



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**CARACTERIZACIÓN DE CKS1 Y CKS2, SUBUNIDADES REGULADORAS DE  
LA ACTIVIDAD DE CDKs EN *Trichomonas vaginalis*.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Biol. Nataly Morales Galeana

TUTORA PRINCIPAL  
Dra. María Imelda López Villaseñor  
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

COMITÉ TUTOR  
Dra. Ana María Cevallos Gaos.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

Dr. Roberto Coria Ortega  
Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

MÉXICO, D. F. marzo, 2015



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.

# Caracterización de CKS1 y CKS2, subunidades reguladoras de la actividad de CDKs en *Trichomonas vaginalis*.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Imelda López Villaseñor, en el laboratorio B137 en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Imelda López Villaseñor	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Ana María Cevallos Gaos	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular

Se reconoce y agradece la participación técnica, asistencia y asesoría de la M. en C. Karla Concepción López Pacheco durante el desarrollo del trabajo experimental de este proyecto de Maestría.

Se utilizó el servicio de secuenciación de DNA del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, el cual fue realizado por la M. en C. Patricia de la Torre.

Se agradece el apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir al IV Congreso de Transducción de Señales de la Sociedad Mexicana de Bioquímica.

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), a través del donativo IN205813.

Este estudio de maestría fue apoyado con una beca para estudios de posgrado de tiempo completo otorgada por CONACyT.

El jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Jorge Vázquez Ramos	Facultad de Química
Vocal	Dra. María Elena Ibarra Rubio	Facultad de Química
Secretario	Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez	Instituto de Ecología
Suplente	Dra. Martha Robles Flores	Facultad de Medicina
Suplente	Dra. Martha Patricia Coello Coutiño	Facultad de Química

## Agradecimientos

A la *Dra. Imelda López Villaseñor* por admitirme en su equipo de trabajo, por su dirección y sus enseñanzas. Su tutoría y su apoyo fueron fundamentales para mi desarrollo y para la culminación de este proyecto. Gracias Imelda, eres una gran persona.

A mi *Comité Tutor* conformado por el Dr. Roberto Coria y la Dra. Ana María Cevallos, por el tiempo prestado para criticar y dirigir el trabajo realizado.

Al *Dr. Roberto Hernández* y a su grupo de trabajo, por compartir sus ideas y sus recomendaciones en cada seminario.

A la *M. C. Karla López Pacheco* por el gran apoyo técnico y por sus valiosos consejos.

A los *miembros del jurado*: Dr. Jorge Vázquez, Dra. María Elena Rubio, Dra. María de la Paz Sánchez, Dra. Martha Robles y Dra. Patricia Coello, por la revisión y las correcciones a este escrito.

A *mi padre*, por ser la respuesta de mi vida.

A *mis papás*, por brindarme su apoyo incondicional, por guiar a mi persona y por sustentar gran parte de mi vida. Los amo profundamente.

A *mi numerosa familia*, por el núcleo tan importante que conforman, por estar conmigo y por recordarme lo necesario y lo más importante siempre que lo olvido. Porque yo también soy todos ustedes.

A *mis compañeros* de laboratorio Karlita, Lluvia, Oli, Sandra y Erick que me apoyaron académicamente con la paciencia y la gracia que los caracteriza, y por supuesto por compartir conmigo diversas experiencias.

A *todos los amigos* que convivieron conmigo durante este proceso, principalmente a: Lau, Luletas, Sandunga, Anita, Gloria y Beto en quienes confío y encuentro felicidad, distracción y comprensión siempre que lo necesito. Gracias chicos, los quiero.

A *Daniel*, porque materializa el amor, por la paz que me provoca y por convertirse en un proyecto. Te amo.

## ABREVIATURAS

**ATP:** Adenosín Trifosfato

**APC/C:** Complejo promotor de la anafase (por sus siglas en inglés)

**cDNA:** Cadenas de DNA complementarias al RNA

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**dNTPs:** Desoxinucleótidos trifosfatados

**EST:** Marcador de secuencia expresada (por sus siglas en inglés)

**HisProbe-HRP:** Sonda que detecta la etiqueta de 6X-His

**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-tio-galactósido

**kDa:** kilo Daltones

**LB:** Medio Luria Bertani

**mRNA:** RNA mensajero

**OD:** Densidad Óptica

**ORF:** Marco de lectura abierto "Open Reading Frame"

**PEG:** Polietilenglicol

**pb:** Pares de bases

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa utilizando como templado cDNA sintetizado con la enzima retrotranscriptasa

**SCF:** Complejo que ubiquitina proteínas y contiene a la proteína SKP con una F-box (por sus siglas en inglés)

**SDS:** Dodecil Sulfato de Sodio

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio

**TE:** Buffer Tris.HCl 1mM, EDTA 0.2 mM

***tvcks:*** gen que codifica para la proteína CKS de *Trichomonas vaginalis*

***TvCKS:*** Subunidad reguladora de cinasa dependiente de ciclina de *Trichomonas vaginalis*

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**YNB w/o aminoacids:** Base nitrogenada para levadura (por sus siglas en inglés) sin aminoácidos.

**YPD:** Medio de cultivo rico para levaduras que contiene, extracto de levadura, peptona y dextrosa.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	
2.1 Taxonomía de <i>Trichomonas vaginalis</i>	8
2.2 Biología celular	10
2.3 Importancia médica	11
2.4 Genética	13
2.5 El ciclo celular y sus principales reguladores	15
2.6 Reguladores del ciclo celular de protozoarios	20
2.7 Control de la actividad de CDKs de ciclo celular	22
<b>3. ANTECEDENTES</b>	
3.1 Características estructurales de las (CKSs)	23
3.2 Funciones de las CKSs	25
3.3 Otras funciones de las CKSs	28
3.3 Las CKSs de organismos modelo	30
<b>4. OBJETIVOS</b>	
General	33
Particulares	33
<b>5. METODOLOGÍA</b>	
5.1 Alineamiento de secuencias de CKSs	34
5.2 Modelado <i>in silico</i> de las proteínas TvCKSs	34
5.3 Obtención de los extremos 3' de los cDNAs de <i>tvcks</i>	
5.3.1 Cultivo de <i>Trichomonas vaginalis</i>	35
5.3.2 Purificación de RNA poly A+	35
5.3.3 Síntesis de cDNA	35
5.3.4 Reacción de PCR	35
5.3.5 PCR anidada	36
5.3.6 Clonación en el vector pGEM-TE	36
5.3.7 Transformación de <i>E. coli</i>	38
5.3.8 Obtención de DNA plasmídico	38
5.3.9 Análisis de restricción	39
5.3.10 Secuenciación	39
5.4 Clonación de genes y expresión de proteínas recombinantes	
5.4.1 Amplificación de los genes <i>tvcks1</i> y <i>tvcks2</i>	40
5.4.2 Clonación en el vector pGEM-T Easy	40

5.4.3	Subclonación en el vector pQE30	41
5.4.4	Obtención de las proteínas recombinantes y su Purificación	41
5.4.5	SDS-PAGE y Western Blot	43
5.5	Ensayo de Doble híbrido en levaduras	
5.5.1	Amplificación de los genes de <i>tvcks1</i> y <i>tvcks2</i>	43
5.5.2	Clonación en pJG4-5	44
5.5.3	Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	45
5.5.4	Síntesis de reporteros	47
5.5.5	Subclonación en pEG202	48
6.	RESULTADOS	
6.1	Alineamiento de secuencias de CKSs	49
6.2	Modelado <i>in silico</i> de las <i>TvCKSs</i> putativas de <i>T. vaginalis</i>	52
6.3	Expresión de <i>tvcks1</i> y <i>tvcks2</i> a nivel de RNA mensajero	53
6.4	Formación de dímeros de <i>TvCKS1</i>	58
6.5	Interacciones de <i>TvCKSs</i> con CRKs de <i>T. vaginalis</i>	61
6.6	La fusión de <i>TvCKS1</i> y <i>TvCKS2</i> a un dominio de unión a DNA es capaz de activar la transcripción de dos reporteros de un sistema de doble híbrido	70
7.	DISCUSIÓN	74
8.	CONCLUSIONES	83
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
10.	APÉNDICES	91

## 1. RESUMEN

*Trichomonas vaginalis* es un protozoo parásito causante de la tricomonosis humana, una enfermedad de transmisión sexual; este parásito forma parte de la clase Parabasalia, que se caracteriza por agrupar a eucariontes de divergencia evolutiva temprana; ambas razones hacen de este organismo un interesante objeto de estudio tanto por su importancia médica como por el conocimiento básico de su biología.

El ciclo celular eucarionte está regulado principalmente por la actividad de heterodímeros de cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y ciclinas (CYC). La formación y funcionalidad de estos complejos depende en gran medida de las modificaciones postraduccionales de las que es objeto la CDK, entre ellas, su unión a CKS, subunidad reguladora de cinasas dependientes de ciclinas.

Las CKSs son proteínas de bajo peso molecular. En su forma monomérica se unen al extremo carboxilo de las CDKs y pueden regular su actividad mediante dos mecanismos: el primero, incrementando la afinidad de la CDK por sustratos fosforilados, y permitiéndole a ésta fosforilar esos sustratos en múltiples sitios; y el segundo, constituyendo una plataforma de acoplamiento entre la CDK y sus reguladores. Por otra parte, las CKSs interactúan con el proteosoma y pueden regular la degradación de algunas moléculas involucradas en el ciclo celular. Se han descrito CKSs en levaduras, protozoarios, metazoarios y plantas.

Uno de los intereses de nuestro laboratorio es la caracterización de proteínas involucradas en el ciclo celular de *T. vaginalis*. En este trabajo se identificaron dos genes que están anotados en el genoma de *T. vaginalis* como GenBank: XM\_001325540.1 y XM\_001320060.1; se propone que estos genes codifican para CKSs y se denominaron *tvcks1* y *tvcks2*, respectivamente. Se determinó la expresión de ambos genes a través de la clonación y secuenciación de los cDNAs respectivos, y se encontró que *tvcks1* puede poliadenilarse en varios sitios, ya que la señal de poliadenilación está en distintos sitios en la región 3' del gen. Los genes codifican para proteínas de 82 aminoácidos y la estructura primaria de ambas se modeló en el programa PHYRE2, resultando estructuras similares a las CKSs de humano.

Una de las características de las CKSs es su capacidad para formar dímeros *in vitro*. Para determinar la capacidad de dimerización de las TvCKSs, se expresaron las proteínas recombinantes de TvCKS1 y TvCKS2, se purificaron y se analizaron mediante SDS-PAGE (con menor concentración de SDS) y Western blot. Se detectaron posibles dímeros de 24 kDa de la TvCKS1.

Las CKSs tienen gran afinidad por las CDKs, *in vitro*. Tres posibles CDKs de *T. vaginalis* (TvCRKs) interactúan de manera diferencial con las TvCKSs en ensayos de doble híbrido.

La caracterización de las CKSs de *T. vaginalis* permite acercarnos al estudio de la regulación del ciclo celular en este protozoo parásito, ya que este tipo de proteínas se ha utilizado en la identificación y caracterización de complejos CDK/CYC.



# CARACTERIZACIÓN DE CKS1 Y CKS2, SUBUNIDADES REGULADORAS DE LA ACTIVIDAD DE CDKs EN *Trichomonas Vaginalis*.

## 2. INTRODUCCIÓN

### GENERALIDADES DE *Trichomonas vaginalis*

#### 2.1 Taxonomía de *Trichomonas vaginalis*

En un contexto evolutivo se han descrito seis grupos que engloban a los eucariontes: Amoebozoa, Opisthokonta, Excavata, Chromalveolata, Plantae y Rhizaria. Dentro del grupo Excavata encontramos a la clase Parabasalia que agrupa organismos unicelulares microaerófilos, flagelados, con aparato parabasal y con orgánulos productores de ATP e hidrógeno molecular; pueden ser comensales de vertebrados e invertebrados, o endosimbiontes de éstos últimos, pocos son de vida libre (Simpson y Roger, 2004 y Malik et al., 2011). Los parabasálidos no tienen mitocondrias, al igual que los diplomonádidos y los microsporidia, por lo que son comúnmente llamados amitocondriados (Horner et al., 1996).

Más de 400 especies han sido caracterizadas como parabasálidas. Con base en análisis filogenéticos y morfológicos se dividen en seis grupos: Trichomonadea, Tritrichomonadea, Hypotrichomonadea, Spirotrichonymphea, Cristamonadea y Trichonymphea (Conrad, 2013 y Malik et al., 2011).

*Trichomonas vaginalis* es un protozoo parásito que pertenece al grupo Trichomonadea y su clasificación taxonómica es la siguiente ([www.trichbd.org](http://www.trichbd.org)):

Dominio: Eukarya

Clase: Parabasalia

Orden: Trichomonadida

Familia: Trichomonadidae

Género: *Trichomonas*

Especie: *Trichomonas vaginalis*

*T. vaginalis* comparte el grupo de los amitocondriados con *Giardia* y *Entamoeba*, otros dos parásitos del humano que son de gran importancia médica. Análisis filogenéticos de la pequeña subunidad del RNA ribosomal 16S y factores de la fase de elongación de la traducción (EF-1a y EF-2) colocan a los amitocondriados cerca de la base de los árboles eucariontes (Sogin, 1991). Por ello se sugiere fuertemente que los parabasálidos son organismos de divergencia evolutiva temprana (Sogin et al., 1991 y Embley y Hirt, 1998).

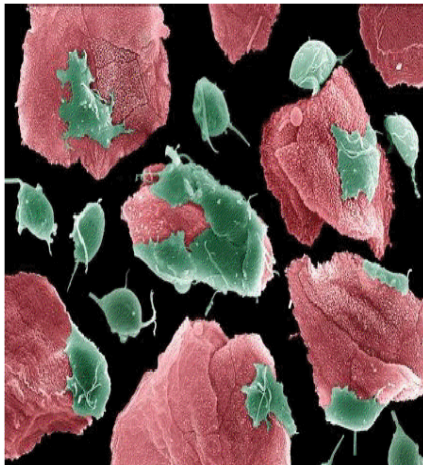
Anteriormente se creía que debido a la carencia de mitocondrias, los organismos amitocondriados representaban una fase premitocondrial en la evolución de los eucariontes (Vanacova et al., 2003); sin embargo, hoy en día también existe la hipótesis de que el ancestro de los tricomonádidos albergó al endosimbionte progenitor de las mitocondrias, y después de la divergencia de los tricomonádidos este endosimbionte dió lugar a los hidrogenosomas (Sogin y Silberman, 1998 y Roger et al., 1996). Otros autores consideran que los hidrogenosomas son una modificación de la mitocondria (Cavalier-Smith, 1987 y Gunderson, 1995). Metabólicamente este parásito es anaerobio y genera su energía en el citoplasma a través de la glicólisis. Los hidrogenosomas se encargan de generar ATP adicional mediante el metabolismo del malato o del piruvato a través de la oxidoreductasa de piruvato: ferredoxina, y utilizan la succinil coenzima A sintetasa para catalizar la formación de ATP. Uno de los productos de la reacción es el hidrógeno molecular, y de ahí el nombre de hidrogenosomas (Müller, 1993, Lahti et al., 1994 y Johnson et. al., 1990).

Se demostró la presencia de genes que codifican para proteínas de choque térmico (cpn60 y HSP70) en el genoma de *T. vaginalis*; en otros eucariontes estas proteínas cumplen la función de chaperonas que permiten el plegado de proteínas que se importan a la mitocondria. La evidencia anterior apoya la idea de que los tricomonadidos alojaron el endosimbionte precursor de las mitocondrias, sin embargo, aún hace falta determinar si este endosimbionte dio lugar a los hidrogenosomas, o si primero originó mitocondrias que después se modificaron a hidrogenosomas (Germot et al., 1996 y Horner et al., 1996).

### 2.3 Biología celular

*T. vaginalis* mide entre 10 y 20  $\mu\text{m}$  de largo y tiene un diámetro aproximado de 7 $\mu\text{m}$ . En este protozooario se pueden observar orgánulos característicos de los eucariontes como el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y el sistema vacuolar, entre otros (Arroyo et al., 1993). Las características de su citoesqueleto son inusuales, tiene algunas estructuras especializadas como la costa, el axostilo y la pelta. Los parabasálidos cuentan con un aparato parabasal que consiste en el aparato de Golgi unido a fibras estriadas cerca del cariomastigonte (estructura formada por el núcleo y cuatro cuerpos basales que anclan los tres flagelos anteriores y el flagelo recurrente) (Malik et al., 2011). *T. vaginalis* tiene cuatro flagelos anteriores y un quinto flagelo asociado a su membrana ondulante (Arroyo et al., 1993 y Hirt, 2013).

*T. vaginalis* coloniza la mucosa del epitelio vaginal en la mujer y de la uretra en el hombre, y fuera de su hospedero no es capaz de sobrevivir. La forma infectiva y el único estadio del parásito se conoce como trofozoito, durante la infección este cambia rápidamente de una forma ovoide a una ameboide aplanada (ver figura 1) (Hirt, 2013).



**Figura 1. Micrografía electrónica de *T. vaginalis*.** Se observa el trofozoito adherido a células epiteliales vaginales (Cover Science. Antonio Pereira-Neves y Marlene Benchimol).

## 2.4 Importancia médica

*T. vaginalis* es un parásito extracelular que habita el tracto urogenital humano y causa la enfermedad conocida como trichomonosis. Esta enfermedad es de distribución cosmopolita y se ha observado en todos los grupos raciales y en todos los estratos socioeconómicos (Petrin et al., 1998).

La trichomonosis es una de las enfermedades sexuales no virales más recurrentes y se transmite por contacto sexual. Se estima que 276.4 millones de nuevos casos ocurren cada año en todo el mundo (World Health Organization, WHO 2012). En México, según el Sistema de Vigilancia Epidemiológica, la tricomonosis ocupa el duodécimo lugar dentro de las principales 20 enfermedades transmisibles, siendo las mujeres las más afectadas. Los estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala son los de mayor incidencia (Información Epidemiológica de Morbilidad Anuario 2011).

Se ha descrito que *T. vaginalis* puede ser un reservorio para diversos virus. Existen cuatro virus de doble cadena de RNA que penetran en el parásito por medio de endocitosis, pertenecen a la familia Totiviridae y sus genomas miden alrededor de 4.5 kb, en esa familia también se incluyen los virus de otros protistas parásitos como *Giardia Lamblia* y *Leishmania braziliens*. Los virus de *T. vaginalis* (TVV) afectan la expresión de las cisteín proteasas y de la glicoproteína inmunógena P270 que se expresa en la superficie del parásito, por lo cual se piensa que la presencia de los virus está asociada con la virulencia de *T. vaginalis* (Benchimol et al., 2002, Conrad et al., 2013, Hirt et al., 2013, Kissinger y Adamski et al., 2013 y Petrin, 1998). Se ha demostrado *in vitro* que el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) también puede internalizarse en el trofozoito del parásito a través de vesículas endocíticas y el virus es albergado aproximadamente 48 horas, tras las cuales es degradado dentro de vacuolas citoplasmáticas (Rendón-Maldonado et al., 2003).

### Síntomatología

En las mujeres la trichomonosis ocasiona vaginitis, provoca inflamación e irritación de la vulva, flujo vaginal con mal olor y color anormal, además de

microhemorragias cervicales conocidas como cérvix de fresa; en estadios más avanzados de la infección se observa prurito y dispareunia (dolor sexual durante y/o después del coito). En los hombres es poco probable que se desarrollen síntomas, sin embargo en ocasiones se desarrolla uretritis purulenta (Petrin, 1998). La trichomonosis asintomática es un problema mayor, ya que las personas infectadas no tratadas se convierten en reservorios potenciales para la transmisión del parásito (Cudmore y Garber, 2010).

Existen otros riesgos para las mujeres que sufren tricomonosis, ya que las embarazadas pueden sufrir aborto, tener un parto prematuro o hijos con bajo peso al nacer. La causa atribuible es la reacción inflamatoria que produce la presencia de *T. vaginalis* (Fichorova et al., 2009 y Sutton, 1999). En los hombres se puede manifestar prostatitis, inflamación pélvica y descarga uretral que puede ser poca o moderada (Krieger, 1995 y Cotch et al., 1997).

Se considera que la trichomonosis puede facilitar la infección por VIH en mujeres, ya que en hombres hay pocos estudios relacionados con el tema (Laga et al., 1994, McClelland, 2007 y Van der Pol et al, 2008). En 11 estudios diferentes se encontró una asociación positiva con significancia estadística entre la tricomonosis y la infección con VIH (Kissinger y Adamski, 2013). La tricomonosis ocasiona una respuesta inmune local agresiva y desequilibrada y se rompen las barreras inmunes de la mucosa en el área infectada, lo cual es aprovechado por el virus para atravesar el epitelio (Hirt, 2013). En casos de vaginosis bacteriana, ésta se ve incrementada por la presencia del protozoario, lo que también ocasiona un proceso inflamatorio y aumenta el riesgo de contraer el virus de la inmunodeficiencia humana. Se ha encontrado que entre los pacientes con VIH, algunos que también están infectados con *T. vaginalis* muestran un mayor título viral en el tracto urogenital, y aunque esa asociación no es clara aún, los pacientes que reciben tratamiento contra la tricomonosis disminuyen la carga viral en sus secreciones genitales (Kissinger y Adamski, 2013).

## **Diagnóstico**

La detección de la tricomonosis puede llevarse a cabo por observación al microscopio de una muestra fresca. El diagnóstico más confiable es el cultivo *in vitro* de esa muestra, aunque también se pueden realizar métodos inmunológicos como el ELISA (Fichorova et al., 2009 y Garber, 2005). Los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos de *T. vaginalis* por PCR, que son altamente sensibles, ya están disponibles comercialmente (Bachmann, 2011). Por otra parte hay factores que dificultan el diagnóstico como son la falta de síntomas y el traslape con síntomas característicos de otras enfermedades ocasionadas por bacterias y/u hongos (Cudmore y Garber, 2010).

## **Tratamiento**

Actualmente el metronidazol, utilizado desde 1960, y el tinidazol aprobado en 2004 por la FDA, son los compuestos útiles para atacar la enfermedad. Lamentablemente el parásito ha adquirido resistencia a esos fármacos, probablemente debido a las similitudes estructurales de estas dos moléculas. El metronidazol se incorpora al hidrogenosoma por difusión pasiva e interfiere con los procesos metabólicos membranales del parásito (Petrin et al., 1998). Los usuarios del tinidazol han tenido menos efectos adversos (frecuentemente problemas gastrointestinales) en comparación con los usuarios del metronidazol (Bachmann, 2011).

## **2.5 Genética**

El genoma de *T. vaginalis* fue liberado en el año 2007. El tamaño de este genoma es grande en comparación con el de otros protozoarios parásitos, mide aproximadamente 160 Mpb (Carlton et al., 2007) y contiene seis cromosomas monocéntricos (Gómez-Conde et al., 2000, Leherker y Alderete, 1999). Se han identificado aproximadamente 46,000 genes que codifican para proteínas. Se ha sugerido que este organismo tuvo uno o varios eventos de duplicación. El genoma es repetitivo en un 65% y es rico en A+T. Sólo se han encontrado 65 genes que

contienen intrones y se han identificado cinco RNAs pequeños nucleares: U1, U2, U4, U5 y U6 (Smith y Johnson, 2011).

Se tiene evidencia de que la transcripción en este parásito puede llevarse a cabo por las tres polimerasas descritas para eucariontes superiores: RNA polimerasa I (pol I), RNA polimerasa II (pol II) y RNA polimerasa III (pol III). Se ha caracterizado ampliamente la región promotora de los genes que codifican proteínas y que son transcritos por pol II. Estos genes no tienen una secuencia típica de las cajas TATA, pero sí una secuencia consenso denominada elemento iniciador de la transcripción, Inr, cuya secuencia consenso es: T/C C A (+1) Py T/A. Este elemento es reconocido por la proteína IBP39 que hasta el momento es específica de *T. vaginalis*, ya que no se han identificado ortólogos en otros organismos. Análisis por BLAST indican que en este parásito hay componentes homólogos de la maquinaria de transcripción de metazoarios (complejo de pre-iniciación) (Vanacova et al., 2003 y Liston et al., 2001).

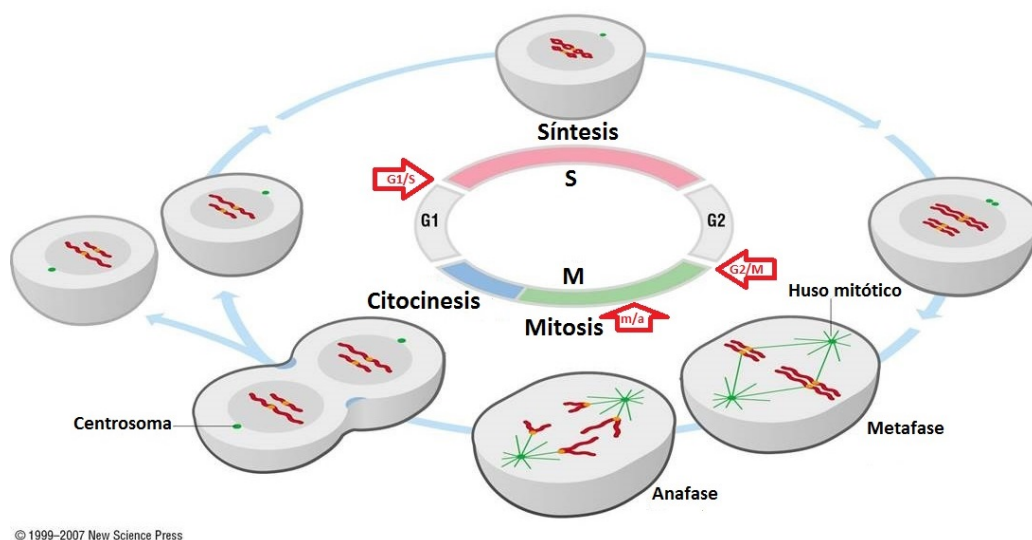
En *T. vaginalis* hay dos proteínas putativas de unión a cajas TATA (TBPs), aunque esas cajas no se han identificado en los promotores transcritos por la pol II y únicamente en el promotor del RNA pequeño nuclear U6 se ha observado una posible secuencia TATA a -28 nt. En este organismo las TBPs pudieran formar parte del complejo de transcripción como sucede en eucariontes superiores. La mayoría de los factores asociados a TBP también han sido descritos *in silico* (datos de nuestro laboratorio).

Los mRNAs de *T. vaginalis* poseen regiones 5' y 3' no traducibles de 5 a 20 nt y de 5 a 43 nt en promedio respectivamente. Son regiones ricas en A/T que son cortas en comparación a las de otros eucariontes (Vanacova et al., 2003). El extremo 5' de los mRNAs maduros posee un cap, y el extremo 3' está poliadenilado. El estudio de las señales de poliadenilación en este organismo ha sido uno de los temas de investigación de nuestro grupo. Se ha encontrado que, en contraste con la señal canónica de poliadenilación eucarionte (AAUAAA), en *T. vaginalis* la señal de poliadenilación es el tetranucleótido UAAA. De manera

interesante, el codón de paro UAA puede formar parte de este motivo (Espinosa et al., 2002 y Fuentes et al., 2012).

## 2.6 El ciclo Celular y sus principales reguladores

El ciclo celular de todos los organismos es el proceso fundamental que sostiene su sobrevivencia, es entendido como un conjunto de eventos que permiten el crecimiento de una célula madre que se duplicará y generará dos células hijas (Harashima et. al., 2013). Para estudiar el ciclo celular, éste se ha dividido en cuatro fases particulares: **Fase Gap 1**, en la que la célula crece y se prepara para tener los recursos necesarios (proteínas y RNA) que le permitan el paso a la **Fase de Síntesis**, en donde el material genético es duplicado con alta fidelidad. En la **Fase Gap 2** la célula crece y se prepara para iniciar la **Fase de División**, en la que la célula puede entrar en mitosis o meiosis (en células germinales) y reparte su material genético y citoplasmático en las dos células hijas. En el ciclo mitótico la fase de división se conoce como **Fase M** y está subdividida en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase (ver figura 2). En el estado celular G0 la célula no replica su DNA ni se divide y en algunas células este estado es posterior a la diferenciación. La duración del ciclo celular puede variar entre organismos y entre tipos celulares (Morgan, 2007).



© 1999-2007 New Science Press

**Figura 2. Fases del ciclo celular.** Se representan las cuatro fases del ciclo celular: Fase G1, Fase de Síntesis (S), Fase G2, Fase M (se compone de subfases: profase, metafase, anafase y



telofase). Los tres puntos principales de control están señalados con flechas rojas: G1/S, G2/M y metafase a anafase. (Modificada de Morgan, 2007)

El ciclo celular de protozoarios parásitos se ve ligado a su ciclo de vida, el cual puede requerir distintos hospederos y una alternancia entre estadios donde son activamente proliferativos y otros donde la división no ocurre (Yaeger, 1996, Hammarton, 2007 y Motram, 1994).

*T. vaginalis* tiene un único estadio, el trofozoito y se reproduce asexualmente por fisión binaria longitudinal. Se ha reportado que el ciclo celular de este parásito consta de las fases G1, S, G2 y M. Inhibidores de la transición G1/S de levaduras y vertebrados (hidroxiurea, afidicolina y timidina) no tienen efecto en *T. vaginalis*, probablemente porque en este protozoario las proteínas involucradas en esa transición son distintas a las de aquéllos organismos. Por otro lado, la fase G2 es la fase dominante en el crecimiento logarítmico y se afecta por colchicina y nocodazol, igual que sucede con las células de levaduras y vertebrados, lo que sugiere que la fase G2 es similar entre todos estos organismos (Riley, 1994). La mitosis dura 45 minutos y se divide en cinco estadios: profase, metafase, anafase (temprana y tardía), telofase (temprana y tardía), y citocinesis, dentro de las cuales la cromatina experimenta diferentes grados de condensación (Gómez-Conde et al., 2000). En *Tritrichomonas foetus* el huso mitótico es lateral y se mantiene intacta la envoltura nuclear (mitosis cerrada), esto último también sucede en *T. vaginalis* (Ribeiro, 2002).

