATTGAT TTGTTGCAAT CTCTTTGGTC AACAAATTTA TTTAATCAAT TAAATAAGGA
1321   AGAACCATTA TTTAATGTTG CAAAGCCTGT TTATGTTACA TCTAATGATA ATACATGTGA
1381   TTCATCAAAA CAAATCCTTG AAAATGAACA AACAAAAATA TTAATTTTGA AATCATTACC
1441   AGATTGCAAC AAAATGAGTA AAACAGTACT TGCAACATTA TCTGATGATG ATTTCCAGTT
1501   AATTTCTCAA TCTTCATCTG CAAATTCAC AATGAAATTA AGTGATTTT CATATGAAAA
1561   AGCAAATTTT GCAAGTGCTG GTCCAGCATA TTCAGGAATC TTGAAACCAG ACATATCAGC
1621   ACCAGGCCTC ATCACAGGTG CTCTTTCATA TGGAAATTCA GAAACAGCAG AAAGAAAAAT

```

```

1681 TGATTTTTCAC AGTCTTTTCAC AGTTCACAGG AACATCAGAG TCAACACCAA TTATTTTCAGG
1741 ATTTTCAAAGT CTTTACGTG AACATTTTCG ATCAAAAAGGA GTTACTCCTT CATCTTCTTT
1801 ACTTAAATCA TTAATTATTT CATCAACAAA ATCAAATAAA AGAGATTTAA ATACAGGTTT
1861 TGGAATTCCA CGATTAGATT GTGCAATTAA ATCATCATAT TCAGATCGTG TTTTAAATCAA
1921 AGGAAATCAA CATTATATTT GTGAATTTTC TAGTCAAACA GGAGACATAT CAGCATCAAT
1981 TTCATGGTTA GATCCATGTT TATCACGTGA TATTGCTTAT CCATTACTTG CAGATTTATC
2041 TATTTTCATT GAATCACCAA CAGGAAAAGT TTATCAAGAA GAATTCGGAA ATTCCATTTT
2101 GACACAAAAC AAAAAGATCA GTGTTACAAG TGAAACTTAT GAAGGTACAT GGAAACTTCA
2161 TGTTATCAGT TCTCGTTTCG AAGGTAATGT TTCATTTTCA TGTCTATTT CTAATTACAT
2221 GTCAGAAAAA CTTGAATTTG CTGAAGAAAC CGAAAAATGT TTATCCGATT GTTCATGCAA
2281 CAAAGGTATC TGGAATGTC CATCAGATAA GACAGATCAT CTTTGTTCAA CAAATCAAG
2341 AGATATTTCT AATTCAGGTG CATTGTGTTG TCAAGGCAAA TATGTTTTTC GTGCACGAGT
2401 TCCTAATATT GACAAACCAC GAATTGATGT TTCATTCAA GGATATTCTA ATGTTTATCT
2461 TATCAAAGGT ATTTCTAATC AACCAAGTGA CAGTTTCACA TCACTTTTAT TCCGAAACAA
2521 AGAGACAAAG CTTTCTAACT ATGAAGTATT AGAACCAGGA ACAACATCA CAATCATTGT
2581 TCGAAGTTTT AGTTCAGGTT CATTGAGAAT TTCATTTATC AGTTCCTCAT ATATTCCATC
2641 AACACCTCCT CCTACAGAAT TCGTCTATCC AACATCAACA CCAGAAATTC CTCCTATCAG
2701 AACTCCTTTT CTTTCTAAAT TCGAATCTCC TTCAAATACA TATCACAACA GCAACATCAC
2761 ATCAAATCAA AACACTAAAT GGATTCTTCC AACATCCATT ACTATCTGTT CATTGATTGG
2821 CATCATCATG ATTGTTTTCA TTATTTTGT TGTTTTCAA CTTGCGAAAT CCCACAAACA
2881 TGACGATTC AGCACATCAG GCCAATTATC AGCACCTATT TTATAggttt aatatccacc
2941 tacattaact actattgtaataataaaact gttcttattt gaaactatat cctaaaaaat
3001 attgaattca ctatgttaca tgcaatgtgt tttttcactt attaccgctc tcaaatttta
3061 tcggttacta ttaaaaaatgg atcaaaaata catgacttac tttacttoga gttagcttaa
3121 ttatcactta tcttggcctt aaaaaagggga ggggaattcac atgtgttacc cccttttttc
3181 aatgggtttt atatgagttt

```

Figura 10. Obtención de la secuencia del extremo 3' del gen *sub1*, la secuencia codificadora se muestra en mayúsculas y las regiones intergénicas en minúsculas. Panel A: Mapa del gen *sub1* y parte de las regiones intergénicas en donde se muestra la secuencia conocida (gris) y la secuencia desconocida en la región 3' (diagonales) además se muestran los sitios de anclaje de los oligos 8Agact24, SPCR1, 92sepr21 y SPCOR2 utilizados para amplificar la región 3' de *sub1* y los sitios de restricción para la enzima *EcoRI*. Panel B: Productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos 8Agact24 y SPCR1 específicos para *sub1* y DNA genómico, carril 1: Pesos moleculares λ /*Hind* III, carril 2: Productos de amplificación del primer PCR. Panel C: Productos del PCR anidado, carril 1: Pesos moleculares λ /*Hind*, carril 2: Productos de amplificación del PCR anidado utilizando los oligonucleótidos 92sepr21 y SPCOR2. Panel D: Purificación de la banda de aproximadamente 1,400 pb, carril 1: Pesos Moleculares λ /*Hind* III, carril 2: banda purificada de aproximadamente 1,400 pb. Panel E: Clona obtenida de 3'SPTOPO.11 obtenida de la ligación en el vector pCR-BLUNT II-TOPO de la banda purificada de ~1400 pb. Carril 1: Clona 3'SPTOPO.11 sin digerir, carril 2: Clona 3'SPTOPO.11/*EcoRI*. Se observan los fragmentos de tamaño esperado de ~576 pb, ~347 pb y ~254 pb. Panel F: Secuencia completa del gen *sub1*. En la región 5' se muestran los dos posibles iniciadores (CTAAATT y TTA~~CTTC~~ subrayados), dos posibles ATG's para el inicio de la traducción (en cajas), en la región 3' la secuencia obtenida del inserto de la clona 3'SPTOPO.11 se muestra en negritas, en esta secuencia se identificó el codón TAG (subrrayado y en cursivas) que marca el final del marco de lectura de *sub1*. También se identificaron dos posibles señales depoliadenilación (cursivas y doble subrayado).

Los elementos identificados en la secuencia completa del gen *sub1* son: dos posibles iniciadores (INR's) para el inicio de la transcripción (CTAAATT y TTA~~CTTC~~, posiciones 187 y 336), dos posibles ATG's en fase, para el inicio de la traducción (posiciones 206 y 353), el codón de término de la traducción TAG (posición 2,924) y

dos posibles señales de poliadenilación TAAA (posiciones 2,958 y 2,965) [50]. El marco de lectura abierto de *sub1* tiene una longitud de 2,721 pb.

VIII.2. EXPRESIÓN DE *sub1*

Como una primera aproximación para conocer si el gen de *sub1* se expresa, se llevaron a cabo ensayos de northern blot con RNA total de *T. vaginalis* para tratar de detectar el mRNA de *sub1*. Se corroboró que mediante estos ensayos no se logra observar ninguna señal cuando la membrana se hibrida con una sonda homóloga de *sub1*, sugiriendo que este gen no se expresa o bien que la cantidad de mensajero presente se encuentra por debajo del límite de detección de esta técnica.

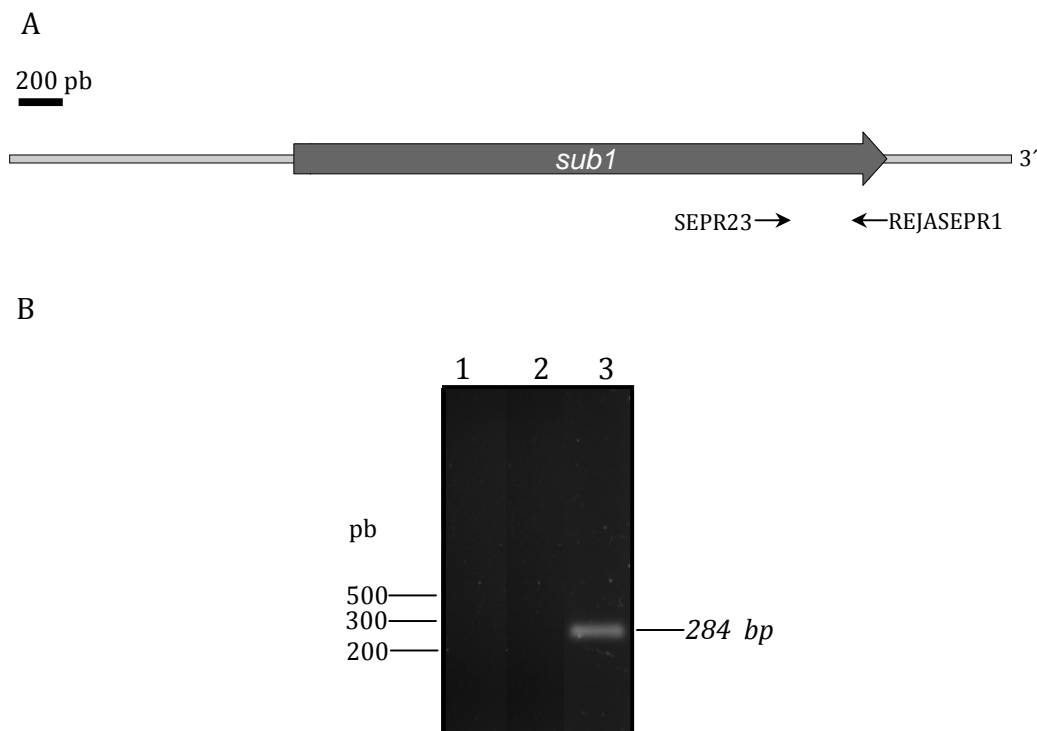


Figura 11. Expresión de *sub1*. Panel A: Mapa de *sub1* en donde se indica la región amplificada de *sub1* y los sitios de unión de los oligonucleótidos SEPR23 y REJASEPR1. Panel B: Ensayo de RT-PCR utilizando RNA total de *T. vaginalis* para la síntesis de cDNA. Carril 1: Control de PCR; 2: Control para descartar contaminación con DNA genómico utilizando como templado RNA total de *T. vaginalis*; Carril

3: Producto de amplificación esperado para *sub1* utilizando cDNA de parásitos cultivados en medio TYM la reacción de PCR se llevó a cabo con 30 ciclos de amplificación.

Como alternativa se optó por tratar de evaluar la expresión de *sub1* por medio de una técnica más sensible como el ensayo de RT-PCR. Se utilizó RNA total de *T. vaginalis* para la síntesis de cDNA y los oligonucleótidos específicos para *sub1* SEPR23 y REJASEPR1 que se anclan en las posiciones 2,475 y 2,739 respectivamente (Figura 10 panel C). En estos ensayos se obtuvo un amplicón del tamaño esperado (284 pb), lo que sugería la presencia del mRNA de *sub1* en *T. vaginalis* (Figura 11 panel B).

VIII.3. DETERMINACIÓN DEL SITIO DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN Y DEL EXTREMO 3' UTR de *sub1*

Debido a que en la región 5' del gen *sub1* se identificaron dos posibles iniciadores (Inr's) para la transcripción y dos posibles ATG's (en fase) para el inicio de la traducción, se procedió a determinar el sitio de inicio de la transcripción de *sub1*. La determinación correcta del sitio de inicio de la transcripción es importante ya que, como se mencionará más adelante, la secuencia traducida de aminoácidos de SUB1 muestra un péptido señal en su región amino terminal que estaría presente en la proteína solamente si el gen se empezara a transcribir a partir del primer Inr. Para determinar el sitio de inicio de la transcripción de *sub1* se llevó a cabo un ensayo de protección a ribonucleasas (RPA: ribonuclease protection assay), utilizando como control positivo del ensayo el sitio de inicio de la transcripción del cistrón ribosomal (CR) previamente descrito [99].

Los resultados esperados para este ensayo son los siguientes: Si *sub1* se transcribe desde el Inr distal, se observaría un fragmento protegido de 408 pb,

mientras que un fragmento protegido de 259 pb se produciría si la transcripción se inicia del Inr proximal, como se indica en la figura 12 panel A.

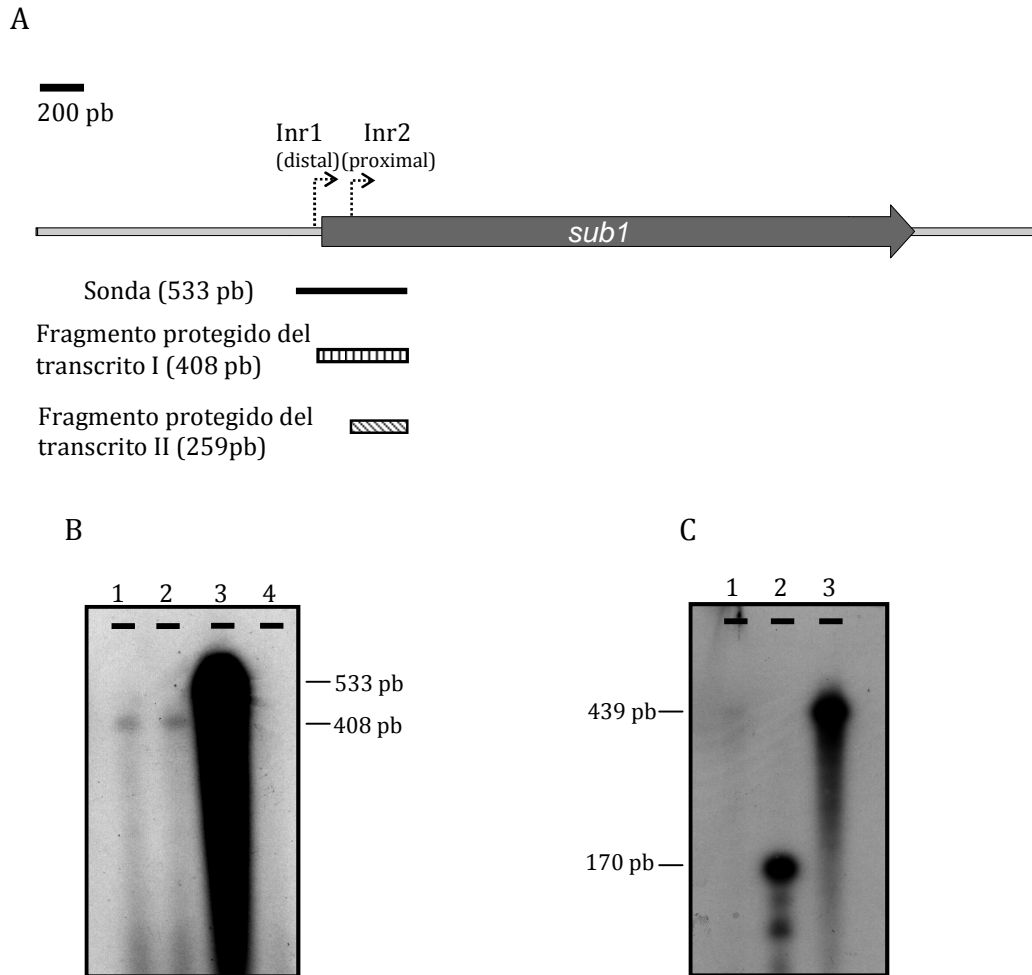


Figura 12. Identificación del sitio de inicio de la transcripción para *sub1*. Panel A: Representación esquemática del gen *sub1* indicando la posición de la sonda antisentido (línea sólida) utilizada en el ensayo de protección a ribonucleasas. Los tamaños de los dos posibles fragmentos protegidos se muestran como cajas sombreadas. Panel B: Ensayo de protección a ribonucleasas del gen *sub1*. Carril 1 y 2 (duplicados): RNA total de *T. vaginalis* + sonda antisentido de *sub1* + RNasa (sonda protegida); Carril 3: Sonda antisentido de *sub1* (sonda intacta); Carril 4: RNA de levadura + sonda antisentido de *sub1* + RNasa (sonda no protegida). Se necesitó la sobreexposición de la autorradiografía para observar los fragmentos protegidos. Panel C: Ensayo de protección a ribonucleasas del transcrito de rRNA utilizado como control positivo. Carril 1: Sonda antisentido del CR + RNA de levadura + RNasa (sonda no protegida); Carril 2: RNA total de *T. vaginalis* + sonda antisentido de CR + RNasa (sonda protegida); Carril 3: Sonda antisentido del CR (sonda intacta).

Para este ensayo se llevó a cabo la transcripción *in vitro* de una sonda de RNA marcada con (α -³²P)UTP de 533 pb para *sub1* y 439 pb para el cistrón ribosomal, usado como control.

El resultado del ensayo de RPA para *sub1* muestra un fragmento protegido de ~408 pb, indicando que la transcripción del gen *sub1* se inicia a partir del Inr distal (CTAAATT)(Figura 12 panel B). Como control positivo se llevó a cabo un ensayo de protección a ribonucleasas para el sitio de inicio de la transcripción del rRNA de *T. vaginalis* (Figura 12 panel C) [99].

Por otra parte, el extremo 3' UTR del mRNA de *sub1* se determinó mediante un ensayo de 3'RACE (Rapid Amplification of 3'cDNA End). Para este ensayo, la síntesis de cDNA a partir de RNA total de *T. vaginalis* se llevó a cabo con el oligonucleótido AP que se une en la cola de poli A de los RNA mensajeros. El primer PCR se hizo utilizando los oligonucleótidos AUAPB, que se une en una secuencia complementaria que posee el oligo AP, y el oligo JASEPR22 (que se ancla en la posición 2,286) (Figura 13 panel B). Posteriormente utilizando como molde este PCR inicial se realizó un PCR semi-anidado con los oligonucleótidos AUAPB y SEPR23 (que se ancla en la posición 2,475) (Figura 13 panel C), en ambas reacciones de PCR se observaron varias bandas de amplificación inespecífica. Los productos de la amplificación del PCR semi-anidado se clonaron en el vector pCR-BLUNT II-TOPO y se analizaron 200 colonias por medio de hibridación en colonia utilizando una sonda de *sub1*. A partir de este escrutinio se seleccionaron 15 colonias de las cuales 11 tuvieron los fragmentos de tamaño esperado (~300 pb y ~180 pb) con base en el análisis de restricción con *EcoRI* (Figura 13 panel D). Para secuenciar se seleccionaron las clonas #5, #11, #13 y

#9. En las 3 primeras clonas se observó el sitio de poliadenilación de *T. vaginalis* (UAAA) 13 nt río abajo de la señal de poliladenilación, mientras que en la clona #9 el sitio de poliadenilación de *T vaginalis*(UAAA) se localizó 17 nt río abajo de la señal de poliadenilación (Figura 13 panel E).

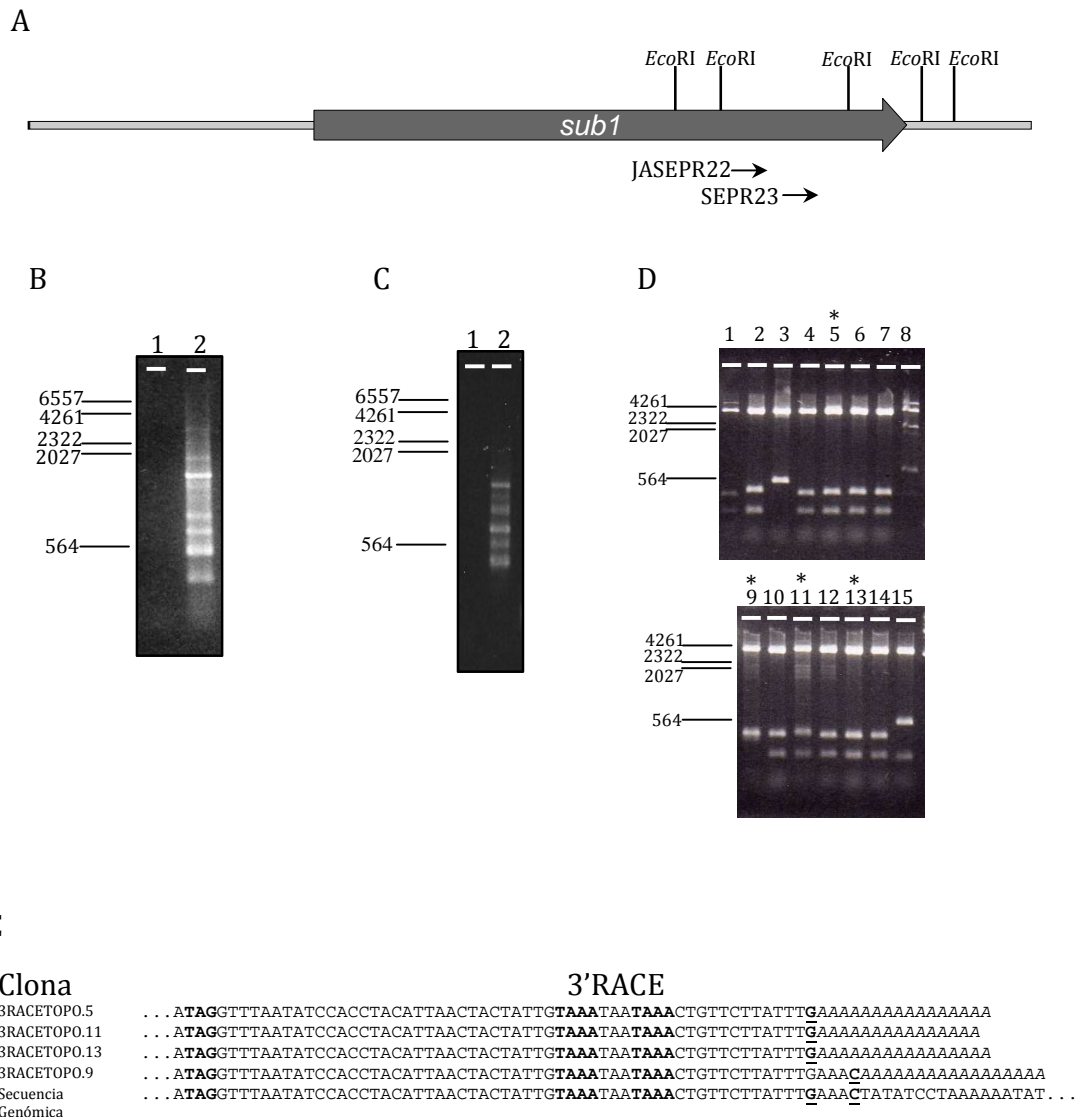


Figura 13. Determinación de la región 3'UTR del mRNA de *sub1*. Panel A: Mapa de *sub1* en donde se indican los sitios de restricción para la enzima *EcoRI* y los sitios de unión de los oligonucleótidos JASEPR22 y SEPR23. Pabel B: Productos de amplificación del primer PCR llevado a cabo con los oligos AUAPB y JASEPR22 y cDNA de *T. vaginalis*. Carril 1: Control del primer PCR. Carril 2: Productos de amplificación del primer PCR. Panel C: Productos de ampificación del PCR semianidado. Carril 1: Control del PCR semianidado, Carril 2: Productos de amplificación del PCR semi-anidado. Panel D: Análisis de restricción con la enzima *EcoRI* de las clonas seleccionadas por hibridación en colonia.

Gel superior: Carriles 1-8: Clonas #1 a #8/*EcoRI*. Gel inferior: Carriles 9-15: Clonas #9 a #15/*EcoRI*. Los asteriscos indican las clonas que se secuenciaron. Panel E: Sitios de poliadenilación encontrados en las 4 clonas secuenciadas.

También se observa que las clonas #1, #3 y #15 tienen insertos de diferente tamaño, es posible que los insertos de estas clonas no estén relacionados con *sub1* o bien que estas clonas tengan insertos con un sitio de poliadenilación diferente al observado en las clonas secuenciadas.

Con los datos obtenidos del ensayo de 3'RACE se determinó que en tres de las clonas secuenciadas la región 3'UTR tiene una longitud de 56 nt mientras que en otra clona la región 3'UTR es de 60 nt. En la región 3'UTR están presentes dos señales de poliadenilación (UAAA) a 31 y 38 nt río abajo del codón de paro (Figura 13 panel E). Estos elementos son consistentes con los motivos de poliadenilación propuestos previamente para *T. vaginalis*[50].

Conociendo el sitio de inicio de la transcripción correcto de *sub1*, se obtuvo la secuencia deducida de aminoácidos de SUB1 (Figura 14 panel A) que consta de 906 residuos y un peso molecular teórico de 101 kDa. A partir de esta secuencia se hizo un análisis de hidrofobicidad que nos permitió identificar dos regiones hidrofóbicas una en la región amino y otra cerca de la región carboxilo, que sugieren la presencia de un péptido señal y de una región transmembranal respectivamente (Figura 14 panel B). Analizando la secuencia de SUB1 por medio de programas de predicción de péptidos señal (signalP) y de hélices transmembranales (TMHMM), se predijo un péptido señal de 17 residuos en la región amino terminal (posiciones 1-17, Figura 14 panel C) y una hélice transmembranal de 23 residuos (posiciones 862-884, Figura 14 panel D).

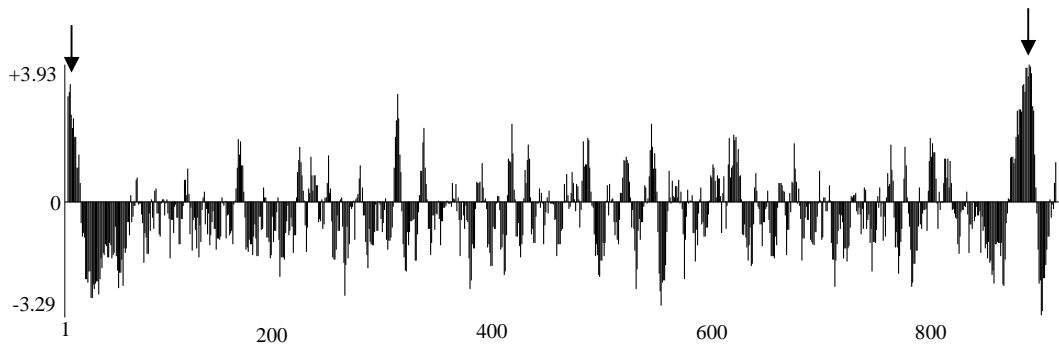
A

