

11281

//



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA**



**"CARACTERIZACION DEL SISTEMA GENICO
DE ACTINA Y SUS TRANSCRITOS EN
Trichomonas vaginalis"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

P R E S E N T A:

BIOL. NORMA ESPINOSA SANCHEZ



DIRECTOR DE LA TESIS: DRA. IMELDA LOPEZ VILLASEÑOR

MEXICO. D.F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Imelda López Villaseñor en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y fue financiada por DGAPA (UNAM), proyecto IN212199 y el CONACYT, proyecto 28036M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis padres.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A Víctor Manuel por su amor, confianza y apoyo.

A mis hermosas hijas, Ximena y Norma Renata.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A mis hermanas, Cony, Veva, Rosi, Maru, Silvia, Lety y Gina por su apoyo y consejos en las diversas etapas de mi vida.

A Alfredo mi primo.

A mis cuñados y sobrinos.

A Mario y Marina, amigos entrañables.

A Marco y Laura.

A Catalina, Ana Luz y Elsa.

A Lorena, Juliana, Ana María, Marcela, Natasha, María Victoria, y demás amigos del laboratorio.

A Carmen y José Luis.

A mi suegra +

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por contribuir en mi formación.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado, por la beca recibida durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Imelda López Villaseñor por permitirme colaborar en su laboratorio, por sus enseñanzas, su amistad, su apoyo desinteresado tanto moral como académico durante el transcurso de este trabajo.

Al Comité tutorial integrado por el Dr. Roberto Hernández Fernández y el Dr. Alejandro Alagón Cano, por su valiosa asesoría en el proyecto, y que gracias a sus sugerencias y críticas permitieron alcanzar los objetivos buscados.

A los miembros del jurado: Dra. Cecilia Montañez Ojeda, Dra. Imelda López Villaseñor, Dra. Rossana Arroyo Verástegui, Dra. Laura Camarena Mejía, Dr. Alejandro Zentella Dehesa, Dr. Roberto Coria Ortega y el Dr. Abraham Landa Piedra, por su amabilidad y comentarios en la revisión final del presente trabajo.

A mi amiga, la Bióloga Lorena López Griego, técnico académico de nuestro laboratorio, quien siempre estuvo cerca colaborando intensamente durante la realización de este proyecto.

A los fotógrafos, Jorge Hernández Juárez, Domingo López López y al dibujante Enrique Vázquez Carmona por los trabajos que realizaron para las publicaciones presentadas en la tesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABREVIATURAS.

° C	grados centígrados.
cap	7'metil guanosina en la región 5' no traducida del transcrito.
cDNA	DNA complementario a RNA.
CFI	factor de corte I (cleavage factor I).
CFII	factor de corte II (cleavage factor II)..
CPSF	factor específico de corte y poliadenilación (cleavage and polyadenylation specificity factor).
CstF	factor de estimulación de corte (cleavage stimulation factor).
DEPC	dietilpirocarbonato.
dNTP	desoxinucleotido trifosfato
DMSO	dimetil sulfóxido
DSE	elemento río abajo (downstream element).
DTT	ditiotreitól.
EDTA	ácido etilendiamino tetra-acético.
EE	elemento de eficiencia (efficiency element).
ETS	enfermedades de transmisión sexual.
FUE	elemento lejano río arriba (far-upstream element).
Inr	elemento iniciador de la transcripción.
kb	kilobases.
kDa	kilodaltones.
min	minuto.
µg	microgramo.
µl	microlitro.
ml	mililitro.
mRNA	RNA mensajeros.
NUE	elemento cercano río arriba (near-upstream element).
ORF	marco de lectura abierto.
PAB II	proteína II de unión a poli(A).
PAP	poli(A) polimerasa.
pb	pares de bases.
PBS	amortiguador salino de fosfatos.
PCR	reacción en cadena de la polimerasa.
PE	elemento posicionador (positioning element).
poli(A)	cola de poliadeninas.
RNA pol II	RNA polimerasa II.
rpm	revoluciones por minuto.
SDS	dodecil sulfato de sodio.
SSC	amortiguador salino y citrato de sodio.
TAE	amortiguador de Tris-acetato.
TE	amortiguador de Tris-EDTA.
USE	elemento río arriba (upstream element).
u	unidades.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE.

1. RESUMEN.	1
2. INTRODUCCIÓN.	3
2.1. Importancia biológica de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	3
2.2. Importancia médica de <i>T. vaginalis</i> .	3
2.3. Trichomonosis en México.	5
2.4. Descripción de la enfermedad.	5
2.5. Biología de <i>T. vaginalis</i> .	6
2.5.1. Clasificación taxonómica.	6
2.5.2. Características generales.	7
2.5.2.1. Ciclo de vida.	7
2.5.2.2. Forma y tamaño.	7
2.5.2.3. Citoplasma.	10
2.5.2.4. Núcleo.	10
2.5.2.5. Número cromosómico.	10
2.5.2.6. Metabolismo.	10
2.5.2.7. Tipo de reproducción y mitosis.	11
2.5.3. Patogenicidad.	11
2.5.3.1. Citoadherencia.	12
2.5.3.2. Citotoxicidad.	12
2.5.4. El citoesqueleto de <i>T. vaginalis</i> .	14
2.5.4.1. Características generales de actina.	15
2.5.4.2. Actina en <i>T. vaginalis</i> .	17
2.5.5. Aspectos moleculares de <i>T. vaginalis</i> .	18
2.5.5.1. Organización génica.	18
2.5.5.2. Regulación de la expresión génica.	18
2.6. Proceso de poliadenilación en eucariontes superiores.	20
2.6.1. Señales de poliadenilación en mamíferos.	23
2.6.2. Factores que participan en el proceso de poliadenilación.	26