El ciclo celular eucarionte se regula en mayor o menor medida tanto por factores genéticos como por factores ambientales. Se identificaron tres puntos de control en el ciclo celular: el llamado punto de control G1/S o *START* que compromete a la célula a iniciar un nuevo ciclo celular y a la duplicación del DNA; el punto de control G2/M que controla los eventos tempranos de la mitosis; y finalmente el punto de la transición de metafase a anafase en la mitosis que controla la separación de las cromátidas hermanas en las dos células recién formadas (ver figura 2) (Harashima et. al., 2013). Estos puntos de control monitorean que las

condiciones metabólicas sean apropiadas para la generación de células hijas. En los eucariontes se conservan dos grupos importantes de proteínas que a través de su interacción regulan los puntos de control antes mencionados: las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y las ciclinas (CYCs).

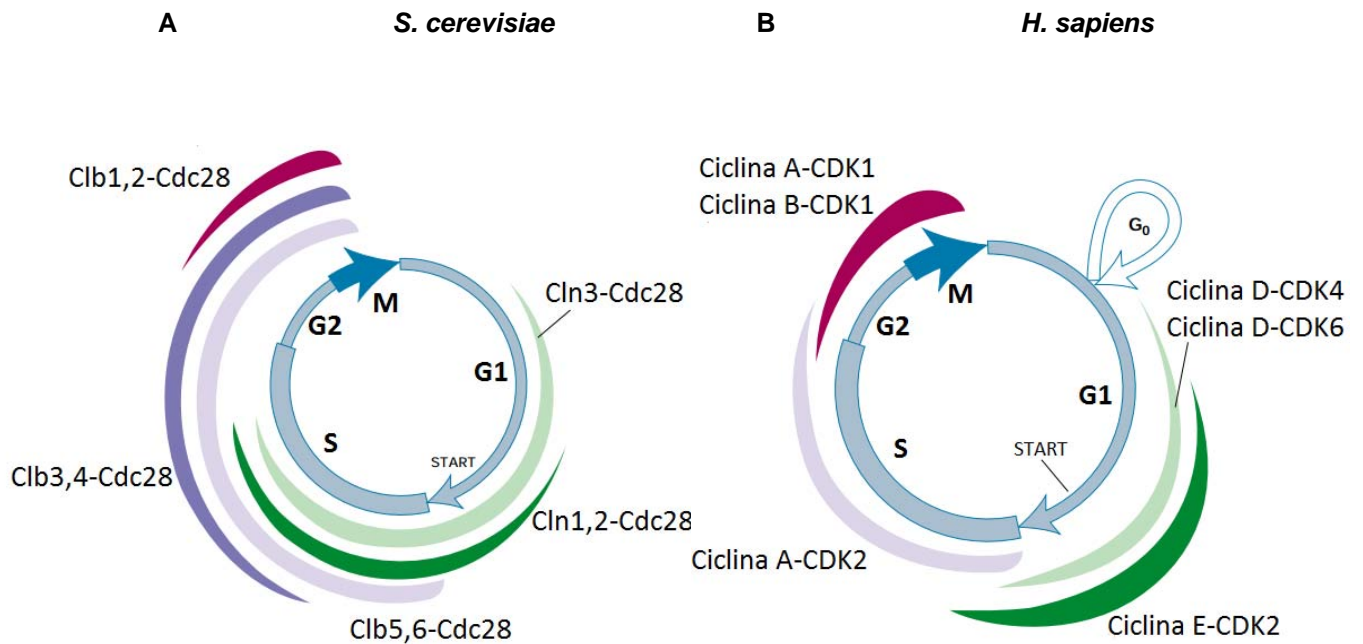
### **Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs)**

Las CDKs son enzimas de tipo cinasa que tienen como función la fosforilación de serinas y/o treoninas de diversos sustratos, los cuales regularmente tienen la secuencia consenso S/T\*PXR, donde \* marca los residuos fosforilables y X es cualquier aminoácido. Para la fosforilación en levaduras basta la presencia del motivo S/T\*P, y existen sustratos que son fosforilados sin mediar una secuencia particular (Loog y Morgan, 2005 y Ubersax, 2008).

Las CDKs tienen un extremo amino rico en hojas beta, donde se encuentra el sitio de unión a ATP, además de una hélice mayor llamada hélice C que contiene una secuencia PSTAIRE conservada, la cual forma parte de un dominio de unión a ciclinas (16 aminoácidos). Es a través de este dominio que las CDKs forman heterodímeros con las ciclinas y se activan parcialmente, ya que su actividad basal no es suficiente para su funcionalidad *in vivo*. En el extremo amino también están dos residuos, la treonina 14 y la tirosina 15 (equivalentes en Cdc2) que al ser fosforilados mantienen inhibida la actividad de cinasa. El extremo carboxilo está menos conservado y posee un segmento de activación compuesto por varios residuos, incluyendo la treonina 161 que al ser fosforilada activa a la CDK, sin embargo, para una activación completa los residuos fosforilados inhibitoriamente (mencionados arriba) deben ser desfosforilados por acción de una fosfatasa (Ducommun et al., 1996, Brown 1999, Doreig et al., 2000 y Harashima et. al., 2013).

La primer CDK descrita fue Cdc2 de *Schizosaccharomyces pombe*; el homólogo en *Saccharomyces cerevisiae* es Cdc28 y en mamíferos es CDK1. Estas tres cinasas son esenciales, Cdc2 y Cdc28 son las CDKs que controlan el ciclo celular de levaduras al unirse y activarse por ciclinas mitóticas y de interfase. La CDK1

principalmente regula la mitosis, pero puede regular todo el ciclo celular si otras cinasas no están presentes (CDK2, CDK4 y CDK6); esta cinasa se asocia con ciclinas tipo A (G2) y ciclinas tipo B (G2/M) (ver figura 3) (Harashima et al., 2013 y Malumbres, 2011). En plantas existen familias de CDKs que controlan el ciclo celular, la familia de CDKA y la familia de CDKB que sólo se encuentra en estos organismos (Kitsios y Doonan, 2011).



**Figura 3. Control del ciclo celular por complejos CDK/CYC en *S. cerevisiae* y *H. sapiens*.**

Panel A: La CDK (Cdc28) en complejo con distintas ciclinas regulan el ciclo celular de la levadura *S. cerevisiae*. Panel B: Complejos de diferentes CDK/CYC regulan el ciclo celular en mamíferos. Los sustratos en la fase G1 están involucrados en el crecimiento y en la morfogénesis, los sustratos en la fase S están involucrados en la replicación del DNA, y los sustratos en la transición G2/M están involucrados en la mitosis (Modificada de Lodish, et al. 2000).

### Ciclinas (CYCs)

Las ciclinas son proteínas cuya concentración aumenta o disminuye de manera cíclica durante el ciclo celular, de ahí su nombre. Activan a las CDKs y les

confieren especificidad en su actividad; se acumulan de manera periódica y difieren dependiendo del tipo celular. Estas proteínas tienen una región conservada de 100 aminoácidos conocida como caja de ciclinas, la cual está involucrada en la interacción con las CDKs (Van Hellemond et al., 2000). Algunas de ellas tienen una región hidrofóbica que interacciona con el motivo RXL (también llamado Cy) presente en algunos sustratos e inhibidores de CDKs (Loog y Morgan, 2005).

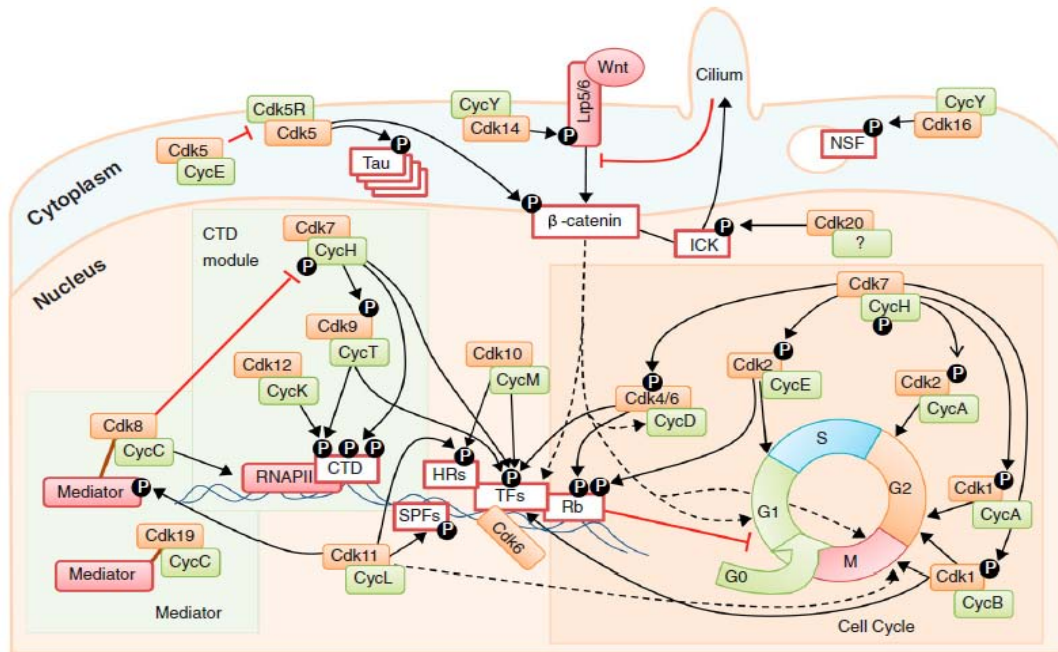
Las ciclinas de levaduras se han clasificado con base en el punto de control sobre el que actúan; algunas de las ciclinas de G1 tienen una secuencia PEST en el carboxilo terminal, mientras que las ciclinas mitóticas tienen un motivo de nueve aminoácidos al que se le conoce como caja de destrucción, ambas secuencias están involucradas en su degradación dependiente de ubiquitinación (Van Hellemond et al., 2000, Glotzer et al., 1991 y Arnaud et al., 1998).

Se han identificado cuatro ciclinas en la levadura *S. pombe*: Puc1 en la fase G1, Cig1 y Cig2 en la fase S y Cdc13 en la fase M; la sola presencia de Cdc13 es suficiente para llevar a cabo un ciclo celular normal (Uhlmann et al., 2011, Roberts, 1999 y Miller y Cross, 2001). En *S. cerevisiae* existen tres ciclinas relacionadas a G1: Cln1, Cln2, Cln3, dos ciclinas de fase S: Clb5 y Clb6, y cuatro ciclinas tanto para la transición G2/M como para la fase M: Clb1, Clb2, Clb3 y Clb4 (Andrews y Measday, 1998 y Morgan, 2007).

En los eucariontes superiores las ciclinas se han clasificado con base en su función, las de tipo D, E, A y B, son las involucradas en el ciclo celular (Johnson y Walker, 1999). Las CYC tipo A controlan la fase S, las tipo B controlan la fase M, mientras que las tipo D y E controlan la fase G1 (ver figura 3) (Roberts, 1999). Las plantas cuentan con ciclinas de tipo D, A y B, pero no de tipo E; hasta ahora, estos organismos tienen el grupo más diverso de ciclinas (Miller y Cross, 2001).

Numerosos estudios, inicialmente en levaduras y posteriormente en otros eucariontes, han llevado a concluir que las interacciones entre CDKs y ciclinas dan lugar a redes complejas, ya que una CDK puede unirse a muchas ciclinas y

viceversa. Aunado a ello hay una gran diversidad de sustratos blanco para los complejos CDKs/CYC (ver figura 4).



**Figura 4. Algunas funciones de las CDKs en eucariotes superiores.** Las CDKs pueden actuar en el núcleo en el proceso de transcripción (fondo naranja), pueden estar asociadas a la membrana o actuar en el citoplasma (fondo azul) y regular las transiciones a través de las distintas fases del ciclo celular (cuadro inferior derecho). Cada CDK (naranja) se muestra formando un complejo con una ciclina (verde); se muestran pocos sustratos (rojo). Las CDKs implicadas directamente en el ciclo celular son: CDK4, CDK6, CDK2 y CDK1 (Malumbres et al., 2014).

## 2.7 Reguladores del ciclo celular de protozoarios

A pesar de la considerable divergencia entre los protozoarios y los eucariotes superiores, las principales familias de reguladores del ciclo celular identificadas en estos últimos operan también en los protozoarios parásitos (Doerig et al., 2000).

En protozoarios las CDKs son genéricamente nombradas “Cinasas relacionadas a Cdc2”, o CRKs, por sus siglas en inglés (Cdc2-Related Kinases). Su identidad en aminoácidos se encuentra por arriba del 40% e incluyen dominios conservados (Mottram, 1994). Las CRKs han sido identificadas en los cinetoplástidos: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* y *Crithidia*

*fasciculata*; y también en los Apicomplexa: *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* y *Theileria annulata*. Los proyectos de los genomas de algunos parásitos de otros órdenes también indican la presencia de posibles CRKs (Doreig et al., 2000 Hammarton, 2007 y Motram, 1994).

En el protozoario *T. brucei* se han descrito diez ciclinas (Hammarton, 2007), de las cuales CYC2 y CYC3 son capaces de complementar mutantes de las Cln de *S. cerevisiae* (Van Hellemon, 2000). En *T. cruzi* se caracterizó funcionalmente la ciclina TcCYC2 y se sabe que su sobreexpresión altera la dinámica del ciclo celular y la morfología de los epimastigotes (Potenza et al., 2012).

En los amitocondriados *Giardia lamblia*, *Encephalitozoon intestinalis* (Doerig et al., 2000) y *T. vaginalis* (datos de nuestro grupo de trabajo), se han identificado CRKs y CYC putativas. Por otra parte, en *T. vaginalis* se identificó un gen con similitud a CDC2/28 de levaduras, su producto proteico es detectado con un antisuero específico para p34 (Cdc2), que reconoce la secuencia PSTAIRE (Riley et al., 1993).

En la tabla 1 se enlistan algunos de los reguladores del ciclo celular de levaduras, metazoarios y de algunos protozoarios parásitos. En algunos casos sólo se conoce alguno de los dos componentes de los complejos CDK/CYC.

Organismo	CDK	CICLINA			
		G1	S	G2	M
<i>S. pombe</i>	Cdc2	Puc1	Cig1,2	Cdc13	Cdc13
<i>S. cerevisiae</i>	Cdc28	Cln1,2,3	Cln1,2 Clb5,6,3,4	Clb3,4	Clb1,2,3,4
<i>T. cruzi</i>	CRK1 CRK3			TzCYC4,5,6	TzCYC4,5,6 TzCYC2
<i>T. brucei</i>	TbCRK1 TbCRK2 TbCRK3 TbCRK9 TbCRK4,6,7,8, 10,11 TbCRK12 ¿? ¿?	CYC2,4,5,7 CYC2 CYC2 ¿? ¿?	CYC2,4,5,7 CYC2 CYC2 ¿? ¿?	CYC6 CYC6 ¿? CYC9 CYC3 CYC8	CYC6 CYC6 ¿? CYC9 CYC3 CYC8
<i>L. mexicana</i>	CRK1 CRK3 SBCRK	¿? ¿?	¿? ¿?	¿? CYCA ¿?	¿? CYCA ¿?

<i>L. major</i>	CRK3			CYCA,3,6,8	CYCA,3,6,8
<i>L. donovani</i>	CRK3		CYC1		
<i>G. intestinalis</i>	CDK1				CYCB
<i>E. histolytica</i>	p34cdc2	¿?	¿?	¿?	¿?
<i>H. sapiens</i>	CDK1 CDK2 CDK4 CDK6	CYCE CYCD CYCD	CYCA	CYCA,B	CYCA,B

**Tabla 1. Proteínas reguladoras del ciclo celular de distintos organismos.** CDKs y sus respectivas ciclinas, descritas y analizadas experimentalmente en levaduras, humano y en algunos parásitos, en algunos casos se han descrito CRKs y se desconocen las ciclinas con las que interaccionan y viceversa.

## 2.8 Control de la actividad de CDKs en el ciclo celular

La función de los complejos CDK/CYC es la fosforilación de diversos sustratos, la cual es controlada principalmente a través de su unidad efectora, la CDK. La CDK puede ser modificada pos-traduccionalmente por su unión a ciclinas, por su fosforilación activadora e inhibitoria por parte de otras cinasas, por la desfosforilación inhibitoria por acción de fosfatasas y por su unión a CKSs, regulando así su actividad (Morgan, 2007). Además, uno de los mecanismos para que los niveles de actividad de la CDKs generen direccionalidad y progresión a través de cada fase del ciclo celular es la capacidad para fosforilar varios sitios en distintos sustratos, lo cual permite a las cinasas gobernar las funciones de éstos (Fisher et al., 2012). Los blancos con varios residuos fosforilables (naturaleza multisitio), pueden generar nuevos dominios de unión a proteínas (Holt et al., 2009). La fosforilación multisitio es dependiente de la proteína CKS como parte del complejo CDK/CYC.

Se ha comprobado experimentalmente que las CKSs son necesarias para la entrada y salida de la mitosis, y en algunos organismos para la transición G1/S (Pines, 1996). El presente trabajo se enfoca en el estudio de las CKSs de *T. vaginalis*, por lo que a continuación se describirán con más detalle este tipo de proteínas.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Características estructurales de las subunidades reguladoras de CDK (CKSs).

Los primeros organismos en los que se estudiaron las proteínas CKS fueron las levaduras, posteriormente se caracterizaron también en distintos eucariontes. Los metazoarios *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* tienen dos, y las CKSs de humano; *HsCKS1* y *HsCKS2* son las más estudiadas. Estas proteínas tienen similitudes y diferencias estructurales y funcionales. Las CKSs son proteínas de 9 a 18 kDa con características en común:

- **Motivo HxPEPH:** His-85, X, Pro-86, Glu-87, Pro-88, His-89 (numeración de p12CKS1) involucrado en su dimerización. La presencia de las prolinas en este motivo es importante para las conformaciones que pueden llegar a adoptar (Rousseau et al., 2001).
- **Cluster hidrofóbico:** Leu-32, Tyr-37, Phe-42, Tyr-44, His-46, Tyr-82, His-85, Pro-86, Glu-87, His-89 (numeración de p12CKS1), que rige las interacciones proteína-proteína. Algunos de estos aminoácidos son importantes para la interacción con las CDKs: Leu-32, Tyr-37, Tyr-38, Asp-39, Asp-40, Tyr-44, His-46, Ile-48, Tyr-82, Met-83, His-85, Pro-86, Glu-87, Val-91, Leu-93 y Lys-95.
- **Cluster cargado:** Lys 36, Met-41, Glu-43, Arg-45, Ser-76, Trp-79 y Arg-96 (numeración de p12CKS1), que incluye los cinco sitios de unión a fosfato: Lys-36, Arg-45, Ser-76, Trp-79 y Arg-96.

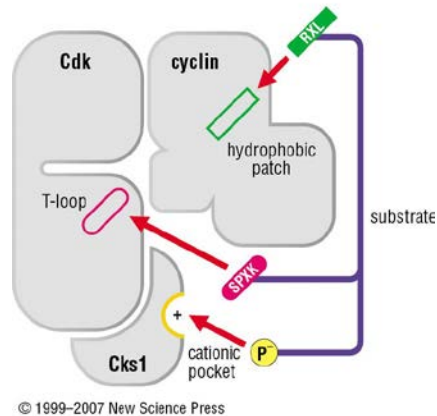
Estructuralmente estas proteínas constan de cuatro hojas  $\beta$  antiparalelas rodeadas por dos o tres hélices alfa. El motivo HxPEPH es conocido como bisagra  $\beta$  (Bourne et al., 2000) y se localiza entre la tercera y cuarta hoja  $\beta$ . Cuando se pliega sobre sí mismo la proteína se encuentra en forma de monómero, y si mantiene una forma extendida la proteína puede interaccionar con la forma extendida de otro monómero para formar dímeros de dominio intercambiado (Jaskólski, 2001). Se sugiere que estas dos conformaciones son las que se



encuentran *in vivo*. En *S. pombe* se han observado *in vitro* tres distintas conformaciones de la CKS, p13suc1: la monómerica, la dimérica, y la dimérica mediada por zinc<sup>2+</sup> (Morris et al., 1998). A diferencia de p13suc1, la CKS1 de *S. cerevisiae* forma, *in vitro*, un dímero antiparalelo (orientación antiparalela de las subunidades monoméricas) (Bourne et al., 2000) y oligómeros. Esta proteína tiene una secuencia rica en glutaminas, que se relaciona con la formación de estructuras fibrilares (Bader et al., 2006). La CKS1 de *H. sapiens* forma principalmente monómeros *in vitro*, mientras que la CKS2 forma monómeros, dímeros, y hexámeros mediante la unión de tres dímeros estabilizados por enlaces de hidrógeno que forman una estructura de barril  $\beta$ . (Parge et al., 1993, Rosseau et al., 1998, Bourne et al., 1996 y Arvai et al., 1995).

Las prolinas de la bisagra  $\beta$  tienen un papel determinante en la conformación de las CKSs. Mutación en la Pro-93 de la CKS1 de *S. cerevisiae* favorece el monómero y mutación en la Pro-95 favorece el dímero; de la misma manera, las mutaciones de los aminoácidos Pro-62 y Pro-64 de la HsCKS1 de *H. sapiens* estabilizan el monómero y el dímero respectivamente; las cuatro mutaciones ocasionan una reducción en la unión con CDK2 (Balog et al., 2011).

Estudios estructurales concluyen que las CKSs se unen al lóbulo carboxilo terminal de las CDKs (principalmente mitóticas) sólo en forma de monómero, sin interferir con su sitio catalítico ni tampoco con su interacción con las ciclinas. La formación del complejo CDK/CKS posiciona el sitio de unión a fosfato de la CKS cerca de la superficie de reconocimiento del sustrato de la CDK (ver figura 5), por lo que se ha sugerido que la CKS puede favorecer la interacción de la CDK con sustratos ya fosforilados (Morris et al., 1998 y Bourne et al., 1996).



**Figura 5. Interacción de CKS1 con CDK.** En el complejo de CYC/CDK/CKS, la CKS1 se une al extremo carboxilo terminal de la CDK, mientras que la ciclina lo hace en el extremo amino terminal. Se muestra la secuencia de aminoácidos relevante en el sustrato. (Morgan, 2007).

### 3.2 Funciones de las CKSs

Las CKSs funcionan como una extensión de la interacción entre la CDK y su sustrato, permitiendo la fosforilación multisitio y modulando así la actividad de las CDKs. Asimismo, son consideradas como una plataforma de acoplamiento entre la CDK y sus reguladores, también se les relaciona con la degradación de varias moléculas que participan en el ciclo celular y están involucradas en la activación de la transcripción (Krishnan et al., 2010 y Khattar y Thottassery, 2013).

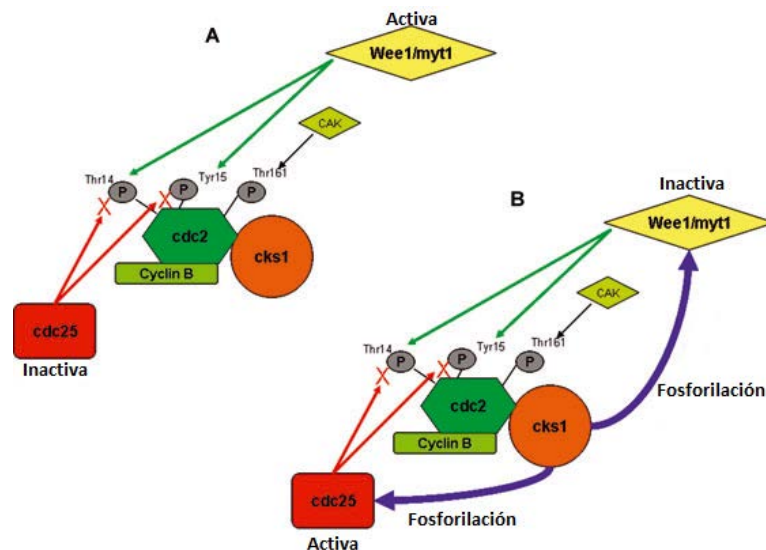
#### Las CKSs en la entrada y en la transición de la fase M

La fosforilación de un residuo por el complejo CYC/CDK/CKS incrementa la afinidad de la CDK por ese mismo sustrato debido a la unión de la CKS al residuo de fosfato, favoreciendo así la fosforilación de sitios vecinos por la CDK (Fisher et al., 2012, Kõivomägi et al., 2013 y Morgan, 2007). En *X. leavis* se puede observar a la fosfatasa Cdc25 en formas hiperfosforiladas, esa hiperfosforilación guarda una estrecha relación con Xe-p9 (proteína CKS de este organismo) (Patra y Dunphy, 1996). La fosforilación multisitio depende de la secuencia contexto del sustrato, principalmente de la distancia entre residuos fosforilables, la cantidad de serinas o

treoninas presentes y la posición de motivos de acoplamiento a ciclinas (McGrath et al., 2013 y Kõivomägi et al., 2013).

En las levaduras y en *Xenopus*, las CKSs son primordiales para la entrada, el desarrollo y la salida de la mitosis, aunque la CKS1 de *S. cerevisiae* modula la actividad de complejos de CDK/CYC tanto de la transición G1/S como de la G2/M (Tang y Reed, 1993 y Reynard et al., 2000).

La completa activación de la CDK mitótica es determinante para que se lleve a cabo la mitosis (ver figura 6). El complejo CYCB/CDK1/CKS1 fosforila en varios sitios a la fosfatasa Cdc25 (Hoffman et. al., 1993 y Izumi y Maller, 1993), tras lo cual se activa y puede desfosforilar los residuos fosforilados que inhiben a la CDK1 (Tyr-15), entonces la célula puede entrar en la fase M (Patra y Dunphy, 1996). Ese mismo complejo también fosforila las cinasas Wee1 y Myt1 (cinasas que fosforilan inhibitoriamente a las CDK de *S. cerevisiae* y de vertebrados respectivamente) (McGrant, 2013).



**Figura 6. La CKS1 en la entrada a la fase M.** Para que la célula entre en mitosis debe activarse el complejo Cdc2/CycB. La CKS1 activa a la Cdc2 a través de la acción de tres reguladores: la fosfatasa Cdc25 y las cinasas Wee1/myt1. **A)** En la interfase G2 la Cdc2 es blanco de una fosforilación activadora en Thr-161 por una cinasa (CAK) y dos fosforilaciones inhibitorias en Tyr-15 y Thr-14 por las cinasas Wee1 y Myt1. En la entrada de la mitosis la Cdc2 se activa por la Cdc25 que desfosforila los residuos Tyr-15 y Thr-14, esa fosfatasa se mantiene inactiva durante la

interfase. **B)** En la entrada a fase M, el complejo Cdc2/CycB fosforila a la Cdc25 activándola. Esta fosforilación depende de CKS1. Así Cdc25 desfosforila los residuos que inhiben a la Cdc2. Por otra parte la CKS1 favorece la fosforilación de las cinasas Wee1 y Myt1 por el complejo Cdc2/CycB, fosforilación que regula negativamente la actividad de esas cinasas <sup>(Modificada de Krishnan, 2010)</sup>.

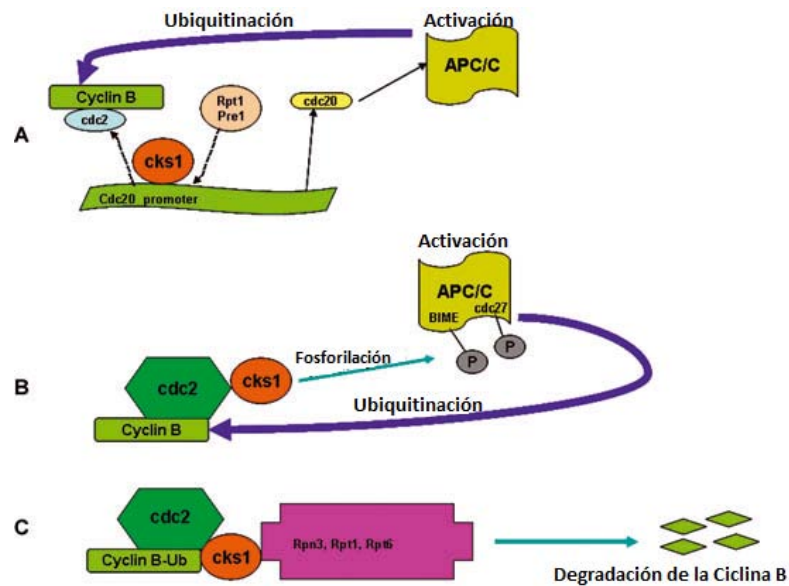
### **Las CKSs en la salida de la fase M**

La degradación de algunas proteínas es importante para la salida de la mitosis. En *X. le avis* la asociación de CYCB/CDK1/Xe-p9 permite la fosforilación de Cdc27, una subunidad del complejo promotor de la anafase, APC/C, el cual ubiquitina a la CYCB y da lugar a su posterior degradación por el proteosoma, favoreciendo la salida de la mitosis (Muñoz, 2006, Patra y Dunphy, 1996 y Glotzer et al., 1991). Estudios recientes demuestran que también es importante que Cdc20 (activador del APC/C) se una al APC/C para activarlo (Fang et al., 1998) y CKS1 promueve la elevada transcripción de *CDC20* (ver figura 7).

En *S. cerevisiae* CKS1 se asocia con componentes del proteosoma 26S y promueve la degradación de la principal ciclina mitótica Clb2, no obstante, la proteólisis de Clb2 no es determinante para la salida de la fase M, en cambio la degradación del inhibidor de la anafase, Pds1, es necesaria para permitir la separación de las cromátidas hermanas (transición metafase/ anafase) y evitar un arresto en la metafase. La degradación de Pds1 también depende de CKS1 e involucra componentes del proteosoma (ver figura 7) (Káiser et al., 1999).