```

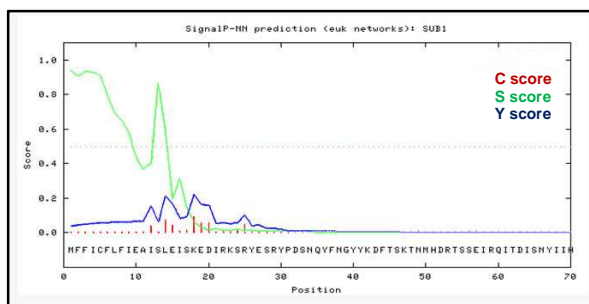
1  MFFICFLFIE AISLEISKED IRKSRYESRY PDSNQYFNGY YKDFTSKTNM HDRTSSEIRQ
61  ITDISNYIIH TTQEFQFPKD ITFSKLGHTY YFIHDASKAQ INSIQNSNV ISVEKASQIR
121 FDRFEAGFM ENGNLDLTYK NGYLWLSLRST NLTGKGEIIA LADSSGIDYRH PMLNDSSRPL
181 INNTLDLNQR KIVVYDSWKD FYDYIPGEGGT HTAGIIAGKS ECGNILPLYD GIAPESKLYF
241 LDMAGDKNM LFDDFDKDKF VQSLKDLNIG ISSNSWGSNE IDYTSTMTDI YDNLAYNNDP
301 ILFVFAAGNS EKSWTIDSPS SGKNIFCVGA TDGTPGQMMG EASTPQIEIS GTKIDLLQSS
361 WSTNLFNQLN KEEP504LFNVAK PVYVTSNDNT CDSIKQILEN EQTKILILKS LPDCNKMSKT
421 VLATLSDDDF QLISQSSAN FTMKLSDFSY EKANFASAGP AYSGILKPD163I SAPGVITGAL
481 SYGNSETAER KCDFSSLSQF TGTSESTPII SGFSSLLREH FRSKGVTPSS SLLKSLIISS
541 TKSNKRD208LNT GFGIPRLDCA IKSSYS504DRVL IKGNQHLYCE FSSQTGDISA SISWLDPLLS
601 RDIAYPLLAD LSIFIESPTG KVVQE504EFGNS ILTTNKKISV TSETYEGTWK LHVISSRFEG
661 NVSFSCSISN YMSEKLEFVE ETEKCLSDCS CNKGI504CEPCS DKTDHLCSTN SRDISNSGTF
721 VGQKGYVFRA RVPNIDKPRI DVSFKGYSNV YLIKGISNQP SDSFTSL504LFR NKETKLSNYE
781 VLEPGTNITI IVRSFSSGSF RISFISSSYI PSTPPPT504FEV YPTSTPEIPP IRTPFPKFE
841 SPSNTYHNSN ITSNQNTKWI LPTSITICSL IGIIMIVFII FVVFKLRKSH KHDDFSTSGQ
901  LSAPIL

```

B



C



D

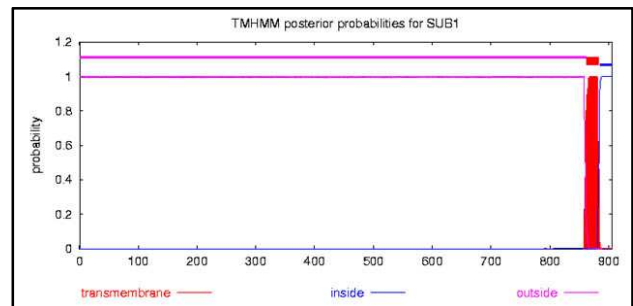


Figura 14. Características y secuencia deducida de aminoácidos de SUB1. Panel A: Secuencia deducida de aminoácidos de SUB1. El probable péptido señal está subrayado y la región transmembranal doble subrayada. Los residuos catalíticos D¹⁶³, H²⁰⁸ y S⁵⁰⁴ están en cajas. Panel B: Perfil de hidrofobicidad de la secuencia deducida de aminoácidos de SUB1 en donde se identificaron dos principales picos de hidrofobicidad en la región amino y carboxilo (↓). Panel C: Análisis de SUB1 con el programa signalP, el cual predice un péptido señal de 17 aa. Panel D: Análisis de SUB1 con el programa TMHMM, el cual predice una hélice transmembranal de 23 aa en la región carboxilo.

La secuencia de *sub1* obtenida del aislado CNCD147 se comparó con la secuencia accesada en el genoma (TIGR contig 83372). Se encontraron 8 diferencias a nivel de nucleótidos y 5 a nivel de aminoácidos (4 cambios no conservados y 1 conservado). Ninguna de estas diferencias se localizó dentro de los dominios catalíticos.

Las subtilisinas se sintetizan como zimógenos o precursores inactivos, que constan de un péptido pre y un péptido pro. El péptido pre por lo general sirve para dirigir a la proteína a través de la ruta secretoria mientras que el péptido pro se procesa una vez que la proteasa ha llegado a su sitio de acción funcionando como una chaperona intramolecular para dar paso a la enzima madura [100]. En la mayoría de las subtilisinas maduras, el aspartato de la triada catalítica usualmente se encuentra en la posición 32, por lo que la extensión de la región amino terminal de SUB1 sugiere un péptido de activación (pro) de aproximadamente 114 aminoácidos.

A nivel de la secuencia deducida de aminoácidos, SUB1 tiene motivos conservados presentes en otras subtilisinas dentro de los 342 aminoácidos que comprenden el dominio catalítico (aminoácidos 163 al 504). Esta región contiene los residuos conservados de la triada catalítica (D¹⁶³, H²⁰⁸, S⁵⁰⁴) y la asparagina necesaria para la formación del agujero de oxianión (N³⁰⁹).

El alineamiento de los dominios catalíticos de SUB1 y de secuencias equivalentes de subtilisinas de *P. falciparum*, *T. gondii*, *A. healyii* y *B. amyloliquefaciens*, muestra una clara similitud entre estas secuencias. Una característica interesante de SUB1 es un fragmento de 97 aminoácidos entre la H208 y la S504 presente

unicamente en la subtilisina de *T. vaginalis* comparada con las subtilisinas de los otros organismos utilizados para el alineamiento (Figura 15).

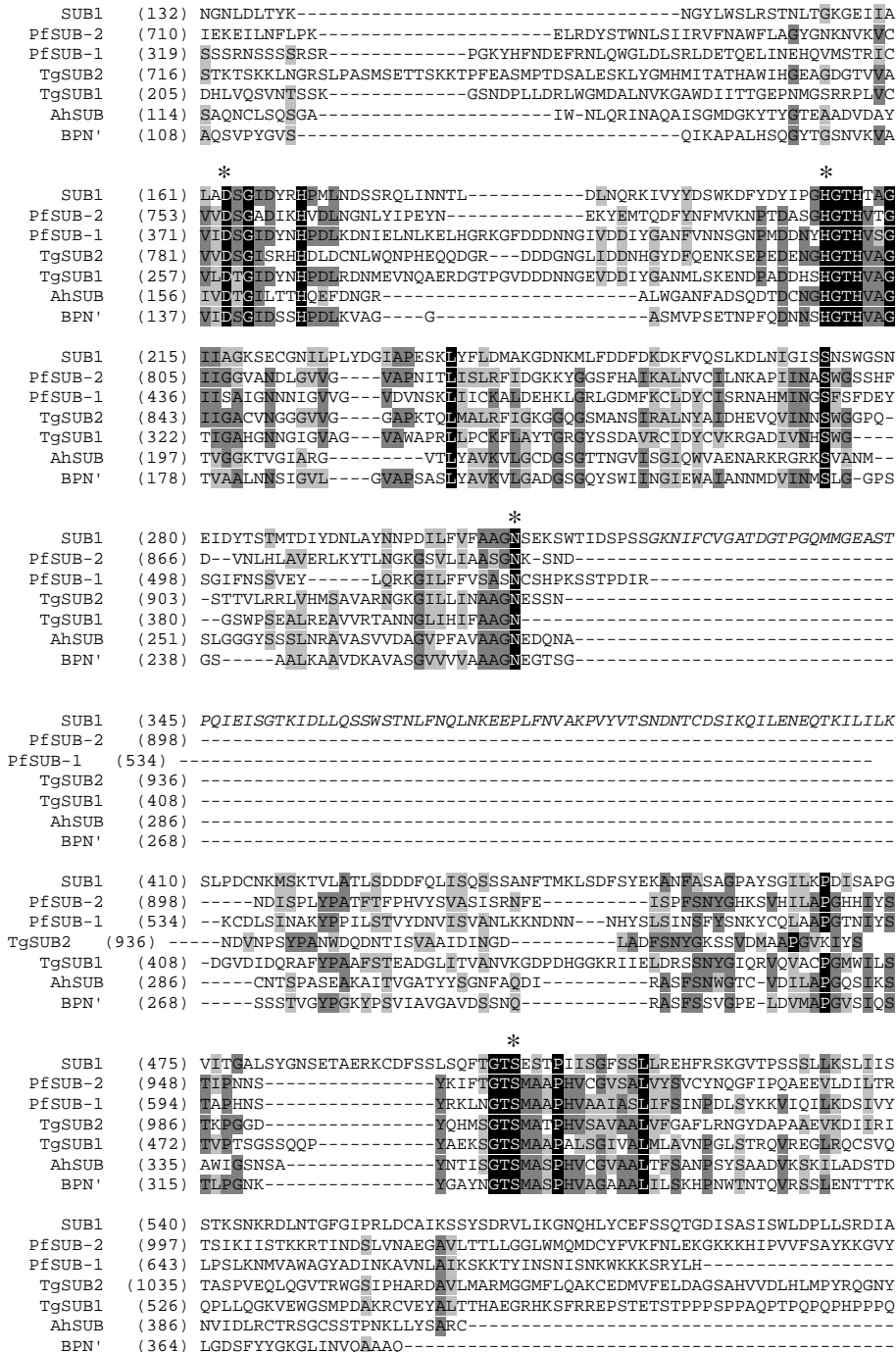


Figura 15. Alineamiento múltiple de subtilisinas de varios parásitos: SUB1 (*T. vaginalis*), PfSUB-1 y PfSUB-2 (*P. falciparum*), TgSUB1 y TgSUB2 (*T. gondii*), AhSUB (*A. healyi*), BPN' (*B.*

amyloliquefaciens). Los aminoácidos que conforman la triada catalítica (D, H, S) y la N necesaria para la formación del agujero de oxianión están indicados con asterisco. En *itálicas* se muestra el fragmento de 97 aminoácidos presente sólo en la subtilisina de *T. vaginalis*

En la familia de las subtilisinas, la estructura terciaria se encuentra muy conservada entre sus miembros. Con la secuencia deducida de aminoácidos de SUB1 se construyó un modelo tridimensional teórico con el programa PHYRE [101], tomando como molde la estructura cristalográfica a 1.30 Å de la proteasa de serina alcalina kp-43 de *Bacillus sp.* [102], el modelo obtenido se muestra en la figura 16 panel A. Se sabe que las subtilisinas son enzimas dependientes de calcio y por lo regular en su estructura se encuentran sitios de unión a calcio [103]; por esta razón el modelo de SUB1 se sometió a un escaneo para encontrar sitios de unión a calcio mediante el programa WebFEATURE.

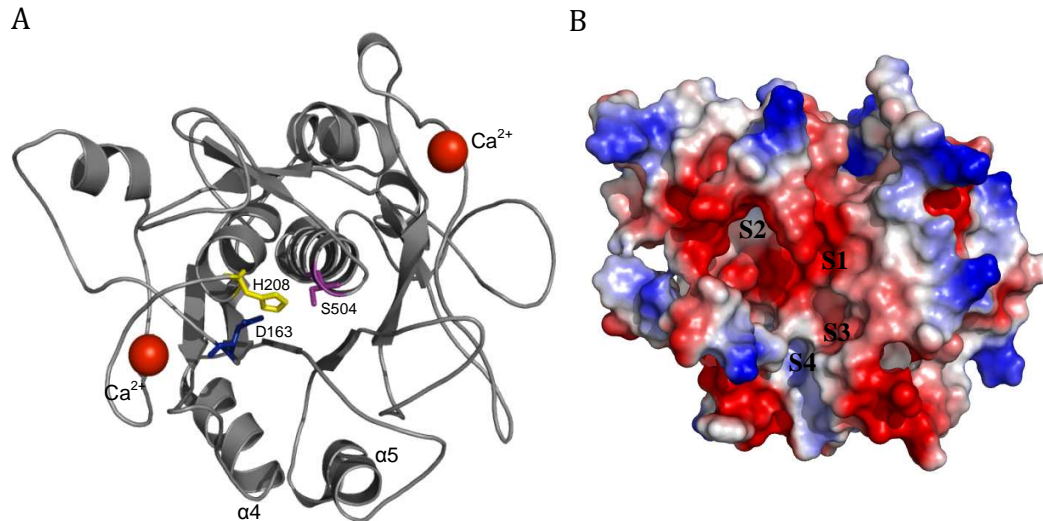


Figura 16. Modelo estructural teórico de SUB1. Panel A: Representación del listones de SUB1, los aminoácidos de la triada catalítica D¹⁶³ (azul), H²⁰⁸ (amarillo), S⁵⁰⁴ (morado) se muestran en conformación de bastones. Las esferas rojas indican los dos sitios de unión a Ca²⁺ importantes para la estabilidad de la proteína. También se indican las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ importantes para la interacción con el péptido pro. Panel B: Modelado de la carga electrostática superficial (en rojo se muestran las cargas negativas y en azul las cargas positivas). Se identificaron los subsitios S1, S2, S3 y S4 del sitio activo.

El escaneo detectó dos probables sitios de unión a calcio en el modelo estructural de SUB1. También se encontraron las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ que interactúan con el propéptido[104](Figura 16 panel A). La precisión con la cual el programa PHYRE fue capaz de modelar el core catalítico de SUB1 fue del 100%.

Se llevó a cabo también el modelado teórico de la carga electrostática superficial en donde se identificaron los subsitios S1, S2, S3 y S4, que conforman el sitio activo (Figura 16 panel B).

*VIII.4. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL HIERRO Y DEL CONTACTO CON CÉLULAS EN LA EXPRESIÓN DE *sub1**

En *T. vaginalis* el hierro regula la expresión de varios genes incluyendo algunos que codifican para factores de patogenicidad como proteasas y adhesinas [51, 75, 94, 105-108]. Para determinar la influencia del hierro en la expresión de *sub1*, los parásitos se crecieron en medio con alto y bajo hierro. Los niveles de expresión de *sub1* en diferentes condiciones se evaluaron mediante reacciones de RT-PCR semicuantitativas. La detección de la expresión del gen *sub1* se hizo con respecto al gen control de *α -tubulina*, para lo cual se llevó a cabo una cinética de reacciones de PCR a 15, 17, 19, 21, 23, 25 y 27 ciclos utilizando como molde el cDNA proveniente de RNA obtenido en las distintas condiciones de hierro (Figura 17).

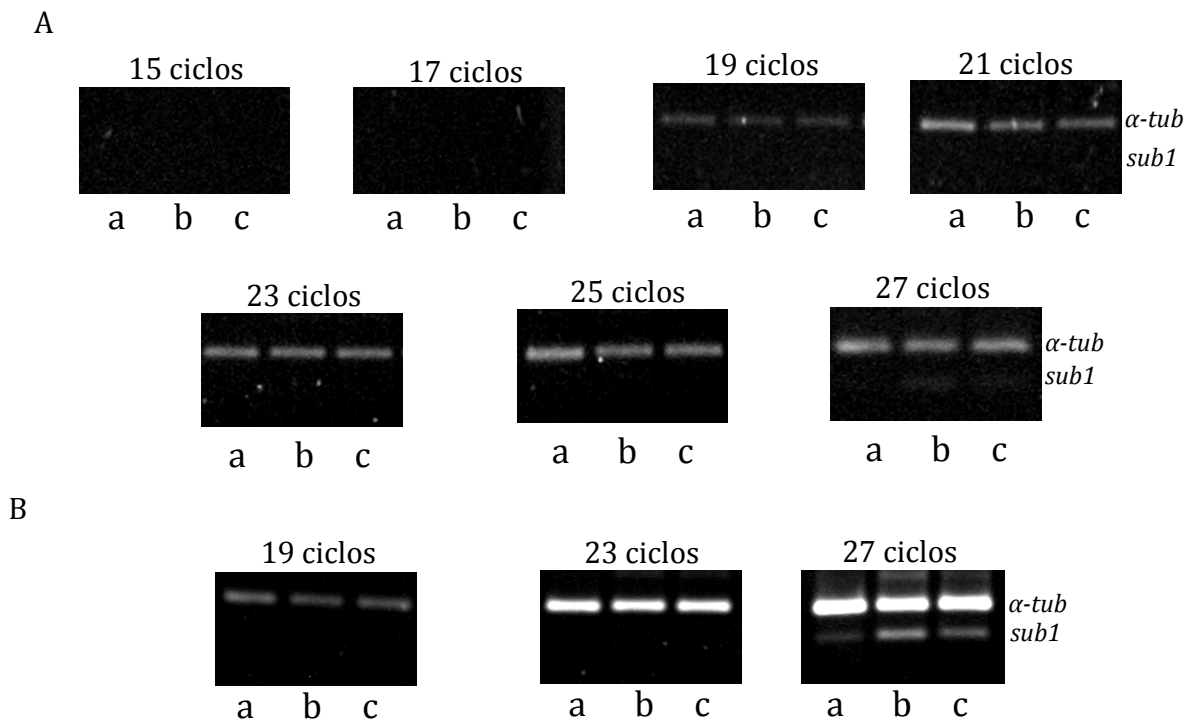


Figura 17. Estandarización de las reacciones de RT-PCR semicuantitativas (a: bajo hierro, b: medio TYM, c: alto hierro). Panel A: Geles de Agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio en los que se analizaron 2 μ l de las reacciones de PCR llevadas a cabo con el cDNA de cada condición. En estos geles solo se observa la banda de amplificación correspondiente a *α-tubulina*, con excepción del gel a 27 ciclos en el que se empieza a observar la banda correspondiente a *sub1*. Panel B: Geles de Agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio en los que se analizaron 10 μ l de las reacciones de PCR amplificadas a 19, 23 y 27 ciclos. En la muestra con 27 ciclos de amplificación son observables las bandas de *α-tubulina* y de *sub1*.

Con base en estos resultados se determinó que los ciclajes óptimos para observar cambios en las intensidades de las bandas de cada condición eran entre 25 y 27 ciclos. Posteriormente se llevaron a cabo las reacciones de RT-PCR semicuantitativas y se hizo la cuantificación densitométrica relativa de las bandas de amplificación de *sub1*, respecto a las del gen control de *α-tubulina*. En estos experimentos se observó un incremento en la intensidad de la banda de amplificación correspondiente a *sub1* en parásitos crecidos en medio con alto hierro y con TYM

comparado con parásitos crecidos en medio con bajo hierro (Figura 18), lo que sugiere que la expresión de este gen es inducida por hierro.

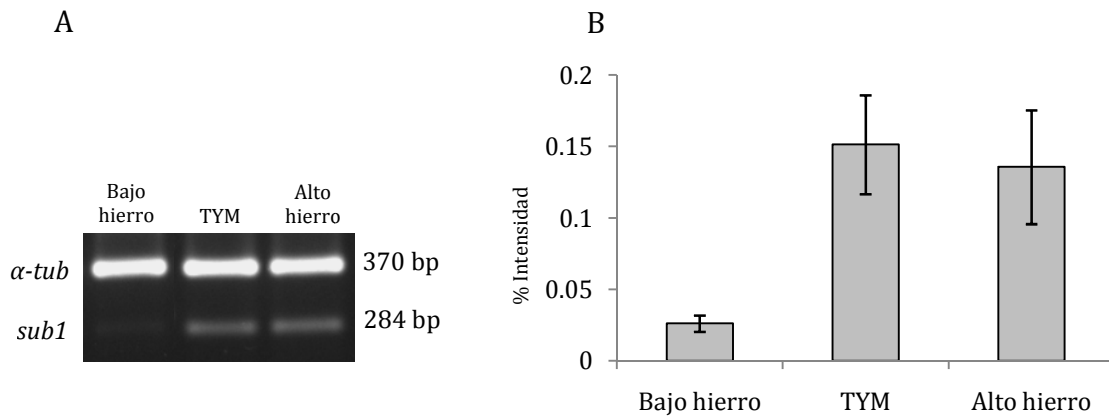


Figura 18. La expresión de *sub1* es inducida por hierro. Panel A: Productos de amplificación provenientes de las reacciones de RT-PCR de los genes *sub1* (284 pb) y α -tubulina (370 pb), utilizando cDNA de parásitos crecidos en medio con bajo hierro, medio normal (TYM) y en medio con alto hierro. Panel B: Expresión relativa de *sub1* con respecto a α -tubulina en parásitos cultivados en diferentes concentraciones de hierro.

Por otro lado, se ha observado que el contacto de *T. vaginalis* con células del epitelio vaginal induce un cambio morfológico importante en el parásito, pasando de una forma piriforme a una forma ameboides [64], también se llevaron a cabo estos experimentos con células de próstata (DU145) ya que se ha establecido a *T. vaginalis* como agente etiológico de prostatitis y su presencia en la glándula prostática [15]. Este cambio morfológico va acompañado de un cambio en la expresión de varios genes [109]. Debido a que el contacto con células modula la expresión de algunas proteínas de *T. vaginalis* [110], se llevaron a cabo análisis de citoadherencia y citotoxicidad a células HeLa (células de cérvix) y DU145 (células de próstata) para determinar el efecto del contacto con células en la expresión de *sub1*.

En estos ensayos se observó un incremento en las intensidades de las bandas de amplificación en parásitos que estuvieron en contacto con las células comparado con los parásitos control (Figura 19).

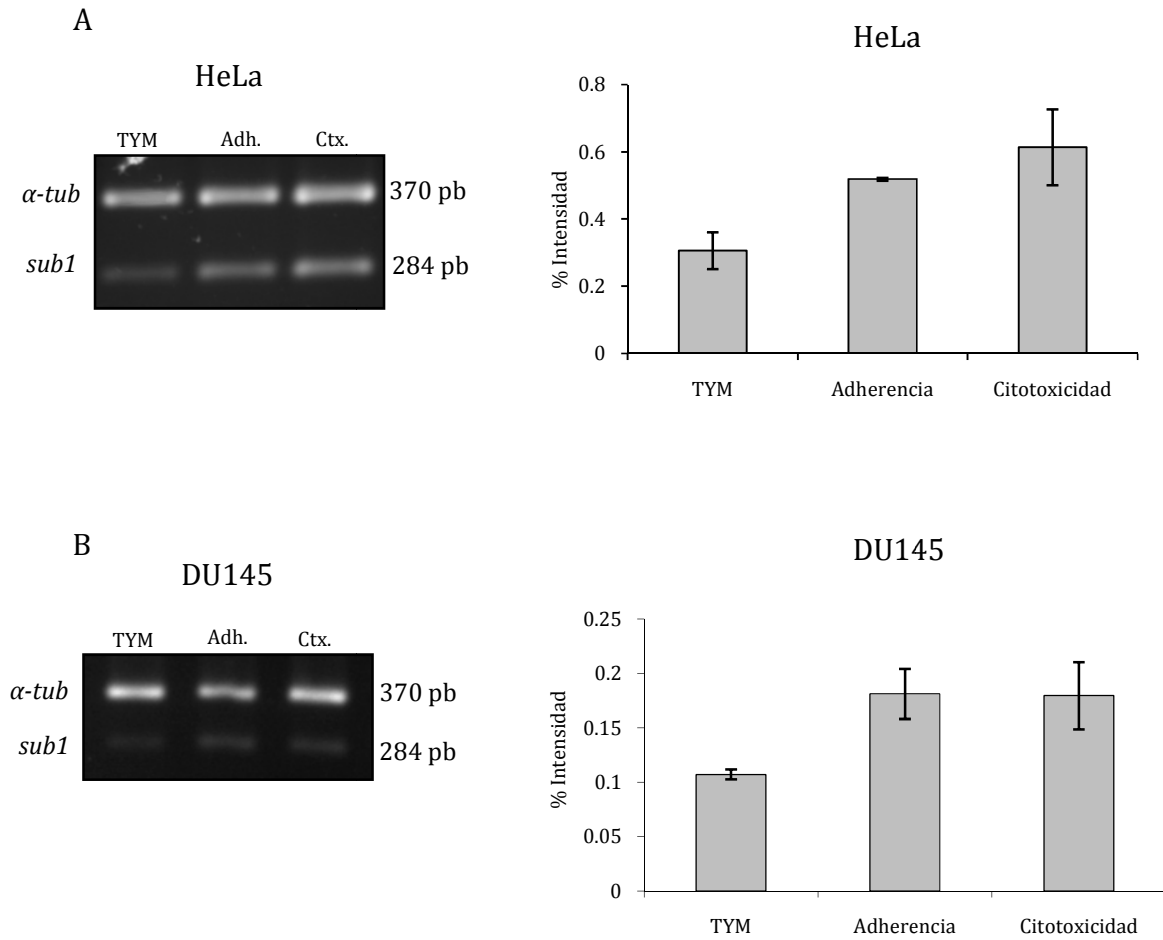


Figura 19. La expresión de *sub1* es regulada por contacto con células. Panel A y B: Productos de amplificación provenientes de las reacciones de RT-PCR de *sub1* y *α-tubulina* utilizando cDNA de parásitos crecidos en medio TYM y en contacto con células HeLa y DU145 (Adh: adherencia, Ctx: citotoxicidad). A la derecha de cada gel se muestran las gráficas de la expresión relativa de *sub1* con respecto a *α-tubulina*.

VIII.5. IDENTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN CELULAR DE SUB1

Para identificar la presencia de la proteína SUB1 en extractos totales de *T. vaginalis* y la localización celular, se obtuvo un anticuerpo dirigido contra esta proteína.

Para obtener una proteína recombinante como inmunógeno, se intentó clonar tanto el gen completo de *sub1* como fragmentos de éste en los vectores de expresión pQE30 y pQE60. Aunque se obtuvieron las construcciones deseadas, al intentar expresar la proteína recombinante en distintas cepas de *E. coli* no se lograron obtener los productos deseados (datos no mostrados).

Como alternativa se optó por generar los anticuerpos utilizando como inmunógeno un péptido sintético de 13 residuos, seleccionado con base en su hidrofiliidad (NSETAERKCDFSS, posiciones 484 a la 496 de SUB1) (Figura 20 panel A) lo que incrementa la probabilidad de que se encuentre en la superficie de la proteína (Figura 20 panel B). Para esto último nos apoyamos en el modelo estructural teórico (Figura 20 panel C). Este péptido es específico de SUB1 como lo mostró un análisis de BLAST llevado a cabo en el genoma de *T. vaginalis*. El péptido se sintetizó como un antígeno múltiple de ocho ramas (MAP-8) (Figura 20 panel D)

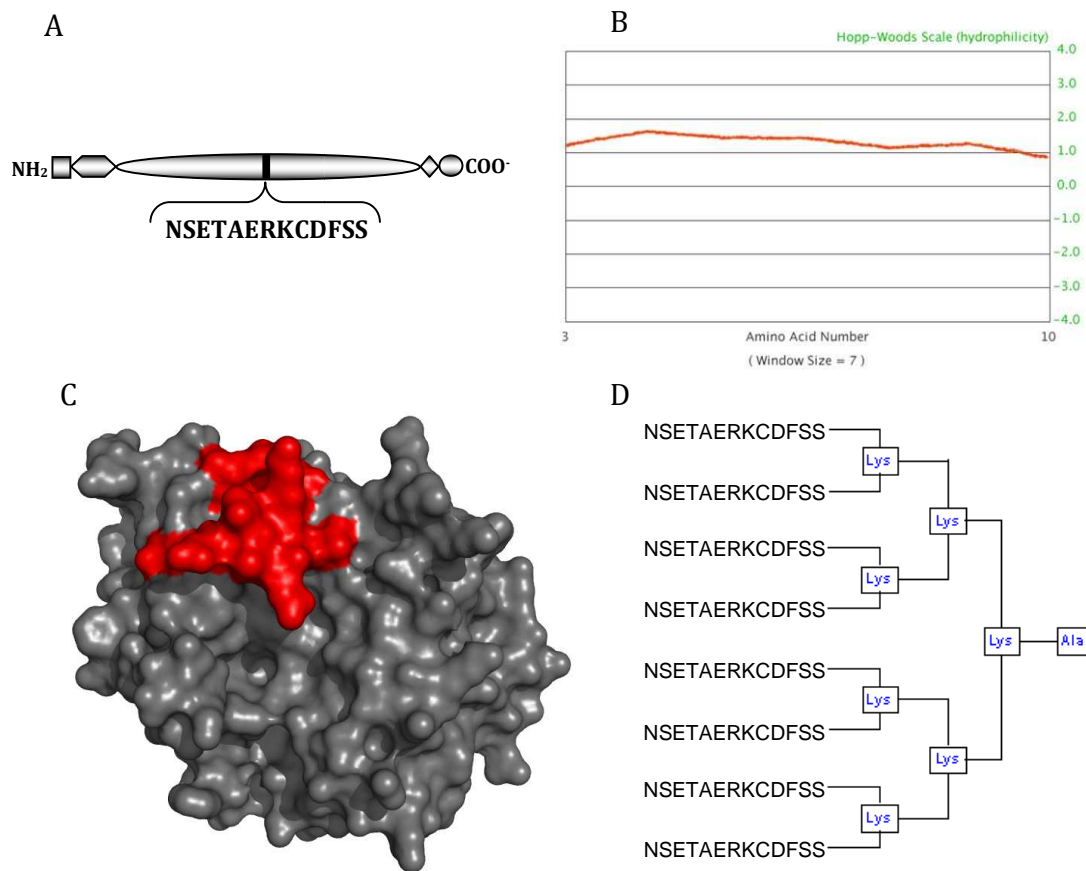


Figura 20. Análisis del péptido de 13 aminoácidos utilizado para la generación de anticuerpos anti-SUB1. Panel A: Localización del péptido en la secuencia lineal de SUB1 (□: péptido señal, ◊: péptido pro, ○: región extracelular ◊: región transmembranal, ○: región intracelular). Panel B: Análisis de hidrofiliidad de Hoop-Woods del péptido seleccionado. Panel C: Modelado de la superficie de SUB1(generado con el programa pymol v 0.99) y localización del péptido seleccionado (rojo) en el modelo teórico de SUB1. Panel C: Representación esquemática del péptido como un antígeno múltiple de ocho ramas utilizado para inmunizar ratones.

En total se inmunizaron 8 ratones con el péptido sintético, pero solamente de uno se obtuvo respuesta inmunológica contra el péptido seleccionado. Una vez generado el anticuerpo, se utilizó como sonda en un ensayo de inmunoelectrotransferencia para la identificación de SUB1 en extractos de proteínas totales de *T. vaginalis*. En este ensayo se utilizó como control negativo el suero preinmune y como control positivo se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-tubulina.

El anticuerpo anti-SUB1 reconoció una banda de ~82 kDa que coincide con el peso molecular teórico de la forma madura de SUB1 (Figura 21).

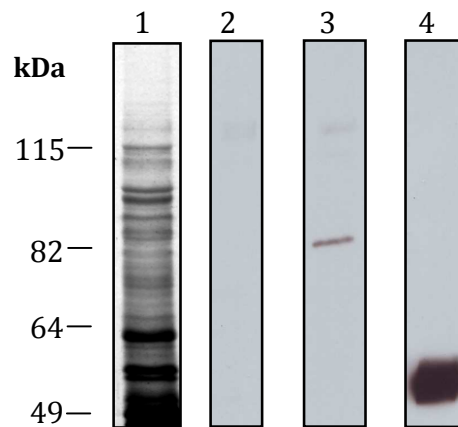


Figura 21. Inmunoelectrotransferencia de proteínas totales de *T. vaginalis* con el anticuerpo anti SUB1. Carril 1: Proteínas totales de *T. vaginalis* teñidas con azul de Coomassie; Carril 2: Inmunoelectrotransferencia de proteínas totales de *T. vaginalis* con el suero preinmune; Carril 3: Inmunoelectrotransferencia de proteínas totales de *T. vaginalis* con anti-SUB1. Carril 4: Inmunoelectrotransferencia de proteínas totales de *T. vaginalis* con anti-tubulina (Control positivo).

Posteriormente se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para determinar la localización celular de SUB1. Estos ensayos se llevaron a cabo tanto en parásitos permeabilizados con Tritón X-100 como en parásitos no permeabilizados, utilizando como sonda el anticuerpo anti-SUB1. Como control negativo se utilizó el suero preinmune y también incubando los parásitos únicamente con el anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína.

En parásitos no permeabilizados, la fluorescencia se observó principalmente en la superficie, aunque no de una manera uniforme ya que en uno de los polos del parásito se observaron zonas en donde la fluorescencia era más intensa. En parásitos permeabilizados, además de la señal en la membrana se observaron puntos dispersos a través de los parásitos, lo que sugiere la presencia de vesículas en el citoplasma (Figura 22). No se observó señal de fluorescencia cuando los parásitos tanto