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.6.3. La poliadenilación está acoplada al procesamiento.	28
2.6.4. Estructura secundaria.	30
2.7. Proceso de poliadenilación en levaduras.	30
2.8. Proceso de poliadenilación en plantas.	31
2.9. Proceso de poliadenilación en procariontes.	31
2.10. Proceso de poliadenilación en protistas.	32
3. OBJETIVOS.	37
3.1. Objetivo general.	37
3.2. Objetivos particulares.	37
4. METODOLOGÍA.	38
4.1. Cultivo de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	38
4.2. Extracción de DNA genómico.	38
4.3. Extracción de RNA total.	39
4.4. Obtención de RNA poli A+.	40
4.5. Obtención de DNA de plásmidos.	41
4.6. Preparación de bacterias competentes.	42
4.7. Preparación de bacterias para electroporación.	42
4.8. "Southern blot" genómico de <i>T. vaginalis</i> .	43
4.9. Clonación de fragmentos genómicos <i>EcoRI</i> – <i>PstI</i> de <i>T. vaginalis</i> .	44
4.10. Secuenciación.	46
4.11. "Northern blot".	50
4.12. Amplificación rápida de extremos 3' (3' RACE).	51
a) Síntesis de cDNA de <i>T. vaginalis</i> .	52
b) Amplificación de los extremos 3' de cDNAs de actina por medio de PCR.	52
Primera amplificación.	52
Segunda amplificación.	53
c) Clonación de los extremos 3' de cDNAs de actina.	53
4.13. Amplificación de los extremos 3' de los cDNAs de calmodulina, metionina gama-liasa, gene 6 de superoxido dismutasa.	55

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

4.14. Análisis de secuencias.	56
5. RESULTADOS.	57
5.1. Determinación del número de genes que codifican para actina.	57
5.2. Clonación de fragmentos genómicos con extremos <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> .	59
5.2.1. Selección de clonas con insertos relacionados a actina.	59
5.2.2. Caracterización de las clonas de actina mediante PCR.	61
5.3. Artículo: "Differences between coding and non-coding regions in the <i>Trichomonas vaginalis</i> genome: an actin gene as a locus model"	65
5.4. "Southern blot" y "Northern blot" del ORF con similitud a la proteína hipotética YER082c de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	66
5.5. Caracterización de los transcritos de actina. Artículo: Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in <i>Trichomonas vaginalis</i> mRNAs"	68
6. DISCUSIÓN.	69
7. CONCLUSIONES.	74
8. BIBLIOGRAFÍA.	75
9. APÉNDICES.	
9.1. Apéndice A.	84
9.2. Apéndice B.	85
9.3. Apéndice C.	87
9.4. Apéndice D.	88

TESIS COM
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig. 1.	Árbol filogenético.	4
Fig. 2.	Trofozoito del género <i>Trichomonas</i> .	8
Fig. 3.	Transformación morfológica de <i>Trichomonas. vaginalis</i> .	9
Fig. 4.	Esquema del proceso de poliadenilación en eucariontes superiores.	22
Fig. 5.	Comparación de señales de poliadenilación en mamíferos, levaduras y plantas.	25
Fig. 6.	Modelo del complejo molecular para el procesamiento de pre-mRNAs en eucariontes superiores.	27
Fig. 7.	Modelo del complejo de poliadenilación en eucariontes superiores.	29
Fig. 8.	"Southern blot" genómico de <i>T. vaginalis</i> .	58
Fig. 9.	"Southern blot" de clonas genómicas de actina con insertos <i>EcoRI + PstI</i> .	60
Fig. 10.	Mapas de tamaños de las clonas 4BGA y 9BGA.	64
Fig. 11.	"Southern blot" y "Northern blot" del ORF con similitud a la proteína hipotética YER082c.	67

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.	Señales de poliadenilación en protistas.	33
Tabla 2.	Oligonucleótidos utilizados para secuenciar el fragmento genómico de <i>T. vaginalis</i> .	49
Tabla 3.	Oligonucleótidos utilizados en el ensayo 3' RACE.	56
Tabla 4.	Tamaños de las regiones 5' y 3' de las clonas 4BGA y 9BGA.	62

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. RESUMEN.

Trichomonas vaginalis es un protozoo parásito de aparición temprana durante la evolución de los eucariotes. Representa una de las primeras ramificaciones de linajes eucarióticos por lo que el conocimiento de la biología de este organismo puede proporcionarnos información relevante de la evolución molecular y celular en organismos de aparición temprana. El presente trabajo se ha enfocado al estudio molecular del sistema génico de actina en *T. vaginalis* en dos aspectos fundamentales: a) el estudio de la organización génica y b) el estudio de la expresión génica en este parásito. Determinamos que actina en *T. vaginalis* está codificada por una familia multigénica de alrededor de 9 miembros. Por medio de la clonación de fragmentos genómicos con extremos *EcoRI* y *PstI* de *T. vaginalis*, obtuvimos una clona genómica (9BGA) que contiene el marco de lectura abierto (ORF) completo de actina y otros dos ORFs incompletos. En este fragmento genómico se analizó la distribución de regiones codificadoras y no codificadoras, así como la composición de bases de estas secuencias; debido a la marcada diferencia en el contenido de bases de estas regiones (codificadoras e intergénicas) se propone que este tipo de análisis es una herramienta valiosa para identificar posibles regiones codificadoras en este parásito. En cuanto a la expresión génica en *T. vaginalis*, en particular se estudiaron las regiones 3' no traducidas en donde se lleva a cabo el proceso de poliadenilación de transcritos, importante para la estabilidad de los mensajeros y posiblemente en la exportación de éstos del núcleo al citoplasma. Mediante el ensayo de amplificación de extremos 3' (3' RACE) se caracterizaron las regiones 3' no traducidas de los transcritos de actina, así como las regiones 3' no traducidas de los transcritos de calmodulina, metionina gama liasa, superóxido dismutasa y de un gen desconocido. Por otra parte, se analizaron también secuencias de cDNA y secuencias genómicas de otros tres genes reportados y se llevó a cabo un análisis comparativo de las regiones 3' no traducidas con las secuencias genómicas correspondientes. Los resultados nos permitieron proponer