### **Las CKSs en la transición G1/S**

En los humanos la función principal de la *HsCKS1* se da en la transición G1/S, en la cual es necesaria la degradación del inhibidor de CDK2, p27. *HsCKS1* interacciona con p27 y con SKP2 (S-phase kinase-associated protein), la cual es una proteína del complejo SCF (Skp, Cullin, F box), quien es el encargado de ubiquitinar a ese inhibidor (Krishnan et al., 2010).



**Figura 7. La CKS1 en la salida de la fase M.** La degradación de la ciclina B es necesaria para que la célula salga de la mitosis. **A)** CKS1 aumenta la transcripción de Cdc20 (activador del complejo APC/C, el cual es encargado de la ubiquitinación de Cyc B), ello gracias a que disocia a Cdc2 del promotor de *CDC20* y atrae hacia éste a componentes del proteosoma 19S (Rpt1) y 20S (Pre1). **B)** CKS1 estimula la fosforilación de componentes del APC/C (Cdc27 y BIME) para activarlo, así éste es capaz de ubiquitinar a la CycB. **C)** CKS1 interactúa directamente con componentes del proteosoma 19S (Rpn3, Rpt1, Rpt6) y ayuda a presentar a la ciclina ubiquitinada al proteosoma para su degradación (Modificada de Krishnan, 2010).

En la fase G1 de *S. cerevisiae*, Sic1 se encarga de inhibir a los complejos Cdc28/Clb5,6, a fin de evitar la síntesis prematura de DNA, por lo cual debe ser degradado para que dé inicio la fase S. En la fase S el complejo Cln1,2/Cdc28 fosforila en seis o más sitios a Sic1, esa fosforilación multisitio es dependiente de CKS1 y regula su ubiquitinación y su destrucción (Koivomagi et al., 2011).

### 3.3 Otras funciones de las CKSs

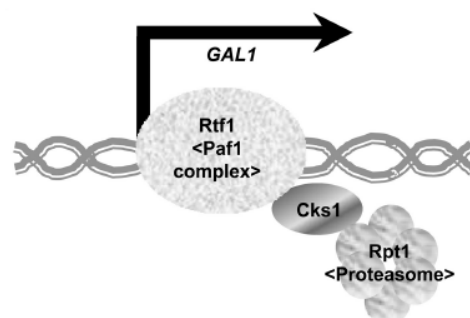
Por otra parte, el equilibrio entre monómeros y dímeros en la célula podría tener un efecto sobre la regulación de la CDK mediada por CKS, modulando la fosforilación de sustratos (Balog et al., 2011). Este equilibrio es controlado por las dos prolina conservadas en la bisagra  $\beta$  (Rosseau et al., 2001). La protil isomerasa modifica la conformación de la bisagra  $\beta$  y es esencial para la salida de

la mitosis en las levaduras (Lu et al., 1996 Revisado en Pines et al., 1996). La caracterización de mutaciones en *HsCKS1* mostró que los aminoácidos esenciales en la interfaz entre CDK2 y *HsCKS1* también están involucrados en la formación de los dímeros de dominio intercambiado (Morris et al., 1998).

### Las CKSs como reguladores de la activación transcripcional

Las CKS también están involucradas en la activación transcripcional de genes relacionados con el ciclo celular. Para que se lleve a cabo la transcripción de *Cdc20*, el activador del complejo APC/C, se requiere que la CKS1 disocie a Cdc28 de la región promotora del gen *CDC20* y reclute el proteosoma a esa región (ver figura 7a), este evento promueve la mitosis en *S. cerevisiae* (Morris et al., 2003).

En *S. cerevisiae*, CKS1 se ha visto involucrada en la transcripción eficiente de diversos genes que requieren rápida regulación, entre ellos *GAL1*. CKS1 conecta el complejo Paf1 con el proteosoma 19S (una de las dos subunidades del proteosoma 26S) y desencadena el remodelamiento de la cromatina para activar la transcripción de *GAL1*; Rtf1 es el componente de Paf1 que interacciona directamente con la proteína CKS1 (ver figura 8) (Holic et al., 2010). Se sugiere que un dominio de unión a ubiquitina en CKS1 reconoce subunidades del proteosoma ubiquitinadas y es a través de este reconocimiento que CKS1 puede reclutar el proteosoma a la cromatina (Pan et al., 2013).



**Figura 8. Activación de la transcripción del gen *GAL1* de *S. cerevisiae*.** La CKS1 interacciona con la proteína Rtf1, que forma parte del factor I asociado a la polimerasa II (Paf1), también interacciona con la proteína Rpt1, la cual es un componente de la subunidad 19S del proteosoma, gracias a esas interacciones CKS1 activa la transcripción del gen *GAL1*.

### 3.4 Las CKSs de organismos modelo

La primer CKS se identificó en 1986 en la levadura *S. pombe*. Se le llamó p13suc1 ya que es codificada por el gen *suc1* y tiene un peso de 13kDa y se encontró como un supresor de mutantes *cdc2-* sensibles a temperatura (Hayles et al., 1986a). *Suc1* es un gen esencial, la sobreexpresión de su producto proteico lleva a las células a un arresto en la fase G2, por lo que se retrasan en la división nuclear ya sea mitótica o meiótica (Hayles et al., 1986b). Cuando su expresión es deficiente las levaduras se detienen en la fase M (Pines, 1996).

En *S. cerevisiae* la proteína homóloga a p13suc1 se llama CKS1 (por sus siglas en inglés Cdc28 Kinase Subunit 1), pesa de 18 kDa y fue encontrada gracias a su interacción con Cdc28 (Hadwiger et al., 1989). La sobreexpresión de CKS1 lleva a un retraso de la fase G2, mientras que una deficiencia mantiene a las levaduras arrestadas en G2 (distinto de lo que pasa con *S. pombe*) (Tang y Reed, 1993).

La CKS de *Xenopus laevis* se denomina Xe-p9 y tiene un peso de 9 kDa. En extractos de huevos se ha observado un retraso en la transición G2/M cuando hay un exceso de esta proteína. La eliminación de esta proteína tiene distintas consecuencias dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentren los huevos: si están en la interfase, la remoción de Xe-p9 suprime la entrada a mitosis (arresto en G2), mientras que si están en mitosis, la ausencia de Xe-p9 provoca un arresto en la fase M (Patra y Dunphy, 1996).

En *Arabidopsis thaliana* también se ha descrito una CKS, llamada CKS1At (De Veylder et al., 1997), su sobreexpresión da como resultado plantas pequeñas con retoños que se comportan de manera anormal. La expresión elevada de CKS1At inhibe las transiciones G1/S y G2/M por lo que la duración del ciclo celular se incrementa provocando la reducción de los meristemas, lo cual afecta las tasas de elongación de la raíz (De Veylder et al., 2001).

Con base en los datos arriba mencionados se puede concluir que las CKSs son esenciales para la viabilidad de las células, y sus distintos niveles de expresión alteran el ciclo de división celular; sin embargo, la alteración es distinta

dependiendo de la especie, aun así las CKSs de *Homo sapiens*, *A. thaliana* y de *X. laevis* son capaces de complementar mutantes de p13suc1 de *S. pombe* y de CKS1 de *S. cerevisiae*. Las diferencias en los fenotipos de las mutantes de levadura indican que las CKSs pueden tener funciones distintas en la célula y aunque no ha sido posible establecer una función generalizada, en la mayoría de los casos se ve afectada la transición G2/M (Pines, 1996 y Krishnan et al., 2010).

### **CKSs de metazoarios**

Los eucariontes inferiores tienen una sola CKS, y hasta el momento sólo se han descrito dos CKSs en *H. sapiens*, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, las cuales tienen algunas diferencias funcionales. La *HsCKS1* forma predominantemente monómeros, se une a SKP2, su mRNA se incrementa mucho más en la transición G2 a M y su expresión se altera por acción de p53; mientras que *HsCKS2* forma además de monómeros, dímeros y hexámeros, no interacciona con SKP2, se incrementa menos que la *HsCKS1* en G2 a M y no se afecta por la expresión de p53 (Krishnan et al., 2010).

En *D. melanogaster* CKS1 (ó Cks85A) mantiene la viabilidad celular, en cambio CKS2 (ó Cks30) está implicada en la mitosis y meiosis durante el desarrollo embrional (Ghorbani et al., 2011, Pearson et al., 2005 y Swan et al., 2005).

En *C. elegans* el estudio de las CKSs ha sido a través del silenciamiento por RNA de interferencia; el silenciamiento de CKS-1 da como resultado defectos en la mitosis y en la meiosis de los embriones del gusano y la interferencia del gen CKS-2 no ocasiona algún cambio fenotípico (Polinko y Strome, 2000).

### **CKSs de protozoarios**

En protozoarios como *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana* las proteínas CKS también regulan la actividad de cinasas de tipo Cdc2. *Tcp12cks1* interacciona con los complejos CDK/CYC e incrementa la fosforilación de la histona H1, lo mismo que *LmmCks1*; estas proteínas tienen alta similitud entre si y los genes que las codifican tienen niveles de expresión altos en los estadios más proliferativos de cada parásito. Ambas proteínas pueden complementar una mutante de CKS1 de



*S. cerevisiae* y p13suc1 de *S. pombe*, respectivamente. En estos organismos solo se describe la presencia de un gen (Mottram y Grant, 1996 y Muñoz et al., 2006).

En nuestro laboratorio se han identificado y se están caracterizando posibles CRKs y ciclinas involucradas en el ciclo celular de *T. vaginalis*. El M. en C. Erick Amador Gaytán trabaja con ocho posibles TvCRKs y mediante una técnica *in vitro* demostró que cuatro TvCRKs interaccionan con la proteína comercial p13suc1 (CKS de la levadura *S. pombe*) acoplada a perlas de sefarosa. En este trabajo se caracterizaron parcialmente a las CKSs de *T. vaginalis*, determinando interacciones entre TvCRKs y TvCKSs a través de ensayos de doble híbrido. Es posible que estas proteínas regulen la actividad de CRKs en este parásito.

La tabla 2 muestra una lista de las CKSs descritas con anterioridad, los eucariontes inferiores tienen una CKS mientras que metazoarios tienen dos. En los parásitos descritos aquí no se sabe con certeza en que fase actúan las proteínas CKS, únicamente se reporta que son importantes para los estadios más proliferativos y que interaccionan con CRKs esenciales.

Organismo	Número de CKSs	Nombre(s)	Fase del ciclo celular que regula
<i>S. pombe</i>	1	p13suc1	G2/M
<i>S. cerevisiae</i>	1	CKS1	G1/S y G2/M
<i>X. laevis</i>	1	Xe-p9	G2/M
<i>D. melanogaster</i>	2	Cks85A (CKS1)	?
		Cks30 (CKS2)	M
<i>C. elegans</i>	2	CKS-1	M
		CKS-2	?
<i>H. sapiens</i>	2	HsCKS1	G1/S
		HsCKS2	G1/S
<i>A. thaliana</i>	1	CKS1At	G1/S y G2/M
<i>L. mexicana</i>	1	LmmCks1	?
<i>T. brucei</i>	1	TbCks1	?
<i>T. cruzi</i>	1	Tcp12cks1	?

**Tabla 2. CKSs de distintos organismos.** Las CKSs generalmente se ven involucradas en la transición G2/M. Levaduras y protozoarios tienen una CKS, mientras que metazoarios tienen dos, de estos últimos organismos, las proteínas del humano son las más estudiadas, mientras que las de *D. melanogaster* y *C. elegans* son estudiadas recientemente.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo General

Estudio de las posibles CKSs, subunidades reguladoras de la actividad de cinasas dependientes de ciclinas del ciclo celular, en *Trichomonas vaginalis*.

### Objetivos Particulares

- Determinar si los genes *tvcks1* y *tvcks2* se expresan.
- Clonar los genes y expresar a las proteínas recombinantes *TvCKS1* y *TvCKS2*.
- Determinar si las proteínas recombinantes *TvCKS1* y *TvCKS2* son capaces de formar homodímeros.
- Determinar si las proteínas recombinantes *TvCKS1* y *TvCKS2* interactúan con algunas de las ocho *TvCRKs* de *T. vaginalis* que están siendo caracterizadas en el laboratorio mediante el sistema de doble híbrido de levaduras.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Alineamiento de secuencias de CKSs

Se realizó un análisis comparativo por medio de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), entre la secuencia genómica de *T. vaginalis* ([www.trichbd.org](http://www.trichbd.org)) liberada en el año 2007 y secuencias de nucleótidos y aminoácidos (BLASTn y BLASTp), de las proteínas CKS de las especies: *H. sapiens Cks1* (NP\_001817.1) *H. sapiens Cks2* (NP\_001818.1), *L. mexicana* (CAA90037.1), *S. cerevisiae* (NP\_009693.3), *S. pombe* (NP\_595431.1), *T. brucei* (XP\_829696.1) y *T. cruzi* (XP\_815745.1). Se identificaron dos genes que codifican proteínas putativas reguladoras de cinasas dependientes de ciclinas (CKS) en *T. vaginalis*: TVAG\_164620 (XM\_001325540.1) y TVAG\_142260 (XM\_001320060.1), para los cuales no se encontraron reportados ESTs.

En este trabajo el gen TVAG\_164620 será denominado *tvcks1* y su proteína TvCKS1 (EAY13352.1), mientras que el gen TVAG\_142260 será denominado *tvcks2* y su proteína TvCKS2 (EAY07872.1), se han considerado esos nombres con base al orden de aparición (determinado por la identidad de las proteínas) tras realizar el BLAST. Ambos genes carecen de intrones.

### 5.2 Modelado *in silico* de los genes *tvcks1* y *tvcks2*

Se utilizó el programa Protein Homology analogY Recognition Engine V 2.0 (PHYRE2, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), para modelar las estructuras de las proteínas codificadas por los dos genes de *T. vaginalis*.

### 5.3 Obtención de los extremos 3' de los genes *tvcks*

Se amplificó el 3'UTR de los genes *tvcks1* y *tvcks2* con oligonucleótidos específicos utilizando como molde cDNA obtenido a partir de RNA poli A+ de *T. vaginalis*.

### **5.3.1 Cultivo de *Trichomonas vaginalis***

La cepa CNCD147 de *T. vaginalis* se cultivó en medio TYM (Trypticase-Yeast extract-Maltose) pH 6.2, suplementado con 10% de suero inactivado de caballo a 37 °C. El cultivo se mantuvo en tubos de vidrio con rosca para su pase diario.

### **5.3.2 Purificación de RNA poly A+**

El RNA total de *T. vaginalis* se obtuvo por el método trizol-cloroformo y la purificación de RNA poly A+ se llevó a cabo como se describe en Álvarez-Arce, 2012.

### **5.3.3 Síntesis de cDNA**

Para sintetizar cDNA se colocó un tubo con aproximadamente 500 ng de RNA poli A+, 1 µl del oligo AP (200 ng/µl), 0.5 µl de la mezcla de dNTPs (10mM cada uno) y 0.5 µl de agua DEPC estéril; se calentó la mezcla a 65 °C por cinco minutos y se incubó un minuto en hielo.

La mezcla se centrifugó unos segundos y se añadieron 2 µl de Buffer First-Strand 5X, 0.5 µl de DTT (0.1 M) y 0.5 µl de retrotranscriptasa SuperScript III (200 U/µl) (se colocó una reacción control a la que no se agregó la retrotranscriptasa). Las reacciones se mezclaron pipeteando y se incubaron a 42 °C durante 15 minutos, después a 50 °C durante 30 minutos y finalmente se inactivaron calentándolas a 70 °C durante 15 minutos.

Mientras disminuía la temperatura del termociclador se añadieron 0.5 µl de RNasa H (2 U/µl) y las reacciones se incubaron a 37 °C durante 35 minutos, se centrifugaron y se almacenaron a -20 °C.

### **5.3.4 Primera reacción de PCR**

Después de obtener el cDNA utilizamos el oligonucleótido p13suc1-20-Kpn-F para *tvcks1* o el oligonucleótido p13suc1-60-Kpn-F para *tvcks2* y el oligonucleótido AUAP-B para amplificar los genes manteniendo la cola de adeninas en el extremo 3'. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 µl y en las condiciones que se detallan abajo.

<b>Solución</b>	<b>TvCks1</b>	<b>TvCks2</b>	<b>Control</b>	<b>Control</b>
Agua bidestilada estéril para PCR	16.3 µl	16.3µl	16.45 µl	17.2 µl
Amortiguador para PCR 10X	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (3 mM final)	1.7 µl	1.7 µl	1.5 µl	1.5 µl
dNTP's (stock de 10mM)	1.5µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
Oligo específico 20 pmol/ul	p13suc1-20-Kpn-F 1µl	p13suc1-60-Kpn-F 1 µl	p13suc1-20-Kpn-F 1 µl	p13suc1-20-Kpn-F 1 µl
Oligo AUAP-B 20 pmol/ul	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
<b>cDNA</b>	0.75µl	0.75 µl	0.75 µl Reacción de cDNA sin utilizar la enzima RT	—
<i>Taq</i> polimerasa	0.25 µl	0.25 µl	0.3 µl	0.3 µl
Total	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

<b>Paso</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura TvCks1</b>	<b>Temperatura TvCks2</b>
1	10´	92°C	92°C
2	30´´	92°C	92°C
3	30´´	<b>56°C</b>	<b>58°C</b>
4	30´´	72°C	72°C
5	30 ciclos (pasos 2-4)		
6	5´	72°C	72°C
7	∞	8°C	8°C
8	END		

Las reacciones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.8% a 100V durante aproximadamente 35 minutos, los geles se tiñieron con bromuro de etidio (este procedimiento se realizó para todo análisis de DNA posterior, ya sea productos de PCR o digestiones).

### 5.3.5 PCR anidada

Se llevó a cabo una segunda reacción de PCR utilizando el oligonucleótido Tvp13suc1nested tanto para la reacción de *tvcks1* como para la reacción de *tvcks2* (este oligo se ancla 118pb arriba del ATG de inicio) y nuevamente el oligonucleótido AUAP-B para amplificar los genes manteniendo la cola de

adeninas en el extremo 3'. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 45 µl, mismo que se dividió en tres reacciones de 15 µl.

Solución	TvCks1	TvCks2	Control
Agua bidestilada estéril para PCR	29.5 µl	28.05 µl	16.23 µl
Amortiguador para PCR 10X	4.5 µl	4.5 µl	2.25 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM (3 mM final)	2.7 µl	2.7 µl	1.35 µl
dNTP's (stock de 10 mM)	2.7 µl	2.7 µl	1.35 µl
Oligo Tvp13suc1nested 20 pmol/µl (40 pmol final)	1.8 µl	1.8 µl	0.6 µl
Oligo AUAP-B 20 pmol/µl (40 pmol final)	1.8 µl	1.8 µl	0.6 µl
<b>PCR I</b>	2 µl	3 µl	-
<i>Taq</i> polimerasa	0.25 µl	0.25 µl	0.12 µl
Total	45 µl	45 µl	22.5 µl

Las reacciones se dividieron en tres reacciones de 15 µl ya que se llevaron a cabo en tres distintas temperaturas, para lo cual se estableció un gradiente en el termociclador.

Paso	Tiempo	Temperatura TvCks1			Temperatura TvCks2			
1	10'	92°C			92°C			
2	30''	92°C			92°C			
3	30''	48°C	49.6°C	56.2°C	48°C	49.6°C	56.2°C	
4	30''	72°C			72°C			
5	30 ciclos (pasos 2-4)							
6	5'	72°C			72°C			
7	∞	8°C			8°C			
8	END							

### 5.3.6 Clonación en el vector pGEM T-Easy

Los productos de PCR se ligaron directamente con el vector pGEM-T Easy, para *tvcks1* utilizamos la reacción a 49.6 °C y para *tvcks2* la reacción a 48 °C. Ambas ligaciones (Reacción de ligación: Buffer T4 DNA ligasa 2X 5 µl, Vector pGEM T-Easy 0.5 µl, Producto de PCR 4 µl y T4 DNA ligasa 0.5 µl) y se incubaron a 4 °C, 16 horas aproximadamente.

### 5.3.7 Transformación de *Escherichia coli*

Se realizaron dos transformaciones independientes de la cepa *E. coli* XL1 blue competentes con buffer TB (apéndice II), dos alícuotas se descongelaron

lentamente en hielo, a una se le añadieron 5 µl de la reacción de ligación de *tvcks1* y a otra 5 µl de la reacción de ligación de *tvcks2* sin mezclar.

Las alícuotas se colocaron en hielo durante 30 minutos, al término de ese tiempo se dio un choque térmico a 42 °C durante 30 segundos y se regresaron al hielo dos minutos.

Se adicionó 1 ml de medio LB y las células se incubaron a 37 °C por 1 hora, posteriormente, el sobrenadante se eliminó centrifugando las células a 14,000 rpm 30 segundos, resuspendimos el pellet y este se plaqueó en cajas con medio LB-agar con ampicilina (100 µg/ml), mismas que se incubaron a 37 °C, 14 horas aproximadamente.

### **5.3.8 Obtención de DNA plasmídico**

Cada colonia obtenida se inoculó en 5 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron 16 horas a 37 °C.

Las soluciones I, III (apéndice II) el fenol y el cloroformo se mantuvieron en refrigeración y en hielo al momento de ser utilizados, la solución II se preparó al instante y se mantuvo a temperatura ambiente.

En un microtubo se colocaron 1.5 ml de cultivo, se centrifugaron por 30 segundos a 12,000 rpm, se desechó el sobrenadante y nuevamente se colocaron 1.5 ml de cultivo, se centrifugaron por 30 segundos a 12,000 rpm y se desechó el sobrenadante.

El pellet se resuspendió con el resto de sobrenadante que quedó en el tubo, mezclando éste en el vórtex a velocidad moderada. Se agregaron 100 µl de la solución I fría y se mezclaron en el vórtex a velocidad moderada. Se agregaron 200 µl de la solución II recién preparada a temperatura ambiente y se mezclaron los tubos por inversión seis veces. Los tubos se colocaron rápidamente en hielo y se les agregaron 150 µl de la solución III fría, se mezclaron por inversión seis veces y finalmente se incubaron en hielo por cinco minutos.

Posteriormente se centrifugaron a 12, 000 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante decantando en otro tubo de 1.5 ml, el pellet se desechó. Al sobrenadante se le agregaron 250 µl de fenol frío y 250 µl cloroformo frío, se mezcló en el vórtex a velocidad moderada durante 30 segundos y se centrifugó a 12, 000 rpm durante tres minutos. Se recuperó la fase acuosa y se le agregó 500 µl de cloroformo frío, se mezcló en el vórtex a velocidad moderada durante 30 segundos y se centrifugó a 12, 000 rpm durante tres minutos.

Se recuperó la fase acuosa y se le agregó 1000 µl de etanol absoluto a temperatura ambiente, se mezcló en el vórtex a velocidad máxima por 30 segundos y se incubaron a temperatura ambiente una hora. Los tubos se centrifugaron 10 minutos a 14, 000 rpm, se desechó el sobrenadante y los pellets se lavaron con 700 µl de etanol al 70% frío e inmediatamente se desechó el líquido.

Los pellets se dejaron secar de cinco a siete minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 50 µl de TE RNasa (20 µg/ml), se mezclaron en el vórtex a velocidad máxima y se centrifugaron 30 segundos a 14, 000 rpm. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 20 minutos y posteriormente se analizaron los plásmidos en un gel de agarosa en TAE 1X.

### **5.3.9 Análisis de restricción**

Se hicieron digestiones de los plásmidos para corroborar la presencia del inserto del tamaño esperado. El vector pGEM-T Easy tiene dos sitios para EcoRI en el sitio múltiple de clonación, por lo que se utilizó para liberar el inserto; además de otras enzimas que digieren específicamente las secuencias de cada gen.

### **5.3.10 Secuenciación**

Las clonas con los patrones de digestión esperados se secuenciaron a través del servicio de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; con el equipo Genetic Analyzer 3500 de la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biología de la UNAM, utilizando el kit Big Aye Terminator V.3.



## 5.4 Expresión de proteínas recombinantes

Se expresaron las dos CKSs de *T. vaginalis* con una etiqueta de histidinas para su detección con la sonda HisProbe-HRP (Pierce, cat. no. 15165).

### 5.4.1 Amplificación de los genes de *tvcks1* y *tvcks2*

A partir de DNA genómico se amplificaron los genes *tvcks1* con los oligonucleótidos: p13suc1-20-Kpn-F, p13suc1-Hind-R y *tvcks2* con los oligonucleótidos: p13suc1-60-Kpn-F, p13suc1-Hind-R (se utilizaron los mismos oligonucleótidos reverse ya que los genes son idénticos en el extremo carboxilo). La reacción de PCR y las condiciones se detallan abajo.

Solución	<i>tvcks1</i> y <i>tvcks2</i>	Control
Agua bidestilada estéril para PCR	35.7 µl	17.85 µl
Amortiguador para PCR 10X	5 µl	2.5 µl
MgSO <sub>4</sub> 50 mM (3 mM final)	1 µl	0.5 µl
dNTP's (stock de 10 mM)	1.5 µl	0.75 µl
Oligo F	3 µl	1.5 µl
Oligo p13suc1-Hind-R	3 µl	1.5 µl
<b>DNA</b>	0.3 µl	-----
Pfx polimerasa	0.5 µl	0.25 µl
Total	50 µl	25 µl

Paso	Tiempo	Temperatura
1	5´	94°C
2	30´´	94°C
3	30´´	<b>56°C</b>
4	25´´	68°C
5	6 ciclos (pasos 2-4)	
6	30´´	94°C
7	30´´	62°C
8	25´´	68°C
9	30 ciclos (pasos 6-8)	
10	5´	68°C
11	∞	4°C
12	END	

### 5.4.2 Clonación en el vector pGEM-T Easy

Se clonó el marco de lectura abierto de los genes *tvcks1* y *tvcks2* en el vector pGEM T- Easy; debido a que se utilizó la polimerasa *Pfx* los productos de PCR se sometieron a una reacción de adición de Adeninas con la polimerasa *Taq*, la reacción detallada abajo se colocó en el termociclador a 70 °C durante 30 minutos.

<b>Solución</b>	<b><i>tvcks1</i></b>	<b><i>tvcks2</i></b>
DNA purificado	7.5 µl	7.5 µl
Amortiguador para PCR 10X	1 µl	1 µl
MgCl <sub>2</sub> 50mM (3 mM final)	0.2 µl	0.2 µl
dATP's 10mM (1.5 mM final)	0.3 µl	0.3 µl
<i>Taq</i> polimerasa	1 µl	1 µl

Se transformó la cepa de *E. coli* JM109 con la ligación directa, se purificó plásmido de las colonias resultantes (ver sección 5.3.5 y 5.3.6).

Se hicieron digestiones de las clonas, el vector pGEM-T Easy tiene dos sitios para *EcoRI* con los cuales se liberó el inserto, al igual que con las enzimas *KpnI* y *HindIII*, ya que los sitios de corte se introdujeron con los oligonucleótidos. Las clonas positivas se secuenciaron (ver sección 5.3.8).

#### **5.4.3 Subclonación en el vector pQE30**

Se digirieron tanto plásmidos de las clonas de pGEMTE-*tvcks1* y pGEMTE-*tvcks2* como el vector de expresión pQE30 con las enzimas *KpnI* y *HindIII*.

Se utilizaron 200 ng de vector para una ligación con relación de vector: inserto 1:3, con la cual se transformó la cepa *E. coli* JM109, se purificaron plásmidos de las colonias resultantes.

Se hicieron digestiones de las clonas con *KpnI* y *HindIII* para corroborar la presencia del inserto de tamaño esperado y las clonas positivas se secuenciaron (ver sección 5.3.5 a 5.3.8).

#### **5.4.4 Obtención de las proteínas recombinantes y su purificación**

Se realizaron dos transformaciones independientes de la cepa *E. coli*, una con 200 ng de la construcción pQE30-*tvcks1* y otra con 200 ng de pQE30-*tvcks2*, se tomó una colonia de cada transformación y se les creció en un cultivo de 5ml de LB con Ampicilina (100 µg/ml) y Kanamicina (50 µg/ml) por 16 hr a 37 °C; con estos cultivos se inocularon cultivos de 125 ml de LB con Ampicilina y Kanamicina y se incubaron a 37 °C hasta que alcanzaron una O.D.<sub>600</sub> de 0.6 nm, entonces se indujo la expresión de las proteínas con 1mM de IPTG, por tres horas. Se tomaron

muestras antes y después de la inducción, y se analizaron en un gel de acrilamida al 16% en condiciones desnaturalizantes.

Los cultivos de 125 ml se centrifugaron a 4 000 x *g* por 20 minutos y se almacenaron los pellets a -20 °C durante 14 horas.

En dos tubos de 10 ml se colocó 1 ml de sefarosa acoplada a níquel, se centrifugaron a 10 000 x *g* durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se colocaron 2 ml de buffer de lisis (apéndice II) a cada tubo, se mezclaron para resuspender y equilibrar la sefarosa, nuevamente se centrifugaron a 10 000 x *g* durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se prepararon 10 ml de buffer de lisis con lisozima y benzonasa (apéndice II).

Los pellets de *TvCKS1* y *TvCKS2* se descongelaron en hielo y se les agregó 5 ml de buffer de lisis con lisozima (1 mg/ml) y benzonasa (25 U/ml) a cada uno, con lo cual se resuspendieron completamente. Se incubaron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron a 14 000 x *g* durante 30 minutos a 4 °C.

Se recuperaron los sobrenadantes y se tomó una pequeña muestra de cada uno para almacenarla a -20 °C; a un tubo con sefarosa se le añadió el sobrenadante de *TvCKS1* y al otro tubo el sobrenadante de *TvCKS2*, se incubaron en movimiento a 4 °C durante 45 minutos.

Los sobrenadantes con la sefarosa se vertieron cada uno en una columna, se abrió la tapa hasta que el sobrenadante drenó y éste se almacenó a -20 °C. A cada columna se le realizaron dos lavados con 2 ml de buffer de lavado (apéndice II), ambos lavados se colectaron y almacenaron a -20 °C.