permeabilizados como no permeabilizados se incubaron con suero pre-inmune o unicamente con el anticuerpo secundario.

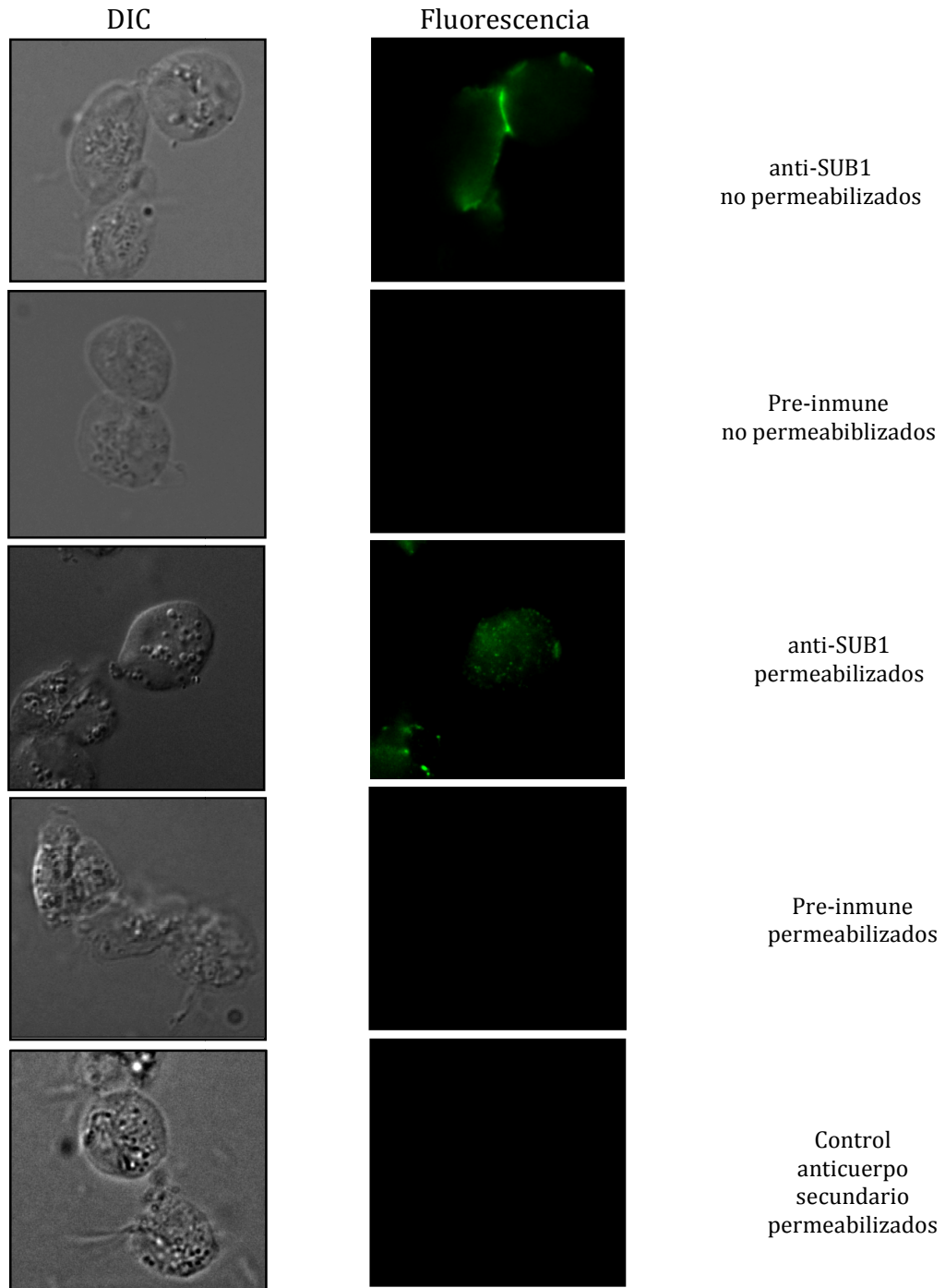
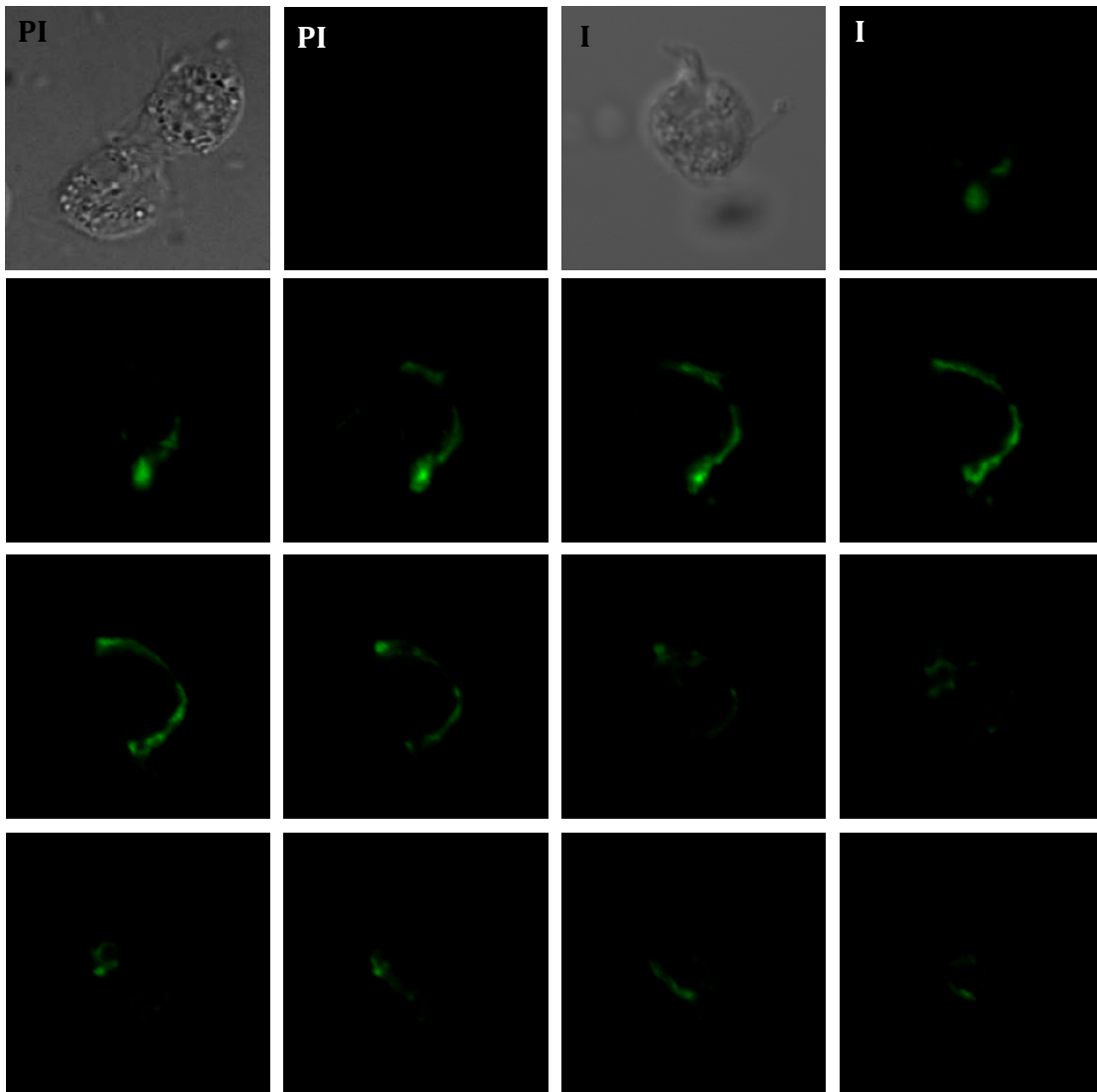


Figura 22. Inmunolocalización de SUB1. Ensayo de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-SUB1 en parásitos no permeabilizados y permeabilizados. Los parásitos se observaron con el objetivo 100X. DIC: Microscopía de interferencia y contraste de fases.

Para averiguar si la señal de SUB1 observada en la superficie de los parásitos estaba focalizada en una zona de la membrana y corroborar la señal observada en el citoplasma, se llevó a cabo un análisis por microscopía confocal tanto de parásitos permeabilizados como de parásitos no permeabilizados (Figura 23).

A



Mediante esta técnica se observó que en parásitos no permeabilizados la señal se localiza en la membrana y está focalizada hacia uno de los polos del parásito. La señal no está distribuida uniformemente ya que al avanzar los planos de corte se observa la aparición y la desaparición de la fluorescencia en la superficie celular.

B

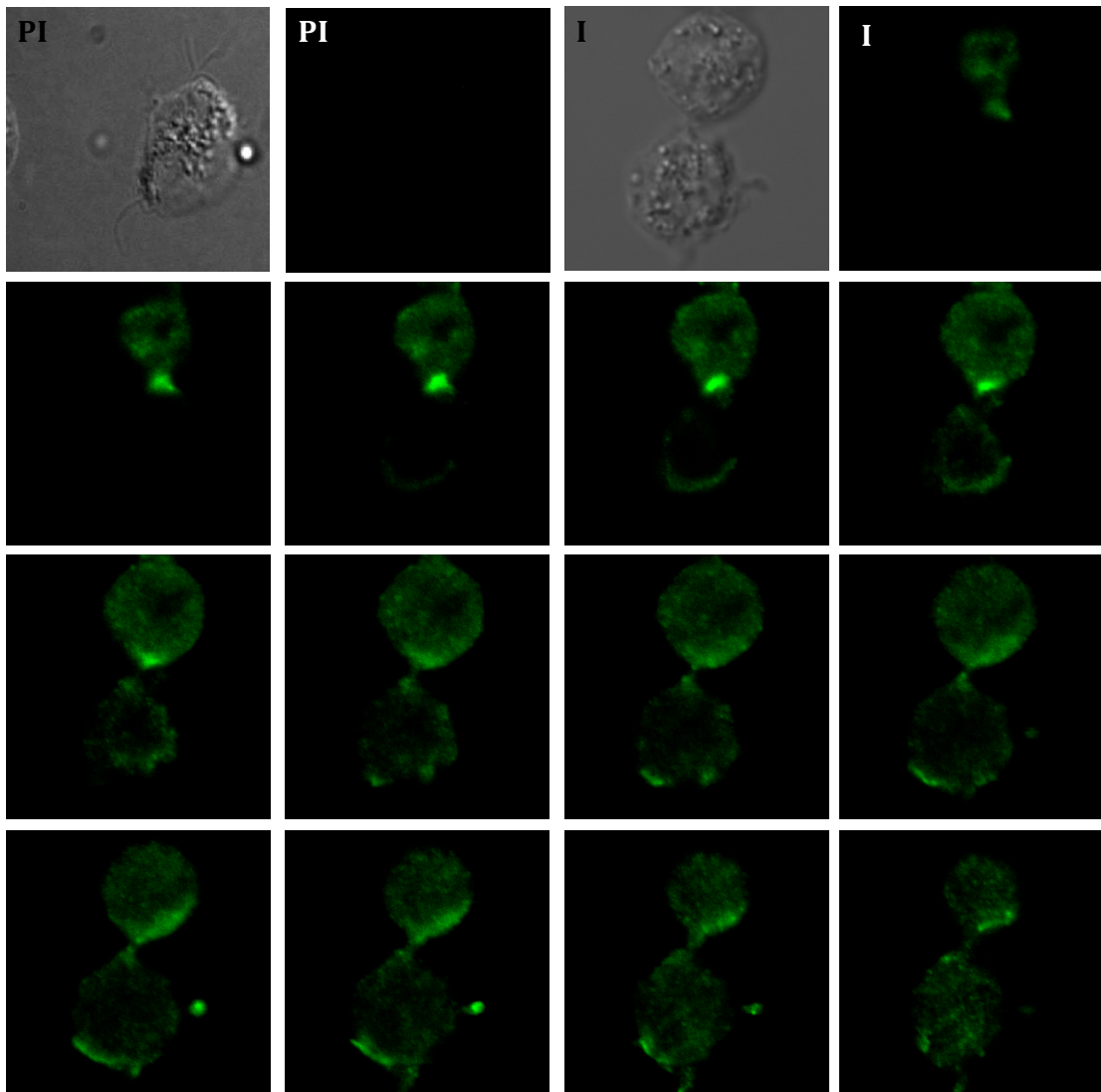


Figura 23. Microscopía confocal de *T. vaginalis* con el anticuerpo anti-SUB1. Panel A: Parásitos no permeabilizados, en estos la señal de fluorescencia se observa sólo en la membrana plasmática. Panel B: Parásitos permeabilizados, en los cuales además de la señal en la membrana se observa señal

en el citoplasma. Los parásitos se observaron con el objetivo de 60X. PI: control de suero pre-inmune. I: Suero Inmune

En parásitos permeabilizados se observó señal de fluorescencia tanto de manera polarizada en la superficie como de manera punteada en el interior del parásito, corroborando la observación de la presencia de SUB1 en vesículas en el citoplasma de *T. vaginalis*.

VIII.6. ACTIVIDAD BIOQUÍMICA DE PROTEASAS DE SERINA

Para determinar la presencia de proteasas de tipo serina en extractos totales de *T.vaginalis*, se llevaron a cabo ensayos de actividad en geles de acrilamida copolimerizada con gelatina y albúmina sérica bovina (BSA) como sustratos. Es importante mencionar que debido a la abundancia de proteasas de cisteína en *T. vaginalis*, la detección de proteasas de otros tipos incluídas las de serina es difícil, por lo que para observar la actividad de SUB1 fue necesario probar diferentes condiciones.

Conociendo que a pH's ácidos se favorece la activación se proteasas de tipo cisteína, se decidió activar los geles a pH 7.4 en amortiguador TB, el cual contiene CaCl_2 (como fuente de calcio ya que las subtilisinas son calcio-dependientes) y DTT (necesario para reconstituir los puentes disulfuro).

Se llevaron a cabo cinéticas de digestión sin inhibidores y con inhibidores de proteasas de cisteína (E64) utilizando tanto gelatina como BSA como sustratos. Estos ensayos permitieron determinar con cuál sustrato se podían resolver mejor las bandas de actividad proteolítica (Figura 24). Los resultados muestran que la gelatina

es mejor sustrato tanto para las proteasas totales de *T. vaginalis* como para las proteasas resistentes al inhibidor E64 que la BSA (Figura 24).

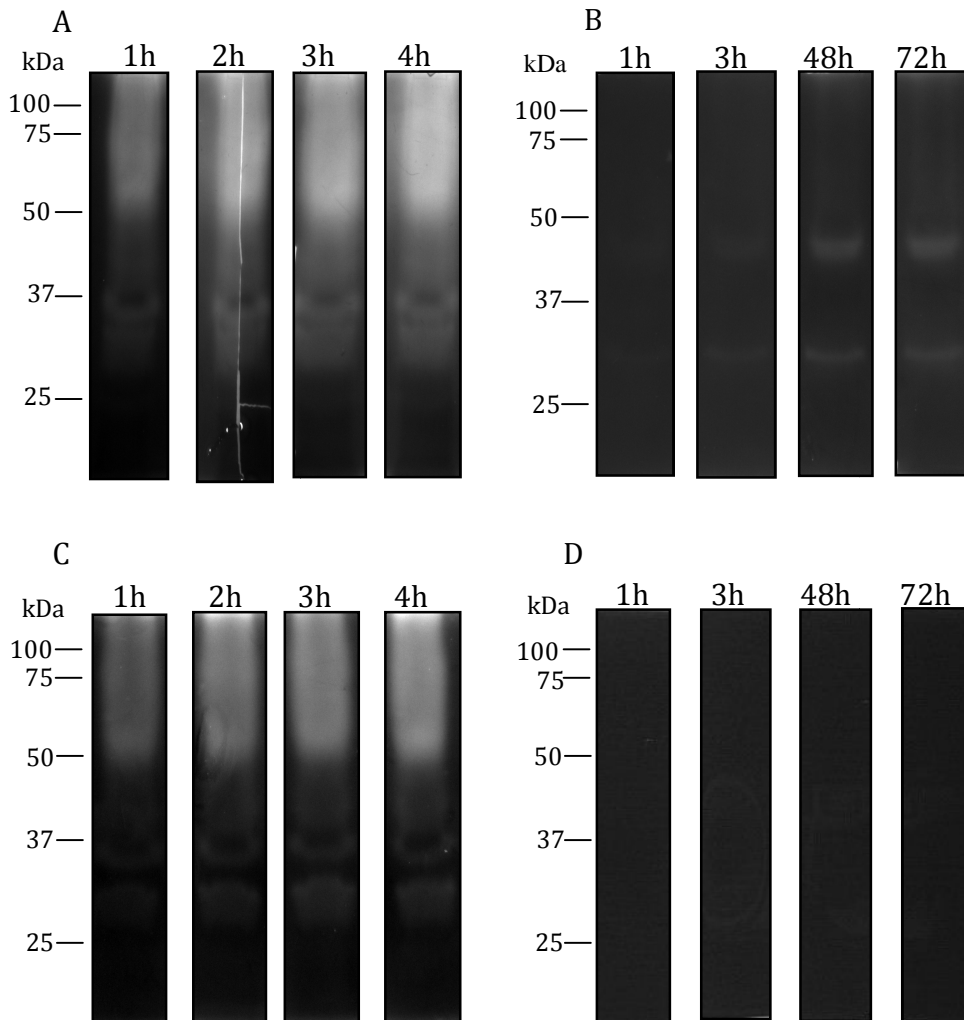


Figura 24. Cinéticas de digestión de gelatina y BSA copolimerizas en geles de acrilamida por proteasas de *T. vaginalis*. Panel A: Cinética de 4 horas de digestión de gelatina por proteasas totales de *T. vaginalis*. Panel B: Cinética de 72 horas de digestión de gelatina por proteasas totales de *T. vaginalis* tratadas con el inhibidor para proteasas de cisteína E64. Panel C: Cinética de 4 horas de digestión de BSA por proteasas totales de *T. vaginalis*. Panel D: Cinética de de 72 horas de digestión de BSA por proteasas totales de *T. vaginalis* tratadas con el inhibidor para proteasas de cisteína E64.

Cabe mencionar que cuando los extractos se trataron con el inhibidor para proteasas de cisteína E64, en los geles que contenían gelatina se observaron bandas

de actividad tenue a las 3 horas (Figura 24 panel B), mientras que en los que contenían BSA no se observó ninguna banda de actividad (Figura 24 panel D), contrario a lo que se observa con los dos sustratos digeridos con extractos totales sin inhibidor, en donde a las dos horas se observa una digestión considerable de ambos sustratos (Figura 24 paneles A y C). Al incubar más tiempo los geles que contenían gelatina en donde se cargaron los extractos tratados con el inhibidor de proteasas de cisteína E64, a las 48 y 72 horas se logran observar bandas bien definidas de actividad residual. En el caso de los geles que contienen BSA no se observaron bandas de actividad ni a las 48 ni a las 72 horas de incubación. Con base en estos resultados se optó por utilizar gelatina como sustrato para detectar actividad de proteasas de tipo serina.

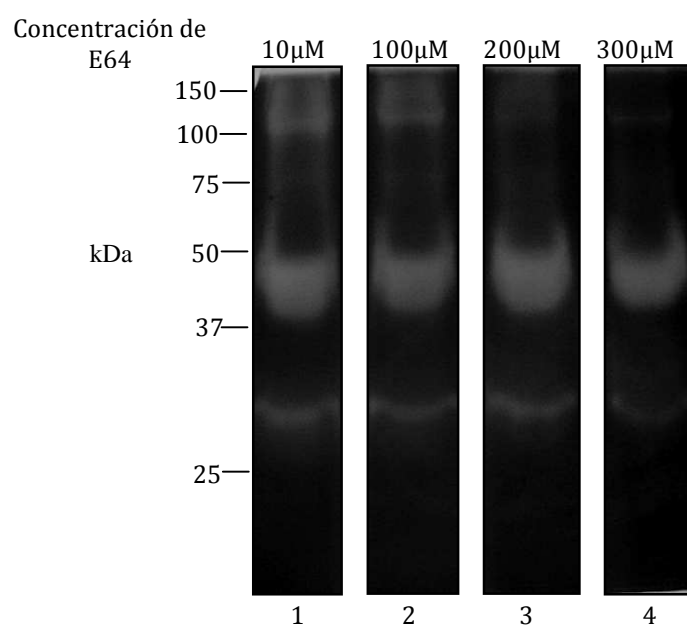


Figura 25. Influencia de la concentración del inhibidor de proteasas de cisteína E64 en extractos totales de *T. vaginalis*. Carril 1: Extractos totales+10 μM de E64, Carril 2: Extractos totales+100 μM de E64, Carril 3: Extractos totales+200 μM de E64, Carril 4: Extractos totales+300 μM de E64.

Posteriormente se evaluó el efecto de concentraciones crecientes del inhibidor irreversible de proteasas de cisteína (E64) en los extractos totales para descartar que la actividad residual observada se debiera a proteasas de tipo cisteína resistente a bajas concentraciones de E64 (Figura 25). Los resultados muestran que las bandas de actividad residual no desaparecieron incluso a concentraciones de 300 μM de E64. Cabe mencionar que la concentración efectiva de este inhibidor para proteasas de cisteína es de 1-10 μM . Estos resultados sugieren que las bandas de actividad residual observadas pueden deberse a proteasas de tipo serina.

A continuación se determinó la sensibilidad de las bandas con actividad residual a inhibidores de proteasas de tipo serina. Aunque en el mercado existen varios inhibidores de tipo serina, la mayoría de ellos son muy inestables en soluciones acuosas. Como inhibidor irreversible de proteasas de tipo serina se eligió el AEBSF o Pefabloc, por ser el inhibidor de proteasas de serina más estable en solución acuosa.

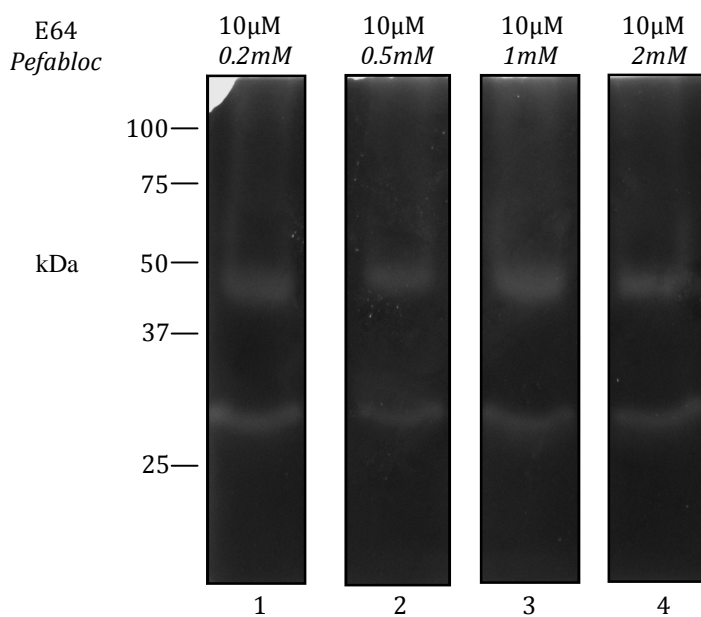


Figura 26. Ensayo de actividad en presencia de 10 μM de E64 y concentraciones bajas de Pefabloc. Carril 1: Extractos totales + 10 μM de E64 + 0.2 mM de Pefabloc, Carril 2: Extractos totales + 10 μM de E64 + 0.5 mM de Pefabloc, Carril 3: Extractos totales + 10 μM de E64 + 1 mM de Pefabloc, Carril 4: Extractos totales + 10 μM de E64 + 2 mM de Pefabloc.

Como una primera aproximación se llevó a cabo un ensayo de actividad con 10 μM del inhibidor de proteasas de cisteína E64 y concentraciones bajas del inhibidor de proteasa de serina pefabloc (0.2 mM, 0.5 mM, 1 mM y 2 mM), a estas concentraciones de pefabloc no se observó inhibición de las bandas residuales resistentes a E64 (Figura 26). Para determinar el efecto de altas concentraciones de Pefabloc sobre las bandas de actividad resistentes a E64 se realizaron geles de actividad en los cuales se varió tanto la concentración de E64 como de Pefabloc (Figura 27).

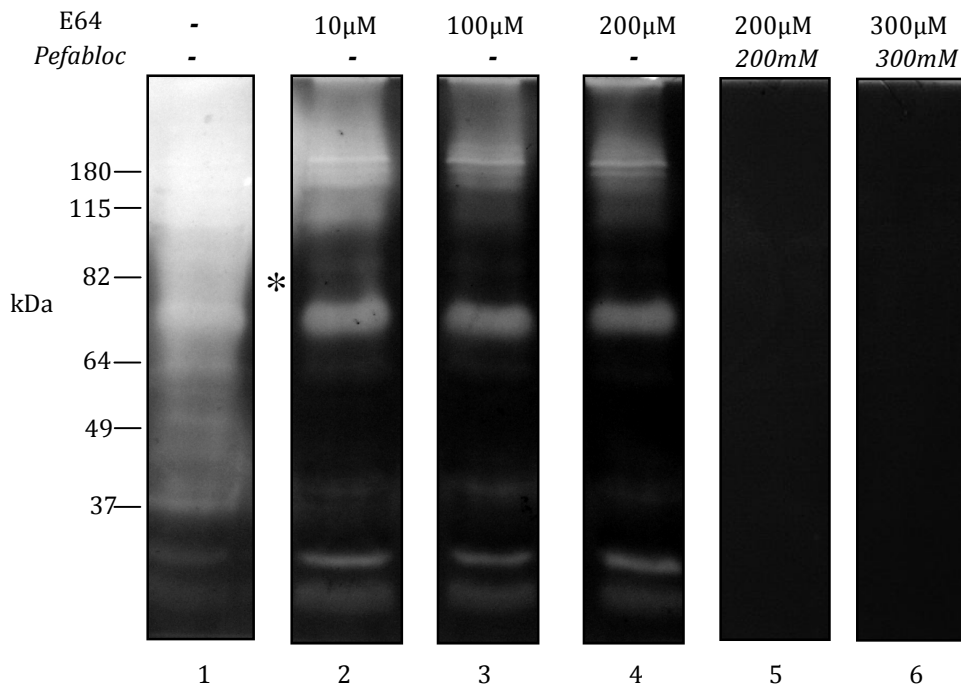


Figura 27. Las bandas resistentes al inhibidor de proteasas de cisteína E64 son inhibidas con altas concentraciones de Pefabloc (inhibidor específico de proteasas de serina). Carril 1: Extractos totales sin inhibidor, Carril 2: Extractos totales + 10 μM de E64, Carril 3: Extractos totales + 100 μM de E64, Carril 4: Extractos totales + 200 μM de E64, Carril 5: Extractos totales + 200 μM de E64 + 200 mM de Pefabloc, Carril 6: Extractos totales + 300 μM de E64 + 300 mM de Pefabloc.

Los resultados de estos experimentos sugieren que las bandas residuales resistentes a E64 se deben a proteasas de serina ya que se observó inhibición de las mismas a concentraciones altas de Pefabloc (200 mM y 300 mM). Un dato importante obtenido de estos ensayos es la detección de una banda de actividad de aproximadamente 82 kDa que concuerda con la banda observada por inmunoelectrotransferencia y podría corresponder a SUB1.

Por otra parte, las bandas de actividad residual de proteasas de serina se observaron en geles que se incubaron de pH 5 a pH 9. La actividad de proteasa de ~82 kDa fue mayor a pH 5 y pH 6 (Figura 28).

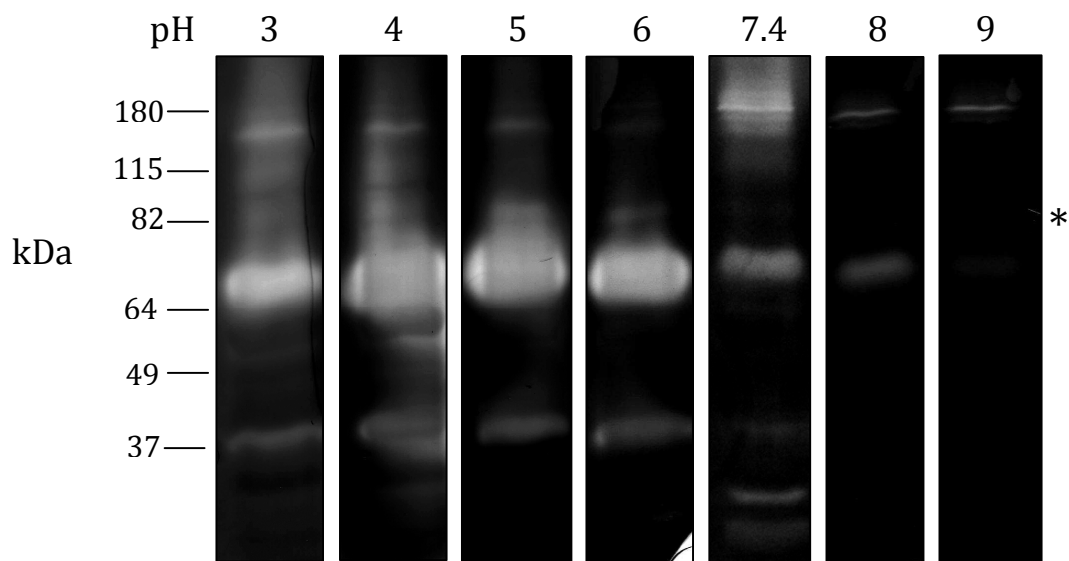


Figura 28. Actividad de proteasas de serina en lisados totales de *T. vaginalis* tratados con 100 μ M de E64. El análisis se hizo en un rango de pH 3 a pH 9.

VIII.7. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SUB1

Para inferir la relación que tiene SUB1 con subtilisinas de otros organismos, se llevó a cabo un análisis filogenético (Figura 29). En el árbol filogenético obtenido se observa que SUB1 (*T. vaginalis**) parece estar más relacionada con subtilisinas de plantas que con subtilisinas de bacterias y otros protozoarios, por lo que es posible que pueda tener funciones similares a aquellas.

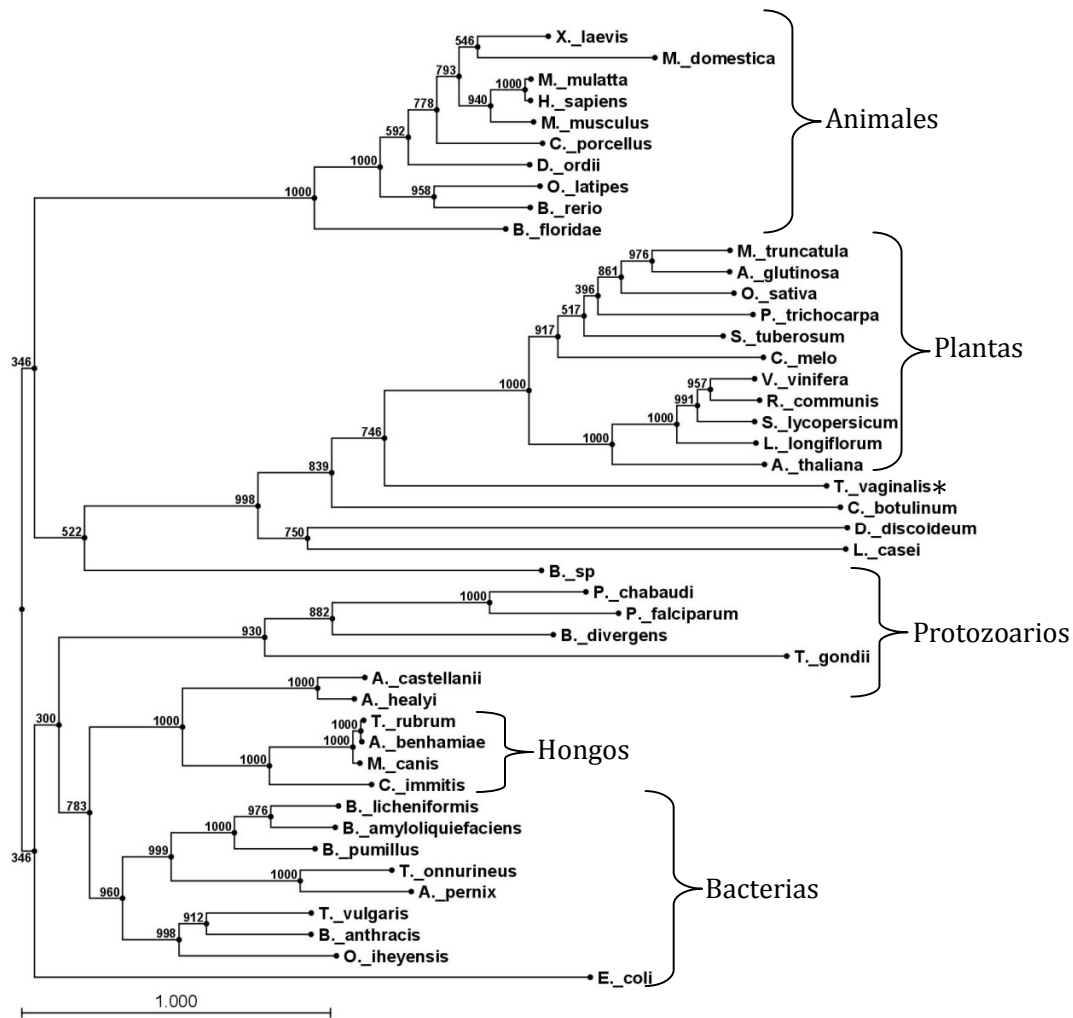


Figura 29. Árbol filogenético construido con secuencias de subtilisinas de diferentes organismos obtenidos de la base de datos MEROPS utilizando el algoritmo de neighbor joining. En los

nodos se muestran los valores de BOOTSTRAP de 1,000 réplicas. Los números de acceso de cada proteína son: *Bacillus licheniformis* (MER000309), *Bacillus pumillus* (MER001755), *Bacillus anthracis* (MER020846), *Thermoactinomyces vulgaris* (MER000333), *Oceanobacillus iheyensis* (MER021983), *Plasmodium falciparum* (MER004690), *Plasmodium chabaudi* (MER049747), *Alnus glutinosa* (MER002779), *Arabidopsis thaliana* (MER015439), *Oriza sativa* (MER019141), *Lilium longiflorum* (MER000363), *Medicago truncatula* (MER063464), *Populus trichocarpa* (MER134612), *Solanum lycopersicum* (MER002760), *Ricinus communis* (MER177246), *Solanum tuberosum* (MER050332), *Vitis vinifera* (MER165001), *Lactobacillus casei* (MER070961), *Homo sapiens* (MER022416), *Dipodomys ordii* (MER158080), *Cavia porcellus* (MER103883), *Brachiostoma floridae* (MER160186), *Brachyodanio rerio* (MER171403), *Macaca mulatta* (MER161661), *Musca domestica* (MER077833), *Mus musculus* (MER022415), *Oryzias latipes* (MER110645), *Xenopus laevis* (MER172800), *Cucumis melo* (MER001561), *Arthroderma benhamiae* (MER054530), *Coccidioides immitis* (MER142327), *Microsporium canis* (MER005078), *Trichophyton rubrum* (MER029350), *Escherichia coli* (MER037258), *Acanthamoeba healyi* (MER006074), *Acanthamoeba castellanii* (MER125416), *Clostridium botulinum* (MER092670), *Dictyostelium discoideum* (MER026564), *Aeropyrum pernix* (MER005707), *Thermococcus onnurineus* (MER145074), *Babesia divergens* (MER087792), *Toxoplasma gondii* (MER028365), *Bacillus sp* (MER016985), *Bacillus amyloliquefaciens* (MER000311).

VIII.8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SUBTILISINAS REPORTADAS EN EL GENOMA DE *T. vaginalis*.

En la base de datos TrichDB donde se encuentra anotado el genoma de *T. vaginalis*, se han reportado 33 genes que codifican para proteasas de serina de tipo subtilisinas, incluyendo el gen que aquí denominamos *sub1*. Sin embargo hasta el momento no se conoce nada acerca de la expresión de los otros 32 genes.

Una diferencia importante entre la secuencia de *sub1* reportada en el genoma de *T. vaginalis* y nuestros datos es que, como se determinó por medio del ensayo de RPA, en nuestras condiciones experimentales *sub1* se transcribe a partir del promotor distal mientras que el gen correspondiente a *sub1* reportado en el genoma (TVAG_090450) está anotado a partir del promotor proximal.

Se llevó a cabo un análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos deducidas de los 33 genes reportados como subtilisinas, y se encontró que únicamente 21 de estos 33 genes anotados en el genoma contenían la triada catalítica y el dominio S8 completo característico de las subtilisinas (Figura 30). De estas 21 subtilisinas, seis tienen un dominio EGF (Epidermal Growth Factor) asociado al

dominio extracelular de proteínas membranales, 19 poseen una hélice transmembranal que podría actuar como un dominio de anclaje a alguna membrana del parásito, tres poseen el dominio asociado a proteasas (PA) y solamente 2 contienen un péptido señal que podría dirigir la proteína hacia alguna ruta secretoria (Figura 30 panel A).

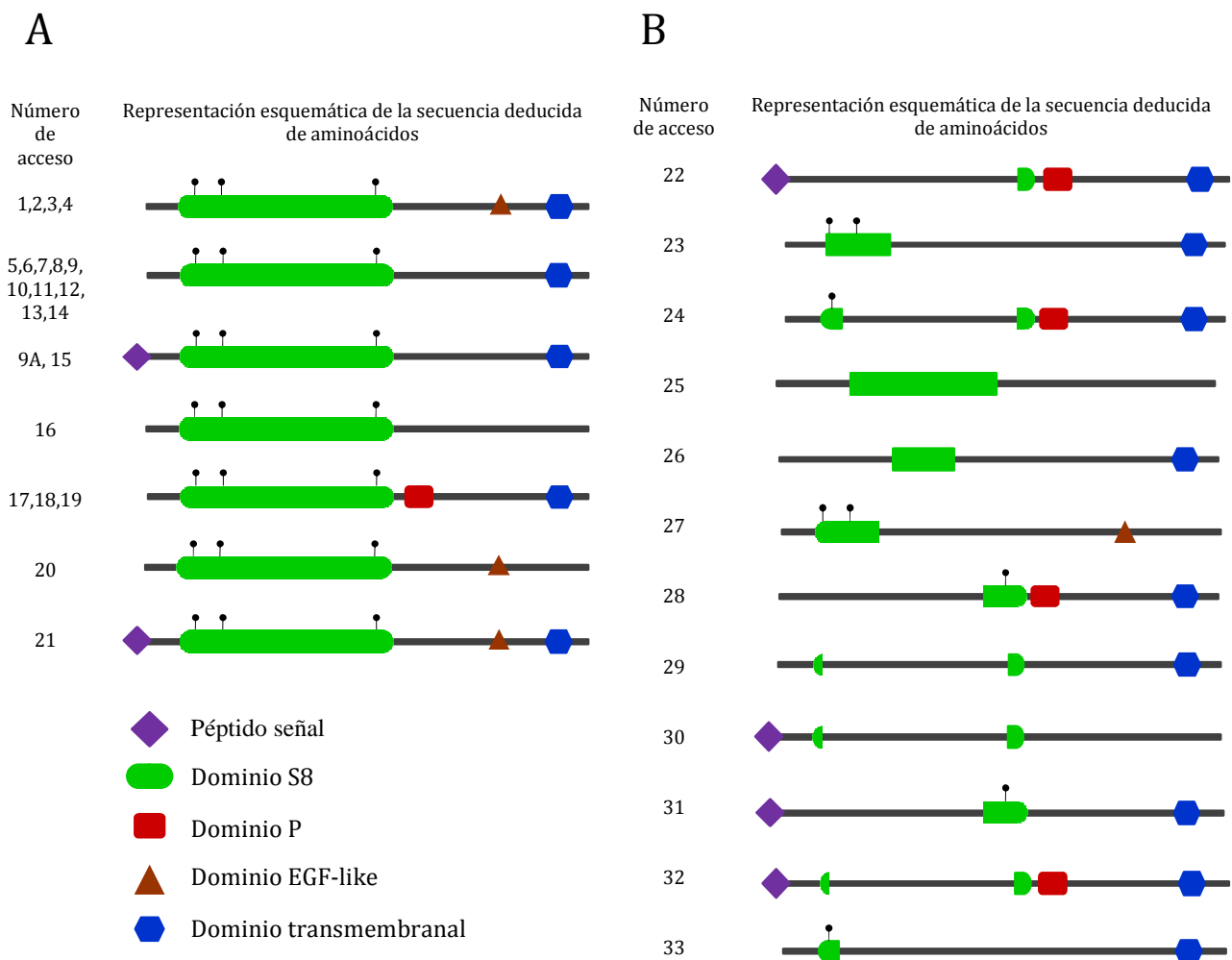


Figura 30. Representación esquemática de los elementos encontrados por análisis bioinformáticos en los 33 genes de subtilisinas reportados en la base de datos TrichDB. Panel A: Genes que poseen la triada catalítica y el dominio S8 completo característico de las subtilisinas. Los números de acceso son: 1: TVAG_124770; 2: TVAG_213290; 3: TVAG_227060; 4: TVAG_379760; 5: TVAG_003700; 6: TVAG_035840; 7: TVAG_045540; 8: TVAG_062550; 9: TVAG_090450; 9A: GenBank FJ384963 (SUB1); 10: TVAG_109360; 11: TVAG_162950; 12: TVAG_230700; 13: TVAG_418990; 14: TVAG_376790; 15: TVAG_054370; 16: TVAG_079860; 17: TVAG_083790; 18: TVAG_103310; 19:

TVAG_161600; 20: TVAG_238680; 21: TVAG_482670. Panel B: Genes anotados como subtilisinas pero que carecen de algun aminoácido de la triada catalítica y no tienen el dominio S8 completo. Los números de acceso son: 22: TVAG_028690; 23: TVAG_035830; 24: TVAG_042330; 25: TVAG_090240; 26: TVAG_142720; 27: TVAG_151300; 28: TVAG_184220; 29: TVAG_270490; 30: TVAG_276930; 31: TVAG_282560; 32: TVAG_321410; 33: TVAG_465250.

Con respecto a los 12 genes restantes (Figura 30 panel B), 6 de ellos no tienen la triada catalítica completa ni el dominio S8A completo y los 6 restantes no tienen ningún aminoácido de la triada catalítica y tienen incompleto el dominio S8A. Al parecer estos genes se anotaron como subtilisinas debido a que tenían una pequeña región similar a éstas. Entre estos genes encontramos proteínas que contienen péptidos señal, dominios PA, EGF y transmembranales, pero es poco probable que estos genes codifiquen para proteínas con actividad de subtilisina