que las señales que dirigen el proceso de poliadenilación en este parásito son: i) la señal de poliadenilación de *T. vaginalis* es la secuencia UAAA, que puede formar parte del codón de terminación de la traducción (TAA); ii) una secuencia novedosa $\text{Py(A)}_{10-3}\text{AATT}$ que marca el sitio de corte del transcrito, localizada río abajo y adyacente al sitio de corte y poliadenilación y iii) una secuencia rica en Us que se localiza río abajo del sitio de corte de los transcritos.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE *Trichomonas vaginalis*.

Trichomonas vaginalis es un protozoo flagelado de aparición temprana durante la evolución de los eucariontes. Este parásito representa una de las primeras ramificaciones de linajes eucarióticos según estudios comparativos tanto de secuencias de la subunidad grande de RNA ribosomal (Baroin y col., 1988) como de secuencias de la subunidad pequeña de RNA ribosomal (16s-like rRNA) (Sogin, 1991) (figura 1). Por lo tanto se propone que el conocimiento de la biología de *T. vaginalis* podría proporcionarnos información acerca de la evolución molecular y celular en organismos que divergieron muy tempranamente de la rama de los eucariontes.

2.2. IMPORTANCIA MÉDICA DE *T. vaginalis*.

T. vaginalis es el agente infeccioso responsable de la trichomonosis, una de las enfermedades más comunes transmitida por vía sexual. En esta enfermedad se produce daño en los tejidos del tracto urogenital provocando embarazos de alto riesgo a mujeres embarazadas con trichomonosis (Cotch y col., 1997), una mayor susceptibilidad a la infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (Laga y col., 1993; Cohen y col., 1997; Jackson y col., 1997; Sorvillo y Kerndt, 1998) y predisposición de algunas pacientes con trichomonosis al cáncer cérvico-uterino (Viikki y col., 2000). La trichomonosis es considerada como una de las enfermedades de transmisión sexual de mayor frecuencia en el mundo, afectando aproximadamente a 170 millones de personas anualmente (WHO, 1996).

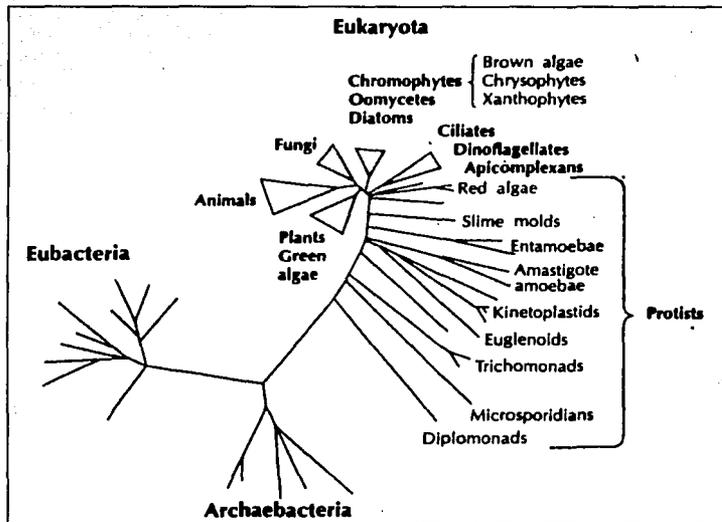


Fig. 1. Árbol filogenético construido con base en la similitud de las secuencias de la subunidad pequeña de RNA ribosomal (16s like). Se muestran tres ramas principales: eubacterias, arqueobacterias y eucariontes. *Trichomonas vaginalis* se ubica entre los organismos amitocondriados que divergieron muy tempranamente de la rama de los eucariontes (Sogin, 1991).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3. TRICHOMONOSIS EN MÉXICO.

Tanto en México como a nivel mundial las enfermedades de transmisión sexual (ETS) representan un problema de salud pública; a nivel nacional son una de las diez primeras causas de morbilidad, con un promedio de 220,000 casos anuales. La trichomonosis y la candidiasis urogenital, por su comportamiento epidemiológico ascendente han sido incorporadas a las enfermedades de transmisión sexual denominadas de nueva generación como el herpes genital, las infecciones por el virus del papiloma, etc. En México, como en otros países en desarrollo, el conocimiento de la situación epidemiológica de las ETS se dificulta por existir un subregistro de los casos. Con estas limitaciones, se observa que de 1990 a 1996 la trichomonosis y la candidiasis muestran una tendencia al ascenso (Bernal y Hernández, 1997). Los casos de trichomonosis reportados a nivel nacional en los últimos tres años fueron: 168,869, 174,447 y 178,073 en 1999, 2000 y 2001, respectivamente (Vigilancia Epidemiológica semana 1 de 2001 y semana 2 de 2002, Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salubridad y Asistencia). En el transcurso del presente año se han registrado alrededor de 60,466 (Vigilancia Epidemiológica semana 19 de 2002, misma fuente). La trichomonosis en la República Mexicana se encuentra distribuida principalmente en las zonas centro y sur del país, con la mayor incidencia en el estado de Veracruz y en el Estado de México.

2.4. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD.