Las proteínas se recuperan con 300 µl de buffer de elución (apéndice II) en fracciones y se almacenaron a -20 °C.

#### **5.4.5 SDS-PAGE y western blot**

Los eluidos se analizaron en geles de poliacrilamida al 15% en una electroforesis con menor concentración de SDS (0.1% en gel separador y concentrador, 1% en buffer de muestra 5X y 0.5% en el buffer de corrida,apéndice III). Las muestras se

mezclaron con el buffer de muestra, se calentaron cuatro minutos a 80°C y se cargaron en los pozos. La electroforesis se realizó a 20 mA por gel durante una hora.

Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante una hora con 20 minutos a 350 mA utilizando el buffer de carbonatos (apéndice II), las membranas se bloquearon con leche al 5% diluida en TTBS (apéndice II) durante 1 hora, posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TTBS. Las membranas se incubaron con HisProbe-HRP durante una hora, nuevamente se realizaron 3 lavados de 10 minutos y finalmente se reveló por quimioluminiscencia, 1:1 SuperSignal West Pico.

## 5.5 Ensayo de Doble híbrido en levaduras

Para determinar la interacción entre *TvCRKs* y *TvCKS* realizamos ensayos de doble híbrido en la levadura *S. cerevisiae*.

### 5.5.1 Amplificación de los genes de *tvcks1* y *tvcks2*

Utilizando como DNA molde la clona de pGEMTE-*tvcks1* se amplificó el gen *tvcks1* con los oligonucleótidos p13suc1-20-EcoRI-F y p13suc1-Xho-R. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 µl y sus condiciones se detallan abajo.

Solución	<i>tvcks1</i>	Control
Agua bidestilada estéril para PCR	35.5 µl	17.5 µl
Amortiguador para PCR 10X	5 µl	2.5 µl
MgSO4 50 mM (3 mM final)	1 µl	0.5 µl
dNTP's (stock de 10 mM)	1.5 µl	0.75 µl
Oligo F	3 µl	1.5 µl
Oligo R	3 µl	1.5 µl
<b>DNA</b>	0.5 µl	-----
<i>Pfx</i> polimerasa	0.5 µl	0.25 µl
Total	50 µl	25 µl

Paso	Tiempo	Temperatura
1	5'	94°C
2	30''	94°C
3	30''	<b>56°C</b>
4	25''	68°C
5	6 ciclos (pasos 2-4)	

6	30''	94°C
7	30''	62°C
8	25''	68°C
9	30 ciclos (pasos 6-8)	
10	5'	68°C
11	∞	4°C
12	END	

Para amplificar el gen *tvcks2*, se utilizó como DNA molde la clona de pGEMTE-*tvcks2* y los oligonucleótidos p13suc1-60-EcoRI-F y p13suc1-Xho-R. La reacción de PCR y las condiciones se detallan abajo.

Solución	TvCks2	Control
Agua bidestilada estéril para PCR	35.8 µl	17.9 µl
Amortiguador para PCR 10X	5 µl	2.5 µl
MgSO4 mM (3mM final)	1.0 µl	0.5 µl
dNTP's (stock de 10mM)	1.5 µl	0.75 µl
Oligo	3 µl	1.5 µl
Oligo	3 µl	1.5 µl
<b>DNA</b>	0.5 µl	----
<i>Taq</i> Hi Fi polimerasa	0.2 µl	0.1 µl
Total	50 µl	25 µl

Paso	Tiempo	Temperatura
1	5'	94°C
2	30''	94°C
3	30''	<b>56°C</b>
4	25''	68°C
5	6 ciclos (pasos 2-4)	
6	30''	94°C
7	30''	62°C
8	25''	68°C
9	30 ciclos (pasos 6-8)	
10	5'	68°C
11	∞	4°C
12	END	

### 5.5.2 Clonación en pJG4-5

Se clonó el marco de lectura abierto del gen de *tvcks1* en el vector pJG4-5 utilizando los sitios para *EcoRI* y *XhoI*. Se transformó la cepa de *E. coli* XL1BLUE con una ligación con relación vector:inserto 1:4. Se purificó plásmido de las colonias resultantes y se hicieron digestiones con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* para corroborar la presencia del inserto; las clonas positivas se secuenciaron (ver secciones 5.3.5 a 5.3.8).

Para el gen *tvcks2* primero se clonó en el vector pGEM T-Easy utilizando una ligación estándar (ver sección 5.3.4). De una clona positiva se extrajo plásmido que se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* para liberar suficiente inserto y subclonarlo en pJG4-5, como se describe para *tvcks1*.

### 5.5.3 Transformación de la cepa EGY48 de *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizó la cepa EGY48 de *S. cerevisiae* (*ura3 trp1 his3 3LexA-operator-LEU2*) la cual tiene integrado en su genoma el gen reportero *LEU2* que sintetiza leucina y se transformó con el plásmido reportero pSH18 que codifica para la enzima betagalactosidasa, este plásmido contiene el marcador seleccionable *URA3*. La transcripción de ambos reporteros sucede si *TvCRKs* y *TvCKSs* interaccionan, pues su unión permite la formación de un factor de transcripción y recluta entonces la maquinaria de transcripción.

Las *TvCRKs* se clonaron en el vector pEG202 para crear fusiones con el dominio de unión a DNA LexA, las construcciones se realizaron por el M. en C. Erick Amador Gaytán. Este vector contiene el marcador seleccionable *HIS3*. Para los controles también se clonó la proteína  $\alpha$  de *S. cerevisiae*.

Se realizaron nueve transformaciones separadas de EGY48, utilizando las siguientes combinaciones de plásmidos:

*pEG202- <i>TvCRK16</i> y	pSH18 ( <i>lacZ</i> )
*pEG202- <i>TvCRK22</i> y	
*pEG202- <i>TvCRK40</i> y	
*pEG202- <i>TvCRK51</i> y	
*pEG202- <i>TvCRK53</i> y	
*pEG202- <i>TvCRK57</i> y	
*pEG202- <i>TvCRK59</i> y	
*pEG202- <i>TvCRK96</i> y	
*pEG202- $\alpha$ y	
*contiene el dominio de unión a DNA (DBD)	

Se creció un pre-cultivo de levaduras de la cepa EGY48 en 10 ml de YPD (apéndice III) 20 hr a 30 °C, a partir del cual se creció otro cultivo de 50 ml hasta que alcanzó una D. O.<sub>600</sub> entre 0.3 y 0.4 nm.

El cultivo se centrifugó a 6,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos, se lavaron las levaduras dos veces con agua estéril y se resuspendió el pellet de células en 1 ml de agua, el cual se transfirió a un microtubo de 1.5 ml y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 segundos. Se retiró el sobrenadante con micropipeta. Se agregaron 400 µl de agua, 50 µl de acetato de litio y 5 µl de buffer TE y se resuspendió el pellet celular.

Se usaron 50 µl de levaduras para cada transformación. A cada alícuota se le agregaron 10 µl de DNA de esperma de salmón (previamente hervido durante 5 minutos y colocado en hielo 5 minutos), tras lo cual se añadieron 200 ng de TvCRK o  $\alpha$ , 200 ng del vector pSH18 y 300 µl de PEG al 40%. Se mezcló ligeramente en vórtex.

Se incubaron las levaduras 30 minutos a 30 °C; en seguida se dió un choque térmico 15 minutos a 42 °C. Finalizando éstos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 segundos y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 180 µl de agua estéril y se plaquearon en cajas con Medio Mínimo (MM) con Dextrosa, Leucina y Triptófano.

Se utilizaron las colonias resultantes de la primera transformación, las cuales llevaban los dos plásmidos anteriormente descritos, para introducirles las construcciones realizadas en el vector pJG4-5 que tienen la fusión de las proteínas TvCKs, la proteína  $\beta$  y endoquitinasa (de *S. cerevisiae*) con el dominio activador “acid blob” de un factor de transcripción. Este vector tiene el marcador de selección *TRP1*. Se introdujeron las construcciones de la siguiente manera:

<b><i>TvCRK16</i></b> y	<p>*pJG4-5-<b><i>TvCKS1</i></b> ó</p> <p>*pJG4-5-<b><i>TvCKS2</i></b> ó</p> <p>*pJG4-5 <b>Endoquitinasa</b></p>
<b><i>TvCRK22</i></b> y	
<b><i>TvCRK40</i></b> y	
<b><i>TvCRK51</i></b> y	
<b><i>TvCRK53</i></b> y	
<b><i>TvCRK57</i></b> y	
<b><i>TvCRK59</i></b> y	
<b><i>TvCRK96</i></b> y	
<b>Proteína <math>\alpha</math></b> y	<p>*pJG4-5-<b><math>\beta</math></b> (control +)</p> <p>*pJG4-5-<b>Endoquitinasa</b> (control -)</p> <p>*Contiene el dominio de activación (AD)</p>

Se crecieron los nueve precultivos de las levaduras con los dos plásmidos en 10 ml de MM Dextrosa con Leucina y Triptófano (apéndice III) 20 hr a 30 °C, a partir de los cuales se crecieron otros cultivos de 50 ml hasta que alcanzaron una O.D.<sub>600</sub> entre 0.3 y 0.4 nm.

Se continuó con el protocolo de transformación como anteriormente se describió. En esta ocasión por cada *TvCRK* se hicieron alícuotas para añadir 200 ng de la construcción de *tvcks1*, de *tvcks2*, o de endoquitinasa clonadas en pJG4-5, y a todas ellas se les colocaron 300  $\mu$ l de PEG al 40%. A las levaduras con la construcción para la proteína  $\alpha$  se les transformó con la construcción para la proteína  $\beta$ . Se utilizaron cajas con MM con Dextrosa y Leucina para plaquear las levaduras.

#### 5.5.4 Síntesis de reporteros

Las levaduras con los tres plásmidos se estiraron en cajas de MM con Dextrosa y Leucina para purificar colonias y se incubaron a 30 °C por 48 horas. Se eligieron colonias y se crecieron cultivos en MM con Galactosa, Rafinosa y Leucina (MM/Gal/Raf/Leu) (apéndice III), los cuales se mantuvieron 48 horas en agitación a 30 °C.

Los cultivos se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos a 4 °C; se realizaron dos lavados con agua estéril y finalmente se resuspendieron en 2 ml de agua. Se



ajustaron cultivos de 1 ml a una O.D. <sub>600</sub> de 0.6 nm y se hicieron diluciones 1/5, 1/50 y 1/500 en tubos eppendorf de 1.5 ml.

Se colocaron gotas de 3 µl comenzando por la muestra concentrada y terminando con la dilución a menor concentración. Para determinar la expresión del reportero de leucina se utilizaron cajas con MM/Gal/Raf, para el reportero *lacZ* cajas con MM/Gal/Leu/X-Gal y para ambos reporteros cajas con MM/Gal/X-Gal (apéndice III). Se incubaron las cajas a 30 °C, 48 horas aproximadamente.

#### **5.5.5 Subclonación en pEG202**

Para probar si *TvCKS* pueden formar heterodímeros se realizó un ensayo de Doble Híbrido entre *TvCKS*. Los genes se subclonaron en el vector pEG202 que tiene el dominio de unión al DNA. Y se aprovecharon las clonas de pJG4-5-*tvcks1* y pJG4-5-*tvcks2* las cuales se digirieron con *EcoRI* y *XhoI* para liberar suficiente inserto y ligarlo con pEG202 en una relación vector:inserto 1:4. El procedimiento continuó y las clonas positivas se mandaron a secuenciar (ver secciones 5.3.5 a 5.3.8).

Se transformaron las levaduras en dos ocasiones, en la primera se introdujo las construcciones en pEG202 y el plásmido pSH18 y en la segunda las construcciones en pJG4-5. Se continuó el procedimiento para ver la expresión de los genes reporteros como se describió anteriormente (ver secciones 5.5.3 y 5.5.4).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Alineamiento de secuencias de CKSs

Se investigó la presencia de genes homólogos a *suc1* de *S. pombe* en el genoma de *T. vaginalis*, se identificaron dos genes que codifican proteínas putativas reguladoras de cinasas dependientes de ciclinas (CKS): TVAG\_164620 (XM\_001325540.1) y TVAG\_142260 (XM\_001320060.1), para los cuales no se encontraron reportados EST. Ambos genes constan de 249pb y codifican proteínas de 82 aminoácidos.

En este trabajo el gen TVAG\_164620 se denomina *tvcks1* y su proteína TvCKS1 (EAY13352.1) y el gen TVAG\_142260 se denomina *tvcks2* y su proteína TvCKS2 (EAY07872.1).

El análisis teórico indica que *TvCKS1* tiene un punto isoeléctrico de 6.63 y un peso molecular de 9906 Da, mientras que *TvCKS2* tiene un punto isoeléctrico de 6.39 y un peso molecular de 9922 Da.

En la tabla 3 se enlistan los porcentajes de identidad y similitud entre las proteínas CKS de otros organismos y las proteínas de *T. vaginalis*. Las dos *TvCKS* son >50% similares a otras CKSs, pero con mayor porcentaje de identidad (>50%) y similitud (>70%) a las CKS humanas, principalmente a la *HsCKS2*.

Ambas proteínas tienen el motivo HXPEPH que es característico de las CKSs descritas hasta el momento. En *TvCKS1* se compone de: His-60, Ala-61, Pro-62, Glu-63, Pro-64 y Asn-65. En *TvCKS2* el motivo es el mismo, excepto por Asn-61. En las dos proteínas el último aminoácido del motivo de dimerización es una asparagina en lugar de una histidina. Se conservan también los cinco aminoácidos involucrados en la unión a fosfato: Lys-11, Arg-20, Ser-51, Trp-54 y Arg-71, y la mayoría de los aminoácidos necesarios para la interacción con CDKs.

Proteína	Organismo	Proteína putativa de <i>T. vaginalis</i>	*Probabilidad	Identidad	Similitud
HsCKS1	<i>H. sapiens</i>	TvCKS1	3.0e-22	56%	73%
		TvCKS2	4.9e-22	55%	73%
HsCKS2	<i>H. sapiens</i>	TvCKS1	4.8e-24	57%	76%
		TvCKS2	7.8e-24	56%	76%
LmmCKS1	<i>L. mexicana</i>	TvCKS1	4.9e-22	39%	54%
		TvCKS2	1.0e-21	37%	55%
CKS1	<i>S. cerevisiae</i>	TvCKS1	3e-21	28%	40%
		TvCKS2	1.0e-19	27%	38%
p13suc1	<i>S. pombe</i>	TvCKS1	3.7e-17	36%	55%
		TvCKS2	1.6e-16	36%	52%
TbCKS1	<i>T. brucei</i>	TvCKS1	3.8e-22	42%	55%
		TvCKS2	4.4e-21	39%	54%
Tcp12CKS1	<i>T. cruzi</i>	TvCKS1	1.2e-20	38%	55%
		TvCKS2	2.7e-21	39%	57%

**Tabla 3. Porcentajes de identidad y similitud de las TvCKSs con CKSs de otros organismos.**

A pesar de que *T. vaginalis* es un protozooario parásito, sus dos CKS tienen arriba del 70% de similitud con las CKSs de humano y mayor identidad con la HsCKS2. \*Entre más pequeño es el valor de e, es menos probable que el alineamiento sea producto del azar.

Las CKSs de levaduras tienen un extremo amino extenso y una inserción de nueve aminoácidos. La CKS1 de *S. cerevisiae* es la proteína más grande del grupo y tiene una cola de glutaminas en su extremo carboxilo. Las CKSs de los cinetoplástidos son proteínas de menor tamaño y aunque tienen un extremo amino grande no es parecido al de las levaduras. A pesar de que *T. vaginalis* también es un protozooario parásito como los cinetoplástidos, sus CKSs tienen mayor similitud a las CKSs del humano, las cuales tienen un extremo amino corto y son las proteínas más pequeñas del grupo (ver figura 9). TvCKS1 y TvCKS2 son 94%

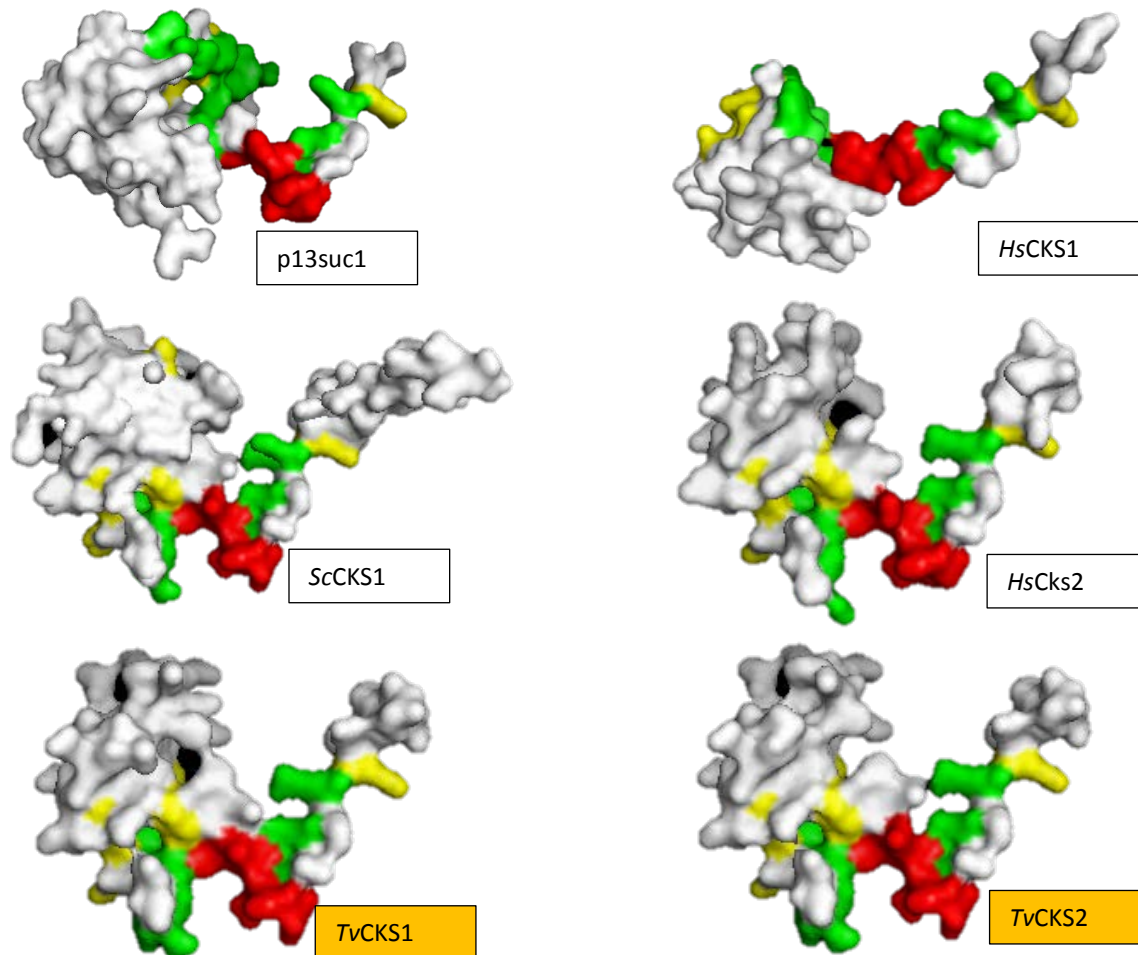
idénticas y 96% similares, la diferencia entre una y otra radica en cinco aminoácidos (ver figura 9).

TvCKS1	---MSVD---	-----	-----	-----↓DIRY	SDKYDDVYE	YRHVILPKEI	28
TvCKS2	---MSVD---	-----	-----	-----EITY	SEKYDDVYE	YRHVILPKEI	28
TbCKS1	---MSGR---	---DYFSITD	PVQREQARM	ISKLQSKILY	SDKYDDEYE	YRHVILPKDF	51
Tcp12CKS1	---MSAR---	---DFFSITD	PVQKEQARM	ISKLQSKILY	SEKYDDEYE	YRHVILPKDF	51
LmmCKS1	---MPAKPAQ	---DFFSLDA	NGQRE-ALII	IKKLQCKILY	SDKYDDMF	YRHVILPKDL	53
HsCKS1	---MSHK---	-----	-----	-----QIYY	SDKYDDEFE	YRHVILPKDI	28
HsCKS2	---MAHK---	-----	-----	-----QIYY	SDKYFDEHYE	YRHVILPREL	28
p13suc1	---MSKS---	-----GVP	RLLTASERER	LEPFIDQIHY	SPRYADDEYE	YRHVILPKAM	47
ScCKS1	---MYHHYHA	-----FQG	RKLTQERAR	VLEFQDSIHY	SPRYSDDNYE	YRHVILPKAM	50
					-----β1---	---β2---	-α1-
TvCKS1	SRKDPKD---	-----HLLS	EEWRALGIQ	MSPGWIHYHR	HAPEPNILLF	RREHHGNVPK	79
TvCKS2	SRKDPKD---	-----HLLS	EEWRALGIQ	MSPGWIHYHR	HNPEPNILLF	RREHHGNVPK	79
TbCKS1	SRLVPRG---	-----RLME	ESEWRQLGVQ	QSVGWRHYML	HAPEPHVLLF	KRPKTQ----	98
Tcp12CKS1	ARLVPRH---	-----RLMD	ESEWRQLGVQ	QSVGWRHYMF	HKPEPHVLLF	KRPKTQ----	98
LmmCKS1	ARLVPTS---	-----RLMS	EMEWRLGVQ	QSOGWVHYMI	HKPEPHVLLF	KRPRT-----	99
HsCKS1	AKLVPKT---	-----HLMS	ESEWRNLGVQ	QSOGWVHYMI	HEPEPHILLF	RRPLPKPKK	79
HsCKS2	SKQVPKT---	-----HLMS	EEWRRLGVQ	QSLGWVHYMI	HEPEPHILLF	RRPLPKDQOK	79
p13suc1	LKAIPTDYFN	PETGTLRILQ	EEWRGLGIT	QSLGWEMYEYV	HVPEPHILLF	KREKDYQMKF	107
ScCKS1	LKVIPSDYFN	SEVGTLRILT	EDEWRGLGIT	QSLGWEHYEC	HAPEPHILLF	KRPLNYEDEL	110
			--α2-	--β3-	---β4---		
TvCKS1	DAL-----	-----	-----	-----	82		
TvCKS2	DAL-----	-----	-----	-----	82		
TbCKS1	-----	-----	-----	-----	98		
Tcp12CKS1	-----	-----	-----	-----	98		
LmmCKS1	-----	-----	-----	-----	99		
HsCKS1	-----	-----	-----	-----	79		
HsCKS2	-----	-----	-----	-----	79		
p13suc1	-----SQQR GG	-----	-----	-----	113		
ScCKS1	RAATAAAQQQ	QQQQQQQQQQ	QQQHQTQISIS	NDMQVPPQIS	150		

**Figura 9. Alineamientos de las CKSs de distintos organismos.** Las proteínas de *T. vaginalis* TvCKS1 y TvCKS2 presentan el motivo HXPEPH con algunos cambios, los residuos marcados en **amarillo** son los involucrados en la unión a fosfato y los residuos marcados en **verde** son los necesarios para la interacción con CDKs. En **morado** los aminoácidos de HsCKS1 importantes para la unión a SKP2. En **azul** el dominio de unión a ubiquitina en CKS1. ↓ Aminoácidos diferentes en las CKS de *T. vaginalis*. Cambios conservados: El aspartato (D) 5 y 10 en TvCKS1 cambian por glutamato (E) 5 y 10 en TvCKS2. Cambios no conservados: La arginina (R) 7, la Isoleucina (I) 23 y la alanina (A) 61 en TvCKS1 cambian por Isoleucina (I) 7, Treonina (T) 23 y Asparagina (N) 61 en TvCKS2. Tv. *Trichomonas vaginalis*, Tb. *Trypanosoma brucei*, Tc. *Trypanosoma cruzi*, Lmm. *Leishmania mexicana*, Hs. *Homo sapiens*, Sc. *Saccharomyces cerevisiae*.

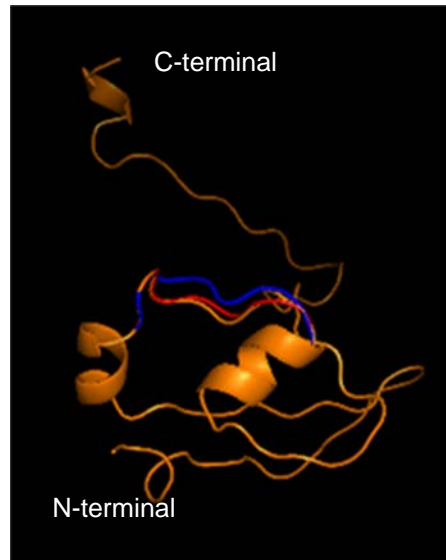
## 6.2 Modelado *in silico* de las CKSs putativas de *T. vaginalis*

Las secuencias de aminoácidos de p13suc1, CKS1, *HsCKS1*, *HsCKS2*, *TvCKS1* y *TvCKS2* se usaron para modelar las proteínas en el programa PHYRE 2. Todas las CKSs se caracterizan por hojas  $\beta$  rodeadas por hélices  $\alpha$ , incluyendo las de *T. vaginalis*. Las CKSs de levaduras son más grandes, debido a su extremo amino, p13suc1 de *S. pombe* y CKS1 de *S. cerevisiae* tienen mayor similitud estructural a *HsCKS1* y *HsCKS2* de *H. sapiens*, respectivamente. Las *TvCKS*s se estructuran de manera similar entre ellas y en comparación con la CKS2 de humano. En *TvCKS2* hay dos diferencias estructurales en comparación con *TvCKS1* (ver figuras 10 y 11).



**Figure 10. Estructuras teóricas de las proteínas CKSs.** Se utilizó la secuencia de aminoácidos de las CKS de varios organismos para modelar su estructura en el programa PHYRE2. Las dos

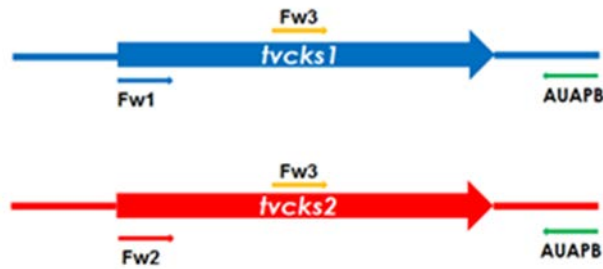
proteínas de *T. vaginalis* se estructuran de manera similar a la *HsCKS2*. Arriba p13suc1 (13 kDa) y *HsCKS1* (9 kDa), en medio CKS1 (18 kDa) de *S. cerevisiae* y *HsCKS2* (9 kDa), abajo *TvCKS1* (10 kDa) y *TvCKS2* (10 kDa) de *T. vaginalis*. En rojo el motivo HXPEPH, en verde los residuos de interacción con CDKs y en amarillo el sitio unión a aniones (fosfato).



**Figura 11. Modelo estructural teórico de las CKSs de humano y de *T. vaginalis*.** Representación de listones de *HsCKS2* y *TvCKS*, todas se componen de hojas  $\beta$  rodeadas por  $\alpha$ -hélices y se estructuran de manera similar con ligeras diferencias que se pueden observar en diferentes colores. En naranja CKS2 de humano, en azul *TvCKS1*, en rojo *TvCKS2*.