IX. DISCUSIÓN

La degradación enzimática de proteínas es un proceso celular importante. Entre otras funciones, la actividad proteolítica está involucrada en la recuperación de aminoácidos, activación de receptores, en la señalización de la apoptosis, generación de péptidos para la presentación de antígenos, regulación del ciclo celular y coagulación [111].

Los protozoarios parásitos son ricos en proteasas, muchas de ellas involucradas en procesos celulares importantes como el metabolismo, invasión a células huésped, exquistación, citoadherencia, así como en la maduración y activación de otras proteínas [112]. El estudio de las proteasas en protozoarios parásitos y en particular en *T. vaginalis*, se ha enfocado en las proteasas de tipo cisteína, mientras que las proteasas de tipo serina han permanecido poco estudiadas. Sin embargo, datos recientes sugieren que las proteasas de tipo serina pueden jugar papeles importantes en los ciclos de vida de los protozoarios parásitos [113-115].

T. vaginalis es un organismo abundante en proteasas, la mayoría de ellas de tipo cisteína. Se ha reportado que las proteasas de cisteína de *T. vaginalis* CP65, CP39 y CP30, están involucradas en la citoadherencia y la citotoxicidad del parásito hacia las células del epitelio vaginal [92-95]. La CP39 también se ha encontrado en secreciones de pacientes con tricomonosis [92]. Aunado a esto, las proteasas de cisteína de *T. vaginalis* parecen inducir apoptosis en las células del epitelio vaginal [116] y degradar todos los subtipos de inmunoglobulinas [74, 117] contribuyendo así a la evasión de la respuesta inmune por parte del parásito. En contraste, sólo una

proteasa de tipo metalo, probablemente involucrada en el procesamiento de proteínas hidrogenosomales, ha sido caracterizada [98]. Hasta el momento, en *T. vaginalis* las proteasas de tipo serina sólo han sido propuestas con base en análisis bioinformáticos del genoma de este parásito [39].

La familia de las subtilisinas (Clan SB, familia S8A) es una de las familias más grandes de proteasas de serina. Estas proteasas son un antiguo grupo de enzimas dependientes de calcio con un arreglo tridimensional muy conservado y distribuidas ampliamente a través de la evolución [104]. Estas enzimas son funcionalmente diversas y en muchos casos son secretadas, ya sea para actuar extracelularmente o en la ruta secretoria. En las subtilisinas, la triada catalítica está formada por los aminoácidos: aspartato (D), histidina (H) y serina (S). Estos aminoácidos están agrupados en los dominios DSG, HGTH y GTS. En muchos casos, las subtilisinas son sintetizadas como pre-pro-enzimas que después son translocadas a la membrana celular o al retículo endoplásmico vía el péptido señal (pre). Una vez que llegan a su sitio de acción, estas enzimas son activadas mediante el autoprosesamiento del péptido de activación (pro), el cual también funciona como una chaperona intramolecular ayudando a que la enzima madura adquiera el plegamiento adecuado [80, 118].

Por medio de un análisis tipo Southern blot, se determinó que el gen *sub1* es un gen único, aunque se logran distinguir bandas débiles de hibridación adicionales que podrían corresponder a algunos de los otros genes de subtilisinas reportados en el genoma [39]. Mediante un análisis de RPA se identificó el sitio de inicio de la transcripción correcto para el gen *sub1* (Figura 12 panel D), lo que ayudará a corregir

la secuencia del gen y el marco de lectura anotado en la base de datos TrichDB [39]. El ensayo de RPA reveló también que este gen se expresa en niveles bajos. Aunque en nuestras condiciones experimentales se determinó que *sub1* se empieza a transcribir a partir del elemento iniciador distal, no se puede descartar una muy baja expresión desde el elemento iniciador proximal (Figura 12 panel D). Este mapeo es muy importante, ya que si la transcripción iniciara a partir del elemento iniciador proximal, como está anotado en la base de datos del genoma, la proteína traducida carecería de péptido señal lo que tendría un efecto importante en la localización celular de la proteína. Debido a que la transcripción de este gen se inicia a partir del iniciador distal, la proteína tendría un péptido señal de 17 aminoácidos en la región amino terminal, como fue predicho tanto por el análisis de hidrofobicidad como por los análisis bioinformáticos. Este péptido señal tendría la capacidad de dirigir a la proteína ya sea a un compartimiento celular o a la membrana plasmática.

En estudios llevados a cabo con AhSUB, una subtilisina secretada por *Acanthamoeba healyi*, se encontró que el péptido señal es necesario para un tráfico intracelular correcto y la posterior secreción de la proteasa [119]. En subtilisinas de parásitos de la familia apicomplexa, como PfSUB1 de *P. falciparum* y TgSUB1 de *T. gondii*, el péptido señal es probablemente procesado en el retículo endoplásmico durante el transporte secretorio [88, 120].

Los péptidos señal median la translocación de las proteínas secretorias a través de las membranas intracelulares. Aunque los péptidos señal no son altamente conservados, se caracterizan por tener una longitud de 13 a 36 residuos, una región N-terminal cargada, una región H hidrofóbica y una región C-terminal polar neutra

[121, 122]. El péptido señal predicho de SUB1 tiene la longitud y carga correcta para ser funcional.

En los eucariotes, el péptido señal de una proteína precursora naciente sintetizada en el citoplasma se une a una ribonucleoproteína llamada SRP (Signal recognition peptide), la cual dirige al complejo péptido señal-ribosoma-SRP al retículo endoplásmico (RE) a través de un canal transmembranal. Durante el proceso de translocación, el péptido señal de la proteína precursora es procesado por una peptidasa de péptidos señal unida a la membrana del RE. La presencia de un péptido señal sugiere que SUB1 es translocada a la membrana, lo que concuerda con los resultados de la inmunolocalización tanto por microscopía de epifluorescencia como confocal, en los que se observó la localización de SUB1 tanto en la superficie del parásito como en vesículas dispersas en el citoplasma (Figuras 22 y 23).

Aunque especulativo, con base en las propiedades de SUB1, hemos propuesto un modelo para la maduración de esta proteína (Figura 31). SUB1 se empezaría a traducir en el citoplasma, y el péptido señal naciente se uniría a la SRP, después el complejo SUB1-Ribosoma-SRP se uniría al receptor de SRP (SRP-R) el cual está acoplado al canal de integración a la membrana en donde se procesa el péptido señal. Una vez completada la traducción de SUB1, su región transmembranal es translocada lateralmente hacia la membrana del retículo endoplásmico (RE). Posteriormente por medio de transporte vesicular llegaría al aparato de Golgi en donde podría tener modificaciones postraduccionales adicionales para después ser transportada hacia la membrana plasmática. Finalmente, el péptido pro sería procesado en la membrana plasmática para así adquirir la forma madura.

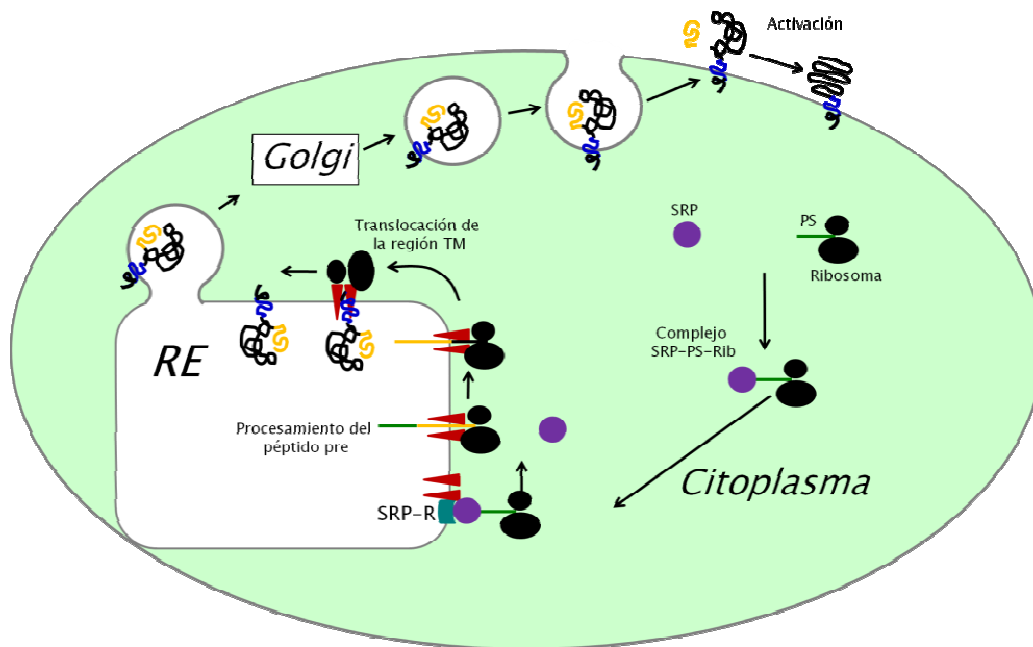


Figura 31. Modelo propuesto para la maduración de SUB1. Se muestra el péptido pre en amarillo y la región transmembranal en azul.

En cuanto a la estructura de las subtilisinas, se ha visto que en varias formas maduras de estas proteasas el residuo de aspartato de la triada catalítica se encuentra usualmente en la posición 32. Debido al tamaño del extremo amino terminal de SUB1, se propone que esta proteasa posee un péptido de activación de 114 aminoácidos. (posiciones 18-131) esencial para la activación de la proteasa. Este péptido de activación funcionaría como una chaperona intramolecular para que la proteína pueda adquirir el plegamiento adecuado una vez que alcance su sitio de acción [118, 123]. Otra característica importante encontrada en SUB1 es la presencia de una probable hélice transmembranal cerca del extremo C terminal.

En los experimentos de inmunoelectrotransferencia se identificó una banda de ~82 kDa reconocida por el anticuerpo anti SUB1. El peso molecular teórico para el precursor de SUB1, incluyendo el péptido pre y pro, es de ~101 kDa. Como se mencionó anteriormente las subtilisinas sufren un proceso de maduración en el que tanto el péptido pre y pro se pierden. El peso molecular estimado para la forma madura de SUB1 sin los péptidos pre y pro es de aproximadamente 85 kDa, que concuerda con la banda observada en las inmunoelectrotransferencias y la banda de actividad sensible a inhibidores de proteasas de serina observada en los zimogramas.

Los análisis bioinformáticos de la secuencia deducida de aminoácidos de SUB1 sugieren que tiene todos los elementos necesarios para ser una proteasa activa. A nivel de la secuencia primaria, el centro catalítico de SUB1 tiene homología con otras subtilasas ya reportadas: SUB1 posee los tres residuos conservados de la triada catalítica conocidos para las subtilisinas (Asp¹⁶³, His²⁰⁸, y Ser⁵⁰⁴) y un residuo de asparagina (Asn³⁰⁹) necesario para la formación del agujero de oxianión [80]. En cuanto al fragmento de 97 aminoácidos presente sólo en SUB1, se ha propuesto que las secuencias o dominios adicionales de las proteasas podrían estar involucradas en la interacción con otras proteínas [78]. El modelo teórico de SUB1 se analizó con el programa ProSA-web, para el reconocimiento de errores en estructuras tridimensionales de proteínas, obteniéndose un valor de z igual a -5.43 (Figura 32), lo que sugiere que el modelo obtenido es una buena aproximación de la estructura real. En el modelo teórico de SUB1 los residuos de la triada catalítica se encuentran en la conformación espacial correcta para llevar a cabo el rompimiento del enlace peptídico, además de que posee otras características estructurales importantes

identificadas en otras subtilasas como son los sitios de unión a calcio y las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ que interactúan con el péptido pro [103, 104].

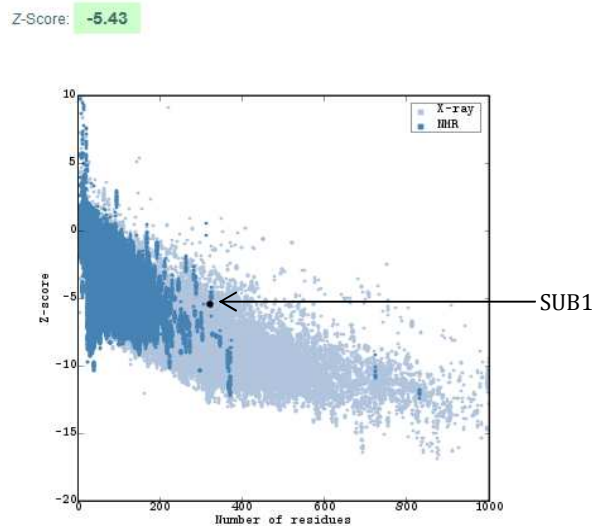


Figura 32. Calidad general del modelo teórico de SUB1 analizado con el programa ProSA. Gráfica obtenida de la comparación del valor de z obtenido para el modelo de SUB1 y los valores de z experimentales de otras subtilisinas obtenidas por cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear.

En los ensayos de actividad para proteasas se detectó una banda de actividad de aproximadamente ~ 82 kDa. La banda de ~ 82 kDa es resistente a altas concentraciones del inhibidor de proteasas de cisteína E64 y sensible al inhibidor de proteasas de serina pefabloc (AEBSF) y concuerda con el peso molecular de la banda observada en los ensayos de inmunoelectrotransferencia, por lo que es probable que corresponda a SUB1. La actividad de esta banda fue mayor a pH 5 y 6, y fue menos evidente a valores de pH altos (Figura 28). Dado que el rango de pH de la cavidad vaginal en mujeres con tricomonosis va de pH 4 a pH 7 [91], la actividad de SUB1 en este rango de pH sugiere que esta proteasa podría ser activa durante la infección. Es posible que SUB1 pueda ser otra proteasa involucrada en promover el desenmascaramiento de adhesinas para facilitar la interacción con las células del

epitelio vaginal, como se ha hipotetizado anteriormente y reportado recientemente [62, 124, 125]. De hecho, las subtilisinas se han propuesto como proteasas procesadoras de proteínas involucradas en la interacción con la célula hospedera en otros protozoarios parásitos [83, 88, 89]. Es importante notar que la expresión de *sub1* se incrementa en parásitos que estuvieron en contacto con células (Figura 19), como se ha descrito para la α -enolasa [110] y para las adhesinas [105]. Estas observaciones son consistentes con la necesidad de la actividad proteolítica superficial de *T. vaginalis* para el desenmascaramiento de adhesinas y la adherencia del parásito a las células epiteliales [62, 126]. Aunque el papel de SUB1 en *T. vaginalis* es desconocido, la localización en la superficie celular podría sugerir un papel en la adherencia y/o citotoxicidad [62, 93, 95, 106]. Si este fuera el caso para SUB1, la diversificación de actividades proteolíticas conferiría al parásito la capacidad de degradar un amplio espectro de sustratos en diferentes condiciones, especialmente debido a que las proteasas de tipo cisteína son activas en ambientes con pH ácido mientras que las subtilisinas son activas a valores de pH presentes en muchos pacientes con trichomonosis.

Por otra parte, el hierro es un nutriente esencial para *T. vaginalis* y regula diferentes aspectos metabólicos [127, 128]. También regula la expresión de factores de patogenicidad involucrados en la citoadherencia como es el incremento en la expresión de adhesinas [108], proteasas y la fosforilación de P270, el mayor inmunógeno de superficie de *T. vaginalis*, que participan en la evasión de la respuesta inmune [75, 129]. Durante el ciclo menstrual la concentración de hierro y el ambiente en la cavidad vaginal está cambiando constantemente. En *T. vaginalis* se ha

descrito un promotor que responde a diferentes concentraciones de hierro en el medio para el gen *ap65-1* [53-55]. Se ha reportado que en la regulación por hierro están involucrados factores de transcripción conocidos como proteínas Myb. En *T. vaginalis* Myb1 se une a secuencias ANAACGAT y ATCG [53] y Myb2 se une a secuencias CGATA y tAtCGTc [54]. Además de estos motivos, tres secuencias ricas en T son importantes para la regulación por hierro (ATTTTT, ATTATT y ATTTTT) [55]. Debido a que se observó que el gen *sub1* incrementa su expresión en parásitos crecidos en alto hierro comparado con bajo hierro, se compararon las regiones río arriba de los genes *ap65-1* y *sub1*. En la región 5' de *sub1* se encontró el motivo ⁻³⁶⁹ATCG⁻³⁶⁶ que puede ser un sitio de unión para la proteína Myb1, ⁻²⁵⁸ACGATA⁻²⁵³ y ⁻⁴⁶⁶TATCGAC⁻⁴⁶⁰ que pueden ser sitios de unión para la proteína Myb2 y tres secuencias ricas en T's (⁻¹⁷⁰ATTATT⁻¹⁶⁵, ⁻²⁰ATTTTT⁻¹⁵ y ⁻¹²ATTTTT⁻⁷) (Figura 32). Aún está pendiente determinar cuáles de los elementos descritos para el gen *ap65-1* están también involucrados en la regulación de la expresión del gen *sub1* bajo diferentes concentraciones de hierro.