La trichomonosis humana es una enfermedad crónica no mortal, causada por el protozooario *Trichomonas vaginalis*. En la mujer, el parásito coloniza primordialmente el epitelio de la vagina y del exocervix. Los síntomas principales de la enfermedad son: flujo vaginal purulento verde-amarillento y de olor fétido e irritación vulvo-vaginal, en algunos casos se presenta dolor en el vientre, en la espalda y al contacto sexual. Se puede presentar también, eritema vaginal y

enrojecimiento cervical causado por dilatación capilar y puntos hemorrágicos, conocidos como "cérnix de fresa". Los síntomas varían durante el ciclo menstrual y se exacerban durante la menstruación y el embarazo. Sin embargo, del 25 al 50% de las mujeres infectadas son asintomáticas. La trichomonosis se ha identificado como un factor de riesgo en el embarazo, ya que puede provocar parto prematuro, bajo peso neonatal e incremento en la incidencia de endometritis postparto. En el hombre el parásito se aloja principalmente en la uretra, aunque en algunas ocasiones también en la próstata y en las vesículas seminales, originando una trichomonosis asintomática. Ocasionalmente la enfermedad presenta inflamación de la uretra y puede llegar a ser causa de esterilidad (Arroyo, 2000; Meysich y Garber, 1995).

Para el tratamiento de la trichomonosis se utiliza la droga metronidazol que se activa en los hidrogenosomas del parásito: aquí se lleva a cabo la reducción del grupo nitro del metronidazol catalizada por la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa, formándose un compuesto intermediario citotóxico.

2.5. BIOLOGÍA DE *T. vaginalis*.

2.5.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

Reino:	Protista.
Phylum:	Protozoa.
Subphylum:	Sarcomastigophora.
Clase:	Zoomastigophorea.
Subclase:	Zoomastigia.
Orden:	Trichomonadida.
Familia:	Trichomonadidae.
Género:	Trichomonas.
Especie:	<i>Trichomonas vaginalis</i> .

2.5.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES.

2.5.2.1. CICLO DE VIDA. El ciclo de vida de *T. vaginalis* solo presenta un estadio, el trofozoito uninucleado (figura 2) y no tiene huéspedes intermediarios ni vectores. La transmisión de la trichomonosis humana es de persona a persona mediante el contacto sexual con personas infectadas.

2.5.2.2. FORMA Y TAMAÑO. Este protozooario presenta cuatro flagelos anteriores, un flagelo recurrente adosado a la membrana ondulante y un axostilo que es una estructura especializada del citoesqueleto formada por microtúbulos. Los parásitos en cultivo presentan formas y tamaños variables, miden en promedio de 10 a 20 μm de largo por 7 μm de diámetro. Las formas ovoides y redondas son las que predominan en cultivo líquido y en las secreciones vaginales. Las formas ameboides aplanadas se encuentran en biopsias de pacientes, aunque algunas veces se les encuentra también en cultivos, adheridos a las paredes de los tubos; estas formas ameboides se desplazan lentamente sobre el sustrato al que se adhieren. En su interacción con células del epitelio vaginal *in vitro*, los microorganismos de forma ovoide se transforman morfológicamente en formas ameboides en menos de tres minutos: forman lamelipodios y son capaces de emitir pseudópodos que se interdigitan en diferentes sitios con la membrana plasmática de las células blanco, reduciendo el espacio intercelular en las áreas de contacto (Arroyo y col., 1993; Arroyo, 2000) (figura 3).

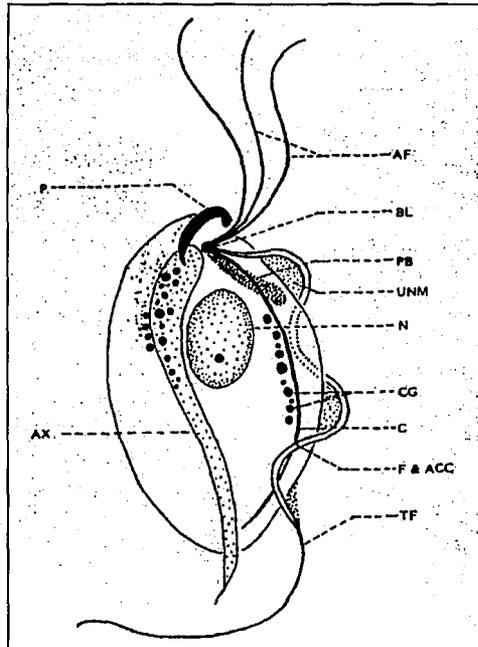


Fig. 2. Esquema generalizado del trofozoito del género *Trichomonas* donde se muestran las estructuras del citoesqueleto y otras estructuras principales. Pelta (P), axostilo (AX), flagelos anteriores (AF), costa (C), flagelo y filamento accesorio (F y ACC), flagelo recurrente (TF), membrana ondulante (UNM), cuerpo basal (BL), cuerpo parabasal o Golgi (PB) núcleo (N), granulos costales (hidrogenosomas, CG) (Marquardt y col., 2000).