### 6.3 Expresión de *tvcks1* y *tvcks2* a nivel de mRNA

La expresión de los genes *tvcks1* y *tvcks2* en *T. vaginalis* se evaluó mediante un análisis de RT-PCR. Como se describe en materiales y métodos, se extrajo RNA total, se purificó RNA poly (A)+, se sintetizó cDNA y se amplificaron los extremos 3' de los mRNA utilizando un oligonucleótido específico para cada gen (ver figura 12). A partir de esta reacción se realizó una PCR anidada para favorecer la amplificación específica.



```

TvCks1    ATGAGTGTGACGATATCAGGTACTCTGATAAGTACTACGATGATGTCTA 50
TvCks2    ATGAGTGTGACGAGATTATATACTCAGAAAAGTATTATGATGACGTCTA 50
*****
TvCks1    TGAATATCGTCATGTAATCTTCTCCTAAAGAGATAAGTAGGAAAGATCCAA 100
TvCks2    TGAGTATAGGCATGTTACATTACCAAAGAAATCAGCAGGAAAGATCCGA 100
*** ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TvCks1    AAGATCATCTTTTAAGTGAAGAAGAATGGAGAGCATTAGGAATACAAATG 150
TvCks2    AGGACCACCTTTTAAGCGAAGAAGAATGGAGAGCTCTTGGCATCCAAATG 150
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TvCks1    AGTCCTGGCTGGATACATTACCATCGTCATGCACCAGAGCCTAATATTCT 200
TvCks2    AGCCCAGGATGGATCCATTATCACAGACATAATCCAGAGCCAAATATTCT 200
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TvCks1    TCTATTTAGACGTGAGCACCATGGAAATGTTCTAAAGATGCCCTTTAA 249
TvCks2    CTTATTTAGAAGAGAACCACCATGGAAATGTTCCGAAAGATGCCCTTTAA 249
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Oligo Fw1 p13suc1-20-KpnF 5' TATAGGTACCAGTGTGACGATATCAGGTACTC 3'
Oligo Fw2 p13suc1-60-KpnF 5' CATAGGTACCAGTGTGACGAGATTATATACTCAG 3'
Oligo Fw3 Tvp13suc1nested GAAGAAGAATGGAGAGC
Oligo AUAPB 5' GGATCCGGCCACGCGTCGACTAGTAC 3'

```

```

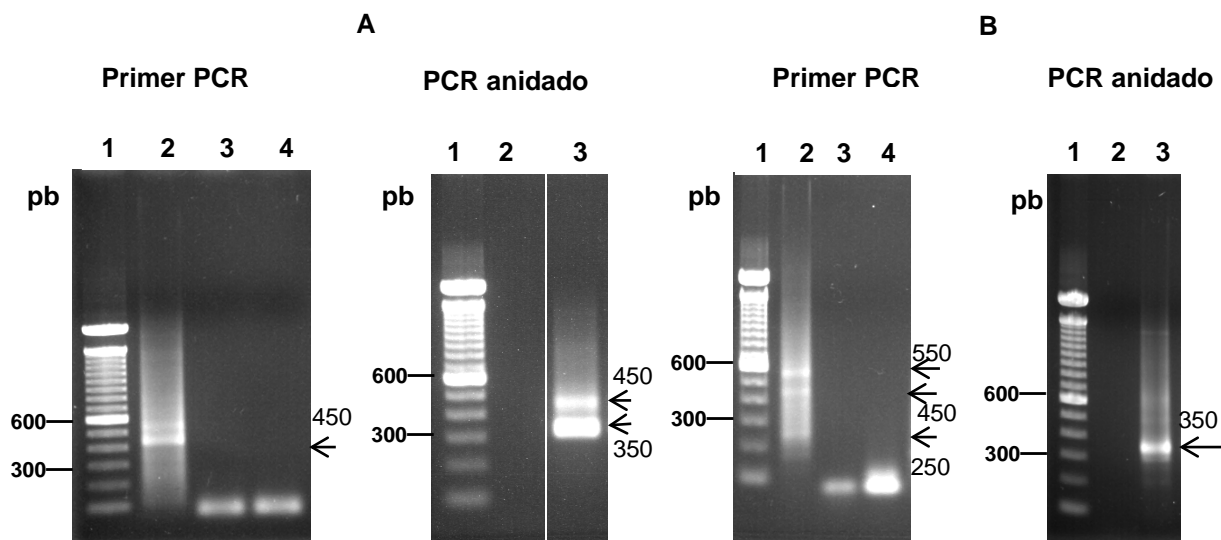
GATATC SECUENCIA DE CORTE DE Eco RV
GGATCC SECUENCIA DE CORTE DE Bam HI
GAGCCC SECUENCIA DE CORTE DE Sac I

```

**Figura 12. Secuencias genómicas de las CKSs de *T. vaginalis*.** Arriba: Esquema de los sitios de anclaje de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los extremos 3' de los genes *tvcks*, Fw1 y Fw2 son oligonucleótidos específicos para cada gen y Fw3 es el oligonucleótido común para ambos genes. Fw1 y Fw2 fueron utilizados para la primera reacción de PCR y el Fw3 para la reacción de PCR anidado. Abajo: Secuencias de nucleótidos del ORF de los genes *tvcks1* y *tvcks2*. Se muestran los oligonucleótidos para las reacciones de PCR y los sitios que son reconocidos por las enzimas de restricción *EcoRV*, *BamHI* y *SacI* que nos sirven para diferenciar los genes.

En la primera reacción de PCR de *tvcks1* se amplificaron dos bandas con un tamaño mayor a 400 pb, dada la similitud de los genes es probable que se estén amplificando los dos genes, por ello realizamos la PCR anidada, en la cual se

obtuvieron dos productos, uno de aproximadamente 350pb y otro mayor a 400pb (ver figura 13A) (la banda superior puede ser el mismo amplificado de la reacción uno, debido a que se utilizó como templado sin haber sido purificada). En la primera reacción de PCR de *tvcks2* se amplifican tres productos de aproximadamente 250, 450 pb y de 550 pb. En la PCR anidada se amplifica una banda de aproximadamente 350 pb (ver figura 13B).



**Figura 13. Amplificación del 3'UTR del mRNA de los genes *tvcks1* y *tvcks2* mediante 3'RACE.** Se aisló RNA poly (A)+, se sintetizó cDNA y se obtuvo por PCR el extremo 3' de los genes *tvcks1* y *tvcks2*. **A)** 3'UTR de *tvcks1*. Primer PCR con oligonucleótidos específicos. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Fragmentos de aproximadamente 450 y 550 pb. Carril 3: Control de PCR sin cDNA. Carril 4: Control de PCR sin Taq polimerasa. PCR semianidado del 3'UTR de *tvcks1*. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Control de PCR sin Taq polimerasa. Carril 3: Fragmentos de aproximadamente 350 y 450 pb. **B)** 3'UTR de *tvcks2*. Primer PCR con oligonucleótidos específicos. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Fragmentos de aproximadamente 250, 400 y 500pb. Carril 3: Control de PCR sin cDNA. Carril 4: Control de PCR sin Taq polimerasa. PCR semianidada del 3'UTR de *tvck2*. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Control de PCR sin Taq polimerasa. Carril 3: Fragmento de aproximadamente 350 pb.



Para corroborar que los amplicones fueran de *tvcks1* o *tvcks2*, los productos del PCR anidado se clonaron en el vector pGEM T-Easy, se obtuvo plásmido y se digirieron las clonas con *Bam*HI y *Sac*I. Los plásmidos de *tvcks1* se linearizan con ambas enzimas pues el vector tiene un sitio de corte para cada enzima, mientras que los de *tvcks2* liberan un inserto al ser digeridos con *Bam*HI y con *Sac*I, ya que tanto el vector como el gen se cortan con estas enzimas. Se mandaron a secuenciar las clonas con el patrón de digestión esperado.

La presencia de los cDNAs de *tvcks1* y *tvcks2* demuestra que ambos genes se expresan, y sugiere que su producto proteico también está presente (figuras 14 y 15). Generalmente los extremos 3'UTR de los mRNAs de *T. vaginalis* constan de 5 a 43 nucleótidos en promedio (Vanacova S. et al., 2003). La poliadenilación (adición de Adeninas) de estos extremos en *T. vaginalis* está dirigida por la señal de poliadenilación UAAA, que en muchos genes forma parte del codón de paro de la traducción UAA (Fuentes V. et al., 2012). Llama la atención que los extremos 3'UTR de los mRNA de *tvcks1* y *tvcks2* son mayores a 130 nucleótidos y utilizan una señal de poliadenilación que se encuentra distante al codón de paro.

En el extremo 3' UTR del gen *tvcks1* se obervó la señal de poliadenilación UAAA en cinco posiciones y se encontró que en cuatro de ellas dirige la poliadenilación, originando la adición de adeninas en diferentes sitios (ver figura 14). Mientras que en el 3' UTR del gen *tvcks2* se encontró la señal en tres lugares distintos, en dos de estos la señal dirige la poliadenilación y la cola de adeninas se ubican en sitios que cercanos entre sí (ver figura 15). La población de mRNAs del gen *tvcks1* tiene una poliadenilación heterogénea en comparación con la población de mRNAs del gen *tvcks2*. Lo anterior podría tener implicaciones en la regulación de la traducción de los mRNAs de estos genes.

```

CKS1-9      GATGCCCTTTAAAATTCAAAAACGTTATTTTGATCATTAAATTTAGATCAAATGTCAATGC
CKS1-1      GATGCCCTTTAAAATTCAAAAACGTTATTTTGATCATTAAATTTAGATCAAATGTCAATGC
CKS1-7      GATGCCCTTTAAAATTCAAAAACGTTATTTTGATCATTAAATTTAGATCAAATGTCAATGC
CKS1-3      GATGCCCTTTAAAATTCAAAAACGTTATTTTGATCATTAAATTTAGATCAAATGTCAATGC
CKS1-13     GATGCCCTTTAAAATTCAAAAACGTTATTTTGATCATTAAATTTAGATCAAATGTCAATGC
CKS1-6      GATGCCCTTTAAAATTCAAAAACGTTATTTTGATCATTAAATTTAGATCAAATGTCAATGC
CKS1-10     GATGCCCTTTAAAATTCAAAAACGTTATTTTGATCATTAAATTTAGATCAAATGTCAATGC
tvcks1     GATGCCCTTTAAAATTCAAAAACGTTATTTTGATCATTAAATTTAGATCAAATGTCAATGC
              1
CKS1-9      ATCATGAGTCATTTCACTACTTTCGTAGTTACTTGTTATTTAATTAGATTAAAAATTTCGA
CKS1-1      ATCATGAGTCATTTCACTACTTTCGTAGTTACTTGTTATTTAATTAGATTAAAAATTTCGA
CKS1-7      ATCATGAGTCATTTCACTACTTTCGTAGTTACTTGTTATTTAATTAGATTAAAAATTTCGA
CKS1-3      ATCATGAGTCATTTCACTACTTTCGTAGTTACTTGTTATTTAATTAGATTAAAAATTTCGA
CKS1-13     ATCATGAGTCATTTCACTACTTTCGTAGTTACTTGTTATTTAATTAGATTAAAAATTTCGA
CKS1-6      ATCATGAGTCATTTCACTACTTTCGTAGTTACTTGTTATTTAATTAGATTAAAAATTTCGA
CKS1-10     ATCATGAGTCATTTCACTACTTTCGTAGTTACTTGTTATTTAATTAGATTAAAAATTTCGA
tvcks1     ATCATGAGTCATTTCACTACTTTCGTAGTTACTTGTTATTTAATTAGATTAAAAATTTCGA
              2
CKS1-9      TTCCTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
CKS1-1      TTCCTATCAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
CKS1-7      TTCCTAACAAATAATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAA
CKS1-3      TTCCTATCAATAATATAAAATACTTCTCTTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
CKS1-13     TTCCTATCAATAATATAAAATACTTCTCTTATACATTTCAAAAAAAAAAAAA
CKS1-6      TTCCTATCAATAATATAAAATACTTCTCTTATACATTTCAATACAAAGGATTTTACCTAA
CKS1-10     TTCCTATCAATAATATAAAATACTTCTCTTATACATTTCAATACAAAGGATTTTACCTAA
tvcks1     TTCCTATCAATAATATAAAAACTTCTCTTATACATTTCAATACAAAGGATTTTACCTAA
              3
CKS1-9      -----
CKS1-1      -----
CKS1-7      AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-----
CKS1-3      -----
CKS1-13     -----
CKS1-6      TTTTCATAAAATATTGCATTTTGATGTTATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
CKS1-10     TTTTCATAAAATATTGCATTTTGATGTTATTTTACATATAAAACATGTTAATTTTGATAAA
tvcks1     TTTTCATAAAATATTGCATTTTGATGTTATTTTACATATAAAACATGTTAATTTTGATAA
              4              5
CKS1-9      -----
CKS1-1      -----
CKS1-7      -----
CKS1-3      -----
CKS1-13     -----
CKS1-6      AAAAAAAA-----
CKS1-10     AAAAAAAAAAAAAAAA-----
tvcks1     -----

```

**Figura 14. Alineamiento del 3'UTR del mRNA de *tvcks1*.** En el extremo 3' del gen *tvcks1* se encontró en cinco sitios la señal de poliadenilación, en cuatro de ellos la señal fue utilizada. En *cursivas* la secuencia genómica anotada. En **negritas** el codón de paro y la cola de adeninas. Subrayada la señal de poliadenilación. **Sombreada** la señal de poliadenilación utilizada en cada una de las ocho clonas secuenciadas.

CKS2-5 GATGCCCTT**TAAA**ATTTTGGATGTAGTCTATGCACAAGGAATCAGTATAACACAATTCCA  
 CKS2-12 GATGCCCTT**TAAA**ATTTTGGATGTAGTCTATGCACAAGGAATCAGTATAACACAATTCCA  
 CKS2-10 GATGCCCTT**TAAA**ATTTTGGATGTAGTCTATGCACAAGGAATCAGTATAACACAATTCCA  
 CKS2-11 GATGCCCTT**TAAA**ATTTTGGATGTAGTCTATGCACAAGGAATCAGTATAACACAATTCCA  
*tvcks2* GATGCCCTT**TAAA**ATTTTGGATGTAGTCTATGCACAAGGAATCAGTATAACACAATTCCA

1

CKS2-5 ATCATACAATGACTATAATACCTTGACATGTTTGTAAATACATAAAATCGCCATTTGATATA  
 CKS2-12 ATCATACAATGACTATAATACCTTGACATGTTTGTAAATACATAAAATCGCCATTTGATATA  
 CKS2-10 ATCATACAATGACTATAATACCTTGACATGTTTGTAAATACATAAAATCGCCATTTGATATA  
 CKS2-11 ATCATACAATGGCTATAATACCTTGACATGTTTGTAAATACATAAAATCGCCATTTGATATA  
*tvcks2* ATCATACAATGACTATAATACCTTGACATGTTTGTAAATACAT**AAA**TCGCCATTTGATATA

2

CKS2-5 TGAAATAATAAAAATTTTCATTTTGAAGTTTTAT**AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**  
 CKS2-12 TGAAATAATAAAAATTTTCATTTTGAAGTTTTAT**AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**  
 CKS2-10 TGAAATAATAAAAATTTTCATTTTGAAGTTTTAT**AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**  
 CKS2-11 TGAAATAATAAAAATTTTCATTTTGAAGTTTTATAAATCTTCTACAT**AAAAAAAAAAAAAAAA**  
*tvcks2* TGAAATAAT**AAA**ATTTTCATTTTGGAGTTTTATAAATCTTCTACATAATATGTTTGTCTAT

3

**Figura 15. Alineamiento del 3'UTR del mRNA de *tvcks2*.** El extremo 3' del gen *tvcks2* tiene un patrón homogéneo de poliadenilación, ya que se encontró la señal de poliadenilación en tres sitios, en dos de ellos la señal es utilizada. En *cursivas* la secuencia genómica anotada. En **negritas** el codón de paro y la cola de adeninas. Subrayada la señal de poliadenilación. **Sombreado** las dos señales de poliadenilación.

#### 6.4 Formación de dímeros de *TvCKS1*

Las proteínas tipo CKS forman dímeros *in vitro*, que han sido detectados mediante cromatografía de filtración en gel y a través de estudios estructurales. Anticuerpos contra las CKS de protozoarios detectan dímeros en lisados totales de *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi* analizados mediante SDS-PAGE (Ducommun et al., 1991, Mottram y Grant et al., 2006, Muñoz et al., 2006). Se encontró que la conformación dimérica es capaz de resistir la desnaturalización. Para evaluar la capacidad de dimerización de las *TvCKSs*, se expresaron estas proteínas recombinantes fusionadas a una etiqueta de 6X-His, la cual nos permitió analizarlas mediante electroforesis y Western blot.

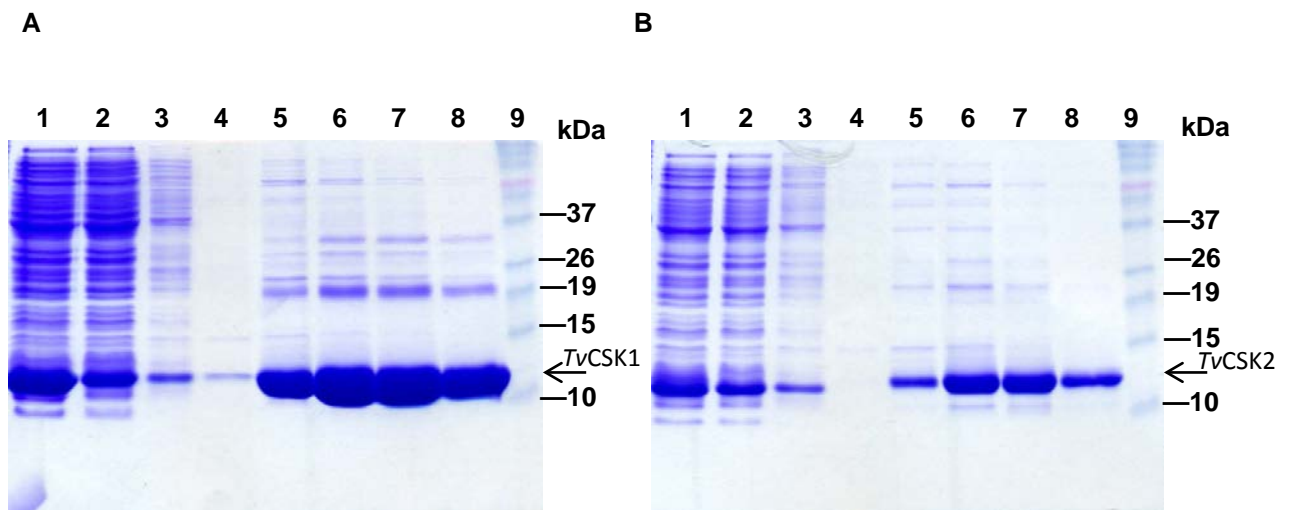
#### Clonación de los genes *tvcks1* y *tvcks2*

A partir de DNA genómico se amplificó por PCR el ORF de los genes *tvcks1* y *tvcks2*, ambos de 249pb. Los productos se clonaron en el vector pGEM T-Easy, las clonas que liberaron un inserto del tamaño esperado se digirieron para obtener

los insertos que fueron subclonados para su expresión en pQE30 utilizando los sitios *KpnI* y *HindIII* añadidos con los oligonucleótidos. Las clonas con el inserto de tamaño esperado se secuenciaron para verificar que la fusión a la etiqueta de histidinas no modificara el marco de lectura o se generara alguna mutación.

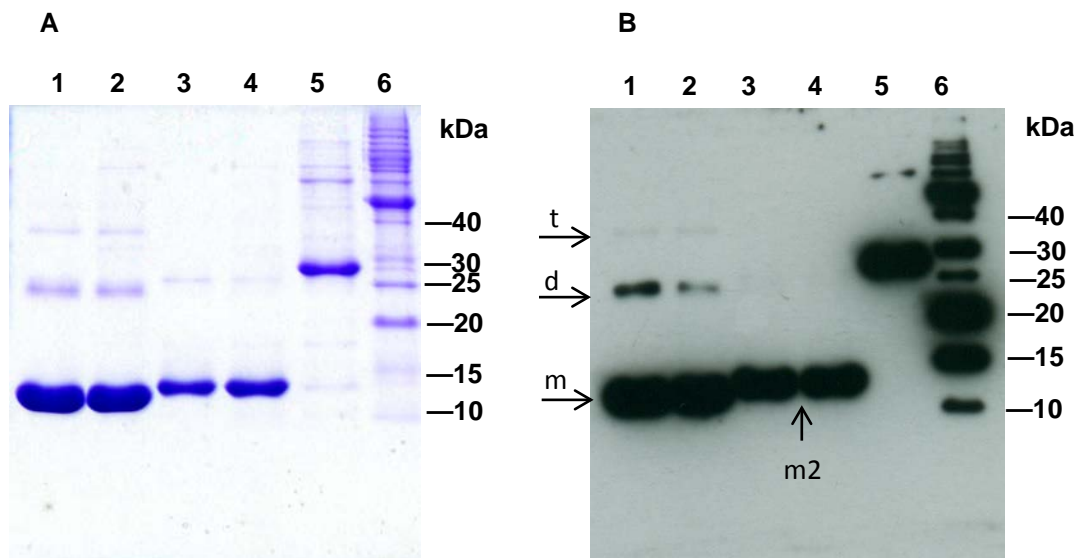
#### Expresión de las proteínas recombinantes de *TvCKS1* y *TvCKS2*

Ambas proteínas recombinantes se expresaron en la cepa *E. coli* M15 y se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando una columna de sefarosa acoplada a níquel. Se realizaron cuatro eluciones que fueron analizadas en una electroforesis desnaturalizante. Se comprobó la presencia de ambas proteínas con el peso esperado de 12 kDa (con la etiqueta de histidinas). *TvCKS1* se expresa mejor y migra ligeramente arriba de los 10 kDa, mientras que *TvCKS2* se observa por arriba de los 10 kDa y más cerca de los 15 kDa (ver figura 16).



**Figura 16. SDS-PAGE de las proteínas *TvCKSs* purificadas.** Purificación de *TvCKS1* (Panel A) y *TvCKS2* (panel B). Carril1: Lisado total inducido. Carril 2: Proteína no unida a la columna. Carriles 3 y 4: Lavados. Carriles 5-8: Proteína eluída. Carril 9: Marcador de peso molecular. Gel de poliacrilamida al 15%.

Para evaluar la posible dimerización de las proteínas se llevó a cabo una electroforesis con menor concentración de SDS (ver materiales y métodos), se incubaron las muestras cinco minutos a 80°C. En el Western blot con HisProbe-HRP se detectó el monómero de 12 kDa y un posible dímero de 24 kDa en las eluciones de *TvCKS1*, además de una tercera banda menor a los 40 kDa. Para *TvCKS2* se observó únicamente los monómeros. Como control utilizamos a la proteína TPB1 de *T. vaginalis* la cual también tiene una etiqueta de histinas y puede formar dímeros (ver figura 17).



**Figura 17. Gel de poliacrilamida y Western Blot de las proteínas recombinantes *TvCKS* purificadas.** Las proteínas recombinantes His-*TvCKS1* y His-*TvCKS2* fueron detectadas mediante la sonda HisProbe-HRP (1:5000) como se describe en materiales y métodos. **Panel A:** gel de poliacrilamida; **panel B:** Western blot. Carriles 1 y 2: Eluciones de His-*TvCKS1*. Se observa el monómero de 12kDa (m), el posible dímero de 24kDa (d) y una banda debajo de los 40 kDa (t). Carriles 3 y 4: Eluciones de His-*TvCKS2*; se observa el monómero de 12kDa (m2). Carril 5: Control His-TBP1. Carril 6: Marcador de peso molecular.

Podría ser que el dímero de *TvCKS1* fuese más estable a la desnaturalización que el dímero de *TvCKS2*. Aunque ambas proteínas tienen el motivo de dimerización

HXPEPN en lugar de HXPEPH, el cambio de la histidina final por asparagina puede no ser relevante para la dimerización pues son aminoácidos de características similares.

Las CKSs del parásito en estudio podrían ser análogas a las CKS1 y CKS2 de *H. sapiens*, las cuales son 81% similares y presentan ligeros cambios estructurales que favorecen la formación de dímeros en *HsCKS2*.

### **6.5 Interacciones de TvCKS1 y TvCKS2 con las CRKs de *T. vaginalis***

En nuestro laboratorio se están caracterizando ocho TvCRKs que posiblemente participan en el ciclo celular de *T. vaginalis*. El M. en C. Erick Amador Gaytán observó interacción *in vitro* de cuatro de ellas con p13suc1 (CKS de la levadura *S. pombe*). En este proyecto se determinó la interacción de tres de las ocho TvCRKs con las dos CKSs de *T. vaginalis*, mediante ensayos de doble híbrido.

Clonación de *tvcks* en vectores para doble híbrido.

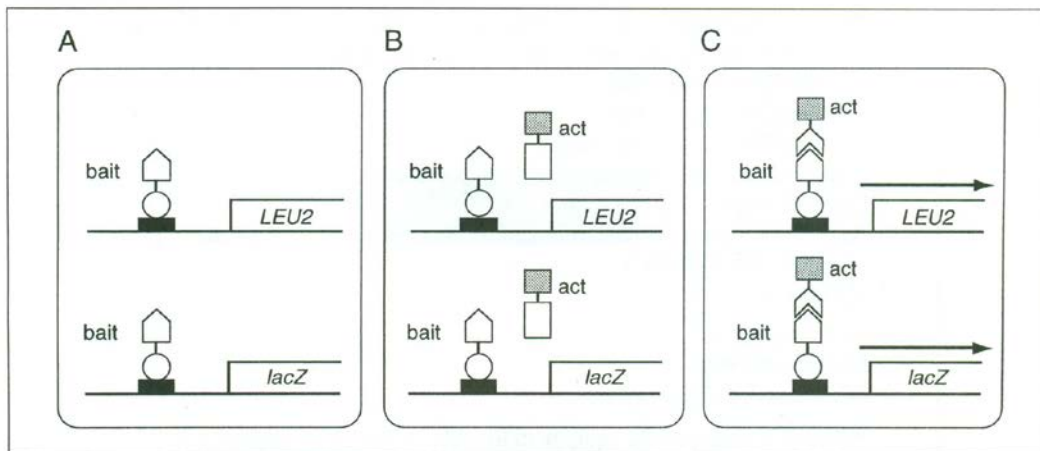
Se amplificaron los genes de *tvcks* teniendo como molde a las clonas en pGEM T-Easy-*tvcks*, utilizando oligonucleótidos específicos que contienen los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *XhoI* y *EcoRI*.

Se clonaron las dos CKSs en el vector pJG4-5 para construir una proteína de fusión con las TvCKS y el dominio activador “acid blob” de un factor de transcripción. La fusión está bajo el promotor inducible por galactosa, *GAL1*.

El M.en C. Erick Amador Gaytán clonó las ocho posibles CRKs de *T. vaginalis* en el vector pEG202 para construir proteínas de fusión con el dominio de unión a DNA, LexA. Las fusiones están bajo el promotor constitutivo del gen de la proteína alcohol deshidrogenasa, *ADH1*.

Se utilizaron dos reporteros: uno endógeno LexAopLEU2 que sintetiza leucina y que cuenta con cuatro operadores LexA, y pSH18 que cuenta con seis operadores LexA y que se encuentra bajo el promotor de *GAL1*. Este reportero sintetiza la

enzima beta galactosidasa que al degradar el sustrato X-Gal da una coloración azul. Las *TvCRKs* se unen al DNA a través del dominio de unión a DNA LexA que reconoce los operadores *LexA* en los genes reporteros, si hay una interacción con las *TvCKS*, la unión entre esas proteínas permite al dominio activador reclutar la maquinaria de transcripción a los genes para que sean transcritos. Si las proteínas no interaccionaron no hay transcripción de los genes reporteros (ver figura 18).



**Figura 18. Sistema reportero de la cepa EGY48 de *S. cerevisiae*.** Dos reporteros de respuesta a operadores *lexA*: gen *LEU2* (requerido para crecer sin Leu) integrado cromosomalmente y el gen *lacZ* fusionado al promotor *GAL1* (genera una coloración azul en medio con X-Gal). **A)** Las levaduras contienen las proteínas quiméricas: *TvCRK* fusionadas a LexA (dominio de unión a DNA) funcionando como cebos y *TvCKS* fusionadas al dominio activador. **B)** Si las proteínas no interaccionan, no se activa la transcripción. **C)** La interacción de las proteínas activa la transcripción y permite el crecimiento de las levaduras en medio sin leucina. La presencia de X-Gal en el medio de cultivo produce una coloración azul en las colonias. Símbolos: Rectángulo negro, operador *lexA*; círculo: proteína LexA que interacciona con los operadores; pentágono, *TvCRKs*; Rectángulo blanco *TvCKS1/2*; cuadro sombreado, dominio activador (“acid blob”).

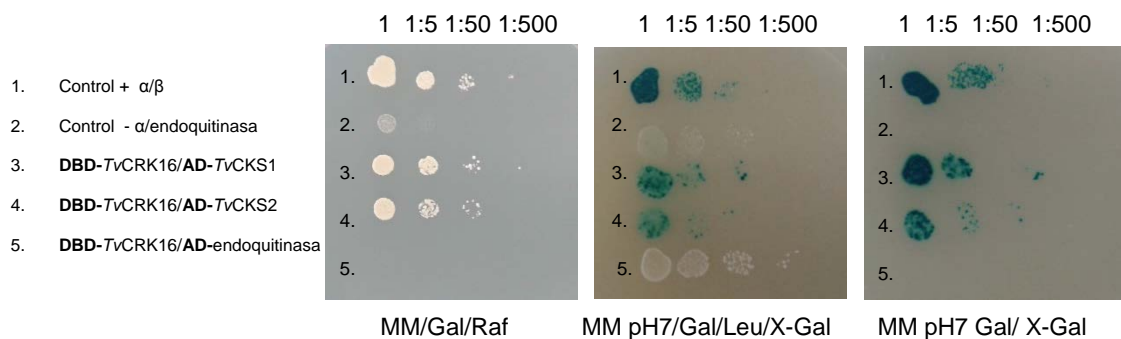
La cepa EGY48 se transformó con las construcciones plasmídicas como se describe en materiales y métodos. Se purificaron colonias y se evaluaron las interacciones por viabilidad y por coloración. Como control positivo se utilizaron las proteínas  $\alpha$  y  $\beta$ , y como control negativo las proteínas  $\alpha$  y endoquitinasa. Como

control del experimento se utilizaron las proteínas *TvCRKS* y la endoquitinasa ( $\alpha$ ,  $\beta$  y endoquitinasa son proteínas de la levadura *S. cerevisiae*).

De las ocho *TvCRKs* evaluadas *TvCRK16*, *TvCRK51* y *TvCRK96* interactúan con *TvCKS1* y *TvCKS2*. En todos los casos la interacción con *TvCKS1* es más fuerte que con *TvCKS2*; sin embargo, se necesitan ensayos cuantitativos de la actividad de betagalactosidasa para corroborarlo. *TvCRK16* y *TvCRK51* muestran mayor interacción que la observada con *TvCRK96* (ver figuras 19, 22 y 26).

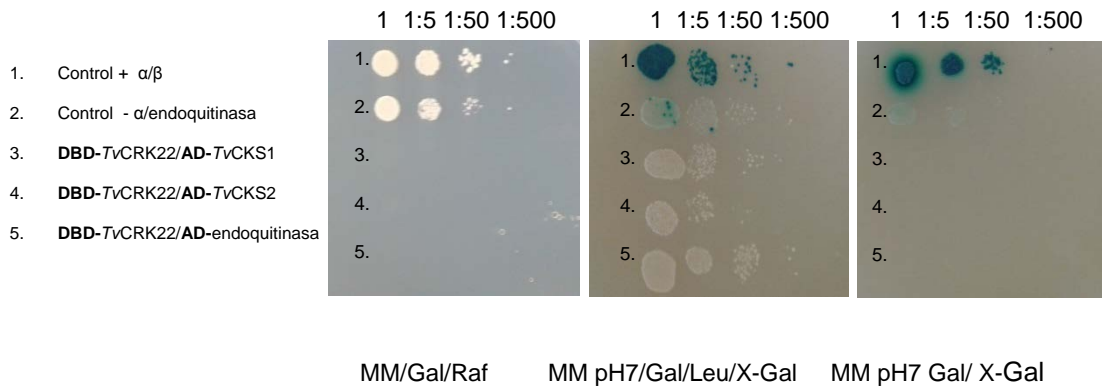
Observamos cualitativamente que la interacción de *TvCRK16* con *TvCKS1* es la más fuerte, ello pudiera significar que este complejo tiene más afinidad en la célula.