```

1      agtaaacaat aactctgtag atatctcttg gcaaaaagata ta[tatcgacg] actgaaagga tgatacccat actaactttg
81     ccaaaatagc aggcatttaa gttcagaaaa tggataataa tcagggcaaa cgctttgat[a_tcg]aatggag tgttcggagt
161    ataaacaaaa tgcgtgaaaa gaatagctgg tatgataaatt acgtatcttt tgatttcaaa gtaaaagggtt gacgaatota
241    aacgggtgtg [acgata]atta acttgcgatt gagacaaaat catgaggagt aatgatttga taagtattaa aggtggtttg
321    tttgttgata tactatga[at_tatt]gtaaca ataatactg catttattaa ttttgctttt gtgcgagtaa agtaatatat
401    taataagccg aatgggatca tggcaatcct tctgttttgt tcatcttcca aaaacgtaag gagcatccct aaaagatcaa
481    agatggcc[at_tttt]ta[attt_t]tttt[ctaaatt]gttttgacaaaaATGTT TTTCATCTGT TTTCCTTCA TTGAAGCAAT

```

Figura 33. Posibles sitios de unión a proteínas Myb y regiones ricas en T en la región 5' de *sub1* que podrían estar participando en la regulación por hierro.

Por otro lado se construyó un árbol filogenético con secuencias de subtilisinas de diferentes organismos en el que se observa la distribución de las subtilisinas en 5 grupos: plantas, animales, hongos, protozoarios y bacterias (Figura 29). Las subtilisinas pueden tener diferentes funciones dependiendo del organismo al que pertenezcan. En animales tienen funciones como proteín convertasas, las cuales procesan precursores de neuropéptidos, hormonas, receptores, enzimas y moléculas de adhesión [130]. En plantas, las subtilisinas están involucradas en la señalización celular y procesamiento de enzimas. Las subtilisinas mejor caracterizadas en plantas son la SDD1 y ALE1 (abnormal leaf shape 1). SDD1 está localizada en la membrana de las células precursoras de los estomas y está involucrada en la generación de señales celulares para prevenir la formación de estomas cercanos. ALE1 promueve la formación de la cutícula activando proteolíticamente otras enzimas [131]. En hongos patógenos de animales, insectos y plantas, las subtilisinas son necesarias para la degradación de los tejidos del hospedero [132, 133], mientras que en protozoarios parásitos están involucradas como factores de virulencia y procesadoras de otras proteínas [87, 90, 134]. Las subtilisinas bacterianas están involucradas principalmente en nutrición, aunque también son factores de virulencia [135, 136].

En el árbol filogenético de subtilisinas, la rama correspondiente a SUB1 de *T. vaginalis* se encuentra en un clade junto con las subtilisinas de plantas (Figura 29). Por lo tanto, es posible que SUB1 tenga funciones celulares similares a las subtilisinas de plantas, reforzando la hipótesis de que SUB1 pueda ser una proteasa procesadora de proteínas de superficie o bien que participe en la señalización celular.

En la base de datos del genoma de *T. vaginalis* (TrichDB) [39], se tienen reportados treinta y tres genes correspondientes a subtilisinas pertenecientes a la familia S8A. El análisis *in silico* llevado a cabo con las secuencias de aminoácidos deducidas de los 33 genes anotados muestran que solo 21 de los 33 genes anotados tienen los tres aminoácidos de la triada catalítica y el dominio S8A completo (Figura 30). De estos 21 genes, la mayoría tienen hélices transmembranales y sólo dos (además de SUB1) tienen péptidos señales. Estas subtilisinas pueden estar relacionadas a las bandas de actividad observadas en la zona de alto peso molecular de los zimogramas (Figuras 25 y 26). De los otros 12 genes anotados como subtilisinas, algunos sólo tienen un residuo de la triada catalítica y fueron clasificados como tales debido a que una pequeña región de la proteína tiene similitud con las subtilisinas (Figura 29 panel B). La expresión, localización y caracterización de los otros 20 genes que codifican para subtilisinas anotados en el genoma de *T. vaginalis* todavía está por determinarse.

Este trabajo es el primer reporte y caracterización experimental de una proteasa de serina en *Trichomonas vaginalis*. SUB1 se localiza tanto en la membrana citoplasmática como en vesículas en el interior del parásito y su expresión es regulada por el contacto con células y por la disponibilidad de hierro en el medio. Dada su localización celular, es posible que participe en el procesamiento de proteínas y activación de proteasas en la superficie celular del parásito durante la adhesión a la célula huésped.

XI. APÉNDICE

- AGAROSA AL 1%.

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

- AGAROSA AL 0.8%

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

- TRIS 1M pH=7.4.

Para 100 ml.
12.114 g de Tris base
100 ml de H₂O bidestilada.
Ajustar el pH a 7.4 con HCl.
Esterilizar.

- EDTA 0.5M pH=7.4.

Para 50 ml.
10.405g de EDTA.
50 ml de H₂O bidestilada.
Ajustar el pH a 7.4 con HCl.
Esterilizar.

- SDS 10%.

Para 100 ml.
10 g de SDS.
Llevar a 100 ml con H₂O bidestilada.
Esterilizar.

- NaOH 10M.

Para 20 ml.
8 g de NaOH.
Llevar a 20 ml con H₂O bidestilada.

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

Para 50 ml.
0.5 ml de Tris 1 M pH 7.4.
0.02ml de EDTA 0.5 M pH 7.4.
Llevar a 50 ml con H₂O bidestilada.
Esterilizar.

- TAE 50X.

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

- TRIS 1M pH=8.

Para 100 ml.
12.114 g de Tris base
100 ml de H₂O bidestilada.
Ajustar el pH a 8.
Esterilizar.

- MEDIO LB LÍQUIDO(100 ml).

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

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

- SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO.

Solución I

Glucosa 50 mM .
Tris pH 8 25 mM
EDTA pH 8 10 mM.
H₂O cbp. 100 ml.
Se preparan 100 ml, y se esterilizan.

Solución II

Para 5 ml
-NaOH 0.2N. 0.1 ml de NaOH 10M
-SDS 1%. 0.5 ml de SDS 10%
 4.4 ml de H₂O

Solución III

Acetato de potasio 5 M	60 ml.
Acido acético glacial	11.5 ml
Agua destilada	28.5 ml.

- MEDIO DE CULTIVO TYM.

Preparar 500 ml.
-Bacto tryptone 10 g.
-Extracto de levadura 5 g.

-Maltosa 2.5 g.
-L-cisteína 0.5 g.
-Acido ascórbico 0.1g.
-KH₂PO₄ 0.4 g.
-K₂HPO₄ 0.4g.
-H₂O 450 ml.

Se ajusta a pH de 6.2 con HCl.

Se ajusta a 500 ml en H₂O

Alicuotar y esterilizar.

Antes de usar agregar 10% de suero de caballo.

- PBS pH 7.4 (1000 ml).

NaCl 8 g.
KCl 0.2 g.
Na₂HPO₄ 1.44 g.
KH₂PO₄ 0.24 g.

Llevar a 1000 ml con agua bidestilada.

- AMORTIGUADOR DE EXTRACCIÓN (100 ml),

-SDS 10% 2 ml.
-NaCl 5M 2 ml.
-EDTA 0.5M pH8 2 ml.
-Tris 1M pH 8 1 ml.
-H₂O 93 ml

- NaCl 5M (50 ml).

-NaCl 14.61 g.
-Llevar a 50 ml con H₂O.

- ACETATO DE SODIO 3M (50 ml).

-CH₃COONa 12.305 g
-Llevar a 50 ml con H₂O.

- SOLUCIÓN DE TRANSFERENCIA (1 M NH₄CH₃CO₂, 1 M NH₄OH, 0.02 N NAOH).

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

- SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN:

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

- 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.
- 16.2 ml de formaldehído al 37% (Concentración final).
- 73 ml de H₂O DEPC.
- 10 ml de amortiguador MOPS/EDTA 10X a Temperatura ambiente.
- Dejar el gel solidificando de 2 ½ a 3 horas (Todo el material debe estar estéril).

AMORTIGUADOR DE ELECTROFORESIS.

Para 800 ml de MOPS/EDTA 1X:

- 80 ml de MOPS/EDTA 1X.
- 720 ml de H₂O DEPC

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA.

- SSC 10X en agua-DEPC.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS 1.2 M:

- 8.51 g de NaH₂PO₄ disolver en 100 ml de agua DEPC y esterilizar.

AMORTIGUADOR A:

-294 µl de amortiguador MOPS (0.5M)/EDTA (0.01M) pH 7.0. 10X
-706 µl de agua DEPC

BROMURO DE ETIDIO EN AGUA-DEPC-

-250 ml de agua-DEPC
-5 ml de solución stock de bromuro de etidio.

COLORANTES

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

AMORTIGUADOR DE CARGA

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

AMORTIGUADOR DE ELECTROFORESIS (Northern):

Para 800 ml de MOPS/EDTA 1X:
-80 ml de MOPS/EDTA 10X.
-720 ml de H₂O DEPC

AMORTIGUADOR DE CARGA PARA RNA 6X (5 ml).

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

- SOLUCIONES PARA LA HIBRIDACIÓN EN COLONIA.

NaOH 0.5 N; NaCl 1.5 N

5 ml de NaOH 10 N.
30 ml de NaCl 5N
Llevar a 100 ml con H₂O bidestilada.

TRIS 0.5 M pH 7.4; NaCl 1.5 M.

30 ml de NaCl 5M
50 ml de Tris 1M pH 7.4
Llevar a 100 ml con H₂O 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 H₂O bidestilada.

- MEDIO SOC.

Para 10 ml.

10 ml de medio SOB.

200 µl de glucosa 1M.

X. REFERENCIAS

1. Johnston VJ, Mabey DC: **Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis***. *Curr Opin Infect Dis* 2008, **21**(1):56-64.
2. Lehker MW, Alderete JF: **Biology of trichomonosis**. *Curr Opin Infect Dis* 2000, **13**(1):37-45.
3. Cotch MF, Pastorek JG, Nugent RP, Hillier SL, Gibbs RS, Martin DH, Eschenbach DA, Edelman R, Carey JC, Regan JA *et al*: ***Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group**. *Sex Transm Dis* 1997, **24**(6):353-360.
4. Viikki M, Pukkala E, Nieminen P, Hakama M: **Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia**. *Acta Oncol* 2000, **39**(1):71-75.
5. Hobbs MM, Kazembe P, Reed AW, Miller WC, Nkata E, Zimba D, Daly CC, Chakraborty H, Cohen MS, Hoffman I: ***Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawian men**. *Sex Transm Dis* 1999, **26**(7):381-387.
6. Laga M, Manoka A, Kivuvu M, Malele B, Tuliza M, Nzila N, Goeman J, Behets F, Batter V, Alary M: **Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study**. *AIDS* 1993, **7**(1):95-102.
7. Cohen J: **HIV transmission. AIDS researchers look to Africa for new insights**. *Science* 2000, **287**(5455):942-943.
8. Kissinger P, Amedee A, Clark RA, Dumestre J, Theall KP, Myers L, Hagensee ME, Farley TA, Martin DH: ***Trichomonas vaginalis* treatment reduces vaginal HIV-1 shedding**. *Sex Transm Dis* 2009, **36**(1):11-16.
9. Kissinger P, Secor WE, Leichter JS, Clark RA, Schmidt N, Curtin E, Martin DH: **Early repeated infections with *Trichomonas vaginalis* among HIV-positive and HIV-negative women**. *Clin Infect Dis* 2008, **46**(7):994-999.
10. McClelland RS, Sangare L, Hassan WM, Lavreys L, Mandaliya K, Kiarie J, Ndinya-Achola J, Jaoko W, Baeten JM: **Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition**. *J Infect Dis* 2007, **195**(5):698-702.
11. Van Der Pol B, Kwok C, Pierre-Louis B, Rinaldi A, Salata RA, Chen PL, van de Wijgert J, Mmiro F, Mugerwa R, Chipato T *et al*: ***Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women**. *J Infect Dis* 2008, **197**(4):548-554.
12. Sutcliffe S, Alderete JF, Till C, Goodman PJ, Hsing AW, Zenilman JM, De Marzo AM, Platz EA: **Trichomonosis and subsequent risk of prostate cancer in the Prostate Cancer Prevention Trial**. *Int J Cancer* 2009, **124** (9): 2082-7.
13. Sutcliffe S, Alderete JF, Till C, Goodman PJ, Hsing AW, Zenilman JM, De Marzo AM, Platz EA: **Trichomonosis and subsequent risk of prostate cancer in the Prostate Cancer Prevention Trial**. *Int J Cancer* 2009, **124**(9):2082-2087.

14. Garber GE: **The laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis***. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005, **16**(1):35-38.
15. Gardner WA, Jr., Culberson DE, Bennett BD: ***Trichomonas vaginalis* in the prostate gland**. *Arch Pathol Lab Med* 1986, **110**(5):430-432.
16. Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G: **Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis***. *Clin Microbiol Rev* 1998, **11**(2):300-317.
17. Kulda J, Tachezy J, Cerkasovova A: ***In vitro* induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis***. *J Eukaryot Microbiol* 1993, **40**(3):262-269.
18. Quon DV, d'Oliveira CE, Johnson PJ: **Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis***. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(10):4402-4406.
19. Heine P, McGregor JA: ***Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen**. *Clin Obstet Gynecol* 1993, **36**(1):137-144.
20. 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**(5):985-987.
21. Nanda N, Michel RG, Kurdgelashvili G, Wendel KA: **Trichomoniasis and its treatment**. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006, **4**(1):125-135.
22. 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**(11):3205-3210.
23. Shaio MF, Lin PR, Liu JY: **Colorimetric one-tube nested PCR for detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal discharge**. *J Clin Microbiol* 1997, **35**(1):132-138.
24. Honigberg BM: **Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby**. *J Protozool* 1963, **10**:20-63.
25. Nadler SA, Honigberg BM: **Genetic differentiation and biochemical polymorphism among trichomonads**. *J Parasitol* 1988, **74**(5):797-804.
26. Embley TM, Hirt RP: **Early branching eukaryotes?**. *Curr Opin Genet Dev* 1998, **8**(6):624-629.
27. Germot A, Philippe H: **Critical analysis of eukaryotic phylogeny: a case study based on the HSP70 family**. *J Eukaryot Microbiol* 1999, **46**(2):116-124.
28. Katiyar SK, Visvesvara GS, Edlind TD: **Comparisons of ribosomal RNA sequences from amitochondrial protozoa: implications for processing, mRNA binding and paromomycin susceptibility**. *Gene* 1995, **152**(1):27-33.
29. Viscogliosi E, Muller M: **Phylogenetic relationships of the glycolytic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, from parabasalid flagellates**. *J Mol Evol* 1998, **47**(2):190-199.
30. Roger AJ, Sandblom O, Doolittle WF, Philippe H: **An evaluation of elongation factor 1 alpha as a phylogenetic marker for eukaryotes**. *Mol Biol Evol* 1999, **16**(2):218-233.
31. Edgell DR, Malik SB, Doolittle WF: **Evidence of independent gene duplications during the evolution of archaeal and eukaryotic family B DNA polymerases**. *Mol Biol Evol* 1998, **15**(9):1207-1217.

32. Mertens E, Ladorf US, Lee JA, Miretsky A, Morris A, Rozario C, Kemp RG, Muller M: **The pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of the protist, *Trichomonas vaginalis*, and the evolutionary relationships of protist phosphofructokinases.** *J Mol Evol* 1998, **47**(6):739-750.
33. Hashimoto T, Sanchez LB, Shirakura T, Muller M, Hasegawa M: **Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(12):6860-6865.
34. Dacks JB, Walker G, Field MC: **Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists.** *Parasitol Int* 2008, **57**(2):97-104.
35. Lehker MW, Chang TH, Dailey DC, Alderete JF: **Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*.** *J Exp Med* 1990, **171**(6):2165-2170.
36. Benchimol M, de Souza W: **Carbohydrate involvement in the association of a prokaryotic cell with *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*.** *Parasitol Res* 1995, **81**(6):459-464.
37. Bricheux G, Brugerolle G: **Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences.** *FEMS Microbiol Lett* 1997, **153**(1):205-213.
38. Espinosa N, Hernandez R, Lopez-Griego L, Arroyo R, Lopez-Villasenor I: **Differences between coding and non-coding regions in the *Trichomonas vaginalis* genome: an actin gene as a locus model.** *Acta Trop* 2001, **78**(2):147-154.
39. Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UC, Besteiro S *et al*: **Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*.** *Science* 2007, **315**(5809):207-212.
40. Honigberg BM, King VM: **Structure of *Trichomonas vaginalis* Donn'e.** *J Parasitol* 1964, **50**:345-364.
41. Wang AL, Wang CC: **Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*.** *Mol Biochem Parasitol* 1985, **14**(3):323-335.
42. Riley DE, Campbell LA, Puolakkainen M, Krieger JN: ***Trichomonas vaginalis* and early evolving DNA and protein sequences of the CDC2/28 protein kinase family.** *Mol Microbiol* 1993, **8**(3):517-519.
43. Brugerolle G: **Ultrastructure of the genus *Enteromonas* da Fonseca (Zoomastigophorea) and revision of the order of Diplomonadida Wenyon.** *J Protozool* 1975, **22**(4):468-475.
44. Riley DE, Krieger JN, Miner D, Rabinovitch PS: ***Trichomonas vaginalis*: dominant G2 period and G2 phase arrest in a representative of an early branching eukaryotic lineage.** *J Eukaryot Microbiol* 1994, **41**(4):408-414.
45. Lau AO, Smith AJ, Brown MT, Johnson PJ: ***Trichomonas vaginalis* initiator binding protein (IBP39) and RNA polymerase II large subunit carboxy terminal domain interaction.** *Mol Biochem Parasitol* 2006, **150**(1):56-62.
46. Schumacher MA, Lau AO, Johnson PJ: **Structural basis of core promoter recognition in a primitive eukaryote.** *Cell* 2003, **115**(4):413-424.

47. Liston DR, Lau AO, Ortiz D, Smale ST, Johnson PJ: **Initiator recognition in a primitive eukaryote: IBP39, an initiator-binding protein from *Trichomonas vaginalis*.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(22):7872-7882.
48. Liston DR, Johnson PJ: **Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**(3):2380-2388.
49. Quon DV, Delgadillo MG, Khachi A, Smale ST, Johnson PJ: **Similarity between a ubiquitous promoter element in an ancient eukaryote and mammalian initiator elements.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(10):4579-4583.
50. Espinosa N, Hernandez R, Lopez-Griego L, Lopez-Villaseñor I: **Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs.** *Gene* 2002, **289**(1-2):81-86.
51. O'Brien JL, Lauriano CM, Alderete JF: **Molecular characterization of a third malic enzyme-like AP65 adhesin gene of *Trichomonas vaginalis*.** *Microb Pathog* 1996, **20**(6):335-349.
52. Engbring JA, Alderete JF: **Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains.** *Microbiology* 1998, **144** (Pt **11**):3011-3018.
53. Ong SJ, Hsu HM, Liu HW, Chu CH, Tai JH: **Multifarious transcriptional regulation of adhesion protein gene ap65-1 by a novel Myb1 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*.** *Eukaryot Cell* 2006, **5**(2):391-399.
54. Ong SJ, Hsu HM, Liu HW, Chu CH, Tai JH: **Activation of multifarious transcription of an adhesion protein ap65-1 gene by a novel Myb2 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*.** *J Biol Chem* 2007, **282**(9):6716-6725.
55. Ong SJ, Huang SC, Liu HW, Tai JH: **Involvement of multiple DNA elements in iron-inducible transcription of the ap65-1 gene in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*.** *Mol Microbiol* 2004, **52**(6):1721-1730.
56. Hsu HM, Ong SJ, Lee MC, Tai JH: **Transcriptional regulation of an iron-inducible gene by differential and alternate promoter entries of multiple Myb proteins in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*.** *Eukaryot Cell* 2009, **8**(3):362-372.
57. Solano-Gonzalez E, Burrola-Barraza E, Leon-Sicairos C, Avila-Gonzalez L, Gutierrez-Escolano L, Ortega-Lopez J, Arroyo R: **The trichomonad cysteine proteinase TVCP4 transcript contains an iron-responsive element.** *FEBS Lett* 2007, **581**(16):2919-2928.
58. Lahti 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, **174**(21):6822-6830.
59. 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, **87**(16):6097-6101.

60. Bozner P: **The heat shock response and major heat shock proteins of *Tritrichomonas mobilensis* and *Tritrichomonas augusta*.** *J Parasitol* 1996, **82**(1):103-111.
61. Delgado-Viscogliosi P, Brugerolle G, Viscogliosi E: **Tubulin post-translational modifications in the primitive protist *Trichomonas vaginalis*.** *Cell Motil Cytoskeleton* 1996, **33**(4):288-297.
62. Arroyo R, Alderete JF: ***Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells.** *Infect Immun* 1989, **57**(10):2991-2997.
63. Moreno-Brito V, Yanez-Gomez C, Meza-Cervantez P, Avila-Gonzalez L, Rodriguez MA, Ortega-Lopez J, Gonzalez-Robles A, Arroyo R: **A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron.** *Cell Microbiol* 2005, **7**(2):245-258.
64. Arroyo R, Gonzalez-Robles A, Martinez-Palomo A, Alderete JF: **Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence.** *Mol Microbiol* 1993, **7**(2):299-309.
65. Furtado MB, Benchimol M: **Observation of membrane fusion on the interaction of *Trichomonas vaginalis* with human vaginal epithelial cells.** *Parasitol Res* 1998, **84**(3):213-220.
66. Garber GE, Lemchuk-Favel LT, Bowie WR: **Isolation of a cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*.** *J Clin Microbiol* 1989, **27**(7):1548-1553.
67. Garber GE, Lemchuk-Favel LT: **Characterization and purification of extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*.** *Can J Microbiol* 1989, **35**(10):903-909.
68. Krieger JN, Poisson MA, Rein MF: **Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence.** *Infect Immun* 1983, **41**(3):1291-1295.
69. Dailey DC, Chang TH, Alderete JF: **Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis.** *Parasitology* 1990, **101 Pt 2**:171-175.
70. Garber GE, Lemchuk-Favel LT: **Association of production of cell-detaching factor with the clinical presentation of *Trichomonas vaginalis*.** *J Clin Microbiol* 1990, **28**(11):2415-2417.
71. Fiori PL, Rappelli P, Rocchigiani AM, Cappuccinelli P: ***Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes.** *FEMS Microbiol Lett* 1993, **109**(1):13-18.
72. Pindak FF, Mora de Pindak M, Gardner WA, Jr.: **Contact-independent cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis*.** *Genitourin Med* 1993, **69**(1):35-40.
73. Fiori PL, Rappelli P, Addis MF, Mannu F, Cappuccinelli P: **Contact-dependent disruption of the host cell membrane skeleton induced by *Trichomonas vaginalis*.** *Infect Immun* 1997, **65**(12):5142-5148.
74. Min DY, Hyun KH, Ryu JS, Ahn MH, Cho MH: **Degradations of human immunoglobulins and hemoglobin by a 60 kDa cysteine proteinase of *Trichomonas vaginalis*.** *Korean J Parasitol* 1998, **36**(4):261-268.
75. Alderete JF, Provenzano D, Lehker MW: **Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis.** *Microb Pathog* 1995, **19**(2):93-103.

76. Sajid M, McKerrow JH: **Cysteine proteases of parasitic organisms.** *Mol Biochem Parasitol* 2002, **120**(1):1-21.
77. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ: **MEROPS: the peptidase database.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(Database issue):D160-164.
78. Page MJ, Di Cera E: **Serine peptidases: classification, structure and function.** *Cell Mol Life Sci* 2008, **65**(7-8):1220-1236.
79. **Barret AJ, Rawlings, N. D., Woessner, J. F.: Handbook of Proteolytic Enzymes.** vol. 2, Second Edition. San Diego, California USA: Elsevier Academic Press; 2004.
80. Siezen RJ, Leunissen JA: **Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases.** *Protein Sci* 1997, **6**(3):501-523.
81. Poole CB, Jin J, McReynolds LA: **Subtilisin-like proteases in nematodes.** *Mol Biochem Parasitol* 2007, **155**(1):1-8.
82. Siezen RJ, Renckens B, Boekhorst J: **Evolution of prokaryotic subtilases: genome-wide analysis reveals novel subfamilies with different catalytic residues.** *Proteins* 2007, **67**(3):681-694.
83. Withers-Martinez C, Jean L, Blackman MJ: **Subtilisin-like proteases of the malaria parasite.** *Mol Microbiol* 2004, **53**(1):55-63.
84. Hackett F, Sajid M, Withers-Martinez C, Grainger M, Blackman MJ: **PfSUB-2: a second subtilisin-like protein in Plasmodium falciparum merozoites.** *Mol Biochem Parasitol* 1999, **103**(2):183-195.
85. Yeoh S, O'Donnell RA, Koussis K, Dluzewski AR, Ansell KH, Osborne SA, Hackett F, Withers-Martinez C, Mitchell GH, Bannister LH *et al*: **Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes.** *Cell* 2007, **131**(6):1072-1083.
86. Blackman MJ, Fujioka H, Stafford WH, Sajid M, Clough B, Fleck SL, Aikawa M, Grainger M, Hackett F: **A subtilisin-like protein in secretory organelles of Plasmodium falciparum merozoites.** *J Biol Chem* 1998, **273**(36):23398-23409.
87. Carruthers VB: **Proteolysis and Toxoplasma invasion.** *Int J Parasitol* 2006, **36**(5):595-600.
88. Miller SA, Binder EM, Blackman MJ, Carruthers VB, Kim K: **A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of Toxoplasma gondii.** *J Biol Chem* 2001, **276**(48):45341-45348.
89. Miller SA, Thathy V, Ajioka JW, Blackman MJ, Kim K: **TgSUB2 is a Toxoplasma gondii rhoptry organelle processing proteinase.** *Mol Microbiol* 2003, **49**(4):883-894.
90. Hong YC, Kong HH, Ock MS, Kim IS, Chung DI: **Isolation and characterization of a cDNA encoding a subtilisin-like serine proteinase (ahSUB) from Acanthamoeba healyi.** *Mol Biochem Parasitol* 2000, **111**(2):441-446.
91. Alderete JF, Newton E, Dennis C, Neale KA: **The vagina of women infected with Trichomonas vaginalis has numerous proteinases and antibody to trichomonad proteinases.** *Genitourin Med* 1991, **67**(6):469-474.
92. Hernandez-Gutierrez R, Avila-Gonzalez L, Ortega-Lopez J, Cruz-Talonia F, Gomez-Gutierrez G, Arroyo R: **Trichomonas vaginalis: characterization of a**

- 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions.** *Exp Parasitol* 2004, **107**(3-4):125-135.
93. Alvarez-Sanchez ME, Avila-Gonzalez L, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LV, Ortega-Lopez J, Arroyo R: **A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity.** *Microb Pathog* 2000, **28**(4):193-202.
 94. Hernandez-Gutierrez R, Ortega-Lopez J, Arroyo R: **A 39-kDa cysteine proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal cytotoxicity.** *J Eukaryot Microbiol* 2003, **50 Suppl**:696-698.
 95. Mendoza-Lopez MR, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LV, Avila-Gonzalez L, Ruiz-Tachiquin ME, Ortega-Lopez J, Arroyo R: **CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence.** *Infect Immun* 2000, **68**(9):4907-4912.
 96. Irvine JW, North MJ, Coombs GH: **Use of inhibitors to identify essential cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*.** *FEMS Microbiol Lett* 1997, **149**(1):45-50.
 97. Bozner P, Demes P: **Proteinases in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas mobilensis* are not exclusively of cysteine type.** *Parasitology* 1991, **102 Pt 1**:113-115.
 98. Brown MT, Goldstone HM, Bastida-Corcuera F, Delgadillo-Correa MG, McArthur AG, Johnson PJ: **A functionally divergent hydrogenosomal peptidase with protomitochondrial ancestry.** *Mol Microbiol* 2007, **64**(5):1154-1163.
 99. Lopez-Villaseñor I, Contreras AP, Lopez-Griego L, Alvarez-Sanchez E, Hernandez R: ***Trichomonas vaginalis* ribosomal DNA: analysis of the intergenic region and mapping of the transcription start point.** *Mol Biochem Parasitol* 2004, **137**(1):175-179.
 100. Rapoport TA: **Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes.** *Nature* 2007, **450**(7170):663-669.
 101. Bennett-Lovsey RM, Herbert AD, Sternberg MJ, Kelley LA: **Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre.** *Proteins* 2008, **70**(3):611-625.
 102. Nonaka T, Fujihashi M, Kita A, Saeki K, Ito S, Horikoshi K, Miki K: **The crystal structure of an oxidatively stable subtilisin-like alkaline serine protease, KP-43, with a C-terminal beta-barrel domain.** *J Biol Chem* 2004, **279**(45):47344-47351.