TESIS COM
FALLA DE ORIGEN

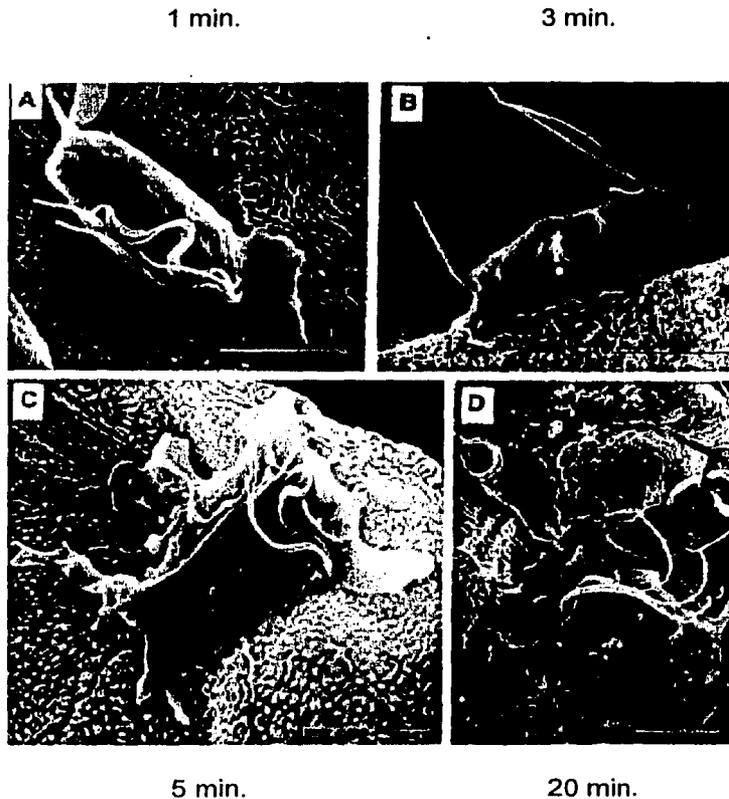


Fig. 3. Transformación morfológica de *T. vaginalis* al contacto con células de epitelio vaginal (CEV). Panel A: Después de 1 min. el parásito tiene apariencia alargada y se forman pseudópodos en la periferia del parásito en el sitio de contacto con la CEV. Panel B: Después de 3 min. se observan puntos de contacto múltiples y formación de pseudópodos y lamelipodios. Panel C: Después de 5 min. se observa una transformación morfológica completa, de forma oval a forma ameboide aplanada con asociaciones de membrana-membrana entre el huésped y el parásito, múltiples puntos de contacto y lamelipodios delgados. Panel D: Después de 20 min. se observan varios parásitos adheridos a las CEV (Arroyo y col., 1993).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5.2.3. CITOPLASMA. En el citoplasma de *T. vaginalis* se encuentran las siguientes estructuras: 1) aparato de Golgi muy bien definido, 2) retículo endoplásmico, 3) sistema vacuolar rico en fagosomas y fagolisosomas, 4) gránulos paraxostilares y paracostales (hidrogenosomas), 5) gránulos de glucógeno, 6) ribosomas libres y asociados al retículo endoplásmico y 7) un citoesqueleto muy complejo. Este organismo no posee mitocondrias ni peroxisomas. En algunos parásitos se pueden encontrar partículas virales que poseen un genoma de RNA de doble cadena.

2.5.2.4. NÚCLEO. El núcleo de *T. vaginalis* en interfase es piriforme, mide aproximadamente 4 x 5 µm, se encuentra limitado por una envoltura nuclear con poros típicos y contiene gránulos dispersos de cromatina. Se localiza en la porción anterior y ventral izquierda de la expansión capitular del axostilo. El núcleo contiene un nucleolo esférico pequeño, rodeado de un área libre de cromatina.

2.5.2.5. NÚMERO CROMOSÓMICO. *T. vaginalis* es un organismo diploide y posee seis pares de cromosomas (Yeong-Seng y col., 1997; Yeong-Seng y col., 1998). El tamaño del genoma de *T. vaginalis* se estima en 2.5×10^7 pb (Wang y Wang, 1985).

2.5.2.6. METABOLISMO. *T. vaginalis* es un microorganismo anaerobio facultativo o aerotolerante que carece de mitocondrias pero contiene un organelo rodeado por doble membrana denominado hidrogenosoma, en donde se lleva a cabo el metabolismo de los carbohidratos. Los hidrogenosomas se dividen de manera autónoma por fisión binaria, importan proteínas postraduccionalmente y producen ATP. Estos organelos difieren de las mitocondrias ya que carecen de genoma, de citocromos, del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y de la reacción de fosforilación oxidativa; en su lugar usan enzimas (piruvato-ferredoxina oxidorreductasa e hidrogenasa) típicamente restringidas a organismos anaerobios

(Müller, 1993). Datos recientes indican que los trichomonadidos poseen proteínas de tipo mitocondrial cuyo mecanismo de importación al organelo blanco es similar al de las mitocondrias (Roger y col., 1996; Germot y col., 1996; Hashimoto y col., 1998 y Häusler y col., 1997), lo que sugiere que los hidrogenosomas y las mitocondrias están relacionados y que los primeros podrían haber evolucionado a partir de mitocondrias (Biangini y col., 1997).

2.5.2.7. TIPO DE REPRODUCCIÓN Y MITOSIS. *T. vaginalis* presenta una reproducción asexual por medio de fisión binaria longitudinal. De acuerdo con Heath (Heath, 1980), este parásito presenta una clase de mitosis primitiva, ya que tiene un aparato mitótico extranuclear que no tiene contacto directo con los cromosomas y no ocurre rompimiento de la envoltura nuclear durante la división celular. El tiempo de duración aproximado de la mitosis en este organismo es de 45 minutos y puede ser dividido en cinco fases: profase, metafase, anafase temprana y tardía, telofase temprana y tardía y citocinesis (Gómez-Conde y col., 2000). Ribeiro y col., han propuesto recientemente que el axostilo y los flagelos de *T. vaginalis* contribuyen de manera importante en la mitosis cerrada que presentan estos organismos: sugieren que estas estructuras participan en los cambios de forma del parásito durante este proceso, en la contorsión de la región anterior, en la cariocinesis y en la citocinesis. (Ribeiro y col., 2000).

2.5.3. PATOGENICIDAD.

El mecanismo de patogenicidad de *T. vaginalis* se lleva a cabo en tres pasos principales: 1) adhesión (citoaderencia) de los parásitos a las células blanco (células epiteliales y eritrocitos), 2) efecto citopático dependiente del contacto y mediado por la secreción de sustancias citoactivas y 3) fagocitosis de las células blanco.