No hay interacción de *TvCKSs* con *TvCRK22*, *TvCRK40*, *TvCRK53* y *TvCRK57* (ver figuras 20, 21, 23 y 24).

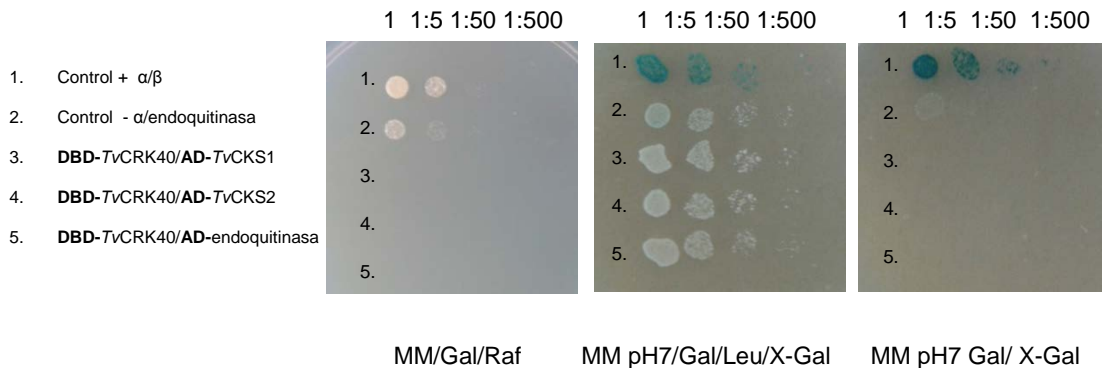


**Figura 19.- Interacción de *TvCRK16* con *TvCks1* y *TvCks2* por doble híbrido.** Diluciones seriadas de la cepa EGY48 cotransformada con *TvCRK16* fusionada al dominio de unión a DNA (DBD) y con *TvCKSs* fusionadas al dominio activador (AD) y crecida en MM/Gal/Raf para evaluar la transcripción del gen *LEU2*; en MM pH7/Gal/Leu/X-Gal para evaluar la transcripción del gen *lacZ* y el medio MM pH7 Gal/X-Gal para evaluar la transcripción de ambos reporteros.

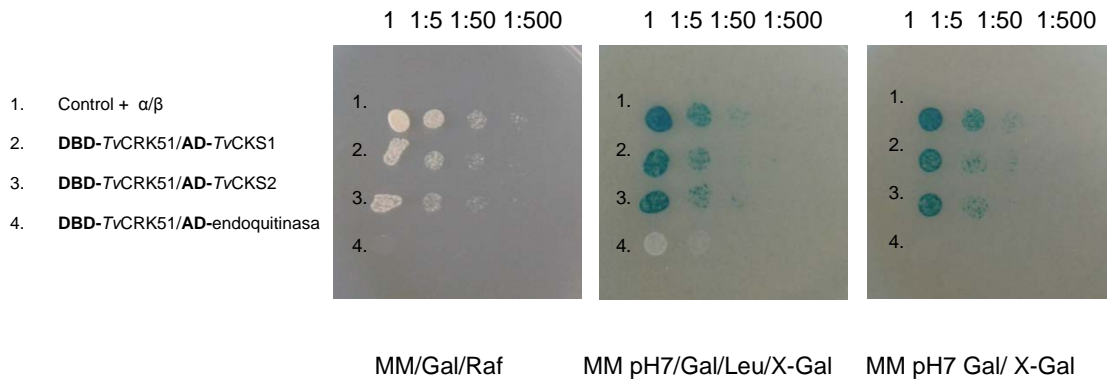




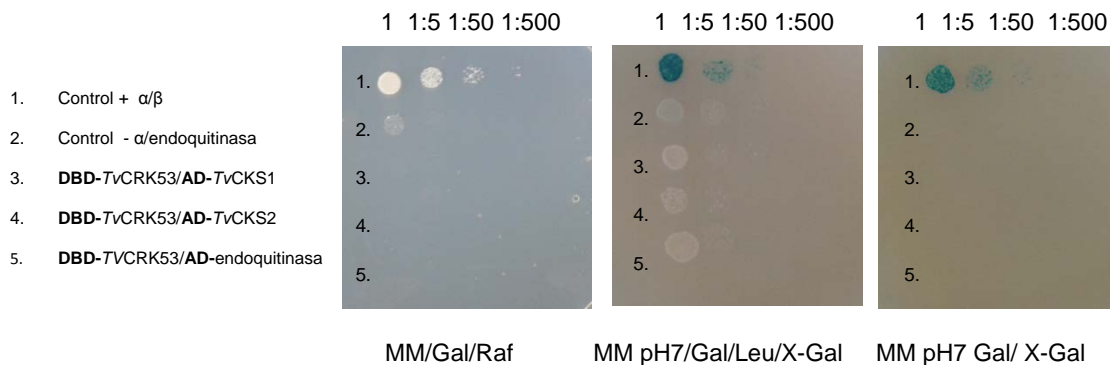
**Figura 20.- Interacción de *TvCRK22* con *TvCks1* y *TvCks2* por doble híbrido.** Diluciones seriadas de la cepa EGY48 cotransformada con *TvCRK22* fusionada al dominio de unión a DNA (DBD) y con *TvCKsS* fusionadas al dominio activador (AD) y crecida en MM/Gal/Raf para evaluar la transcripción del gen *LEU2*; en MM pH7/Gal/Leu/X-Gal para evaluar la transcripción del gen *lacZ* y el medio MM pH7 Gal/X-Gal para evaluar la transcripción de ambos reporteros.



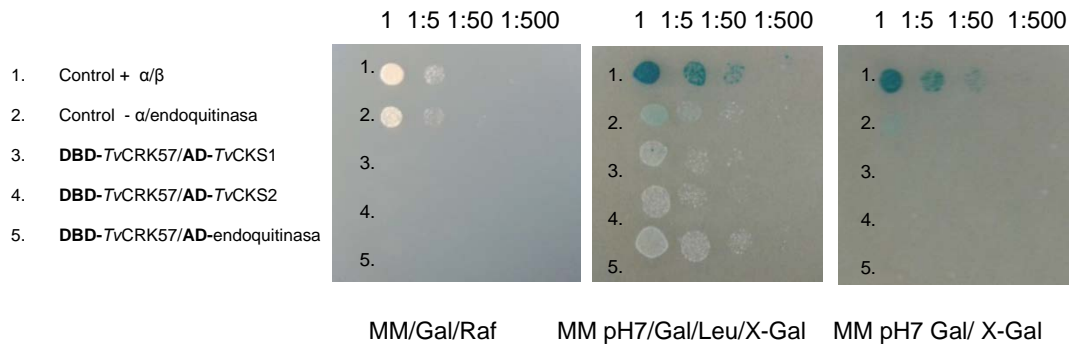
**Figura 21.- Interacción de *TvCRK40* con *TvCks1* y *TvCks2* por doble híbrido.** Diluciones seriadas de la cepa EGY48 cotransformada con *TvCRK40* fusionada al dominio de unión a DNA (DBD) y con *TvCKsS* fusionadas con el dominio activador (AD) y crecida en MM/Gal/Raf para evaluar la transcripción del gen *LEU2*; en MM pH7/Gal/Leu/X-Gal para evaluar la transcripción del gen *lacZ* y el medio MM pH7 Gal/X-Gal para evaluar la transcripción de ambos reporteros.



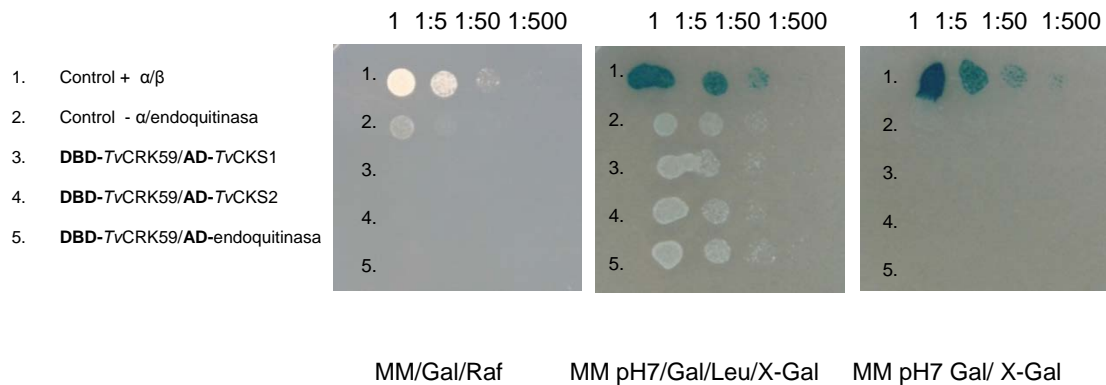
**Figura 22.- Interacción de *TvCRK51* con *TvCks1* y *TvCks2* por doble híbrido.** Diluciones seriadas de la cepa EGY48 cotransformada con *TvCRK51* fusionada al dominio de unión a DNA (DBD) y con *TvCKSs* fusionadas al dominio de activación (AD) y crecida en MM/Gal/Raf para evaluar la transcripción del gen *LEU2*; en MM pH7/Gal/Leu/X-Gal para evaluar la transcripción del gen *lacZ* y el medio MM pH7 Gal/X-Gal para evaluar la transcripción de ambos reporteros.



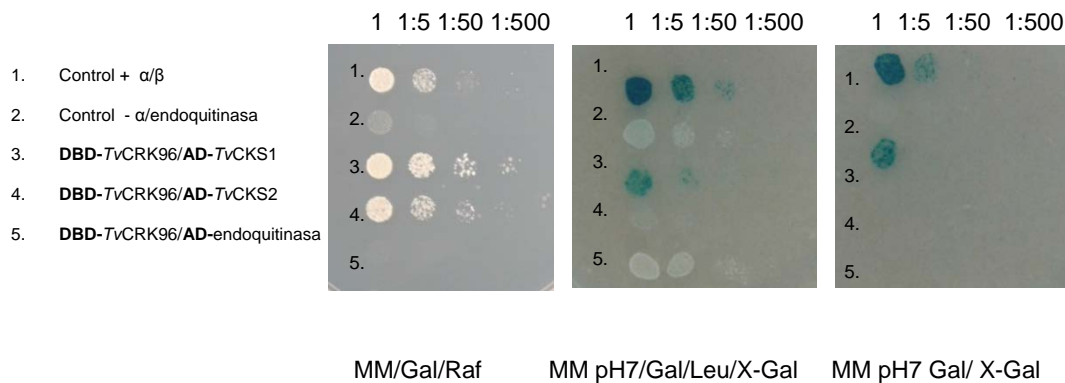
**Figura 23.- Interacción de *TvCRK53* con *TvCks1* y *TvCks2* por doble híbrido.** Diluciones seriadas de la cepa EGY48 cotransformada con *TvCRK53* fusionada al dominio de unión a DNA y con *TvCKSs* fusionadas al dominio de activación (AD) y crecida en MM/Gal/Raf para evaluar la transcripción del gen *LEU2*; en MM pH7/Gal/Leu/X-Gal para evaluar la transcripción del gen *lacZ* y el medio MM pH7 Gal/X-Gal para evaluar la transcripción de ambos reporteros.



**Figura 24.- Interacción de TvCRK57 con TvCks1 y TvCks2 por doble híbrido.** Diluciones seriadas de la cepa EGY48 cotransformada con TvCRK57 fusionada con el dominio de unión a DNA (DBD) y TvCKSs fusionadas con el dominio de activación (AD) y crecida en MM/Gal/Raf para evaluar la transcripción del gen *LEU2*; en MM pH7/Gal/Leu/X-Gal para evaluar la transcripción del gen *lacZ* y el medio MM pH7 Gal/X-Gal para evaluar la transcripción de ambos reporteros.



**Figura 25.- Interacción de TvCRK59 con TvCks1 y TvCks2 por doble híbrido.** Diluciones seriadas de la cepa EGY48 cotransformada con TvCRK59 fusionada con el dominio de unión a DNA y TvCKSs fusionadas con el dominio de activación (AD) y crecida en MM/Gal/Raf para evaluar la transcripción del gen *LEU2*; en MM pH7/Gal/Leu/X-Gal para evaluar la transcripción del gen *lacZ* y el medio MM pH7 Gal/X-Gal para evaluar la transcripción de ambos reporteros.

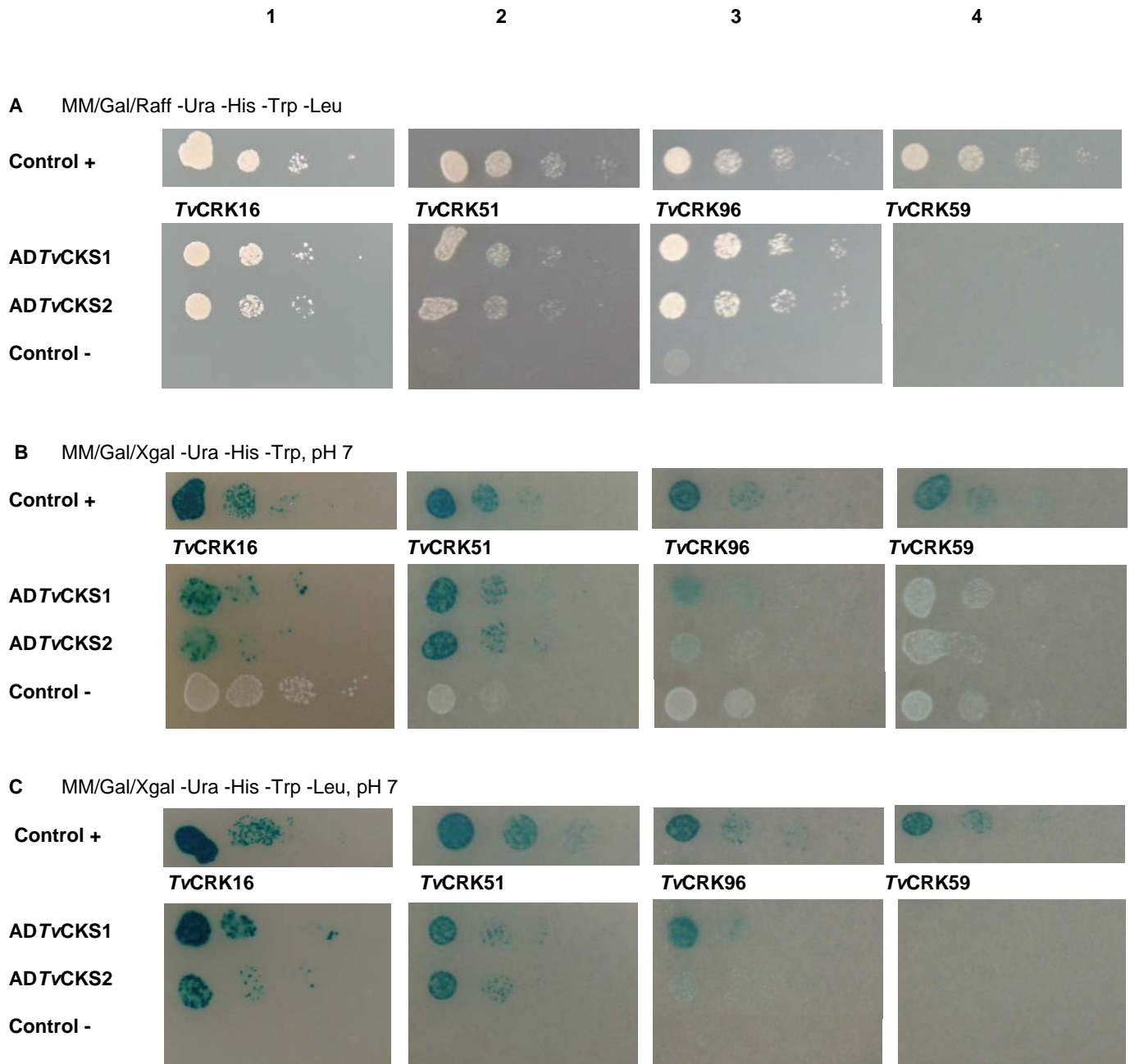


**Figura 26.- Interacción de TvCRK96 con TvCks1 y TvCks2 por doble híbrido.** Diluciones seriadas de la cepa EGY48 cotransformada con TvCRK96 fusionada al dominio de unión a DNA (DBD) y TvCKSS fusionadas al dominio de activación (AD) y crecida en MM/Gal/Raf para evaluar la transcripción del gen *LEU2*; en MM pH7/Gal/Leu/X-Gal para evaluar la transcripción del gen *lacZ* y el medio MM pH7 Gal/X-Gal para evaluar la transcripción de ambos reporteros.

La tabla 4 y la figura 27 muestran en resumen los resultados de los ensayos de doble híbrido. De las cuatro TvCRK que interaccionaron con p13suc1, sólo TvCRK59 no interaccionó con las TvCKSS, posiblemente porque en TvCRK59 los aminoácidos involucrados en su unión a CKS no están tan conservados (ver figura 28).

Interacción	p13suc1	TvCKS1	TvCKS2
<b>TvCRK 16</b>	✓	✓	✓
<b>TvCRK 22</b>	X	X	X
<b>TvCRK 40</b>	X	X	X
<b>TvCRK 51</b>	✓	✓	✓
<b>TvCRK 53</b>	X	X	X
<b>TvCRK 57</b>	X	X	X
<b>TvCRK 59</b>	✓	X	X
<b>TvCRK 96</b>	✓	✓	✓

**Tabla 4. Interacciones entre TvCRKs y TvCKSS o p13suc1.** TvCRK59 que interaccionó con p13suc1 acoplada a perlas de sefarosa, no interaccionó con ninguna TvCKS en ensayos de doble híbrido.

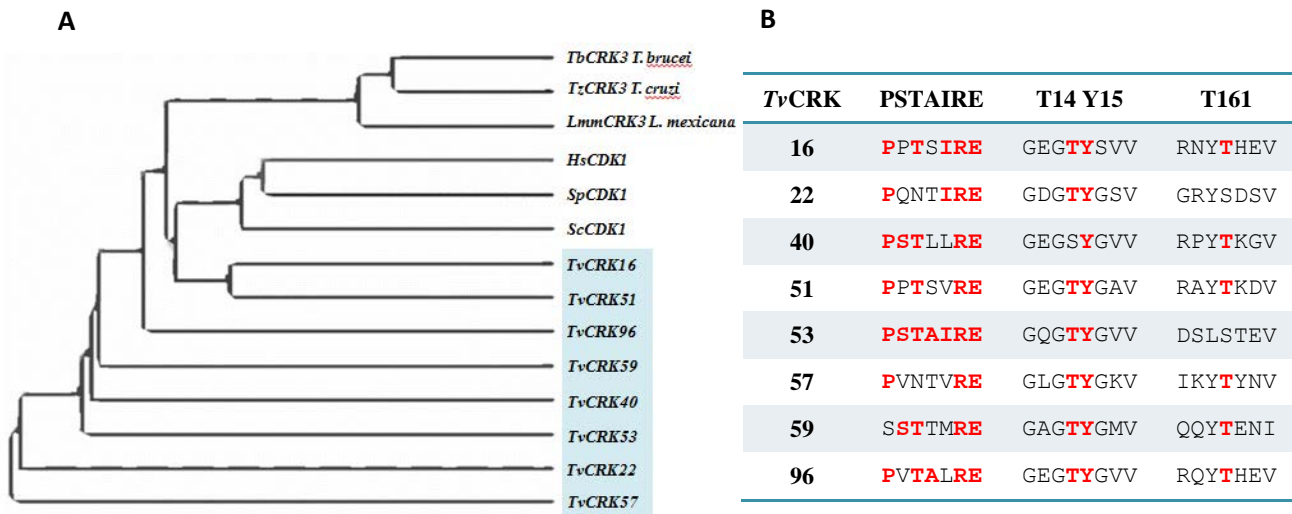


**Figura 27. Interacción entre TvCKSs y TvCRK16, 51, 96 y 59.** Diluciones seriadas de la cepa EGY48 cotransformada con TvCKSs fusionadas al dominio activador (AD) y TvCRKs fusionadas en el dominio de unión a DNA (DBD). **A, C:** La expresión de *LEU2* permite a las levaduras crecer en medio selectivo sin leucina. **B, C:** La expresión de *lacZ* permite la degradación del sustrato X-gal y las colonias de levaduras son azules. Columnas 1, 2 y 3: TvCRK16 y TvCRK51 interaccionan más fuerte con TvCKS1 y TvCKS2 que TvCRK96. Columna 4: TvCR59 no interacciona con las TvCKSs. Cualitativamente, los niveles de transcripción de *LEU2* y *lacZ* son mayores para TvCKS1 que para TvCKS2.

<b>A</b>		<i>Hs</i> CDK1	206	GDSEIDQLFRIFRAL	233	SLQDYKNTFPKWKP
		<i>Sp</i> cdc2	212	GDSEIDEIFKIFQVL	239	LLQDYKSTFPRWKR
		<i>Sc</i> Cdc28	214	GDSEIDQIFKIFRVL	241	YLPDFKPSFPQWRR
		<i>Tv</i> CRK96	206	GDSEIDQLFKIFRVF	233	RLPGYQPTFPKFPE
		<i>Tv</i> CRK16	206	GDSEIDELFSIFKIL	233	ELPSYSSTFPKFRK
		<i>Tv</i> CRK51	205	GDSEIDQLYIIFKIL	232	QFPNYSAEFPKWPK
				<---α5--->		L14
<b>B</b>		<i>Hs</i> CDK1	206	GDSEIDQLFRIFR----AL	233	SLQD---YKN-----TFPKWKP
		<i>Sp</i> cdc2	212	GDSEIDEIFKIFQ----VL	239	LLQD---YKS-----TFPRWKR
		<i>Sc</i> Cdc28	214	GDSEIDQIFKIFR----VL	241	YLPD---FKP-----SFPQWRR
		<i>Tv</i> CRK59	206	GDSILDQIHRIFS----VL	233	DVKD---ELV-----IIPTYPP
		<i>Tv</i> CRK40	205	GDGHIDQLMKIIS----IL	232	NKVK---NELGF-----EMPNVER
		<i>Tv</i> CRK53	154	DSLSTEVI TRWYRPPEILL	193	MITG---QPLFQCASNEELMEKVTVLFGSEAVERAFPEIKK
		<i>Tv</i> CRK22	217	ARENISQIHEIFK----IC	244	QYDS---NKAMLFSA-----KLPNRLK
		<i>Tv</i> CRK57	226	IGKEIDQLTAIFK----IT	253	ELDKGGLFTQ-----KIEGNLL
				<---α5--->		L14

**Figura 28. Aminoácidos de CDKs involucrados en la unión a CKSs.** Los alineamientos indican que tres *Tv*CRKs: 16, 51 y 96 tienen conservados los aminoácidos importantes para su unión a CDK, en la *Tv*CRK59 esos aminoácidos no son tan conservados. **A)** *Tv*CRKs que interactúan con *Tv*CKSs. **B)** *Tv*CRKs que no interactúan con *Tv*CKSs. En verde los aminoácidos que permiten la formación del complejo CDK-CKS. *Hs.* *Homo sapiens*, *Sp.* *Schizosaccharomyces pombe*. *Sc.* *Saccharomyces cerevisiae*, *Tv*CRK. CRK de *Trichomonas vaginalis*. Este análisis fue realizado por el M. C. Erick Amador Gaytán.

Las tres *Tv*CRKs que interactúan con las dos CKS de *T. vaginalis* tienen gran similitud a Cdc2, a Cdc28 y a algunas CRK esenciales de protozoarios parásitos. Estas *Tv*CRKs además presentan en el sitio esperado los aminoácidos para la fosforilación inhibitoria (Thr-14 y Tyr-15) y para la activadora (Thr-161) y el dominio PSTAIRE, sin embargo presenta algunos cambios con respecto al canónico (ver figura 29).



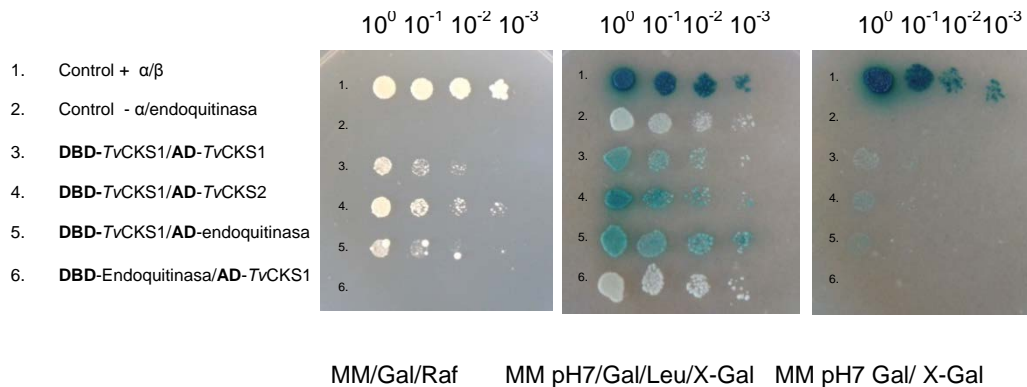
**Figura 29. Esquema de similitud y aminoácidos importantes en las TvCRKs.** A) Las TvCRKs tienen similitud con CRKs esenciales. Las TvCRK16, 51 y 96 se encuentran más relacionadas a las cinasas esenciales de otros organismos. Tb. *Trypanosoma brucei*, Tz. *Trypanosoma cruzi*, Lmm. *Leishmania mexicana*, Hs. *Homo sapiens*, Sp. *Schizosaccharomyces pombe*. Sc. *Saccharomyces cerevisiae*, TvCRK. CRK de *Trichomonas vaginalis*. B) Las ocho TvCRKs estudiadas en el lab conservan algunos aminoácidos que son importantes para su actividad. Análisis realizado por el M. en C. Erick Amador Gaytán.

### 6.6 La fusión de TvCKS1 y TvCKS2 a un dominio de unión a DNA es capaz de activar la transcripción de dos genes reporteros de un sistema de doble híbrido.

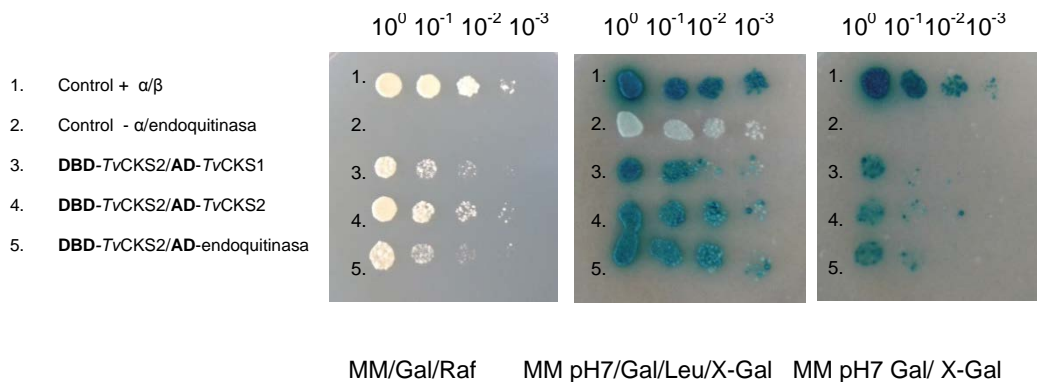
Inicialmente se planteó la posibilidad de que las dos CKS de *T. vaginalis* pudieran interactuar entre ellas y formar heterodímeros; se diseñaron experimentos de doble híbrido que nos permitieran evaluar esas interacciones. Ambas proteínas se subclonaron en el vector pEG202 para realizar las fusiones con el dominio de unión a DNA y se utilizaron las clonas anteriormente obtenidas en pJG4-5 que tienen la fusiones con el dominio activador. Los ensayos se realizaron siguiendo la misma estrategia que para las interacciones con TvCRKS.

Las combinaciones DBD-TvCKS1/AD-TvCKS1, DBD-TvCKS2/AD-TvCKS2, DBD-TvCKS1/AD-TvCKS2, y los controles negativos: DBD-TvCKS1/AD-endoquitinasa y DBD-TvCKS2/AD-endoquitinasa activaron la transcripción de los reporteros (ver figuras 30 y 31); sin embargo las combinaciones DBD-endoquitinasa/AD-TvCKS1 y

DBD-endoquitinasa/AD-*TvCKs2* no activan la transcripción, lo que sugería que las *TvCKs* fusionadas al dominio de unión a DNA podrían activar la transcripción, ya sea por interacción directa con el dominio activador, o porque fuesen capaces de reclutar la maquinaria transcripcional, a través de su unión con otras proteínas.



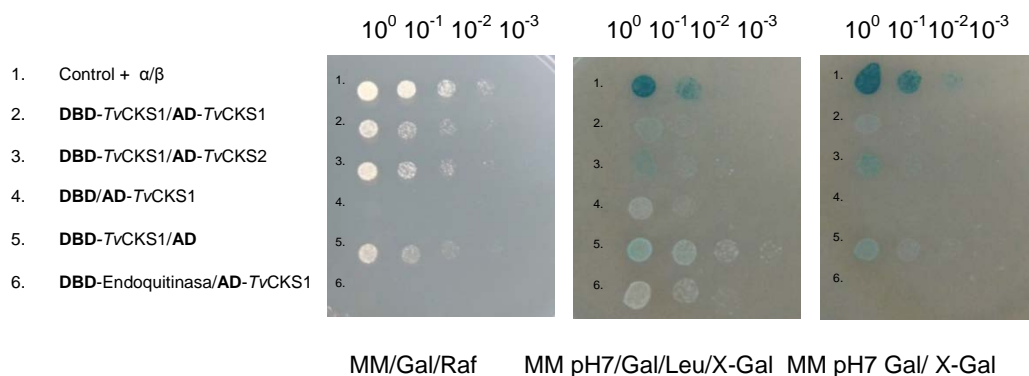
**Figura 30.- Interacción de *TvCKs1* con *TvCKs1* y *TvCKs2* por doble híbrido.** Diluciones seriadas de la cepa EGY48 cotransformada con *TvCKs1* fusionada al dominio de unión a DNA (DBD) y *TvCKs*s fusionadas al dominio de activación (AD) y crecida en MM/Gal/Raf para evaluar la transcripción del gen *LEU2*; en MM pH7/Gal/Leu/X-Gal para evaluar la transcripción del gen *lacZ* y el medio MM pH7 Gal/X-Gal para evaluar la transcripción de ambos reporteros.