 103. Alexander PA, Ruan B, Bryan PN: **Cation-dependent stability of subtilisin.** *Biochemistry* 2001, **40**(35):10634-10639.
 104. Subbian E, Yabuta Y, Shinde U: **Positive selection dictates the choice between kinetic and thermodynamic protein folding and stability in subtilases.** *Biochemistry* 2004, **43**(45):14348-14360.
 105. Garcia AF, Chang TH, Benchimol M, Klumpp DJ, Lehker MW, Alderete JF: **Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*.** *Mol Microbiol* 2003, **47**(5):1207-1224.

106. Alvarez-Sanchez ME, Solano-Gonzalez E, Yañez-Gomez C, Arroyo R: **Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis***. *Microbes Infect* 2007, **9**(14-15):1597-1605.
107. Mundodi V, Kucknoor AS, Chang TH, Alderete JF: **A novel surface protein of *Trichomonas vaginalis* is regulated independently by low iron and contact with vaginal epithelial cells**. *BMC Microbiol* 2006, **6**:6.
108. Leher MW, Arroyo R, Alderete JF: **The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis***. *J Exp Med* 1991, **174**(2):311-318.
109. Kucknoor AS, Mundodi V, Alderete JF: **Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* genes**. *Infect Immun* 2005, **73**(10):6472-6478.
110. Mundodi V, Kucknoor AS, Alderete JF: **Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated alpha-enolase of *Trichomonas vaginalis***. *Infect Immun* 2008, **76**(2):523-531.
111. Luo X, Hofmann K: **The protease-associated domain: a homology domain associated with multiple classes of proteases**. *Trends Biochem Sci* 2001, **26**(3):147-148.
112. Klemba M, Goldberg DE: **Biological roles of proteases in parasitic protozoa**. *Annu Rev Biochem* 2002, **71**:275-305.
113. Conseil V, Soete M, Dubremetz JF: **Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii***. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**(6):1358-1361.
114. Dejkriengkraikhul P, Wilairat P: **Requirement of malarial protease in the invasion of human red cells by merozoites of *Plasmodium falciparum***. *Z Parasitenkd* 1983, **69**(3):313-317.
115. Leher H, Silvany R, Alizadeh H, Huang J, Niederkorn JY: **Mannose induces the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii***. *Infect Immun* 1998, **66**(1):5-10.
116. Sommer U, Costello CE, Hayes GR, Beach DH, Gilbert RO, Lucas JJ, Singh BN: **Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells**. *J Biol Chem* 2005, **280**(25):23853-23860.
117. Provenzano D, Alderete JF: **Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis***. *Infect Immun* 1995, **63**(9):3388-3395.
118. Inouye M: **Intramolecular chaperone: the role of the pro-peptide in protein folding**. *Enzyme* 1991, **45**(5-6):314-321.
119. Moon EK, Lee ST, Chung DI, Kong HH: **Intracellular localization and trafficking of serine proteinase AhSub and cysteine proteinase AhCP of *Acanthamoeba healyi***. *Eukaryot Cell* 2006, **5**(1):125-131.
120. Sajid M, Withers-Martinez C, Blackman MJ: **Maturation and specificity of *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease-1, a malaria merozoite subtilisin-like serine protease**. *J Biol Chem* 2000, **275**(1):631-641.
121. Molhoj M, Degan FD: **Leader sequences are not signal peptides**. *Nat Biotechnol* 2004, **22**(12):1502.

122. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von HG: **Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites.** *Protein Eng* 1997, **10**(1):1-6.
123. Chang YC, Kadokura H, Yoda K, Yamasaki M: **Secretion of active subtilisin YaB by a simultaneous expression of separate pre-pro and pre-mature polypeptides in *Bacillus subtilis*.** *Biochem Biophys Res Commun* 1996, **219**(2):463-468.
124. Alvarez-Sanchez ME, Carvajal-Gamez BI, Solano-Gonzalez E, Martinez-Benitez M, Garcia AF, Alderete JF, Arroyo R: **Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* cytotoxic CP65, a 65-kDa cysteine proteinase involved in cellular damage.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008, **40**(11):2442-2451.
125. Garcia AF, Benchimol M, Alderete JF: ***Trichomonas vaginalis* polyamine metabolism is linked to host cell adherence and cytotoxicity.** *Infect Immun* 2005, **73**(5):2602-2610.
126. Alderete JF, Neale KA: **Relatedness of structures of a major immunogen in *Trichomonas vaginalis* isolates.** *Infect Immun* 1989, **57**(6):1849-1853.
127. Wilson ME, Britigan BE: **Iron acquisition by parasitic protozoa.** *Parasitol Today* 1998, **14**(9):348-353.
128. Gorrell TE: **Effect of culture medium iron content on the biochemical composition and metabolism of *Trichomonas vaginalis*.** *J Bacteriol* 1985, **161**(3):1228-1230.
129. Alderete JF: **Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*.** *Infect Immun* 1999, **67**(8):4298-4302.
130. Rholam M, Fahy C: **Processing of peptide and hormone precursors at the dibasic cleavage sites.** *Cell Mol Life Sci* 2009, **66**(13):2075-2091.
131. van der Hoorn RA: **Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms.** *Annu Rev Plant Biol* 2008, **59**:191-223.
132. St Leger RJ, Joshi L, Roberts DW: **Adaptation of proteases and carbohydrates of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches.** *Microbiology* 1997, **143** (Pt 6):1983-1992.
133. Bagga S, Hu G, Screen SE, St Leger RJ: **Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** *Gene* 2004, **324**:159-169.
134. Harris PK, Yeoh S, Dluzewski AR, O'Donnell RA, Withers-Martinez C, Hackett F, Bannister LH, Mitchell GH, Blackman MJ: **Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase.** *PLoS Pathog* 2005, **1**(3):241-251.
135. Brown GD, Dave JA, Gey van Pittius NC, Stevens L, Ehlers MR, Beyers AD: **The mycosins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: a family of subtilisin-like serine proteases.** *Gene* 2000, **254**(1-2):147-155.
136. Anderson ET, Wetherell MG, Winter LA, Olmsted SB, Cleary PP, Matsuka YV: **Processing, stability, and kinetic parameters of C5a peptidase from *Streptococcus pyogenes*.** *Eur J Biochem* 2002, **269**(19):4839-4851.

XII. ARTÍCULO

Identification and characterization of a surface-associated, subtilisin-like serine protease in *Trichomonas vaginalis*

PABLO HERNÁNDEZ-ROMANO¹, ROBERTO HERNÁNDEZ¹, ROSSANA ARROYO², JOHN F. ALDERETE³ and IMELDA LÓPEZ-VILLASEÑOR^{1*}

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Tercer Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., México

²Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN). México D.F., México

³School of Molecular Biosciences, Washington State University, Pullman, WA, USA.

(Received 14 September 2009; revised 28 November 2009 and 23 February 2010; accepted 1 March 2010)

SUMMARY

Trichomonas vaginalis is a protozoan parasite causing trichomonosis, a sexually transmitted infection in humans. This parasite has numerous proteases, most of which are cysteine proteases that appear to be involved in adherence and cytotoxicity of host cells. In this report we identify and characterize a putative subtilisin-like serine protease (SUB1). The *sub1* gene encodes a 101-kDa protein. *In silico* analyses predict signal and pro-peptides at the N-terminus, and a transmembrane helix at the carboxy-terminal region. The *sub1* gene was found as single copy by Southern analysis, albeit additional serine protease related genes are annotated in the *T. vaginalis* genome. The expression of *sub1* could only be detected by RT-PCR and Ribonuclease Protection Assays, suggesting a low abundant mRNA. The *sub1* gene transcription start site was correctly assigned by RPA. The transcript abundance was found to be modulated by the availability of iron in the growth medium. Antibodies raised to a specific SUB1 peptide recognized a single protein band (~82 kDa) in Western blots, possibly representing the mature form of the protein. Immunofluorescence showed SUB1 on the trichomonad surface, and in dispersed vesicles throughout the cytoplasm. A bioinformatic analysis of genes annotated as serine proteases in the *T. vaginalis* genome is also presented. To our knowledge this is the first putative serine protease experimentally described for *T. vaginalis*.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, serine protease, surface protein, cellular localization, subtilisin.

INTRODUCTION

Trichomonas vaginalis is the causal agent of trichomonosis, the primary non-viral sexually transmitted infection. Men and women with this condition are at higher risk for HIV seroconversion (Laga *et al.* 1993; Cohen, 2000; McClelland *et al.* 2007; Van Der Pol *et al.* 2008; Kissinger *et al.* 2008, 2009). Women with trichomonosis will have adverse pregnancy outcomes (Cotch *et al.* 1997) and elevated susceptibility to cervical cancer (Viikki *et al.* 2000).

T. vaginalis possesses numerous cysteine proteases (CPs). There is evidence to indicate the CPs are promiscuous in activity and appear to be involved in cytoadherence (Arroyo and Alderete, 1989; Mendoza-Lopez *et al.* 2000), haemolysis (Dailey *et al.* 1990), cytotoxicity (Alvarez-Sanchez *et al.* 2000, 2007), disruption of the host cell membrane

skeleton (Fiori *et al.* 1997), and degradation of human immunoglobulins (Provenzano and Alderete, 1995; Min *et al.* 1998). In addition to the CPs, a metallo-peptidase has been identified that could be involved in the processing of hydrogenosomal proteins (Brown *et al.* 2007). The genomic sequence of *T. vaginalis* indicates that there are 33 subtilisin-like serine proteases, but the proteases are annotated as putative based on sequence similarity (Carlton *et al.* 2007). To our knowledge, there are no experimental reports on subtilisin-like serine proteases for *T. vaginalis*.

In an ongoing project in our laboratory a putative subtilisin-like gene (referred to as *sub1*) was identified in a *T. vaginalis* genomic clone as an open reading frame adjacent to an actin gene. We have attempted to characterize the *sub1* gene and the encoded SUB1 protein regarding its expression and localization. As such, this work may be the first experimental characterization of a putative subtilisin-like serine protease in *T. vaginalis*. This 906-aa protein possesses a signal peptide and a pro-peptide at the amino terminal end. The protein, termed SUB1, is detected on the parasite surface by a specific antibody, and this is consistent with a putative

* Corresponding author: Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Tercer Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., México. Tel: +52 55-56228952. Fax: +52 55-56229212. E-mail: imelda@biomedicas.unam.mx

Table 1. Oligonucleotides used in this work

Oligonucleotide	Sequence 5'–3'
5'SPCa	TCATTACCAGATTGCAAC
3'SPRb	ATTGCTCTATCACGAAGG
Adapter primer	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
AUAP-B	GGATCCGGCCACGCGTCGACTAGTAC
SubRTRv	GATGTTGCTGTTGTGATATG
SubRTF1	CTAATCAACCAAGTGACAGT
SubRTF2	GTATCTGTGAATGTCCATC
T7SP	TTGTAATACGACTCACTATAGGGCCATGAATCCGGCTTCAAATC
SP-100	GCCGAATGGGATCATGGC
α -TUBF	TGTCTCCGCTGCTGTCCG
α -TUBR	GCCACCATCTTCTTCTTC

transmembrane domain. Interestingly, the *sub1* gene is modulated in expression by distinct mechanisms involving iron and contact with host epithelial cells. The implications of our findings are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Parasites and cell cultures

The *T. vaginalis* isolate CNCD147 was used in this study (Alvarez-Sanchez *et al.* 2000). Parasites were grown in Diamond's trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium (Diamond, 1957) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated horse serum. The iron concentration in TYM is $\sim 20 \mu\text{M}$ (Alvarez-Sanchez *et al.* 2007). Iron-depleted and iron-rich trichomonads were obtained as described (Lehker *et al.* 1991). Parasites were grown in culture medium supplemented with $250 \mu\text{M}$ ferrous ammonium sulfate (high-iron or iron-rich) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) or with $150 \mu\text{M}$ of the iron chelator 2,2-dipyridil (low-iron or iron-depleted) (Sigma Chemical Co). Parasites in the logarithmic-phase of growth were used in all assays.

Cloning of the sub1 gene

An incomplete open reading frame (ORF) of 2326-bp with similarity to subtilisin-like serine proteases (termed *sub1*) was identified in a clone isolated in our laboratory from a genomic *EcoRI* library of *T. vaginalis* isolate CNCD147. To obtain the missing 3' end of the *sub1* gene, a BLAST search was made on the TIGR database of *T. vaginalis* (www.tigr.org) using the 2326-bp fragment as query. This search retrieved the contig 83372 (TIGR Assembly 83372). The 3' end of *sub1* gene was amplified from genomic DNA using the sense primer 5'SPCa and the anti-sense primer 3'SPRb (Table 1). The PCR product was cloned in the PCR Blunt TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and the selected clones were sequenced. The complete *sub1* gene sequence is accessed in the GeneBank database under Accession number FJ384963.

Reverse transcriptase coupled PCR (RT-PCR)

RT-PCR was used to determine the expression of *sub1* in *T. vaginalis*. Total RNA was prepared from parasites grown in TYM, high-iron or low-iron medium using the TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized with the Superscript III RNase H-kit (Invitrogen) and adapter primer (Table 1) using $3 \mu\text{g}$ of total RNA that was quantified in an Ultraspec 3100 pro spectrometer (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). For semi-quantitative RT-PCR a fragment of 284-bp of the *sub1* cDNA was amplified by PCR using the primers SubRTF1 and SubRTRv. As an internal reference the α -tubulin fragment of 370-bp was amplified using the primers α -TUBF and α -TUBR (Table 1). PCR reactions without the cDNA synthesis step were used as controls to detect contaminant genomic DNA. PCR conditions were as follows. Fifty μl reactions were set up with 25 pmol of each primer, 1X PCR buffer, 10 mM each dNTP, 25 mM MgCl_2 , 2.5 units of Taq DNA polymerase (recombinant, Invitrogen) and 0.5 μl of total cDNA of each condition as template. The amplification reactions consisted of 19, 23 or 27 cycles of 92 °C denaturing for 1 min, 55 °C annealing for 1 min, and 72 °C extension for 3 min, all followed by a 5 min extension at 72 °C. Ten μl of each PCR reaction were loaded in agarose gels and stained with ethidium bromide. Gels were analysed with Quantity One software (Bio-Rad Laboratories).

Rapid amplification of 3' cDNA ends (3' RACE)

The 3' end of the *sub1* mRNA was determined by a 3' RACE assay. cDNA was synthesized using $3 \mu\text{g}$ of total RNA, Superscript III RNase H-kit (Invitrogen) and adapter primer (Table 1). The *sub1* cDNA end was amplified by PCR from the cDNA pool using the SubRTF2 primer and the AUAP-B adapter primer (Table 1). A second (semi-nested) PCR amplification was performed on the initial PCR product using the SubRTF1 and the AUAP-B adapter primer. The PCR product was cloned into

TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced in our institutional sequencing facility.

Ribonuclease protection assay (RPA)

Since we identified 2 possible Inr promoter sequences at the 5' end of the *sub1* gene, a RPA was performed to determine the transcription start point of this gene. The RNA antisense probe was synthesized by *in vitro* transcription using the MAXIscript T7 kit (AMBIION Inc., Austin, TX), [α - 32 P]UTP (Amersham Biosciences UK Ltd) and 1 μ g of a PCR product containing the 2 putative *sub1* Inr sequences as shown in Fig. 2A. The 533-bp PCR product used as template was obtained from the *sub1* clone with primers T7SP and SP-100 (Table 1). The RPA III kit (AMBIION Inc. Austin, TX) was used following the manufacturer's instructions. RPA reactions were performed essentially as described (Lopez-Villaseñor *et al.* 2004) using 10–20 μ g of total RNA and ~60 000 cpm of gel purified probe. After hybridization and digestion, the protected fragments were separated on a denaturing gel comprised of 5% acrylamide-*bis*acrylamide (19:1) and 8 M urea. The *T. vaginalis* rRNA gene transcription start point (Lopez-Villaseñor *et al.* 2004) was used as an internal control in a parallel reaction.

Antibody production and Western blot assay

A mouse antiserum to SUB1 was raised against a synthetic peptide (484-NSETAERKCDFSS-496). This sequence was found to be specific of SUB1 from the *T. vaginalis* genome database. The peptide was covalently linked as an 8-branched multiple antigen peptide (MAP-8), and 300 μ g were mixed with Freund's complete adjuvant (Sigma Immuno Chemicals) and used to immunize mice. The animals were given boosted injections once with 150 μ g of synthetic peptide homogenized with Freund's incomplete adjuvant (Sigma Immuno Chemicals) and 5 times with 75 μ g of synthetic peptide dissolved in water at 1 to 2-week intervals. This antiserum was used in Western blots and immunofluorescence assays. Pre-immune normal mouse serum was obtained before the immunization schedule began.

For Western blots, 1.5×10^7 *T. vaginalis* organisms were washed, centrifuged, and lysed with 100 μ l of 10% SDS in 400 μ l of freshly prepared electrophoresis dissolving buffer (0.6 M Tris, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue) with 5% β -mercaptoethanol. Samples were heated at 75 °C for 10 min and stored on ice before loading. Total *T. vaginalis* proteins were separated by PAGE-SDS and electrophoresed at 30 mA (constant). After electrophoresis, the proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, blocked with 3% skim

milk in PBS for 18 h at 4 °C, and incubated with either pre-immune normal mouse serum or mouse anti-SUB1 serum (1:250) for 1 h at 25 °C. Blots were then washed 5 times with PBS-0.05% Tween-20 and incubated with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody (1:50 000) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) for 1 h at 25 °C prior to developing with hydrogen peroxide and luminol (Supersignal West Pico, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). All antibodies were diluted in 1% skim milk-3%-bovine serum albumin in PBS-0.05% Tween-20.

Immunofluorescence assay

Immunofluorescence was performed using established protocols (Allan, 2000). Briefly, parasites were washed twice with PBS before fixation in 4% paraformaldehyde for 30 min at RT and washed again with PBS. Permeabilized parasites were treated with 0.1% Triton X-100 in PBS for 7 min at RT after the fixation step. Parasites were then washed once with PBS and blocked with 2% fetal bovine serum in PBS for 1 h at RT, and washed with PBS. Next, the parasites were suspended in 100 μ l of the anti-SUB1 serum diluted 1:100 in PBS and incubated 1 h at RT. Parasites were washed once with PBS, suspended in 200 μ l of FITC-conjugated anti-mouse IgG (GE Healthcare, Buckingham, UK) (1:100 in PBS) and incubated for 30 min at RT. Controls were performed with non-permeabilized and permeabilized parasites handled identically, except using the pre-immune normal mouse serum and the secondary antibody. The parasites were then examined with a confocal laser scanning microscope (Olympus FV1000).

Bioinformatic analyses of SUB1 and subtilisin-like serine protease genes of Trichomonas vaginalis

The deduced amino acid sequence of SUB1 was analysed with several programs: the signalP 3.0 software (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) to detect putative signal peptides (Nielsen *et al.* 1997; Bendtsen *et al.* 2004), TMHMM 2.0 software (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/) to detect transmembrane spanning regions and Phobius software (<http://phobius.sbc.su.se/>) for a combined transmembrane topology and signal peptide prediction (Kall *et al.* 2004, 2007). The hydropathy plot (window=7) (Kyte and Doolittle, 1982) and gene maps were constructed with the Vector NTI software (Invitrogen). Subtilisin sequences obtained from the MEROPS database (merops.sanger.ac.uk/) were used for amino acid alignment and for the construction of a phylogenetic tree using the CLC sequence viewer software (Neighbor-joining algorithm).

The theoretical model of SUB1 was constructed using the PHYRE software (Protein Homology/analogy Recognition Engine, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) (Kelley *et al.* 2000; Bennett-Lovsey *et al.* 2008). The model obtained with PHYRE was tested for errors in the three-dimensional structure with the ProSA software (<http://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) (Sippl, 1993; Wiederstein and Sippl, 2007) and scanned for calcium-binding sites with the WebFEATURE software (<http://feature.stanford.edu/webfeature/>) (Liang *et al.* 2003). The protein 3D structures and the electrostatic surface potential were generated with the PyMOL molecular graphics system v0.99 (<http://pymol.org/>). The assignment of S1, S2, S3 and S4 subsites in the theoretical model of SUB1 was based in the localization of the active site in subtilisin like serine proteases (Siezen and Leunissen, 1997).

The deduced amino acid sequence of the 33 subtilisin-like serine protease genes annotated in the *T. vaginalis* database (<http://trichdb.org/trichdb/>) were analysed with the programs signalP 3.0 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) (Nielsen *et al.* 1997; Bendtsen *et al.* 2004), TMHMM 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/), Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) (Kall *et al.* 2004, 2007), Pfam (pfam.sanger.ac.uk/) (Finn *et al.* 2008), and Interpro (www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/) (Hunter *et al.* 2009) to identify functional domains.

RESULTS

The sub1 gene encodes a novel subtilisin-like serine protease in Trichomonas vaginalis

The *T. vaginalis* genome sequence indicates there are 33 genes encoding subtilisin-like serine proteases. However, these genes are annotated as putative based on sequence similarity and nothing is known about their expression, protein localization and cellular function. Here, we identified a subtilisin-like gene, called *sub1*, in a genomic clone of the *T. vaginalis* CNC147 isolate. This sequence has been accessed in the GenBank database under Accession number FJ384963. The equivalent sequence from the G3 isolate is annotated in the *T. vaginalis* genome database as TVAG_090450 (Carlton *et al.* 2007). The *sub1* complete ORF (2,721-bp) does not contain intervening sequences, and encodes for a predicted 101-kDa protein. A BLAST search with the complete deduced amino acid sequence shows that SUB1 has 26–34% similarity with bacterial subtilisins.

In order to determine the gene copy number of *sub1* in the *T. vaginalis* genome, we performed Southern analysis using restriction enzymes that restrict both inside and outside of the coding region. The hybridization pattern expected for a single copy gene was obtained (data not shown), although additional weak hybridization bands were detected that could

correspond to other subtilisin-like serine protease related genes described in the *T. vaginalis* genome (Carlton *et al.* 2007; Hirt *et al.* 2007).

As an initial approach to determine the expression of *sub1*, Northern blot analyses were performed using up to 40 μ g of total *T. vaginalis* RNA. Unexpectedly, no hybridization bands were detected indicating either a very low or absent expression (data not shown). It is important to mention that the RNA used for these analyses was judged to be of high quality by the presence of intact ribosomal bands on gel-electrophoresis and the readily detectable hybridization band with a control probe for a specific mRNA. As an alternative approach, we evaluated the presence of *sub1* mRNA by reverse transcriptase-(RT) PCR analysis using *T. vaginalis* cDNA and SubRTF1 and SubRTRv oligonucleotides. An amplicon of the expected size was detected after 27 cycles (see below, Fig. 3), suggesting a low abundance of *sub1* mRNA in this trichomonad isolate.

The features identified in the genomic and deduced amino acid sequences of *sub1* are illustrated in Fig. 1. Two potential initiator (Inr) promoter elements (Liston and Johnson, 1999) were identified in the 5' region separated by 142-bp as shown in Fig. 1A: CTAAATT (position 507, distal) and TTAATTC (position 656, proximal). Further, 2 in-frame ATGs were found that could be involved in translation initiation (Fig. 1A, positions 526 and 673). To determine the functional transcription initiator in the *sub1* gene, we performed a Ribonuclease Protection Assay (RPA). In the case that this gene is transcribed from the distal initiator a 408-bp protected fragment is predicted, whereas a 259-bp protected fragment would be produced if transcription is initiated at the proximal initiator (Fig. 2A), as annotated for the corresponding TVAG_090450 sequence accessed in the *T. vaginalis* genome database (Carlton *et al.* 2007). The result shows a ~408-bp protected fragment, indicating that transcription of the *sub1* gene initiates at the distal Inr promoter sequence (CTAAATT, Fig. 2B). This result also evidences a low level of expression of the *sub1* transcript. A RPA assay for the rRNA transcription initiation site (Lopez-Villaseñor *et al.* 2004) was done in parallel as a control for this experiment (Fig. 2C).

Regarding the 3' region of the *sub1* gene, it was found that the stop codon of *sub1* is UAG and is not coupled to the UAAA proposed polyadenylation signal as has been described for several *T. vaginalis* mRNAs (Espinosa *et al.* 2002). The 3'-UTR region of *sub1* mRNA was determined by a 3'-RACE assay. This region is 56-nt long with 2 UAAA proposed polyadenylation signals at 31-nt and 38-nt downstream of the stop codon (Fig. 1A). These elements are consistent with previously proposed polyadenylation motifs for *T. vaginalis* (Espinosa *et al.* 2002).

A

5' region

```

1   agtaacaataactctgtagatctcttggcaaaagatataatcgcggactgaaaggatgatacccatactaaccttggcaaaatagcaggcatttaa
101  gttcagaaaatggataataatcagggcaaacgcttggatatcgaaatggagtgctcggagtaaaacaaaatgctgaaaagaatagctggatgataatt
201  acgtatcttttgatttcaaagtaaaaggttgacgaatctaaacggtgtggacgataattaaacttgcgattgagacaaaatcatgaggagtaatgatttga
301  taagtattaaaggtgggttggttgttgatatactatgaattattgtaacaataaacctgcatttattaattttgcttttggcagtaaaagtaatatat
401  taataagcogaatgggcatgccaatcctctgcttttggctatctccaaaaacgtaaggagcatccctaaaagatcaaaagatgcccattttttaattt
501  EtttttctaaattgttttgacaaaaATGTTTTTCATCTGTTTTCTCTTCATTGAAGCAATTTCACTTGAAATTTCTAAGGAAGATATACGTAAATCAAGA
601  TATGAAAGTAGATATCTGATTCAAATCAATATTTCAATGGTTATTACAAGATTTTACTTCGAAAAACGAATATGCATGATAGAACATCAAGTGAAA...
    