2.5.3.1. CITOADHERENCIA.

En el proceso de adhesión de *T. vaginalis* a las células de epitelio vaginal están involucradas diferentes moléculas, entre las que podemos mencionar a proteinasas del parásito, necesarias antes de la unión a la célula blanco (Arroyo y Alderete, 1989); receptores para proteínas de matriz extracelular, como el receptor para laminina de *T. vaginalis* (Silva Filho y col., 1988) y las adhesinas presentes en la superficie del parásito que se unen de manera específica a receptores de la superficie de la célula blanco. Hasta el momento se han reportado 4 adhesinas de 65, 51, 33 y 23 kDa (AP65, AP51, AP33 y AP23) (Arroyo y col., 1992; Arroyo y col., 1995). El contacto entre el parásito y la célula blanco provoca eventos de transducción de señales que desencadenan al menos tres procesos en el parásito: 1) transformación morfológica de ovoide a ameboide con la formación de filopodios y pseudópodos, 2) síntesis de las cuatro adhesinas y 3) quimiotaxis para el reclutamiento de parásitos hacia el sitio inicial de contacto (Arroyo y col., 1993).

2.5.3.2. CITOTOXICIDAD.

Se ha propuesto que el mecanismo de citopatogenicidad de *T. vaginalis* es un proceso multifactorial, en el que el primer evento es la adhesión del parásito a la célula blanco, seguida por un daño progresivo de la misma. Este daño se inicia con un redondeamiento de las células blanco, seguido por la muerte y la fagocitosis, para que finalmente ocurra la desintegración celular.

Investigaciones realizadas por varios grupos sugieren que el contacto directo entre *T. vaginalis* y las células epiteliales es necesario para que se produzca daño (Fiori y col., 1993; González-Robles y col., 1995; Krieger y col., 1985; Alderete y col., 1995). Sin embargo, existen datos que proponen que

además del contacto directo, los componentes solubles liberados también contribuyen al efecto citopático (Krieger y col., 1983; Garber y Lemchuk-Favel, 1990; Fiori y col., 1993). Recientemente, se ha demostrado la actividad citotóxica de una cistein proteinasa de superficie de *T. vaginalis* denominada CP65, la cual también tiene la capacidad de degradar proteínas de matriz extracelular como la fibronectina y la colágena IV (Alvarez-Sánchez y col., 2000).

Estudios ultraestructurales han demostrado que el daño a células MDCK (Madin Darby Canine Kidney) ocurre inicialmente a través de la adhesión y agregación de parásitos, lo que induce cambios en la membrana plasmática de las células blanco, seguidos por la muerte celular. Por otra parte, se ha observado la formación de microcanales en la membrana de *T. vaginalis* a través de los cuales son internalizadas microvellosidades y fragmentos citoplasmáticos de la célula blanco (González-Robles y col., 1995). Recientemente, los trabajos realizados por Bastos Furtado y Benchimol (Bastos y Benchimol, 1997) han mostrado que en los puntos de contacto entre *T. vaginalis* y las células de epitelio vaginal hay fusión de membranas, lo cual podría ser un mecanismo que conduzca al daño y a la muerte celular. Asimismo, se ha descrito que *T. vaginalis* tiene proteínas capaces de formar poros en las membranas de eritrocitos y posteriormente destruirlos (Fiori y col., 1993). La capacidad que tiene este parásito para fagocitar y degradar distintos tipos celulares como lactobacilos, leucocitos, eritrocitos y células de epitelio vaginal puede constituir otro mecanismo de patogenicidad que le permite sobrevivir en el microambiente del huésped (Rendón-Maldonado y col., 1998).

2.5.4. EL CITOESQUELETO DE *T. vaginalis*.

Los estudios que se han realizado sobre el citoesqueleto de *T. vaginalis* se han enfocado principalmente a estructuras constituidas por microtúbulos. Estos forman estructuras muy particulares como el axostilo, la costa, la pelta, cuatro flagelos anteriores y un flagelo recurrente adosado a la membrana ondulante (figura 2). El axostilo esta compuesto por microtúbulos que se doblan sobre sí mismos formando un tubo que recorre la parte media del cuerpo desde la región anterior y se proyecta al exterior por la parte posterior del parásito formando una espícula, rodeada por membrana celular. La pelta es una estructura en forma de collar que refuerza la pared del canal periflagelar en la región anterior del parásito, de donde emergen los flagelos. La parte anterior del axostilo conocida como región capitular se ubica ligeramente arriba de la pelta formando un complejo pelta-axostilo, formado por microtúbulos que parece ser una estructura de soporte para el núcleo. La costa, constituida por proteínas contráctiles, es una estructura fibrilar estriada que se origina en el complejo cinetosomal y se localiza paralelamente por debajo de la membrana ondulante a la cual sirve de apoyo; esta estructura distingue a la familia Trichomonadidae de otras familias clasificadas en el mismo orden. La costa, el axostilo, los flagelos anteriores y el flagelo recurrente participan en el movimiento de los parásitos (Schmidt y Roberts, 1989; Arroyo, 2000).

En lo que se refiere al citoesqueleto de actina, se ha reportado que esta proteína es una de las más abundantes en *T. vaginalis* (Cappuccinelli y col., 1986). El citoesqueleto de actina en otros organismos está involucrado en funciones como el movimiento celular, la citocinesis, la fagocitosis, la adhesión, el transporte vesicular y de organelos, la transducción de señales, la localización de componentes celulares y el establecimiento y mantenimiento de la morfología celular (Alberts y col., 1994). Sin embargo, hay pocos estudios referentes al citoesqueleto de actina en *T. vaginalis*.

2.5.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE ACTINA.