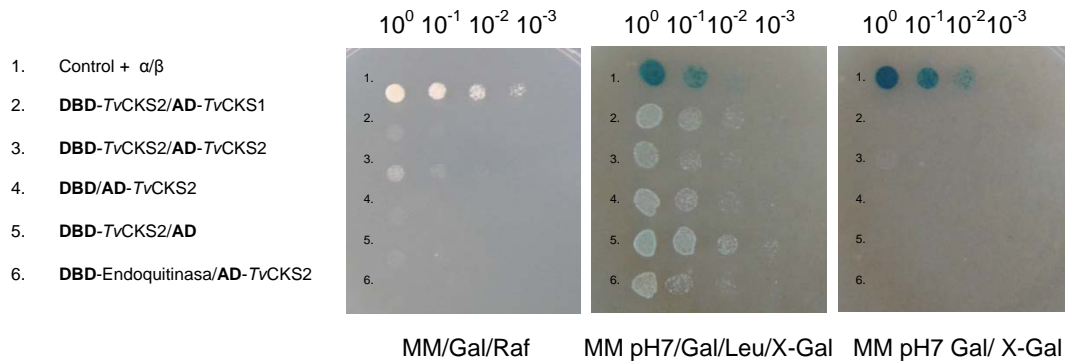
**Figura 31.- Interacción de *TvCKs2* con *TvCKs1* y *TvCKs2* por doble híbrido.** Diluciones seriadas de la cepa EGY48 cotransformada con *TvCKs2* fusionada al dominio de unión a DNA (DBD) y *TvCKs*s fusionadas al dominio de activación (AD) y crecida en MM/Gal/Raf para evaluar la transcripción del gen *LEU2*; en MM pH7/Gal/Leu/X-Gal para evaluar la transcripción del gen *lacZ* y el medio MM pH7 Gal/X-Gal para evaluar la transcripción de ambos reporteros.



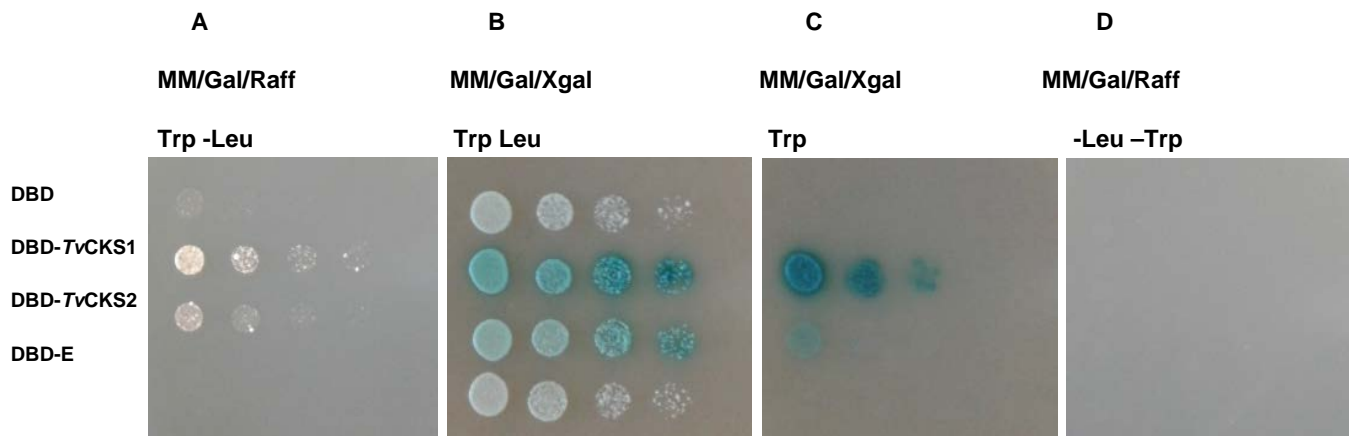
Para comprobar lo anterior se repitieron los ensayos utilizando como controles combinaciones de las *TvCKS* con los vectores pEG202 y JG4-5 vacíos; las levaduras con DBD-*TvCKS1* ó 2/ pJG4-5, crecen y muestran coloración azul (ver figuras 32 y 33). Por otra parte, se transformaron las levaduras únicamente con las fusiones DBD-*TvCKS* y se demostró que las *TvCKS* pueden por sí solas activar la transcripción de los genes *LEU2* y *LACZ*, siempre y cuando estén fusionadas al dominio de unión a DNA LexA. En la caja que no tiene triptófano, no se observa crecimiento pues las levaduras necesitan Triptófano ya que no fueron transformadas con el vector pJG4-5 que lleva la auxotrofia para ese aminoácido (ver figura 34).



**Figura 32.- Interacción de *TvCKS1* con el dominio de unión a DNA y con el dominio activador del sistema de doble híbrido.** Diluciones seriadas de la cepa EGY48 cotransformada con *TvCKS1* fusionada al dominio de unión a DNA (DBD) y al dominio de activación (AD) y crecida en MM/Gal/Raf para evaluar la transcripción del gen *LEU2*; en MM pH7/Gal/Leu/X-Gal para evaluar la transcripción del gen *lacZ* y el medio MM pH7 Gal/X-Gal para evaluar la transcripción de ambos reporteros. El DBD se encuentra en el vector pEG202 y el AD se encuentra en el vector pJG4-5.



**Figura 33.- Interacción de TvCKS2 con el dominio de unión a DNA y el dominio de activación del sistema de doble híbrido.** Diluciones seriadas de la cepa EGY48 cotransformada con TvCKS2 fusionada al dominio de unión a DNA (DBD) y al dominio de activación (AD) y crecida en MM/Gal/Raf para evaluar la transcripción del gen *LEU2*; en MM pH7/Gal/Leu/X-Gal para evaluar la transcripción del gen *lacZ* y el medio MM pH7 Gal/X-Gal para evaluar la transcripción de ambos reporteros. El DBD se encuentra en el vector pEG202 y el AD se encuentra en el vector pJG4-5.



**Figura 34. Proteínas TvCKS activan la transcripción por unirse a operadores *lexA*, a través de un dominio de unión a DNA (DBD).** A, C: Las fusiones DBD-TvCKS1 y DBD-TvCKS2 son suficientes para activar la transcripción de *LEU2*. B, C: DBD-TvCKS1 y DBD-TvCKS2 activan la transcripción de *lacZ*. Las levaduras no expresan TRP por lo tanto no crecen si su medio no contiene triptófano. Cualitativamente se observó mayor transcripción con TvCKS1 que con TvCKS2. E, proteína endoquitinasa.

## 7. DISCUSIÓN

*T. vaginalis* es un protozoo parásito de divergencia evolutiva temprana, que se transmite sexualmente e infecta el tracto urogenital de millones de individuos en el mundo ocasionando Trichomonosis. Se desconocen las proteínas encargadas de regular el ciclo celular de este organismo. Sólo se describió una CRK con similitud a Cdc28 en este parásito (Riley et al., 1993); no obstante, se identificaron en su genoma, genes que codifican para CRKs de mayor similitud, además de ciclinas.

Las CKSs se encargan de regular la actividad de CDKs de ciclo celular y regulan principalmente la transición G2/M. Las levaduras tienen una CKS mientras que los metazoarios tienen dos. La CKS de *Leishmania mexicana*, la de *Trypanosoma cruzi* y las de *H. sapiens* son pequeñas y son capaces de complementar la función de p13suc1 de *S. pombe* y CKS1 de *S. cerevisiae*, que son las proteínas más grandes del grupo, lo que demuestra la función conservada de estas proteínas en organismos filogenéticamente distantes (Pines, 1996, Mottram y Grant, 1996 y Muñoz et al., 2006).

Las CKSs de humano son las más estudiadas y tienen similitudes y diferencias funcionales. La HsCKS1 forma predominantemente monómeros, se une a SKP2 (una proteína que forma parte de un complejo ubiquitinador, SFC). Su mRNA se incrementa mucho más en la transición G2 a M y su expresión se altera por acción de p53; mientras que HsCKS2 forma además de monómeros, dímeros y hexámeros, no interacciona con SKP2, se incrementa menos que la HsCKS1 en G2 a M y no se afecta por la expresión de p53 (Krishnan et al., 2010). La relación entre CKS1 y SKP2 en el humano es muy importante ya que la desregulación de la expresión de estas proteínas permite el desarrollo de diversos tipos de cáncer (Khattar y Thottassery, 2013).

En *D. melanogaster* la presencia de la Cks85A (CKS1) no compensa las funciones de Cks30A (CKS2) y las funciones de ambas proteínas no se sobrelapan. La CKS1 mantiene la viabilidad celular y la ploidía de las células mitóticas, su comportamiento es similar al de la HsCKS1 de Humano, pues ambas

interaccionan con SKP2 que forma parte del complejo SCF utilizado para ubiquitinar proteínas que deben ser degradadas (Ghorbani et al., 2011). La CKS2 está implicada en el correcto ensamblaje del huso en la meiosis de embriones hembra, igual que la CKS1 de *C. elegans* que también afecta la meiosis, además de propiciar la correcta degradación de la ciclina B. La CKS2 de *D. melanogaster* también regula los niveles de CycA a través de un adaptador específico de la línea germinal de las hembras, CDC20-cortex, para el complejo promotor de la anafase, APC (Pearson et al., 2005 y Swan et al., 2005).

En *T. vaginalis* se encontraron dos proteínas CKSs como en los metazoarios, hasta el momento no se reporta otro protozoario con dos CKSs. TvCKS1 y TvCKS2 tienen mayor identidad (>50%) y similitud (>70%) con la HsCKS2. En este trabajo se identificaron los genes que codifican para TvCKSs y se clonaron los ORF para caracterizar las proteínas *in vitro*.

Se demostró que los genes *tvcks* se transcriben a mRNA y su extremo 3'UTR es más grande en comparación con el promedio descrito para los mRNAs de *T. vaginalis*. El gen *tvcks1* se poliadenila en distintos sitios, originando una variación en el tamaño del extremo 3', mientras que el gen *tvcks2* se poliadenila en un sitio particular y su extremo 3' tiene menos nucleótidos que el del gen *tvcks1*. Las secuencias de los extremos 5' y 3'UTR de los mRNA eucariontes son importantes para iniciar su traducción (Lodish et al., 2000). La cola de adeninas participa en mecanismos reguladores tales como: estabilidad del mRNA, exporte del mRNA del núcleo al citoplasma e inicio de la traducción (Fuentes et al., 2012). La expresión periódica de proteínas es una característica esencial del ciclo celular eucarionte y puede ser controlada en distintos niveles: transcripción, estabilidad del mRNA, traducción y estabilidad de la proteína (Doerig et al., 2000). Es posible entonces que la diferencia en el procesamiento de los transcritos de *tvcks* esté involucrada en el control de su expresión a nivel proteico y que a su vez pudiese regular el ciclo celular del protozoario.

Una de las características de las proteínas CKS es la formación de dímeros, las CKSs se unen a las CDKs sólo en forma de monómero, por lo que varios autores

consideran que el equilibrio entre monómeros y dímeros de estas proteínas podría afectar la regulación del ciclo celular *in vivo* (Morris et al., 1998, Bourne et al., 2000, Balog et al., 2011, Parge et al., 1993 y Bader et al., 2006). Los dímeros de las CKSs de *S. pombe*, *L. mexicana* y *T. cruzi* soportan las condiciones desnaturalizantes de un SDS-PAGE, ello puede deberse a interacciones hidrofóbicas fuertes. En los Western blot que detectan la CKS de *L. mexicana* y la de *T. cruzi*, se observa una proporción de monómero similar a la proporción de dímero (Ducommun et al., 1991, Mottram y Grant et al., 2006, Muñoz et al., 2006, Natarajan et al., 1999).

En un Western blot observamos el monómero y el posible dímero de TvCKS1, para TvCKS2 sólo se detectó el monómero. Se necesitan más experimentos para comprobar la capacidad de dimerización de la TvCKS1, y para determinar si TvCKS2 puede o no formar dímeros.

No se observó la misma proporción de monómero que del posible dímero de TvCKS1 en el Western blot y creemos que se debe a que las estructuras teóricas de las TvCKSs son similares a las de las proteínas humanas y se reporta que las CKSs humanas dimerizan débilmente en comparación con las CKSs de levaduras (Seeliger et al., 2002, Seeliger et al., 2005).

Se sabe que el plegamiento del motivo de dimerización HXPEPH de las CKSs (también llamada región bisagra) (Bourne et al., 1995) da como resultado conformaciones dramáticamente diferentes de la hoja  $\beta_4$ , lo que ocasiona la formación de monómeros o dímeros (Arvai et al., 1995). Aun cuando ambas HsCKS1 y HsCKS2 tienen el motivo HXPEPH y son 81% idénticas, la región bisagra de HsCKS1 está en una conformación cerrada lo que no permite un intercambio de la bisagra  $\beta$  entre monómeros y dificulta la formación del dímero, por lo tanto esta proteína se presenta principalmente en forma de monómero, en cambio en la HsCKS2 la conformación de la bisagra está extendida y favorece el dímero intercambiado (Arvai et al., 1995, Bourne et al., 1996). Esto podría suceder con las TvCKSs de *T. vaginalis*, las dos proteínas tienen el motivo de dimerización HXPEPN en lugar de HXPEPH y el cambio de la última histidina por asparagina es

un cambio conservado que muy posiblemente no afecta la dimerización. Si comprobáramos que *TvCKS1* principalmente forma dímeros y *TvCKS2* monómeros, sería posible que existiera algún cambio estructural que fuera la causa de las diferencias que observamos en el Western Blot. *TvCKS1* es la que tiene mayor similitud a *HsCKS2* y es posible que por ello se detectara el dímero, mientras que *TvCKS2* podría tener un comportamiento análogo a *HsCKS1* que se encuentra principalmente en conformación monomérica.

Además del posible dímero de 24 kDa, en los ensayos de Western blot de las muestras de *TvCKS1* se detectó una tercera banda con un peso menor a 40 kDa, pudiera ser que *TvCKS1* tenga otras conformaciones como la *HsCKS2*, la cual puede formar hexámeros y dentro de éstos se han visto interaccionar tres subunidades de CKS (Arvai et al., 1995).

Los monómeros de CKSs interaccionan con el extremo carboxilo de CDKs en una relación 1:1 (Ducommun et al., 1991 y Bourne et al., 1996) y regulan su actividad pos-traduccionalmente (Pines, 1996, Krishnan et al., 2010 y Khattar y Thottassery, 2013). Aminoácidos en los extremos amino y carboxilo de la CDK son importantes para la unión con CKSs. En la CKS los aminoácidos involucrados en la formación del complejo forman parte del cluster hidrofóbico (Ducommun et al., 1991 y Morris et al., 1998), algunos interaccionan directamente con las CDKs y otros ayudan a establecer una conformación adecuada que permite la formación del complejo. El análisis *in silico* de las *TvCKSs* indica que los aminoácidos involucrados en la interacción con CDKs están conservados.

Mediante ensayos de doble híbrido se pudo comprobar que las *TvCKS* son capaces de interaccionar con tres CRKs de *T. vaginalis*: *TvCRK16*, *TvCRK51* y *TvCRK96*, pero no sabemos si regulan su actividad de cinasa. Las CKSs tienen cierta especificidad de unión por CDKs esenciales, pero también llegan a interaccionar con CDKs involucradas en la transición G1/S (Krishnan et al., 2010 y Khattar y Thottassery, 2013). La CKS de *T. cruzi* interacciona con CRK1 y CRK3 y la CKS de *L. mexicana* con CRK1 y SBCRK (Mottram y Grant, 1996 y Muñoz et al., 2006). Las *TvCRKs* que interaccionan con *TvCKSs* tienen gran similitud a

Cdc2, Cdc28 (en levaduras) y a CDKs esenciales de protozoarios parásitos, a pesar de ello no son capaces de complementar una mutante de Cdc28 de *S. cerevisiae*, pero si tienen actividad de cinasa; la fase del ciclo en la que actúan está por caracterizarse (datos de nuestro laboratorio).

Cualitativamente se observó que la interacción de TvCKS1 con tres de las ocho CRKs de *T. vaginalis* que fueron analizadas es más fuerte comparada con TvCKS2, sin embargo, ensayos de la actividad de beta galactosidasa indican que sólo hay una diferencia considerable entre las TvCKSs cuando interaccionan con la TvCRK16, ello podría deberse a los dos cambios en los aminoácidos de unión a cinasas que tiene la TvCKS2 (Ile-7 y Thr-23) y/o a las características de la TvCRK16 (López K. y Amador E.).

La interacción más fuerte se observa entre TvCRK16 y TvCKS1, estrictamente las diferencias en afinidad con las otras TvCRKs pueden ocurrir de forma diferente durante el ciclo celular de *T. vaginalis*, sin embargo, *in vitro* la especificidad de unión entre CDK y CKS es alta. Las proteínas p13suc1 y HsCKS1 se unen a Cdc2 y CDK2 fuertemente y a CDK3 débilmente (Dunphy et al., 1988, Meyerson et al., 1992 y Hannon et al., 1993). La CKS1 de *D. melanogaster* interacciona fuertemente con CDK1 y CDK2, mientras que la CKS2 interacciona menos con CDK1 y débilmente con CDK2, además en las co-inmunoprecipitaciones se detectan las ciclinas A, B y B3 con CKS1 y bajos niveles de CycB y CycB3 con CKS2 (Swan et al., 2005). Dado que TvCKR16 no complementa mutantes de levadura nos hace falta información para saber si esta CRK es de tipo CDK1 (mitótica) o de tipo CDK2 (de fase S).

Gracias a que las CKSs tienen gran afinidad *in vitro* por sus contrapartes CDKs (Dunphy et al., 1988), han funcionado como carnadas para purificar y caracterizar complejos CDK/CYC. La proteína recombinante p13suc1 ha sido explotada ampliamente y ha permitido la identificación de esos complejos en distintas especies (Brizuela et al., 1987, Dunphy et al., 1988, Labbé et al., 1989, Pondaven et al., 1990 y Hershko, 2005). CKS1At permitió la identificación de dos CDK de *A. thaliana* mediante ensayos de doble híbrido (Boudolf et al., 2001).

De las ocho *TvCRKs* utilizadas en el ensayo de doble híbrido, cuatro (*TvCRK16*, *TvCRK51*, *TvCRK57*, *TvCRK59* y *TvCRK96*) interaccionan con p13suc1 acoplada a perlas de sefarosa (Amador E.), de estas, sólo *TvCRK59* no interaccionó con *TvCKS1* y *TvCKS2*. Tanto p13suc1 como *HsCKS1* interaccionan con Cdc2, CDK2 y CDK3 (Meyerson et al., 1992 y Hannon et al., 1993), sin embargo, en *T. brucei* se detectaron a las CRK1, CRK2 y CRK3 utilizando resina acoplada a CKS1 de *L. mexicana* y sólo la CRK3 también fue detectada con resina acoplada a p13suc1 de *S. pombe* (Van Hellemond et al., 2000). Lo anterior demuestra que puede existir cierta especificidad entre las proteínas de especies relacionadas. Además el análisis de los aminoácidos de las *TvCRKs* necesarios para su unión a CKS indica que *TvCRK59* presenta algunas diferencias.

Los inhibidores del microtúbulo: colchicina y nocodazol afectan las fases G2 y M de *T. vaginalis*, mientras que los inhibidores de G1/S hidroxiaurea, afidicolina y timidina no tienen efecto en este protozoario, además de que este parásito tiene una fase G2 dominante como *S. pombe*. Se sugiere entonces que las fases G2 y M son iguales a las de levaduras (*S. pombe*) y vertebrados (Riley, 1994). En levaduras y vertebrados como *X. laevis* la CKS tiene un papel crucial en la transición G2/M, en el transcurso de la fase M y en la salida de M, mientras que en vertebrados mamíferos su función principal es para que la transición G1/S se lleve a cabo adecuadamente. En *S. cerevisiae* la CKS también interacciona con complejos CDK/CYC de la transición G1/S (Hayles et al., 1986b, Hadwiger et al., 1989, Tang y Reed, 1993, Reynard et al., 2000, Patra y Dunphy, 1996 y Krishnan et al., 2010). Por lo tanto no podemos descartar la posibilidad de que las *TvCKSs* actúen de distintas maneras en varias fases del ciclo celular.

La correcta progresión del ciclo celular requiere la proteólisis de ciclinas e inhibidores de CDKs, estas proteínas deben ser ubiquitinadas para ser reconocidas por el proteosoma, que es la maquinaria encargada de degradarlas. En *S. cerevisiae* el final de la mitosis se caracteriza por la degradación del inhibidor Pds1 y de la ciclina Clb2, en *X. laevis* se degrada la ciclina B y estas proteínas se ubiquitan por el complejo APC (Muñoz, 2006, Patra y Dunphy,



1996, Glotzer et al., 1991 y Kaiser et al., 1999). La CKS1 de *S. cerevisiae* disocia a Cdc28 de la región promotora de *CDC20* (activador del complejo APC), a su vez Cdc28 interacciona con las subunidades Rpt1 y Pre1 del proteosoma y recluta a este a la región promotora de *CDC20*, lo cual facilita el remodelamiento de complejos transcripcionales acoplados al promotor; este evento es crucial para que el APC se active y ubiquitine a los componentes que deben ser eliminados (Morris et al., 2013). Una proteína con acción parecida a Cdc20 fue identificada en *D. melanogaster* (Swan et al., 2005). En el genoma de *T. vaginalis* se encontraron proteínas putativas del proteosoma 26S y aparecen proteínas con poca similitud a los componentes del complejo APC.

En *H. sapiens* la HsCKS1 regula la degradación proteosomal del inhibidor de CDK2/CYCE,A; p27, el cual debe ser eliminado para la correcta transición G1/S. HsCKS1 facilita la interacción de p27 con SKP2, proteína que forma parte del complejo SFC, el cual es el encargado de ubiquitinar al inhibidor para degradarlo a través del proteosoma. Se han identificado los aminoácidos de HsCKS1 involucrados en la unión a SKP2: Ala-29, Leu-31, Ser-41 y Asn-45; la HsCKS2 no es capaz de realizar esta función y tiene otros aminoácidos en esas posiciones (Khattar y Thottassery, 2013). La proteína SKP2 de levaduras no interacciona con CKS1, sin embargo, tienen un inhibidor con homología a p27; Sic1, el cual tiene un sitio de múltiple fosforilación dependiente de CKS1 (Kõivomägi et al., 2013). Las proteínas de *T. vaginalis* tampoco conservan los aminoácidos que interaccionan con SKP2, lo que concuerda con la gran similitud que tienen éstas proteínas con la HsCKS2 de humano (tabla 3 y figura 9).

Recientemente la CKS1 de *S. cerevisiae* ha sido implicada en regulación transcripcional, además de su relación con el control del ciclo celular (por ejemplo, la activación transcripcional de *CDC20* descrita arriba). Los complejos CDK/CYC también han sido involucrados en diversos procesos celulares además del control del ciclo celular, tales como: regulación de transcripción, traducción y procesamiento de mRNA (Revisado en Kitsios y Doonan, 2011). *S. cerevisiae* tiene complejos CDK/CYC que actúan a nivel de transcripción (Malumbres, 2011).

El proteosoma 26S se compone de dos subunidades: la subunidad reguladora 19S y la subunidad proteolítica 20S, la primera está involucrada en transcripción. Paf1 (factor I asociado a la polimerasa II) es un complejo que se compone de varias proteínas, entre ellas Rtf1, y sirve de plataforma para el ensamblaje de diversos factores que facilitan el movimiento de la RNA polimerasa II a lo largo de la cromatina durante la elongación transcripcional. CKS1 interacciona directamente con Rtf1 y la recluta al gen *GAL1*, por otro lado la CKS1 interacciona con el proteosoma 19S y también lo recluta a las regiones codificantes de *GAL1*, activando su eficiente transcripción (Pan et al., 2013). Los mecanismos exactos por los cuales se da esa activación se desconocen pero se cree que están relacionados con una reducción de la densidad de los nucleosomas sobre la cromatina, acción que se ejerce gracias a la unión de CDK1, de CKS1 y del proteosoma 19S con el amino terminal de la histona H4 (Chaves et al., 2010). Se reporta que un 25% del genoma de *S. cerevisiae* se transcribe gracias a la participación de Cdc28, CKS1 y la subunidad 19S del proteosoma (Yu et al, 2005).

Quisimos evaluar la formación de heterodímeros TvCKS1/TvCKS2 de *T. vaginalis*, sin embargo, esto no fue posible dado que la clonación de las proteínas en el vector con dominio de unión a DNA es suficiente para la activación transcripcional de los genes reporteros *LEU2* y *LacZ*. Se comprobó que las proteínas TvCKSs son las responsables de esa activación y no una interacción directa de éstas con el dominio activador incluido en el vector pJG4-5. No sabemos de qué manera las TvCKSs reclutan y/o interaccionan con la maquinaria transcripcional de la cepa EGY48 de *S. cerevisiae* o si existen otras proteínas involucradas que permitan que los genes reporteros se transcriban.

Con TvCKS1 hubo una activación transcripcional mayor que con TvCKS2. Se ha fusionado la CKS1 de *S. cerevisiae* al dominio de unión a DNA Gal4DBD, el cual reconoce la secuencia GAL1UAS y activa el promotor del gen GAL1UAS-*HIS3*, tras ello, el dominio de unión a ubiquitina de CKS1 permite el reconocimiento de subunidades del proteosoma ubiquitinadas (Holic et al., 2010). Ese reporte no da evidencias de cuál es la participación del proteosoma. El dominio de unión a

ubiquitina de CKS1 está compuesto de la Ser-56 a la Val-63, y cae dentro de la inserción de 9 aminoácidos que no está presente en otros organismos como *T. vaginalis*.

Es posible que las *TvCKSs* puedan interaccionar con la cinasa Cdc28 de *S. cerevisiae* y/o con el proteosoma para desencadenar mecanismos activadores de la transcripción de los genes reporteros de la cepa EGY48. No sabemos si esa función sea utilizada también por *T. vaginalis*, pues los protozoarios parásitos son distantes filogenéticamente de las levaduras, pero sería interesante explorar esa posibilidad (Sogin, 1991, Embley y Hirt, 1998 y Doerig et al., 2000).