```

3' region

```

3201  ...CGATTTGACACATCAGGCCAATTATCAGCACCTATTTTATAGgtttaataatccacctaactactactattgtaaaaataaactgttcttattt
3301  gaaactataatcctaaaaaatattgaattcacctatgttacatgcaatgtgtttttcacttattaccgctctcaaattttatcgttactattaaaaatg
    
```

B

```

1   MFIFICFLFIE AISLEISKED IRKSRYESRY PDSNQYFNGY YKDFTSKTNM HDRTSSEIRQ ITDISNYIIH TTQEFQFPKD ITFSKLHGTY
91  YFIHDASKAQ INSIQNSNV ISVEKASQIR FDFRFEAGFM ENGNLDLYK NGYLWLSRST NLTKGKEIIA LASGIDYRH PMLNDSRPL
181 INNTLDLNQR KIVYYDSWKD FYDYIPGFT HTAGIIAGKS ECGNILPLYD GIAPESKLYF LDMAKGDNKM LFDDFDKDKF VQSLKDLNIG
271 ISSNSWGSNE IDYTSTMTDI YDNLAYNNDP ILEVFAAGNS EKSWTIDSPS SGKNIFCVGA TDGTPGQMMG EASTPQIEIS GTKIDLLQSS
361 WSTNLFNQLN KEEPFLNVAK PVVYVTSNDNT CDSIKQILEN EQTKILILKS LPDCNKMSKT VLATLSDDDF QLISQSSAN FTKLSDFSY
451 EKANFASAGP AYSGILKPD I SAPGVITGAL SYGNSETAER KCFSSLSQF TGTESTPII SGFSSLLREH FRSKGVTPSS SLLKSLIIS
541 TKSINKRDLNT GFGIPRLDCA IKSSYSDRV L IKGQHLIYCE FSSQTGDISA SISWLDPLLS RDIAYPLLAD LSIFIESPTG KVYQEEFGNS
631 ILTTNKKISV TSETYEGTWK LHVISSRFEG NVSFSCSISN YMSEKLEFVE ETEKCLSDCS CNKGICEPCS DKTDHLCSTN SRDISNSGTF
721 VGQGGYVERA RVPNIDKPRI DVSFKGYSNV YLIKGISNQP SDSFTSLLFR NKETKLSNYE VLEPGTNITI IVRSFSSGSF RISFISSEYI
811 PSTPPPEFV YPTSTPEIPP IRTPPPSKFE SPSNTYHNSN ITSNTQNTKI LPTSITICSL IGIIMIVFII FVVKLRKSH KHDDFSTSGQ
901 LSAPIL
    