Actina es la proteína más abundante del citoesqueleto, está presente en todas las células eucariontes examinadas hasta el momento y su secuencia de aminoácidos es altamente conservada en la escala filogenética (Kreis y Vale, 1993), lo que sugiere un papel central en procesos celulares importantes. La mayoría de los organismos tienen más de un isotipo de actina, con diferencias en uno o más residuos; en mamíferos por ejemplo, existen por lo menos seis genes de actina, los cuales son expresados de manera tejido-específica.

Actina es una proteína esencial como lo muestra el efecto letal que tiene la delección del gen único para actina en levaduras (Shortle y col., 1982). Asimismo, mutaciones en el gen de actina provocan defectos en músculo o en la organización del citoesqueleto (Drummond y col., 1990) y la expresión intracelular anormal de actina ó de proteínas de unión a actina ha sido recientemente implicada en la transformación celular, en el potencial metastásico y en enfermedades fibróticas. Por otro lado, un citoesqueleto de actina normal es esencial para la propagación de varios organismos infecciosos. La liberación de elementos del citoesqueleto hacia el espacio extracelular pueden contribuir a alergias, a defectos de coagulación y a fibrosis quística (Janmey y Chaponnier, 1995).

La estructura tridimensional de actina se ha obtenido a partir de un complejo formado por actina y DNasa I con una resolución de 2.8 Å. La molécula consiste de dos dominios, cada uno subdividido en dos subdominios; en el espacio que hay entre los dominios de actina se unen una molécula de ATP y un ion de calcio (Kabsch y col., 1990).

Actina es una proteína monomérica (actina G), pero en condiciones fisiológicas forma estructuras filamentosas de doble hélice conocidas como actina

F (10 nm de grosor). Los filamentos de actina se forman por la agregación de monómeros en ambos extremos del filamento. Esta reacción de polimerización se lleva a cabo con distinta velocidad: uno de los extremos (barbed ó +) crece más rápido que el otro (pointed ó -). La polimerización de actina es acompañada por la hidrólisis de una molécula de ATP por cada molécula de actina que se polimeriza (Alberts y col., 1994).

El número de genes de actina es heterogéneo en diferentes organismos. En *Saccharomyces cerevisiae*, *Tetrahymena thermophila* y *Aspergillus nidulans* hay un solo gene; en otros organismos actina está codificada por familias génicas, como por ejemplo en *Dictyostelium discoideum*, *Acanthamoeba castellanii*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, etc. (Nellen y Gallwitz, 1982).

Actina puede formar diversas estructuras y participar en un amplio rango de procesos en células eucariontes. La diversidad de formas que los filamentos de actina pueden adoptar es posible gracias a la asociación de actina con las denominadas proteínas de unión a actina. Algunas de estas proteínas facilitan la organización de los filamentos de actina en estructuras de mayor complejidad, por ejemplo: controlan el ensamblaje de filamentos y su longitud, definen la organización tridimensional y unen los filamentos de actina con otros componentes citoplásmicos y membranales; mientras que otras tienen funciones regulatorias, afectando la dinámica de recambio y permitiendo la reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a determinados estímulos. El estado de polimerización de actina en una célula dependerá temporal y espacialmente del balance dinámico de los efectos debidos a las proteínas accesorias presentes (Hartwig y Kwiatkowski, 1991; Ayscough, 1998).

2.5.4.2. ACTINA EN *Trichomonas vaginalis*.

En 1996 el grupo de Brugerolle (Brugerolle y col., 1996), identificó por medio de electroforesis de doble dimensión que la actina de *Trichomonas vaginalis* se resuelve en cuatro manchas, que corresponden probablemente a cuatro isoformas. Las dos manchas más grandes y más ácidas, tienen el mismo tamaño que la α -actina de músculo esquelético de vertebrados y el punto isoeléctrico estimado para la mancha más ácida es de 5.4. En el mismo artículo se describe que la distribución de actina en este parásito es diferente entre las formas ovoide y ameboide. Por medio de inmunofluorescencia se ha observado que cuando el parásito está en forma ovoide, la actina citoplásmica está distribuida de manera uniforme, mientras que cuando los parásitos están adheridos a un portaobjetos y presentan forma ameboide, además de encontrarse actina en citoplasma, esta se redistribuye hacia los pseudópodos y la región cortical. Estudios de microscopía electrónica de células de *T. vaginalis* adheridas a portaobjetos han mostrado redes de microfilamentos de actina arregladas azarosamente en la zona cortical y haces de microfilamentos ubicados principalmente en los pseudópodos (Brugerolle y col., 1996). Estos datos sugieren que el rearreglo de actina podría tener un papel importante en el cambio de forma de *T. vaginalis* durante el proceso de adhesión a las células de epitelio vaginal, que es una de las primeras etapas en el establecimiento de la parasitosis.

Se ha reportado que actina en *T. vaginalis* está codificada por una familia multigénica de aproximadamente 9 miembros (Bricheux y Brugerolle, 1997), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio. En ese reporte los investigadores aislaron una clona genómica de actina y 4 clonás parciales de cDNA de actina; éstas últimas, no poseen el extremo 5' y la región 3' no traducida es corta y carece de una cola de poliadeninas. La secuencia nucleotídica de las clonas de cDNA de actina presenta entre ellas una identidad que va de 99.2 - 98.6%, (Bricheux y Brugerolle, 1997).

En la primera parte de este trabajo de tesis presentamos la caracterización molecular de una clona genómica de actina y su descripción en un contexto genético.