## 8. CONCLUSIONES

- Se identificaron dos genes que codifican para dos proteínas CKS en *T. vaginalis*, ambos se transcriben a mRNA y los 3'UTR de estos tienen un tamaño mayor en comparación con la mayoría de mRNAs de *T. vaginalis*. El extremo 3'UTR del gen *tvcks1* tiene un patrón de poliadenilación heterogéneo en comparación con el del gen *tvcks2*.
- Se detectó un posible dímero de la proteína recombinante TvCKS1 mediante una electroforesis con menor concentración de SDS y western blot con HisProbe-HRP.
- Ambas TvCKSs interactúan con tres TvCRKs putativas, TvCKS1 tiene mayor interacción con TvCRK16.
- Se observó *in vitro* que se activó la transcripción de los genes reporteros *LACZ* y *LEU2* cuando se fusionó a las TvCKSs a un dominio de unión a DNA de un sistema de doble híbrido.
- La evidencia presentada en este proyecto demuestra que las proteínas codificadas por los genes *tvcks* se comportan de manera diferente, tanto en su posible dimerización, como en su interacción con TvCRKs, por lo que podrían llevar a cabo funciones disímiles en la regulación de la actividad de las CRKs del ciclo celular de *T. vaginalis* e incluso podrían estar involucradas en mecanismos de regulación de la activación transcripcional.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Álvarez-Arce EA. 2012.** Clonación del factor de corte y poliadenilación CPSF-160 de *Trichomonas vaginalis*.
2. **Andrews B, Measday V. 1998.** The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea.
3. **Arnaud L, Pines J, Nigg EA. 1998.** GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes. *Chromosoma*. Dec; 107(6-7):424-9.
4. **Arroyo R, González-Robles A, Martínez-Palomo A, Alderete JF. 1993.** Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Mol Microbiol*. Jan; 7(2):299-309.
5. **Arvai AS, Bourne Y, Hickey MJ, Tainer JA. 1995.** Crystal structure of the human cell cycle protein CksHs1: single domain fold with similarity to kinase N-lobe domain. *J Mol Biol*. Jun 23; 249(5):835-42.
6. **Bachmann LH, Hobbs MM, Seña AC, Sobel JD, Schwebke JR, Krieger JN, McClelland RS, Workowski KA. 2011.** *Trichomonas vaginalis* genital infections: progress and challenges. *Clin Infect Dis*. Dec; 53 Suppl 3:S160-72.
7. **Bader R, Seeliger MA, Kelly SE, Ilag LL, Meersman F, Limones A, Luisi BF, Dobson CM, Itzhaki LS. 2006.** Folding and fibril formation of the cell cycle protein Cks1. *J Biol Chem*. Jul 7; 281(27):18816-24.
8. **Balog ER, Saetern OC, Finch W, Hoeft CO, Thai V, Harvey SL, Kellogg DR, Rubin SM. 2011.** The structure of a monomeric mutant Cks protein reveals multiple functions for a conserved hinge-region proline. *J Mol Biol*. Aug 19; 411(3):520-8.
9. **Benchimol M, Monteiro S, Chang TH, Alderete JF. 2002.** Virus in *Trichomonas*--an ultrastructural study. *Parasitol Int*. Sep; 51(3):293-8.
10. **Boudolf V, Rombauts S, Naudts M, Inzé D, De Veylder L. 2001.** Identification of novel cyclin-dependent kinases interacting with the CKS1 protein of *Arabidopsis*. *J Exp Bot*. 2001 Jun; 52(359):1381-2.
11. **Bourne Y, Watson MH, Hickey MJ, Holmes W, Rocque W, Reed SI, Tainer JA. 1996.** Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell*. Mar 22; 84(6):863-74.
12. **Bourne Y, Watson MH, Arvai AS, Bernstein SL, Reed SI, Tainer JA. 2000.** Crystal structure and mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle regulatory protein Cks1: implications for domain swapping, anion binding and protein interactions. *Structure*. Aug 15;8(8):841-50.
13. **Brizuela L, Draetta G, Beach D. 1987.** p13<sup>cdc2</sup> acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34<sup>cdc2</sup> protein kinase. *EMBO J*. Nov; 6(11):3507-14.
14. **Brown L, Hines JC, Ray DS. 1992.** The *Crithidia fasciculata* CRK gene encodes a novel cdc2-related protein containing large inserts between highly conserved domains. *Nucleic Acids Res*. Oct 25; 20(20):5451-6.
15. **Brown NR, Noble ME, Endicott JA, Johnson LN. 1999.** The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol*. Nov; 1(7):438-43.
16. **Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UC, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Müller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CY, Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Perteua M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu CL, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova**

- L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Logsdon JM Jr, Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu CH, Lee YS, Embley TM, Coombs GH, Mottram JC, Tachezy J, Fraser-Liggett CM, Johnson PJ. **2007**. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*. Jan 12; 315(5809):207-12.
17. **Cavalier-Smith T. 1987**. Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*. Mar 26-Apr 1; 326(6111):332-3.
  18. **Chaves S, Baskerville C, Yu V, Reed SI. 2010**. Cks1, Cdk1, and the 19S proteasome collaborate to regulate gene induction-dependent nucleosome eviction in yeast. *Mol Cell Biol*. Nov; 30(22):5284-94.
  19. **Conrad MD, Gorman AW, Schillinger JA, Fiori PL, Arroyo R, Malla N, Dubey ML, Gonzalez J, Blank S, Secor WE, Carlton JM. 2012**. Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(3):e1573.
  20. **Cotch MF, Pastorek JG 2nd, Nugent RP, Hillier SL, Gibbs RS, Martin DH, Eschenbach DA, Edelman R, Carey JC, Regan JA, Krohn MA, Klebanoff MA, Rao AV, Rhoads GG. 1997**. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Sex Transm Dis*. 1997 Jul; 24(6):353-60.
  21. **Cudmore SL, Garber GE. 2010**. Prevention or treatment: The benefits of *Trichomonas vaginalis* vaccine. *J Infect Public Health*. 3(2): 47-53.
  22. **De Veylder L, Beemster GT, Beeckman T, Inzé D. 2001**. *CKS1At* overexpression in *Arabidopsis thaliana* inhibits growth by reducing meristem size and inhibiting cell-cycle progression. *Plant J*. 2001. Mar; 25(6):617-26.
  23. **De Veylder L, Segers G, Glab N, Casteels P, Van Montagu M, Inzé D. 1997**. The *Arabidopsis* Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *FEBS Lett*. Aug 4; 412(3):446-52.
  24. **Doerig C, Chakrabarti D, Kappes B, Matthews K. 2000**. The cell cycle in protozoan parasites. *Prog Cell Cycle Res*. 4:163-83.
  25. **Ducommun B, Brambilla P, Draetta G. 1991**. Mutations at sites involved in Suc1 binding inactivate Cdc2. *Mol Cell Biol*. Dec; 11(12):6177-84.
  26. **Dunphy WG, Brizuela L, Beach D, Newport J. 1988**. The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*. Jul 29; 54(3):423-31.
  27. **Embley TM, Hirt RP. 1998**. Early branching eukaryotes? *Curr Opin Genet Dev*. Dec; 8(6):624-9.
  28. **Espinosa N, Hernández R, López-Griego L, López-Villaseñor I. 2002**. Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene*. May 1; 289(1-2):81-6.
  29. **Fang G, Yu H, Kirschner MW. 1998**. Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell*. Aug; 2(2):163-71.
  30. **Fichorova RN. 2009**. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *J Reprod Immunol*. Dec; 83(1-2):185-9.
  31. **Fisher D, Krasinska L, Coudreuse D, Novák B. 2012**. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *J Cell Sci*. Oct 15; 125(Pt 20):4703-11.
  32. **Fuentes V, Barrera G, Sánchez J, Hernández R, López-Villaseñor I. 2012**. Functional analysis of sequence motifs involved in the polyadenylation of *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Eukaryot Cell*. Jun; 11(6):725-34.
  33. **Garber GE. 2005**. The laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. Jan; 16(1):35-8.

34. **Germot A**, Philippe H, Le Guyader H. **1996**. Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 10; 93(25):14614-7.
35. **Ghorbani M**, Vasavan B, Kraja E, Swan A. **2011**. Cks85A and Skp2 interact to maintain diploidy and promote growth in *Drosophila*. *Dev Biol*. Oct 1; 358(1):213-23.
36. **Glotzer M**, Murray AW, Kirschner MW. **1991**. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. Jan 10; 349(6305):132-8.
37. **Gómez-Conde E**, Mena-López R, Hernández-Jaúregui P, González-Camacho M, Arroyo R. **2000**. *Trichomonas vaginalis*: chromatin and mitotic spindle during mitosis. *Exp Parasitol*. Nov; 96(3):130-8.
38. **Gunderson J**, Hinkle G, Leipe D, Morrison HG, Stickel SK, Odelson DA, Breznak JA, Nerad TA, Müller M, Sogin ML. **1995**. Phylogeny of trichomonads inferred from small-subunit rRNA sequences. *J Eukaryot Microbiol*. Jul-Aug;42(4):411-5.
39. **Hadwiger JA**, Wittenberg C, Mendenhall MD, Reed SI. **1989**. The *Saccharomyces cerevisiae* CKS1 gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* suc1+ gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex. *Mol Cell Biol*. May; 9(5):2034-41.
40. **Hammarton TC**. **2007**. Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. May; 153(1):1-8.
41. **Hannon GJ**, Demetrick D, Beach D. **1993**. Isolation of the Rb-related p130 through its interaction with CDK2 and cyclins. *Genes Dev*. Dec; 7(12A):2378-91.
42. **Harashima H**, Dismeyer N, Schnittger A. **2013**. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol*. Jul;23(7):345-56.
43. **Hayles J**, Aves S, Nurse P. **1986**. *suc1* is an essential gene involved in both the cell cycle and growth in fission yeast. *EMBO J*. Dec 1; 5(12):3373-9.
44. **Hayles J**, Beach D, Durkacz B, Nurse P. **1986**. The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *suc1* that suppresses *cdc2* mutant function. *Mol Gen Genet*. Feb; 202(2):291-3.
45. **Hershko A**. **2005**. Affinity purification of mitotic anaphase-promoting complex/cyclosome on p13<sup>Suc1</sup>. *Methods Enzymol*. 398:170-5.
46. **Hirt RP**. **2013**. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. *Sex Transm Infect*. Sep; 89(6):439-43.
47. **Hoffmann I**, Clarke PR, Marcote MJ, Karsenti E, Draetta G. **1993**. Phosphorylation and activation of human *cdc25-C* by *cdc2*-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J* 12:53–63.
48. **Holic R**, Kukalev A, Lane S, Andress EJ, Lau I, Yu CW, Edelman MJ, Kessler BM, Yu VP. **2010**. Cks1 activates transcription by binding to the ubiquitylated proteasome. *Mol Cell Biol*. Aug; 30(15):3894-901.
49. **Holt LJ**, Tuch BB, Villén J, Johnson AD, Gygi SP, Morgan DO. **2009**. Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science*. Sep 25; 325(5948):1682-6.
50. **Horner DS**, Hirt RP, Kilvington S, Lloyd D, Embley TM. **1996**. Molecular data suggest an early acquisition of the mitochondrion endosymbiont. *Proc Biol Sci*. Aug 22; 263(1373):1053-9.
51. **Izumi T, Maller JL**. **1993**. Elimination of *cdc2* phosphorylation sites in the *cdc25* phosphatase blocks initiation of M-phase. *Mol Biol Cell*. Dec; 4(12):1337-50.
52. **Jaskólski M**. **2001**. 3D domain swapping, protein oligomerization, and amyloid formation. *Acta Biochim Pol*. 48(4):807-27.
53. **Jeffrey PD**, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J, Pavletich NP. **1995**. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*. Jul 27; 376(6538):313-20.

54. **Johnson DG**, Walker CL. **1999**. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:295-312.
55. **Johnson PJ**, d'Oliveira CE, Gorrell TE, Müller M. **1990**. Molecular analysis of the hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug; 87(16):6097-101.
56. **Kaiser P**, Moncollin V, Clarke DJ, Watson MH, Bertolaet BL, Reed SI, Bailly E. **1999**. Cyclin-dependent kinase and Cks/Suc1 interact with the proteasome in yeast to control proteolysis of M-phase targets. *Genes Dev.* May 1; 13(9):1190-202.
57. **Khattar V**, Thottassery JV. **2013**. Cks1: Structure, Emerging Roles and Implications in Multiple Cancers. *J Cancer Ther.* Oct 1; 4(8):1341-1354.
58. **Kissinger P**, Adamski A. **2013**. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. *Sex Transm Infect.* Sep; 89(6):426-33.
59. **Kitsios G**, Doonan JH. **2011**. Cyclin dependent protein kinases and stress responses in plants. *Plant Signal Behav.* Feb; 6(2):204-9.
60. **Krishnan A**, Nair SA, Pillai MR. **2010**. Loss of cks1 homeostasis deregulates cell division cycle. *J Cell Mol Med.* Jan; 14(1-2):154-64.
61. **Köivomägi M**, Valk E, Venta R, Iofik A, Lepiku M, Balog ER, Rubin SM, Morgan DO, Loog M. **2011**. Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase. *Nature.* Oct 12; 480(7375):128-31.
62. **Köivomägi M**, Ord M, Iofik A, Valk E, Venta R, Faustova I, Kivi R, Balog ER, Rubin SM, Loog M. **2013**. Multisite phosphorylation networks as signal processors for Cdk1. *Nat Struct Mol Biol.* Dec; 20(12):1415-24.
63. **Krieger JN**, Jenny C, Verdon M, Siegel N, Springwater R, Critchlow CW, Holmes KK. **1993**. Clinical manifestations of trichomoniasis in men. *Ann Intern Med.* Jun 1; 118(11):844-9.
64. **Krieger JN**. 1995. Trichomoniasis in men: old issues and new data. *Sex Transm Dis.* Mar-Apr; 22(2):83-96.
65. **Labbé JC**, Capony JP, Caput D, Cavadore JC, Derancourt J, Kaghad M, Lelias JM, Picard A, Dorée M. **1989**. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J.* Oct; 8(10):3053-8.
66. **Laga M**, Alary M, Nzila N, Manoka AT, Tuliza M, Behets F, Goeman J, St Louis M, Piot P. **1994**. Condom promotion, sexually transmitted diseases treatment, and declining incidence of HIV-1 infection in female Zairian sex workers. *Lancet.* Jul 23; 344(8917):246-8.
67. **Lahti CJ**, Bradley PJ, Johnson PJ. **1994**. Molecular characterization of the alpha-subunit of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal succinyl CoA synthetase. *Mol Biochem Parasitol.* Aug; 66(2):309-18.
68. **Lehker MW**, Alderete JF. **1999**. Resolution of six chromosomes of *Trichomonas vaginalis* and conservation of size and number among isolates. *J Parasitol.* Oct; 85(5):976-9.
69. **Liston DR**, Lau AO, Ortiz D, Smale ST, Johnson PJ. **2001**. Initiator recognition in a primitive eukaryote: IBP39, an initiator-binding protein from *Trichomonas vaginalis*. *Mol Cell Biol.* Nov; 21(22):7872-82.
70. **Lodish H**, Berk A, Lawrence Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D, y Darnell J, **2000**. New York: W. H. Freeman.
71. **Loog M**, Morgan DO. **2005**. Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature.* Mar 3; 434(7029):104-8.
72. **Malik SB**, Brochu CD, Bilic I, Yuan J, Hess M, Logsdon JM Jr, Carlton JM. **2011**. Phylogeny of parasitic parabasalids and free-living relatives inferred from conventional markers vs. Rpb1, a single-copy gene. *PLoS One.* 6(6):e20774.



73. **Malumbres M. 2011.** Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol Rev.* Jul; 91(3):973-1007.
74. **Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorka C, Nelson C, Harlow E, Tsai LH. 1992.** A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J.* Aug; 11(8):2909-17.
75. **McClelland RS, Sangare L, Hassan WM, Lavreys L, Mandaliya K, Kiarie J, Ndinya-Achola J, Jaoko W, Baeten JM. 2007.** Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *J Infect Dis.* Mar 1; 195(5):698-702.
76. **McGrath DA, Balog ER, Kõivomägi M, Lucena R, Mai MV, Hirschi A, Kellogg DR, Loog M, Rubin SM. 2013.** Cks confers specificity to phosphorylation-dependent CDK signaling pathways. *Nat Struct Mol Biol.* Dec; 20(12):1407-14.
77. **Miller ME, Cross FR. 2001.** Cyclin specificity: how many wheels do you need on a unicycle?. *J Cell Sci.* May; 114(Pt 10):1811-20.
78. **Morgan DO. 2007.** The cell cycle: principles of control. *Primers in Biology.* New Science Press Ltd. Oxford Univ Press, Oxford.
79. **Morris MC, Heitz F, Divita G. 1998.** Kinetics of dimerization and interactions of p13suc1 with cyclin-dependent kinases. *Biochemistry.* Oct 6; 37(40):14257-66.
80. **Morris MC, Kaiser P, Rudyak S, Baskerville C, Watson MH, Reed SI. 2003.** Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature.* Jun 26; 423(6943):1009-13.
81. **Mottram JC. 1994.** cdc2-related protein kinases and cell cycle control in trypanosomatids. *Parasitol Today.* Jul; 10(7):253-7.
82. **Mottram JC, Smith G. 1995.** A family of trypanosome cdc2-related protein kinases. *Gene.* Aug 30; 162(1):147-52.
83. **Mottram JC, Grant KM. 1996.** *Leishmania mexicana* p12cks1, a homologue of fission yeast p13suc1, associates with a stage-regulated histone H1 kinase. *Biochem J.* Jun 15; 316 ( Pt 3):833-9.
84. **Müller M. 1993.** The hydrogenosome. *J Gen Microbiol.* Dec; 139(12):2879-89.
85. **Muñoz MJ, Santori MI, Rojas F, Gómez EB, Téllez-Iñón MT. 2006.** *Trypanosoma cruzi* Tcp12CKS1 interacts with parasite CRKs and rescues the p13SUC1 fission yeast mutant. *Mol Biochem Parasitol.* Jun; 147(2):154-62.
86. **Pan YR, Sun M, Wohlschlegel J, Reed SI. 2013.** Cks1 enhances transcription efficiency at the GAL1 locus by linking the Paf1 complex to the 19S proteasome. *Eukaryot Cell.* 2013 Sep; 12(9):1192-201.
87. **Parge HE, Arvai AS, Murtari DJ, Reed SI, Tainer JA. 1993.** Human CksHs2 atomic structure: a role for its hexameric assembly in cell cycle control. *Science.* Oct 15; 262(5132):387-95.
88. **Patra D, Dunphy WG. 1996.** Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks homolog, has multiple essential roles in cell cycle control. *Genes Dev.* Jun 15; 10(12):1503-15.
89. **Pearson NJ, Cullen CF, Dzhindzhev NS, Ohkura H. 2005.** A pre-anaphase role for a Cks/Suc1 in aacentrosomal spindle formation of *Drosophila* female meiosis. *EMBO Rep.* Nov; 6(11):1058-63.
90. **Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. 1998.** Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev.* Apr; 11(2):300-17.
91. **Pines J. 1996.** Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Curr Biol.* Nov 1; 6(11):1399-402.
92. **Polinko ES, Strome S. 2000.** Depletion of a Cks homolog in *C. elegans* embryos uncovers a post-metaphase role in both meiosis and mitosis. *Curr Biol.* 2000 Nov 16; 10(22):1471-4.
93. **Potenza M, Schenkman S, Laverrière M, Tellez-Iñón MT. 2012.** Functional characterization of TcCYC2 cyclin from *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* Dec; 132(4):537-45.

94. **Ribeiro KC**, Pereira-Neves A, Benchimol M. **2002**. The mitotic spindle and associated membranes in the closed mitosis of trichomonads. *Biol Cell*. Jun; 94(3):157-72.
95. **Riley DE**, Campbell LA, Puolakkainen M, Krieger JN. **1993**. *Trichomonas vaginalis* and early evolving DNA and protein sequences of the CDC2/28 protein kinase family. *Mol Microbiol*. May; 8(3):517-9.
96. **Riley DE**, Krieger JN, Miner D, Rabinovitch PS. **1994**. *Trichomonas v aginalis*: dominant G2 period and G2 phase arrest in a representative of an early branching eukaryotic lineage. *J Eukaryot Microbiol*. Jul-Aug; 41(4):408-14.
97. **Rendón-Maldonado J**, Espinosa-Cantellano M, Soler C, Torres JV, Martínez-Palomo A. **2003**. *Trichomonas vaginalis*: in vitro attachment and internalization of HIV-1 and HIV-1-infected lymphocytes. *J Eukaryot Microbiol*. Jan-Feb; 50(1):43-8.
98. **Reynard GJ**, Reynolds W, Verma R, Deshaies RJ. **2000**. Cks1 is required for G1 cyclin-cyclin-dependent kinase activity in budding yeast. *Mol Cell Biol*. Aug; 20(16):5858-64.
99. **Roberts JM**. **1999**. Evolving ideas about cyclins. *Cell*. Jul 23; 98(2):129-32.
100. **Roger AJ**, Clark CG, Doolittle WF. **1996**. A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 10; 93(25):14618-22.
101. **Rousseau F**, Schymkowitz JW, Sánchez del Pino M, Itzhaki LS. **1998**. Stability and folding of the cell cycle regulatory protein, p13(suc1). *J Mol Biol*. Nov 27; 284(2):503-19.
102. **Rousseau F**, Schymkowitz JW, Wilkinson HR, Itzhaki LS. **2001**. Three-dimensional domain swapping in p13suc1 occurs in the unfolded state and is controlled by conserved proline residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 8; 98(10):5596-601.
103. **SUIVE/DGE/SALUD/Información Epidemiológica de Morbilidad, Anuario 2011**. Versión Ejecutiva.
104. **Seeliger MA**, Schymkowitz JW, Rousseau F, Wilkinson HR, Itzhaki LS. **2002**. Folding and association of the human cell cycle regulatory proteins cks1 and cks2. *Biochemistry*. Jan 29; 41(4):1202-10.
105. **Seeliger MA**, Spichty M, Kelly SE, Bycroft M, Freund SM, Karplus M, Itzhaki LS. **2005**. Role of conformational heterogeneity in domain swapping and adapter function of the Cks proteins. *J Biol Chem*. Aug 26; 280(34):30448-59.
106. **Simpson AG, Roger AJ**. **2004**. The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Curr Biol*. Sep 7; 14(17):R693-6.
107. **Smith A, Johnson P**. **2011**. Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Res Microbiol*. Jul-Aug;162(6):646-54.
108. **Sogin ML**. **1991**. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*. Dec; 1(4):457-63.
109. **Sogin ML, Silberman JD**. **1998**. Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *Int J Parasitol*. Jan; 28(1):11-20.
110. **Sutton MY**, Sternberg M, Nsuami M, Behets F, Nelson AM, St Louis ME. **1999**. Trichomoniasis in pregnant human immunodeficiency virus- infected and human immunodeficiency virus-uninfected congolense women: prevalence, risk, factors, and association with low birth weight. *Am J Obstet Gynecol*. Sep; 181(3):656-62.
111. **Swan A**, Barcelo G, Schüpbach T. **2005**. Drosophila Cks30A interacts with Cdk1 to target Cyclin A for destruction in the female germline. *Development*. Aug; 132(16):3669-78.
112. **Tang Y, Reed SI**. **1993**. The Cdk-associated protein Cks1 functions both in G1 and G2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. May; 7(5):822-32.

113. **Ubersax JA**, Woodbury EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, Shokat KM, Morgan DO. **2003**. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*. Oct 23; 425(6960):859-64.
114. **Uhlmann F**, Bouchoux C, López-Avilés S. **2011**. A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Dec 27; 366(1584):3572-83.
115. **Van Hellemond JJ**, Neuville P, Schwarz RT, Matthews KR, Mottram JC. **2000**. Isolation of *Trypanosoma brucei* CYC2 and CYC3 cyclin genes by rescue of a yeast G(1) cyclin mutant. Functional characterization of CYC2. *J Biol Chem*. Mar 24; 275(12):8315-23.
116. **Van Der Pol B**, Kwok C, Pierre-Louis B, Rinaldi A, Salata RA, Chen PL, van de Wijgert J, Mmiro F, Mugerwa R, Chipato T, Morrison CS. **2008**. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *J Infect Dis*. Feb 15; 197(4):548-54.
117. **Vanacova S**, Liston DR, Tachezy J, Jhonson P. **2003**. Molecular Biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology* Mar; 33(3): 235–255.
118. **WHO 2012**. Global Incidence and Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections-2008. World Health Organization, 2012.
119. **Yaeger R. G. 1996**. Medical microbiology. Baron S, editor Galveston (TX): University of Texas Medical Branch of Galveston Chapter 77.
120. **Yu VP**, Baskerville C, Grünenfelder B, Reed SI. **2005**. A kinase-independent function of Cks1 and Cdk1 in regulation of transcription. *Mol Cell*. Jan 7; 17(1):145-51.

## 10. APÉNDICES

### APENDICE I

#### OLIGONUCLEÓTIDOS PARA REACCIONES DE PCR

Nombre	pb	Tm °C	Secuencia
AUAPB	26	61	5' GGATCCGGCCACGCGTCGACTAGTAC 3'
AP	37	56	5' GGCCACGCGTCGACTAGTACT(T)16 3'
Cks1-S.cerevisiae-EcoRI-F	31	69.7	5' CATAGAATTCATGTACCATCACTATCACGCC 3'
Cks2-S.cerevisiae-Xho-R	31	69.7	5' TATACTCGAGCTAGGAGATTTGGGGTGGAAC 3'
p13suc1-20-Kpn-F	33	71.3	5' TATAGGTACCAGTGTTGACGATATCAGGTACTC 3'
p13suc1-20-EcoRI-F	34	70.4	5' CATAGAATTCATGAGTGTTGACGATATCAGGTAC 3'
p13suc1-60-Kpn-F	35	71.4	5' CATAGGTACCAGTGTTGACGAGATTATATACTCAG 3'
p13suc1-60-EcoRI-F	36	69.7	5' CATAGAATTCATGAGTGTTGACGAGATTATATACTC 3'
p13suc1-Hind-R	36	69.7	5' TATCAAGCTTTTTAAAGGGCATCTTTAGGAACATTTTC 3'
p13suc1-Xho-R	36	72.1	5' TATCCTCGAGTTAAAGGGCATCTTTAGGAACATTTTC 3'
Tvp13suc1nested	17	49.9	5' GAAGAAGAATGGAGAGC 3'

## APÉNDICE II

### REACTIVOS

#### Células competentes

100 ml de Buffer TB:

Pipes 0.30 g

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.22 g

KCl 1.86 g

\*Ajustar el pH a 6.7 con KOH y adicionar 1.09 g de MnCl<sub>2</sub>, filtrar y almacenar a 4°C.

#### Purificación de plásmidos

Solución 1

Glucosa 50mM

Tris 25mM pH 8

EDTA 10 mM pH8

Solución 2

(Se prepara al momento)

NaOH 0.2 N

SDS 1%

Solución 3

60 ml de Acetato de Potasio 5M

11.5 ml de Ácido Acético Glacial

28.5 ml de agua bidestilada

Buffer TE: Tris 10 mM pH 7.4 + EDTA 0.2 mM pH7.4

\* Esterilizar por autoclave.

Stock TE RNAsa 3.3mg/ml Final 0.02 mg/ml

\*Resuspender el volumen necesario de RNAsa en buffer TE.

#### Transformación de bacterias

Stock Ampicilina, 100mg/ml. Concentración final en el medio 100 µg/ml

Stock Kanamicina, 50mg/ml. Concentración final en el medio 50 µg/ml

\*Se diluye el antibiótico en agua estéril y se filtra con membrana de 0.22 µm.

## Transformación de levaduras

Acetato de litio 1 M            PM. 102.02

\* Disolver en agua, aforar y esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm.

Buffer TE pH 7.5

- Tris HCl 10 mM, pH 7.5

- EDTA 1 mM, pH 8.0

\* Preparar a partir de los stocks y esterilizar en autoclave.

DNA de esperma de salmón, 10 mg/ml

\* Ver protocolo de preparación: Invitrogen cat. no. 15632-011)

PEG 4,000 al 40% en agua bidestilada

\* Disolver en la mitad de volumen final, aforar y filtrar a través de una membrana de 0.22 µm.

X-Gal

\* Disolver en la mitad de volumen final, aforar y filtrar a través de una membrana de 0.22 µm.

## Purificación de proteínas

Buffer de Lisis

Buffer de Lavado

Buffer de Elución

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
Imidazole pH 8	10 mM	Imidazole pH 8	20 mM	Imidazole pH 8	250 mM
Lisozima	1 mg/ml				
Benzonasa	25 U/ml				

## SDS-PAGE semi-desnaturalizante

Stock Acrilamida 30% (100 ml) (19:1)

Acrilamida 30%..... 30 g

Bis-acrilamida 0.8%.... 0.8 g

#### Gel separador 15% (2 geles)

2.5 ml Buffer inferior  
5 ml Stock de Acrilamida  
2.39 ml Agua  
100  $\mu$ l Persulfato de Amonio al 10%  
10  $\mu$ l TEMED

#### Gel concentrador 4% (2 geles)

1.25 ml Buffer superior  
0.650 ml Stock de Acrilamida  
3.045 ml Agua  
50  $\mu$ l Persulfato de Amonio al 10%  
5  $\mu$ l TEMED

#### Buffer de muestra 5X

400  $\mu$ l Tris-HCl 1.25 M pH 6.8  
500  $\mu$ l SDS 10%  
800  $\mu$ l Glicerol  
2900  $\mu$ l Agua estéril  
400  $\mu$ l 2-mercaptoethanol  
Azul de bromofenol

#### Buffer de corrida pH 8.3

25 mM Tris  
192 mM Glicina  
0.05% SDS

### Transferencia y Western Blot

#### Buffer de transferencia

840 mg Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )  
318 mg Carbonato de sodio ( $\text{NaCO}_3$ )  
200 ml Metanol  
\* Aforar a 1000 ml

#### Buffer TTBS-Tween

20 mM TrisHCl  
500 mM NaCl  
0.05% (w/v) Tween 20

## APÉNDICE III

### MEDIOS DE CULTIVO

#### Para bacterias

##### Medio Luria Bertani (**LB**)

	Líquido	Sólido
Peptona	10 g	10 g
Extracto de levadura	5 g	5 g
NaCl	5 g	5 g
NaOH 10 M	0.3 ml	0.3 ml
Tris 1 M pH 8	10 ml	10 ml
Agar	---	15 g
Agua bd, c.b.p.	1 L	1 L

#### Para levaduras

Stock de Galactosa al 20% Final: 10 ml del stock por cada 100 ml de medio.

Stock de Rafinosa al 10% Final: 2 ml del stock por cada 100 ml de medio.

\* Disolver en agua, aforar y esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm.

#### Buffer de fosfato a pH 7

1. Fosfato de potasio dibásico ( $K_2HPO_4$ ) PM 174.18

Para 500 ml 50 mM pH 7 pesar 4.35 g y disolver en 400 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.

2. Fosfato de potasio monobásico ( $KH_2PO_4$ ) PM 136.09

Para 50 ml 500 mM pesar 3.4 g disolver en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y llevar a 50 ml.

\* Con el fosfato de potasio monobásico 500 mM (paso 2) ajustar el pH a 7 del fosfato de potasio dibásico (paso 1). Se utilizan aproximadamente 30 ml, una vez en pH 7 llevar a 500 ml.

#### Medio rico (**YPD**)

	Líquido	Sólido
Extracto de levadura	10 g	10 g
Peptona	20 g	20 g
Dextrosa anhidra	20 g	20 g
Agar	---	20 g
Agua bd, c.b.p.	1 L	1 L

\* Disolver los ingredientes en agua bidestilada y esterilizar en autoclave.



Medio mínimo (**MM**)

	Líquido	Sólido
YNB w/o aminoacids	10 g	10 g
Dextrosa anhidra	20 g	20 g
Nutrientes adicionales	(ver tabla de nutrientes adicionales)	
Agar	---	25 g
Agua bd, c.b.p.	1 L	1 L

Nutriente	Concentración stock (g/100 ml)	Volumen (ml) del stock para 1 L de medio mínimo	Concentración final en medio mínimo (mg/L)
Adenina	0.2	10	20
Uracilo	0.2	10	20
L-Triptófano	0.2	10	20
L-Histidina	1	2	20
L-Metionina	1	2	20
L-Leucina	1	10	100
L-Lisina	1	3	30

\* Disolver en agua bidestilada y esterilizar en autoclave. Usar en condiciones de esterilidad. La histidina y el triptófano deben protegerse de la luz.

Medio mínimo con Galactosa y Rafinosa (**MM/Gal/Raf**)

\* Este medio se prepara con agua bidestilada.

Medio mínimo con Galactosa, X-Gal y leucina (**MM/Gal/X-Gal/Leu**)

Medio mínimo con Galactosa, X-Gal (**MM/Gal/X-Gal**)

\* Estos medios se preparan con buffer de fosfatos a pH 7.