```

C

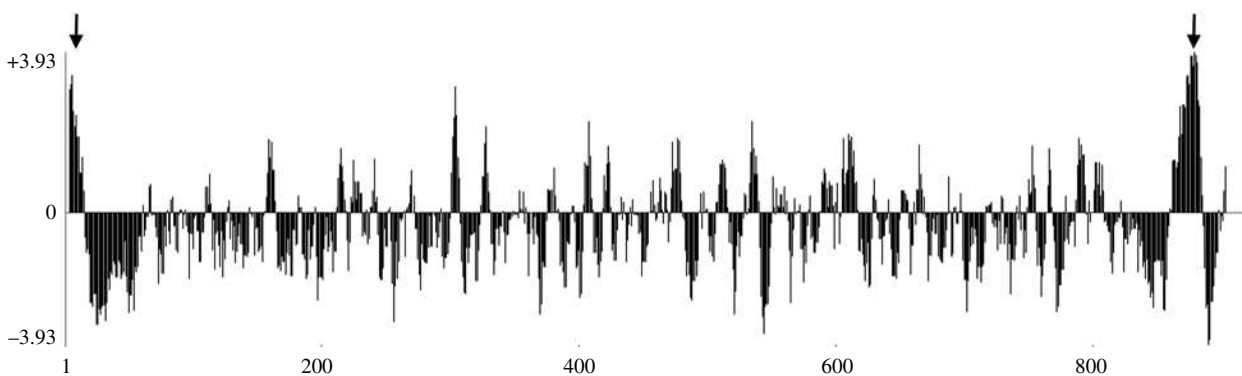


Fig. 1. Features of *sub1* gene and protein sequences. (A) Partial DNA sequence of *sub1* gene. Only the 5' and 3' regions are shown (2500 bp of the internal coding region have been omitted). The non-coding sequence is shown in lower case and the coding sequence in upper case. In the 5' region the two potential transcription initiator elements are in bold (positions 507 and 656). The distal transcription initiator element experimentally confirmed in this work including the putative transcription start site is shown with an arrow. 5' and 3' UTR regions are in italics. The two possible AUG codons for translation initiation are underlined. In the 3' UTR region two contiguous UAAA polyadenylation signals are in bold. T-rich elements and possible binding sites for Myb1 and Myb2 transcription factors are boxed. (B) Deduced amino acid sequence of SUB1. The putative signal peptide is underlined. The predicted transmembrane domain is underlined with a dotted line. The catalytic triad residues D¹⁶³, H²⁰⁸ and S⁵⁰⁴ are boxed. Panel C: Hydropathy plot for SUB1. Two hydrophobic regions are found in the N- and C- terminal regions (arrows).

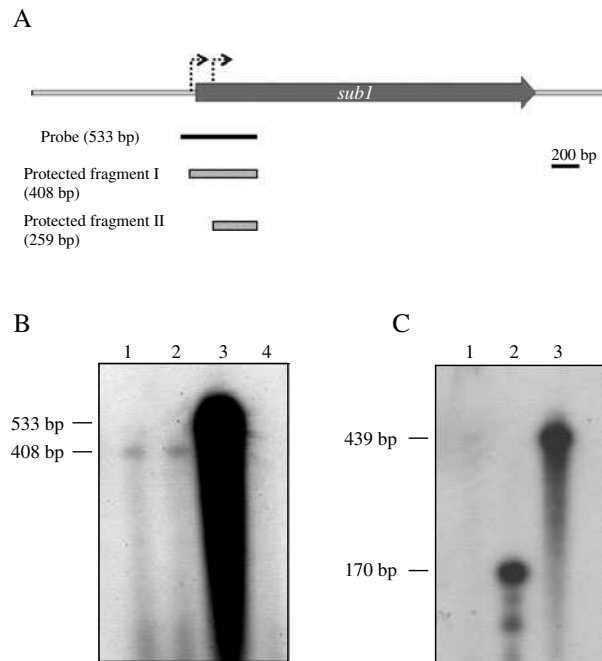


Fig. 2. Identification of the transcription start site for *sub1*. (A) Schematic representation of the *sub1* gene indicating the two potential Inr elements (arrows). The relative position of the antisense RNA probe used in the ribonuclease protection assay (RPA) is shown with a solid line. The sizes of the two possible protected fragments are shown as shadowed boxes. (B) RPA of the *sub1* transcript. Lanes 1 and 2 (duplicates): Total *T. vaginalis* RNA + *sub1* antisense probe + RNase treatment (protected probe). Lane 3: *sub1* antisense probe (non digested probe). Lane 4: total yeast RNA + *sub1* antisense probe + RNase treatment (non protected probe). Over-exposure of the autoradiograph was necessary for the detection of protected bands (lanes 1 and 2). (C) RPA of the rRNA transcript used as a positive control. Lane 1: rRNA antisense probe + total yeast RNA + RNase treatment (non protected probe); Lane 2: Total *T. vaginalis* RNA + rRNA antisense probe + RNase treatment (protected probe). Lane 3: rRNA antisense probe (non-digested probe).

The deduced amino acid (aa) sequence of SUB1 shows several sequence motifs conserved in other subtilisin-like serine proteases, particularly within a region of 342-aa (aa 163 to 504). This region contains the highly conserved residues of the catalytic triad (D¹⁶³, H²⁰⁸ and S⁵⁰⁴) and the oxyanion hole (N³⁰⁹) within locally conserved residues (Fig. 1B). The primary sequence alignment of the catalytic domains of SUB1 and equivalent sequences from other subtilisins show similarity among these sequences (data not shown). The *sub1* coding sequence here analyzed obtained from the CNC147 isolate was compared with the TVAG_090450 sequence accessed in the *T. vaginalis* genome database (Carlton *et al.* 2007). Eight nucleotide differences were found that represent 5 changes at the amino acid level (4 non-conserved and 1 conserved). None of these changes are within the domains of the catalytic triad.

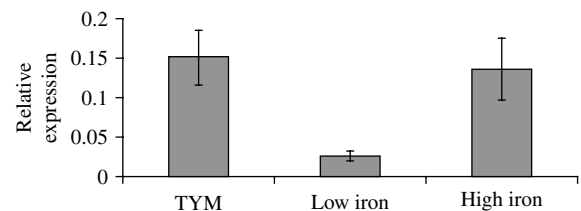
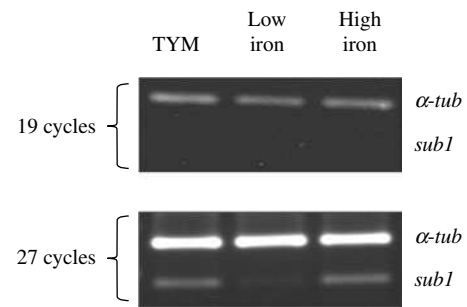


Fig. 3. The expression of *sub1* gene is modulated by iron. RT-PCR amplification products of α -tubulin (α -tub) and *sub1* using cDNA from parasites grown in TYM medium, iron depleted medium (low iron) and iron-rich medium (high iron). Amplification products obtained after 19 and 27 cycles from 1 representative experiment are shown. Graph values represent the average of 3 independent experiments and vertical lines indicate the standard error.

A hydropathy analysis of the SUB1 deduced amino acid sequence identified 2 hydrophobic peaks, one in the amino terminal region and the second near the carboxy-terminal region (Fig. 1C), suggesting the occurrence of a signal peptide in the first 17-aa and a transmembrane domain of 23-aa towards the carboxy-terminal end (position 862–884) (Fig. 1B). A further analysis of the amino-terminal region suggests a potential pro-peptide of about 114 residues (positions 18–131); the assignment of this region was based on the position of the aspartate residue of the catalytic triad usually found at position 32 of the mature subtilisins.

sub1 expression is modulated by the availability of iron

Of interest was to analyse whether the expression of *sub1* gene responded to iron availability. Parasites were grown in TYM, high-iron and low-iron medium as described in the Materials and Methods section. Based on semi-quantitative RT-PCR and as shown in Fig. 3, a decreased level of *sub1* transcript was evident in trichomonads grown in low-iron medium as compared with the level observed in trichomonads grown in TYM and in high-iron medium, with α -tubulin as an internal reference. These data suggest that the level of expression of *sub1* mRNA may be modulated by the external availability of iron in the growth medium. Nevertheless,

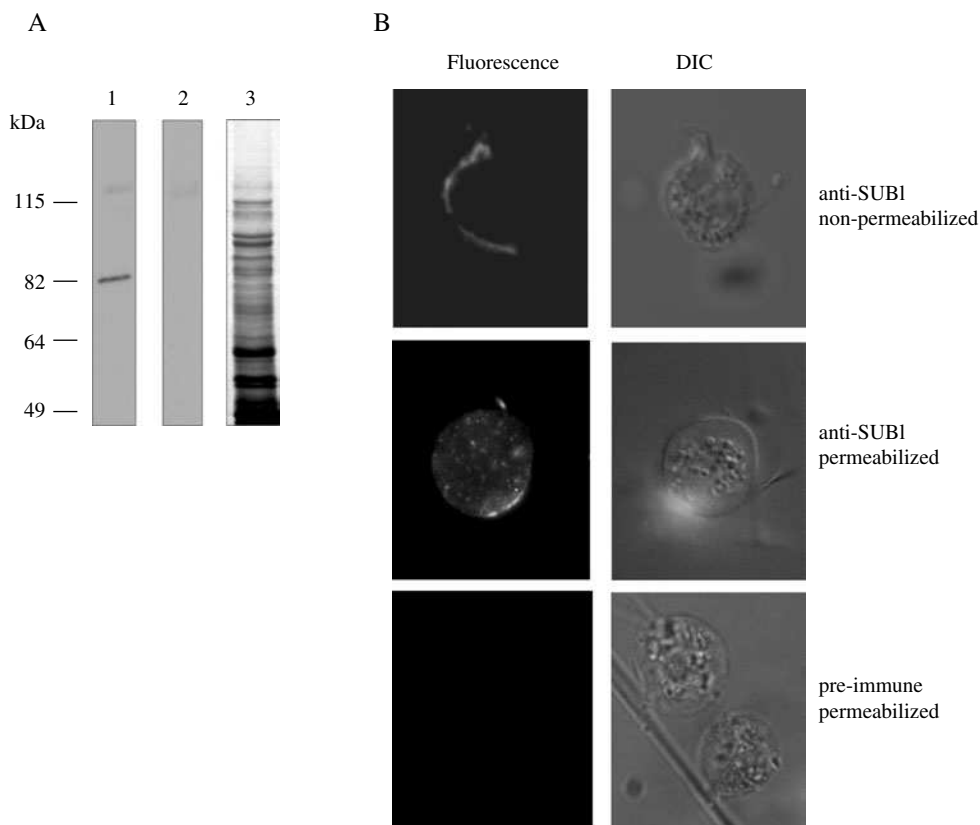


Fig. 4. Western blot of total *Trichomonas vaginalis* proteins and immunolocalization of SUB1. (A) Western blot of total *T. vaginalis* proteins probed with anti-SUB1 antibody (lane 1) and pre-immune serum (lane 2). Total *T. vaginalis* proteins stained with Coomassie blue (lane 3). (B) Immunofluorescence assay using the anti-SUB1 antibody in non-permeabilized and permeabilized parasites. Parasites were observed with 100X magnification objective. DIC: Differential interference contrast microscopy.

further experiments are necessary to determine whether iron directly regulates *sub1* gene expression.

Identification and cellular localization of SUB1

We performed an immunoblot analysis of total trichomonad proteins using the SUB1 peptide antiserum. Not unexpectedly, a single band of ~82-kDa was detected (Fig. 4A, lane 1). No reactivity was evident using normal mouse serum as a control (Fig. 4A, lane 2).

We next performed indirect immunofluorescence using the SUB1 peptide antiserum with non-permeabilized and permeabilized parasites (Fig. 4B). Fluorescence was detected on the trichomonad surface using non-permeabilized parasites. Although fluorescence was distributed across the surface, the increased intensity observed toward a pole may represent capping. In the fluorescence pattern for permeabilized parasites (middle panel), a punctuated labelling suggestive of vesicles was observed in the cytoplasm. Fluorescence was also observed on the surface of permeabilized parasites. No signal was observed when the pre-immune normal mouse serum was used in permeabilized (lower panel) or non-permeabilized parasites (data not shown).

Bioinformatic analysis of SUB1

A phylogenetic tree was constructed with the amino acid sequences of reported subtilisins from animals, plants, fungi, bacteria and protozoa. The cladogram was generated with a Neighbor-joining algorithm, with bootstrap values obtained from 1000 replicates. *T. vaginalis* SUB1 was found to be more related to subtilisin-like serine proteases from plants than to proteases from bacteria or protozoa (Fig. 5). Additionally, a theoretical model for SUB1 was constructed using the Protein Homology/analogy Recognition Engine (PHYRE). The model so generated is consistent with the typical structure of subtilisins (Fig. 6A) (Siezen and Leunissen, 1997).

DISCUSSION

Protozoan parasites are rich in proteases, many of which are involved in important processes like cellular metabolism, host cell rupture and invasion, excystation, cytoadherence, maturation and activation of other proteins (Klemba and Goldberg, 2002). The study of proteases in protozoan parasites has been focused in the cysteine type proteases, while serine proteases have remained poorly studied.

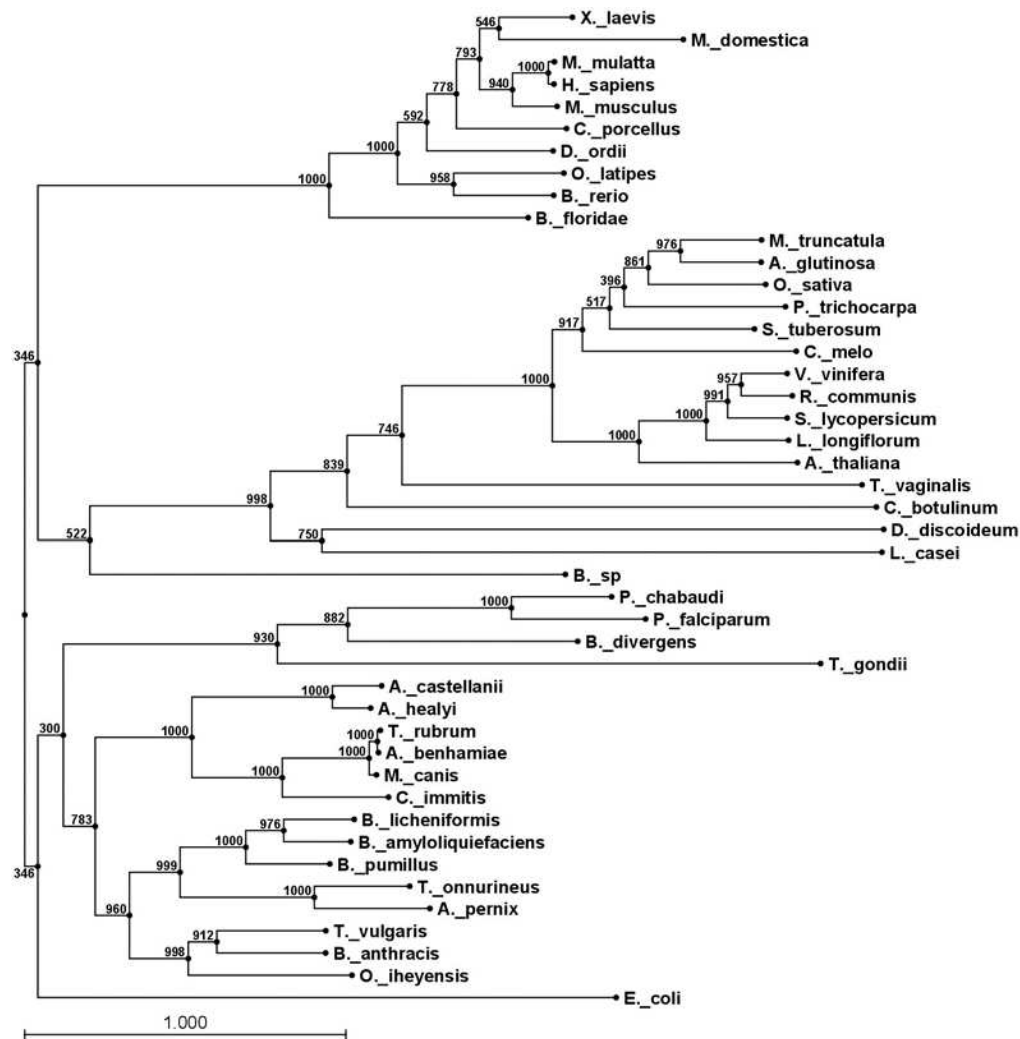
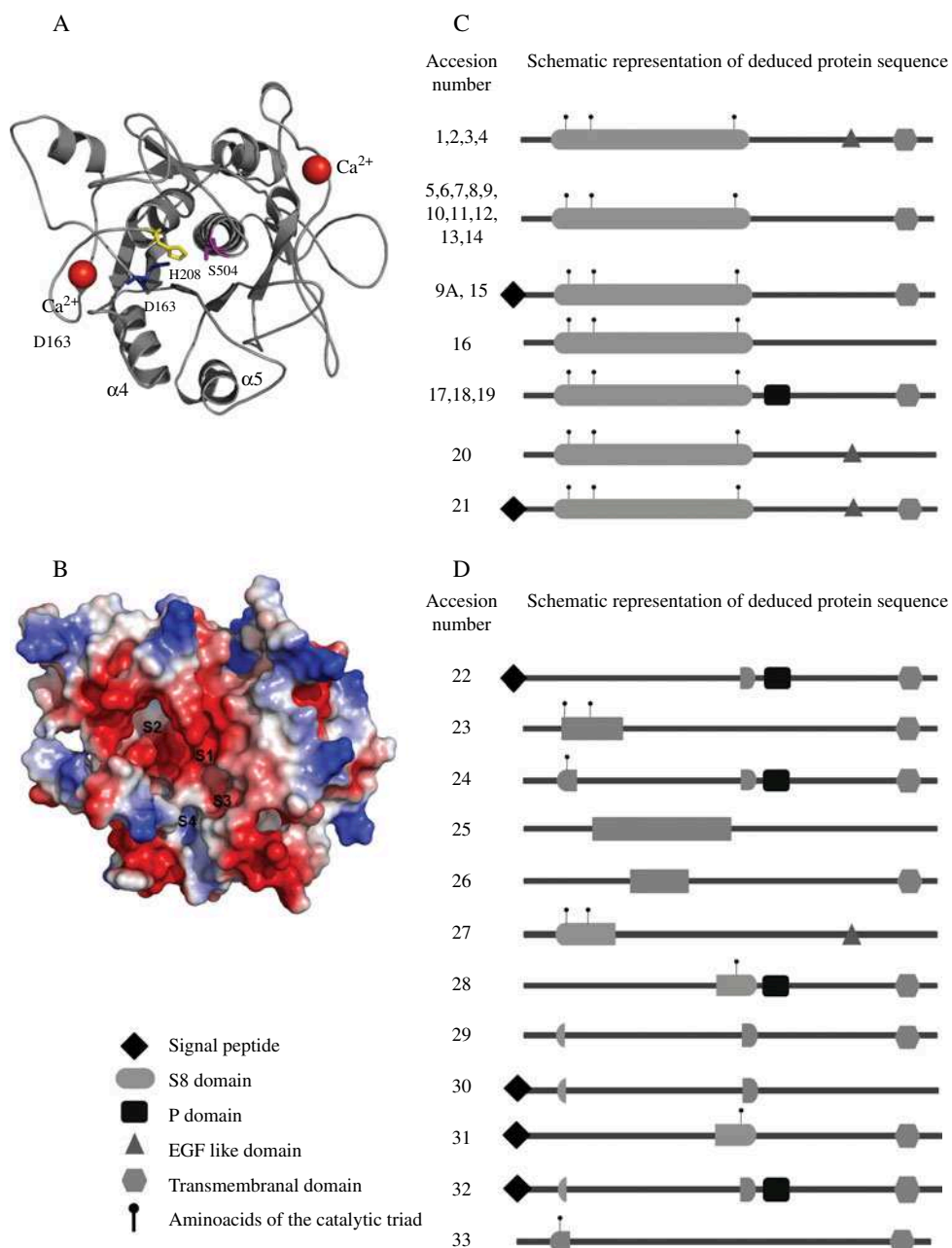


Fig. 5. Phylogenetic tree constructed with subtilisins of different organisms. The cladogram was generated by use of the Neighbor-joining algorithm. Bootstrap values from 1000 replicates are shown. The amino acid sequences were obtained of the MEROPS database: *B. licheniformis* (MER000309), *B. pumillus* (MER001755), *B. anthracis* (MER020846), *T. vulgaris* (MER000333), *O. iheyensis* (MER021983), *P. falciparum* (MER0004690), *P. chabaudi* (MER049747), *A. glutinosa* (MER002779), *A. thaliana* (MER015439), *O. sativa* (MER019141), *L. longiflorum* (MER000363), *M. truncatula* (MER063464), *P. trichocarpa* (MER134612), *S. lycopersicum* (MER002760), *R. communis* (MER177246), *S. tuberosum* (MER050332), *V. vinifera* (MER165001), *L. casei* (MER070961), *H. sapiens* (MER022416), *D. ordii* (MER158080), *C. porcellus* (MER103883), *B. floridae* (MER160186), *B. rerio* (MER171403), *M. mulatta* (MER161661), *M. domestica* (MER077833), *M. musculus* (MER022415), *O. latipes* (MER110645), *X. laevis* (MER172800), *C. melo* (MER001561), *A. benhamiae* (MER054530), *C. immitis* (MER142327), *M. canis* (MER005078), *T. rubrum* (MER029350), *E. coli* (MER037258), *A. healyi* (MER006074), *A. castellanii* (MER125416), *C. botulinum* (MER092670), *D. discoideum* (MER026564), *A. pernix* (MER005707), *T. onnurineus* (MER145074), *B. divergens* (MER087792), *T. gondii* (MER028365), *B. sp* (MER016985), *B. amyloquiefaciens* (MER000311).

Nevertheless, experimental data suggest that serine-type proteases may play important roles in the life cycle of parasites (Dejkriengkraikhul and Wilairat, 1983; Leher *et al.* 1998; Conseil *et al.* 1999).

One of the largest families of serine proteases is the subtilisins (Clan SB, family S8A) or subtilisin-like serine proteases. Subtilisins are an ancient group of calcium-dependent enzymes with very similar three-dimensional structures that are widely dispersed throughout evolution (Subbian *et al.* 2004). These enzymes are functionally diverse but in most cases are secreted to function either within the secretory

transport system or extracellularly. This family of proteases is characterized by a highly similar arrangement in the primary sequence of the amino acids that form the catalytic triad: aspartate (D), histidine (H) and serine (S) residues. These amino acids are grouped in the domains DSG, HGTH and GTS. In most cases subtilisins are synthesized as pre-pro-enzymes that are subsequently translocated through a cell membrane or the endoplasmic reticulum via the pre-peptide (or signal peptide). These enzymes are activated by cleavage of the pro-peptide which also functions as an intramolecular



COLOUR

Fig. 6. Theoretical model of SUB1 and structural analysis of the 33 subtilisin-like serine proteases annotated in the *Trichomonas vaginalis* genome. (A) Theoretical 3D model for SUB1. Residues of the catalytic triad: Asp 163 (blue), His 208 (yellow) and Ser 504 (purple) are shown in sticks. The $\alpha 4$ and $\alpha 5$ helixes, important for the interaction with the pro-peptide, are also shown. The putative calcium binding sites associated with protein stability are shown as red spheres. (B) Theoretical model of SUB1 surface and electrostatic potential. S1, S2, S3 and S4 subsites are indicated. Negatively charged regions are shown in red, positively charged regions are blue. (C) Schematic representation of the elements identified by bioinformatics in the SUB1 protein (9A) and in the subtilisin-like serine proteases annotated in the *T. vaginalis* TrichDB database. These sequences possess the complete catalytic triad characteristic of subtilisin-like serine proteases. Accession numbers are: 1: TVAG_124770; 2: TVAG_213290; 3: TVAG_227060; 4: TVAG_379760; 5: TVAG_003700; 6: TVAG_035840; 7: TVAG_045540; 8: TVAG_062550; 9: TVAG_090450; 9A: GenBank FJ384963 (SUB1 protease); 10: TVAG_109360; 11: TVAG_162950; 12: TVAG_230700; 13: TVAG_418990; 14: TVAG_376790; 15: TVAG_054370; 16: TVAG_079860; 17: TVAG_083790; 18: TVAG_103310; 19: TVAG_161600; 20: TVAG_238680; 21: TVAG_482670. For comparison, drawings are not to scale. (D) Genes annotated as subtilisin-like serine proteases in the *T. vaginalis* TrichDB database. These translated proteins lack some residues of the catalytic triad and have an incomplete S8 domain. The accession numbers are: 22: TVAG_028690; 23: TVAG_035830; 24: TVAG_042330; 25: TVAG_090240; 26: TVAG_142720; 27: TVAG_151300; 28: TVAG_184220; 29: TVAG_270490; 30: TVAG_276930; 31: TVAG_282560; 32: TVAG_321410; 33: TVAG_465250. For comparison, drawings are not to scale.

chaperone that aids in the correct folding of the mature enzyme (Inouye, 1991; Siezen and Leunissen, 1997).

T. vaginalis is a parasite with numerous proteases, most of which appear to be of the cysteine type. Three cysteine proteases (CP65, CP39 and CP30) have been shown to be involved in adherence and cytotoxicity of the parasite to the vaginal epithelial cells (VECs) (Alvarez-Sanchez *et al.* 2000; Hernandez-Gutierrez *et al.* 2003, 2004; Mendoza-Lopez *et al.* 2000). The numerous CPs are found in vaginal secretions of patients (Hernandez-Gutierrez *et al.* 2004). *T. vaginalis* CPs appear to induce apoptosis in VECs (Sommer *et al.* 2005) and have been shown to degrade all human immunoglobulin subtypes (Provenzano and Alderete, 1995; Min *et al.* 1998). In contrast, only 1 metallo-protease has been characterized to date (Brown *et al.* 2007). To our knowledge, serine proteases have only been proposed by bioinformatics analyses of the sequenced *T. vaginalis* genome (Carlton *et al.* 2007). This work represents the first experimental characterization of a putative subtilisin-like serine protease in *T. vaginalis*.

The *sub1* gene appears to be single copy by hybridization assays (data not shown), albeit additional weak hybridization bands were detected that could correspond to other subtilisin-like serine protease related genes described in the *T. vaginalis* genome (Carlton *et al.* 2007; Hirt *et al.* 2007). One main difference between the genome data (TVAG_090450) and our data (GenBank FJ384963) is the localization of the transcription start point for the *sub1* gene. In the 5' region of *sub1* we identified 2 potential transcription initiator promoter elements (Inr) (Liston and Johnson, 1999) and 2 possible in-frame ATGs for initiation of translation that are separated by 144-nt (49 aa). The correct mapping of the *sub1* transcription start point is important since transcription from the distal initiator would produce a translated product containing a putative signal peptide, as predicted from hydrophobicity and bioinformatics analyses. Alternatively, transcription of *sub1* from the proximal initiator would yield a protein without a putative signal peptide. In the genome database the annotated ORF (TVAG_090450) corresponding to the *sub1* gene starts at the proximal ATG. In our experimental conditions we found that *sub1* transcription starts at the distal initiator element, although a very low level of expression from the proximal initiator cannot be ruled out. Therefore, the translated SUB1 protein would have 17-aa at the amino-terminal end that could function as a pre-peptide or signal peptide (positions 1–17).

In studies done with AhSUB, a secreted subtilisin of *Acanthamoeba healyi*, the signal peptide is necessary for the proper intracellular trafficking and secretion of the protease (Moon *et al.* 2006). In

subtilisins of apicomplexan parasites such as PfSUB-1 of *Plasmodium falciparum* and TgSUB1 of *Toxoplasma gondii*, the signal peptide is probably cleaved in the endoplasmic reticulum during the secretory transport (Sajid *et al.* 2000; Miller *et al.* 2001). The putative signal peptide here identified in *T. vaginalis* SUB1 could direct the protein to the parasite's membrane through the endoplasmic reticulum. This is in good agreement with the finding of SUB1 on the trichomonad surface of non-permeabilized parasites. Although speculative, the localization of SUB1 on the parasite surface would allow SUB1 to participate, along with other proteases, in promoting the unmasking of adhesins thus facilitating vaginal epithelial cell attachment. This model has been hypothesized before (Arroyo and Alderete, 1989) and is supported in recent work (Garcia *et al.* 2005; Alvarez-Sanchez *et al.* 2008). Indeed, subtilisin-like serine proteases have been proposed as processing proteases for proteins involved in the interaction with host cells in protozoan parasites (Miller *et al.* 2001, 2003; Withers-Martinez *et al.* 2004). Interestingly, we have found that the expression of *sub1* mRNA is increased upon parasites in contact with epithelial cells (data not shown), as has been described for α -enolase (Mundodi *et al.* 2008) and for adhesins (Garcia *et al.* 2003). These observations are consistent with the occurrence of cell surface proteolytic activity for unmasking of adhesins and adherence of *T. vaginalis* to the host cells (Alderete and Neale, 1989; Arroyo and Alderete, 1989). If this was the case for SUB1, the diversification of proteolytic activities would give the parasite the ability to degrade a broad spectrum of substrates under different conditions.

In mature subtilisins, the aspartate residue of the catalytic triad is usually found in position 32. Consequently, we propose a putative pro-region or pro-peptide of 114 residues (positions 18–131) in SUB1. Many of the reported subtilisins are synthesized as pre-pro-enzymes. The pro-region is essential for protease activation given that the pro-peptide acts as an intramolecular chaperone that allows correct folding of the protein (Inouye, 1991; Chang *et al.* 1996). Another important feature found in the trichomonad SUB1 deduced sequence is the presence of a potential transmembrane helix close to the C terminal and would indicate that SUB1 is a Type I transmembrane protease.

It has been reported that iron is an essential nutrient for *T. vaginalis* and modulates its metabolism and growth (Wilson and Britigan, 1998). Iron positively regulates the synthesis of adhesins (Lehker *et al.* 1991) and resistance to lysis by complement (Alderete *et al.* 1995) due to the up regulation the expression of adhesins and of proteinases involved in complement (C3b) degradation. During the menstrual cycle the iron concentration in the vaginal cavity is constantly changing, providing a variable

environment for this parasite. An iron-responsive promoter has been described for the *ap65-1* gene (Ong *et al.* 2004, 2006, 2007). Two Myb proteins are involved in iron regulation: Myb1 binds to the sequences ANAACGAT and ATCG (Ong *et al.* 2006) and Myb2 binds to the sequences CGATA and tAtCGTc (Ong *et al.* 2007). Three T-rich (ATTTT, ATTATT and ATTTT) sequences are also important in iron regulation (Ong *et al.* 2004). Since our data show that the *sub1* gene is modulated by external availability of iron in the growth medium, we compared the *ap65-1* and the *sub1* upstream regions. In the 5' region of *sub1* gene we found the motif ⁻³⁶⁹ATCG⁻³⁶⁶ that could be a binding site for Myb1, ⁻²⁵⁸ACGATA⁻²⁵³ and ⁻⁴⁶⁶TATCGAC⁻⁴⁶⁰ that could be binding sites for Myb2 and three T-rich sequences (⁻¹⁷⁰ATTATT⁻¹⁶⁵, ⁻²⁰ATTTTT⁻¹⁵ and ⁻¹²ATTTTT⁻⁷). Nevertheless, further experiments are necessary to determine if iron directly regulates *sub1* gene expression.

Bioinformatics analyses of the SUB1 deduced amino acid sequence suggest that it has all the elements necessary to be an active subtilisin. At a primary sequence level, the catalytic core of SUB1 shows significant similarity with known subtilisins: SUB1 possesses the 3 amino acid residues conserved among known subtilisins (the catalytic triad residues Asp¹⁶³, His²⁰⁸, and Ser⁵⁰⁴), and an Asparagine (Asn³⁰⁹) residue necessary to form the oxyanion hole (Siezen and Leunissen, 1997). A theoretical model of SUB1 was constructed with PHYRE 2.0 based on the crystallographic structure (at 1.30 Å) of the alkaline serine protease kp-43 of *Bacillus sp* (Nonaka *et al.* 2004). This program was capable of modelling the catalytic conserved core, with a precision value of 100%. The theoretical model of SUB1 was then analysed with ProSA-web software for recognition of errors in 3-dimensional structures of proteins and the obtained z-score value (-5.43) suggests that the model is a good approximation of the real SUB1 structure. In this model the residues of the catalytic triad are in the correct spatial conformation to carry out the peptidase activity. It also possesses the $\alpha 4$ and $\alpha 5$ helices identified in subtilisin E (SbtE) of *Bacillus subtilis* (Subbian *et al.* 2004) that interact with the pro-peptide, and 2 calcium-binding sites important for protein stability (Alexander *et al.* 2001; Subbian *et al.* 2004). However, the assignment of SUB1 as an active subtilisin protease is still putative and needs additional experimental corroboration.

A phylogenetic tree was constructed with subtilisin sequences from several organisms. In this tree subtilisins are mainly distributed in 5 groups: Plants, animals, fungi, protozoa and bacteria. It has been reported that subtilisins may have different functions in each of these groups of organisms. In animals proprotein convertases process many precursor substrates including neuropeptides, peptide

hormones, receptors, enzymes and adhesion molecules (Rholam and Fahy, 2009). In plants, subtilisins have been involved in cellular signalling and processing of enzymes. In *Arabidopsis thaliana* subtilisin SDD1 (localized at the plasma membrane of developing stomata mother cells) generates signals that move to neighbouring cells (van der Hoorn, 2008). In pathogenic fungi, subtilisins are involved in the degradation of host tissues (St Leger *et al.* 1997; Bagga *et al.* 2004) while in protozoa parasites it has been reported that subtilisins are involved as virulence factors and in the processing proteins (Hong *et al.* 2000; Harris *et al.* 2005; Carruthers, 2006). Bacterial subtilisins are mainly involved in nutrition, although they have also been reported as virulence factors (Brown *et al.* 2000; Anderson *et al.* 2002). It is interesting to note that in the phylogenetic tree depicted in Fig. 5, the branch corresponding to *T. vaginalis* SUB1 is found in the same a clade as plants. Consequently, it is possible that SUB1 may be involved in cellular roles similar to those of plant subtilisins, for example, the processing of surface proteins or cellular signalling.

In an attempt to propose a possible amino acid preference for *T. vaginalis* SUB1, we identified the amino acid preference of plant subtilisins in the MEROPS database. S1 site preference is for polar uncharged residues such as glutamine (31.25%) and serine (12.25%), followed by hydrophobic residues (leucine and alanine, 12.25% respectively) this is consistent with the reported properties for S1 site (Barrett *et al.* 2004). Moreover, the surface electrostatic potential for the S1 site of SUB1 has the same negative electrostatic potential that S1 sites of plant subtilisins. Whether the amino acid preference of SUB1 is the same as plant subtilisins remains to be determined.

In total, 33 subtilisin-like serine protease genes belonging to the S8 family have been annotated in the *T. vaginalis* genome (Carlton *et al.* 2007) and the general structural organization of surface proteases has been proposed (Hirt *et al.* 2007). A detailed *in silico* analysis of the subtilisin-like serine proteases was carried out for all 33 proteins with several programs, as described in the Materials and Methods section. Only 21 out of the 33 annotated genes predict proteins with the 3 conserved residues of the catalytic triad and the complete S8 domain characteristic of subtilisin-like serine proteases. From these 21 annotated subtilisins, 6 have the EGF (Epidermal Growth Factor) motif particularly found in the extracellular domain of membrane-bound proteins, most of them have a predicted transmembranal domain that may anchor proteins to a membrane and only 2 have a predicted signal peptide for intracellular trafficking. The annotated sequence in the *T. vaginalis* genome database (TVAG_090450) corresponding to the *sub1* gene has been assigned starting at the proximal transcription initiation that

AQ1

would render a protein without a signal peptide. Nevertheless, our experimental data show that *sub1* is transcribed from the distal promoter and therefore possesses a putative signal peptide that could direct the protease towards the cytoplasmic membrane.

Most of the remaining 12 genes annotated as subtilisin-like serine proteases have a single residue of the catalytic triad and were probably classified as such because of a small region of similarity with subtilisin-like serine proteases. The expression, localization and characterization of the other 20 subtilisin-like serine protease genes annotated in the *T. vaginalis* genome remain to be determined.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Diego González-Halphen for helpful suggestions throughout the development of this work. Technical assistance from Lorena López Griego, Leticia Ávila and Juliana Herrera López is acknowledged. Finally, we thank Vasanthakrishna Mundodi of the Alderete laboratory for performing some of the RT-PCR reactions.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT (grants number P45037-Q and number 79983) and by the PAPIIT, UNAM (grant number IN214006), México. P.A.H.R. was recipient of a scholarship from the DGEP, UNAM and CONACYT, México.

REFERENCES

- Alderete, J. F. and Neale, K. A.** (1989). Relatedness of structures of a major immunogen in *Trichomonas vaginalis* isolates. *Infection and Immunity* **57**, 1849–1853.
- Alderete, J. F., Provenzano, D. and Lehker, M. W.** (1995). Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microbial Pathogenesis* **19**, 93–103.
- Alexander, P. A., Ruan, B. and Bryan, P. N.** (2001). Cation-dependent stability of subtilisin. *Biochemistry* **40**, 10634–10639.
- Alvarez-Sanchez, M. E., Avila-Gonzalez, L., Becerril-Garcia C., Fattel-Facenda, L. V., Ortega-Lopez, J. and Arroyo, R.** (2000). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis* **28**, 193–202.
- Alvarez-Sanchez, M. E., Carvajal-Gamez, B. I., Solano-Gonzalez, E., Martinez-Benitez, M., Garcia, A. F., Alderete, J. F. and Arroyo, R.** (2008). Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* cytotoxic CP65, a 65-kDa cysteine proteinase involved in cellular damage. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 2442–2451.
- Alvarez-Sanchez, M. E., Solano-Gonzalez, E., Yañez-Gomez, C. and Arroyo, R.** (2007). Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection/Institut Pasteur* **9**, 1597–1605.
- Allan, V. J.** (2000). *Protein Localization by Fluorescence Localization*, Oxford University Press, New York, USA.
- Anderson, E. T., Wetherell, M. G., Winter, L. A., Olmsted S. B., Cleary P. P. and Matsuka Y. V.** (2002). Processing, stability, and kinetic parameters of C5a peptidase from *Streptococcus pyogenes*. *European Journal of Biochemistry* **269**, 4839–4851.
- Arroyo, R. and Alderete, J. F.** (1989). *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infection and Immunity* **57**, 2991–2997.
- Bagga, S., Hu, G., Screen, E. S. and St Leger, R. J.** (2004). Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metharizium anisopliae*. *Gene* **324**, 159–169.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D. and Woessner, J. F.** (2004). Serine and threonine peptidases. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* Vol 2, 2nd Edn, pp. 1787–1789. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Von, H. G. and Brunak, S.** (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* **340**, 783–795.
- Bennett-Lovsey, R. M., Herbert, A. D., Sternberg, M. J. and Kelley, L. A.** (2008). Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins* **70**, 611–625.
- Brown, G. D., Dave, J. A., Gey van Pittius, N. C., Stevens, L., Ehlers, M. R. W. and Beyers, A. D.** (2000). The mycosins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: a family of subtilisin-like serine proteases. *Gene* **254**, 147–155.
- Brown, M. T., Goldstone, H. M., Bastida-Corcuera, F., Delgadillo-Correa, M. G., McArthur, A. G. and Johnson, P. J.** (2007). A functionally divergent hydrogenosomal peptidase with protomitochondrial ancestry. *Molecular Microbiology* **64**, 1154–1163.
- Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J. R., Bidwell, S. L., Alsmark, U. C., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C. J., Dacks, J. B., Foster, P. G., Simillion, C., Van De, P. Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., Westrop, G. D., Muller, S., Dessi, D., Fiori, P. L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F. D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M. T., Hayes, R. D., Mukherjee, M., Okumura, C. Y., Schneider, R., Smith, A. J., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B. J., Perlea, M., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R., Shu, C. L., Osoegawa, K., De Jong, P. J., Hrdy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, S. B., Logsdon, J. M., JR., Henze, K., Gupta, A., Wang, C. C., Dunne, R. L., Upcroft, J. A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S. L., Tang, P., Chiu, C. H., Lee, Y. S., Embley, T. M., Coombs, G. H., Mottram, J. C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C. M. and Johnson, P. J.** (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* **315**, 207–212.
- Carruthers, V. B.** (2006). Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. *International Journal for Parasitology* **36**, 595–600.
- Cohen, J.** (2000). HIV transmission. AIDS researchers look to Africa for new insights. *Science* **287**, 942–943.
- Conseil, V., Soete, M. and Dubremetz, J. F.** (1999). Serine protease inhibitors block invasion of host cells

- by *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1358–1361.
- Cotch, M. F., Pastorek, J. G., Nugent, R. P., Hillier, S. L., Gibbs, R. S., Martin, D. H., Eschenbach, D. A., Edelman, R., Carey, J. C., Regan, J. A., Krohn, M. A., Klebanoff, M. A., Rao, A. V. and Rhoads, G. G.** (1997). *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Sexually Transmitted Diseases* **24**, 353–360.
- Chang, Y. C., Kadokura, H., Yoda, K. and Yamasaki, M.** (1996). Secretion of active subtilisin YaB by a simultaneous expression of separate pre-pro and pre-mature polypeptides in *Bacillus subtilis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **219**, 463–468.
- Dailey, D. C., Chang, T. H. and Alderete, J. F.** (1990). Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology* **101**, 171–175.
- Dejkriengkraikhul, P. and Wilairat, P.** (1983). Requirement of malarial protease in the invasion of human red cells by merozoites of *Plasmodium falciparum*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **69**, 313–317.
- Diamod, L.** (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *The Journal of Parasitology* **43**, 488–490.
- Espinosa, N., Hernandez, R., Lopez-Griego, L. and Lopez-Villaseñor, I.** (2002). Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene* **289**, 81–86.
- Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Cogill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H. R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L. and Bateman, A.** (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **36**, D281–D288.
- Fiori, P. L., Rappelli, P., Addis, M. F., Mannu, F. and Cappuccinelli, P.** (1997). Contact-dependent disruption of the host cell membrane skeleton induced by *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity* **65**, 5142–5148.
- Garcia, A. F., Benchimol, M. and Alderete, J. F.** (2005). *Trichomonas vaginalis* polyamine metabolism is linked to host cell adherence and cytotoxicity. *Infection and Immunity* **73**, 2602–2610.
- Garcia, A. F., Chang, T. H., Benchimol, M., Klumpp, D. J., Lehker, M. W. and Alderete, J. F.** (2003). Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology* **47**, 1207–1224.
- Harris, P. K., Yeoh, S., Dłuzewski, A. R., O'Donnell, R. A., Whitters-Martinez, C., Hackett, F., Bannister, L. H., Mitchell, G. H. and Blackman, M. J.** (2005). Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. *Plos Pathogens* **1**, 0241–0251.
- Hernandez-Gutierrez, R., Avila-Gonzalez, L., Ortega-Lopez, J., Cruz-Talonia, F., Gomez-Gutierrez, G. and Arroyo, R.** (2004). *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental Parasitology* **107**, 125–135.
- Hernandez-Gutierrez, R., Ortega-Lopez, J. and Arroyo, R.** (2003). A 39-kDa cysteine proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal cytotoxicity. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* **50** (Suppl.) 696–698.
- Hirt, R. P., Noel, C. J., Sicheritz-Ponten, T., Tachezy, J. and Fiori, P. L.** (2007). *Trichomonas vaginalis* surface proteins: a view from the genome. *Trends in Parasitology* **23**, 540–547.
- Hong, Y. C., Kong, H. H., Ock, M. S., Kim, I. S. and Chung, D. I.** (2000). Isolation and characterization of a cDNA encoding a subtilisin-like serine proteinase (ahSUB) from *Acanthamoeba healyi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **111**, 441–446.
- Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Bork, P., Das, U., Daugherty, L., Duquenne, L., Finn, R. D., Gough, J., Haft, D., Hulo, N., Kahn, D., Kelly, E., Laugraud, A., Letunic, I., Lonsdale, D., Lopez, R., Madera, M., Maslen, J., McAnulla, C., McDowall, J., Mistry, J., Mitchell, A., Mulder, N., Natale, D., Orengo, C., Quinn, A. F., Selengut, J. D., Sigrist, C. J., Thimma, M., Thomas, P. D., Valentin, F., Wilson, D., Wu, C. H. and Yeats, C.** (2009). InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Research* **37**, D211–D215.
- Inouye, M.** (1991). Intramolecular chaperone: the role of the pro-peptide in protein folding. *Enzyme* **45**, 314–321.
- Kall, L., Krogh, A. and Sonnhammer, E. L.** (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *The Journal of Molecular Biology* **338**, 1027–1036.
- Kall, L., Krogh, A. and Sonnhammer, E. L.** (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Research* **35**, W429–W432.
- Kelley, L. A., MacCallum, R. M. and Sternberg, M. J.** (2000). Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *The Journal of Molecular Biology* **299**, 499–520.
- Kissinger, P., Amedee, A., Clark, R. A., Dumestre, J., Theall, K. P., Myers, L., Hagensee, M. E., Farley, T. A. and Martin, D. H.** (2009). *Trichomonas vaginalis* treatment reduces vaginal HIV-1 shedding. *Sexually Transmitted Diseases* **36**, 11–16.
- Kissinger, P., Secor, W. E., Leichter, J. S., Clark, R. A., Schmidt, N., Curtin, E. and Martin, D. H.** (2008). Early repeated infections with *Trichomonas vaginalis* among HIV-positive and HIV-negative women. *Clinical Infectious Diseases* **46**, 994–999.
- Klemba, M. and Goldberg, D. E.** (2002). Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annual Review of Biochemistry* **71**, 275–305.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *The Journal of Molecular Biology* **157**, 105–132.
- Laga, M., Manoka, A., Kivuvu, M., Malele, B., Tuliza, M., Nzila, N., Goeman, J., Behets, F., Batter, V. and Alary, M.** (1993). Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS* **7**, 95–102.
- Leher, H., Silvany, R., Alizadeh, H., Huang, J. and Niederkorn, J. Y.** (1998). Mannose induces the release

- of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. *Infection and Immunity* **66**, 5–10.
- Lehker, M. W., Arroyo, R. and Alderete, J. F.** (1991). The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Experimental Medicine* **174**, 311–318.
- Liang, M. P., Banatao, D. R., Klein, T. E., Brutlag, D. L. and Altman, R. B.** (2003). WebFEATURE: An interactive web tool for identifying and visualizing functional sites on macromolecular structures. *Nucleic Acids Research* **31**, 3324–3327.
- Liston, D. R. and Johnson, P. J.** (1999). Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 2380–2388.
- Lopez-Villaseñor, I., Contreras, A. P., Lopez-Griego, L., Alvarez-Sanchez, E. and Hernandez, R.** (2004). *Trichomonas vaginalis* ribosomal DNA: analysis of the intergenic region and mapping of the transcription start point. *Molecular and Biochemical Parasitology* **137**, 175–179.
- McClelland, R. S., Sangare, L., Hassan, W. M., Lavreys, L., Mandaliya, K., Kiarie, J., Ndinya-Achola, J., Jaoko, W. and Baeten, J. M.** (2007). Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *The Journal of Infectious Diseases* **195**, 698–702.
- Mendoza-Lopez, M. R., Becerril-Garcia, C., Fattel-Facenda, L. V., Avila-Gonzalez, L., Ruiz-Tachiquin, M. E., Ortega-Lopez, J. and Arroyo, R.** (2000). CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infection and Immunity* **68**, 4907–4912.
- Miller, S. A., Binder, E. M., Blackman, M. J., Carruthers, V. B. and Kim, K.** (2001). A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 45341–45348.
- Miller, S. A., Thathy, V., Ajioka, J. W., Blackman, M. J. and Kim, K.** (2003). TgSUB2 is a *Toxoplasma gondii* rhoptry organelle processing proteinase. *Molecular Microbiology* **49**, 883–894.
- Min, D. Y., Hyun, K. H., Ryu, J. S., Ahn, M. H. and Cho, M. H.** (1998). Degradations of human immunoglobulins and hemoglobin by a 60 kDa cysteine proteinase of *Trichomonas vaginalis*. *The Korean Journal of Parasitology* **36**, 261–268.
- Moon, E. K., Lee, S. T., Chung, D. I. and Kong, H. H.** (2006). Intracellular localization and trafficking of serine proteinase AhSub and cysteine proteinase AhCP of *Acanthamoeba healyi*. *Eukaryotic Cell* **5**, 125–131.
- Mundodi, V., Kucknoor, A. S. and Alderete, J. F.** (2008). Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated alpha-enolase of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity* **76**, 523–531.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and Von, H. G.** (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**, 1–6.
- Nonaka, T., Fujihashi, M., Kita, A., Saeki, K., Ito, S., Horikoshi, K. and Miki, K.** (2004). The crystal structure of an oxidatively stable subtilisin-like alkaline serine protease, KP-43, with a C-terminal beta-barrel domain. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 47344–47351.
- Ong, S. J., Hsu, H. M., Liu, H. W., Chu, C. H. and Tai, J. H.** (2006). Multifarious transcriptional regulation of adhesion protein gene ap65-1 by a novel Myb1 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryotic Cell* **5**, 391–399.
- Ong, S. J., Hsu, H. M., Liu, H. W., Chu, C. H. and Tai, J. H.** (2007). Activation of multifarious transcription of an adhesion protein ap65-1 gene by a novel Myb2 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 6716–6725.
- Ong, S. J., Huang, S. C., Liu, H. W. and Tai, J. H.** (2004). Involvement of multiple DNA elements in iron-inducible transcription of the ap65-1 gene in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology* **52**, 1721–1730.
- Provenzano, D. and Alderete, J. F.** (1995). Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity* **63**, 3388–3395.
- Rholam, M. and Fahy C.** (2009). Processing of peptide and hormone precursors at the dibasic cleavage sites. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 2075–2091.
- Sajid, M., Withers-Martinez, C. and Blackman, M. J.** (2000). Maturation and specificity of *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease-1, a malaria merozoite subtilisin-like serine protease. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 631–641.
- Siezen, R. J. and Leunissen, J. A.** (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science* **6**, 501–523.
- Sipl, M. J.** (1993). Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* **17**, 355–362.
- Sommer, U., Costello, C. E., Hayes, G. R., Beach, D. H., Gilbert, R. O., Lucas, J. J. and Singh, B. N.** (2005). Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 23853–23860.
- St Leger, R. J., Joshi, L., Roberts, D. W.** (1997). Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology* **143**, 1983–1992.
- Subbian, E., Yabuta, Y. and Shinde, U.** (2004). Positive selection dictates the choice between kinetic and thermodynamic protein folding and stability in subtilases. *Biochemistry* **43**, 14348–14360.
- van der Hoorn, R. A. L.** (2008). Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 191–223.
- Van Der Pol, B., Kwok, C., Pierre-Louis, B., Rinaldi, A., Salata, R. A., Chen, P. L., Van De Wijgert, J., Mmimo, F., Mugerwa, R., Chipato, T. and Morrison, C. S.** (2008). *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *The Journal of Infectious Diseases* **197**, 548–554.
- Viikki, M., Pukkala, E., Nieminen, P. and Hakama, M.** (2000). Gynaecological infections as risk

- determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncologica* **39**, 71–75.
- Wiederstein, M. and Sippl, M. J.** (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research* **35**, W407–W410.
- Wilson, M. E. and Britigan, B. E.** (1998). Iron acquisition by parasitic protozoa. *Parasitology Today* **14**, 348–353.
- Withers-Martinez, C., Jean L. and Blackman, M. J.** (2004). Subtilisin-like proteases of the malaria parasite. *Molecular Microbiology* **53**, 55–63.