2.5.5. ASPECTOS MOLECULARES DE *T. vaginalis*.

2.5.5.1. ORGANIZACIÓN GÉNICA.

Estudios realizados acerca de la estructura y expresión de algunos genes de *T. vaginalis* han mostrado que los genes de este organismo no parecen estar arreglados en grupos o "clusters", sino que se encuentran arreglados en unidades de transcripción sencillas. Las secuencias de cDNA estudiadas hasta la fecha son colineares con copias genómicas de los genes correspondientes, revelando la ausencia de "trans-splicing" o de "cis-splicing". Todos los genes reportados hasta el momento carecen de intrones (Liston y Johnson, 1998, datos de nuestro laboratorio).

2.5.5.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

El estudio de la expresión génica en *T. vaginalis* es aún incipiente y se ha enfocado principalmente a la región 5' no traducida, en donde se localizan los elementos promotores de la transcripción.

Hasta el momento solamente una secuencia con actividad promotora de la transcripción se ha caracterizado en *T. vaginalis*. Este elemento rico en pirimidinas, conocido como elemento iniciador (Inr), rodea al sitio de inicio de la transcripción de todos los genes de *T. vaginalis* examinados y se localiza de 6 a 20 nucleótidos río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG). El Inr de

T. vaginalis posee una secuencia altamente conservada: TCA₊₁T/CT/A que comparte un fuerte parecido con el Inr de metazoarios (T/CT/CA₊₁NT/AT/CT/C). El análisis del elemento Inr de *T. vaginalis* ha mostrado que es esencial para la transcripción y es el responsable de definir claramente un sitio para el inicio de la transcripción. No se han encontrado cajas TATA típicas de eucariontes a 25-30 nucleótidos río arriba a los sitios de inicio de la transcripción, ni tampoco en sitios más lejanos (Quon y col., 1994; Liston y Jonson, 1999). Recientemente se ha descrito una proteína de unión al Inr de *T. vaginalis*, denominada IBP39 (39 kDa) que no tiene homología con otras proteínas de eucariontes conocidas (Liston y col., 2001).

Existen otros dos reportes sobre regulación de la transcripción en *T. vaginalis*. El primero describe dos regiones importantes para la transcripción del gen de α -succinil CoA sintetasa (Liston y col., 1999), localizadas río arriba del sitio de inicio de la transcripción (-98 a -84 y -80 a -69) y en el segundo trabajo caracterizaron un elemento de respuesta a hierro en el gen de la adhesina AP65-1, localizado en la posición -110 a -54 relativo al sitio de inicio de la transcripción, el cual puede incrementar de 15 hasta 250 veces la transcripción basal de dicho gen, en respuesta a concentraciones bajas y altas de hierro (Tsai y col., 2002).

La síntesis de los RNAm en *T. vaginalis* parece estar dirigida por una RNA polimerasa II que presenta características diferentes a las RNA polimerasas de eucariontes superiores. Estudios de transcripción *in vitro* han mostrado que la RNA polimerasa II de *T. vaginalis* es resistente a altas concentraciones de α -amanitina (50% inhibición con 250 μ g/ml), a diferencia de lo observado con otras RNA pol II que son inhibidas con 2-20 μ g/ml. Esta resistencia parece deberse a cambios en el sitio probable de unión a α -amanitina encontrados en la subunidad grande de la RNA polimerasa II de *T. vaginalis*. Uno de los hallazgos que apoyan la idea de que la RNA polimerasa II de *T. vaginalis* es responsable de la síntesis del RNAm, es la presencia de un "cap" en los extremos 5' de los mRNAs, lo cual

no sucede típicamente en el proceso de transcripción dirigido por las RNA polimerasas I y III (Liston y Johnson, 1998).

Con respecto al procesamiento de los transcritos de *T. vaginalis*, el proceso de poliadenilación ha sido poco estudiado en este parásito. Algunos reportes han sugerido que los motivos AAUAAA y AAUAA (utilizados en eucariontes superiores) podrían funcionar como señales de poliadenilación en este organismo, debido a que estas secuencias se encontraron en las regiones 3' no traducidas de los genes de ferredoxina y β -succinil coenzima A sintetasa (Johnson y col., 1990; Lahti y col., 1992). Sin embargo, estas propuestas no presentan datos experimentales que las apoyen.

En la segunda parte de este trabajo de tesis nosotros presentamos la caracterización de las regiones 3' no traducidas de 13 genes de *T. vaginalis* y las posibles señales involucradas en la poliadenilación de RNA mensajeros en este parásito.

2.6. PROCESO DE POLIADENILACIÓN EN EUKARIONTES SUPERIORES.

La biosíntesis de los RNA mensajeros (mRNA) de organismos eucariontes es un proceso que requiere de varias etapas de procesamiento. Un paso crítico común en virtualmente todos los transcritos primarios es la generación de extremos 3' maduros y su subsecuente poliadenilación. Las señales de poliadenilación son requeridas para la terminación de la transcripción por la RNA polimerasa II y para la adición de residuos de adenilato en el extremo 3'OH (Whitelaw y Proudfoot, 1986; Proudfoot, 1989; McCracken y col., 1997; Hirose y Manley, 1998). Esta cola de poli(A) es importante en el transporte del mRNA del núcleo al citoplasma (Eckner y col., 1991; Huang y Carmichael, 1996) y en el control de la estabilidad del mRNA (Beelman y Parker, 1995). La elección del sitio

de poliadenilación puede influenciar la expresión génica, como en el caso de las células B, en donde la diferenciación de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en su forma membranal o en su forma secretada, es gobernado en parte a través del uso de sitios alternativos de poliadenilación (Wahle y Kühn, 1997).

El proceso de poliadenilación se lleva a cabo en dos reacciones: en la primera el transcrito es cortado endonucleolíticamente, generándose dos moléculas; en la segunda reacción la parte de la molécula que pertenece al extremo 3' del transcrito es poliadenilada, es decir se agregan de 150 a 200 residuos de adenilato de manera independiente de templado (figura 4).

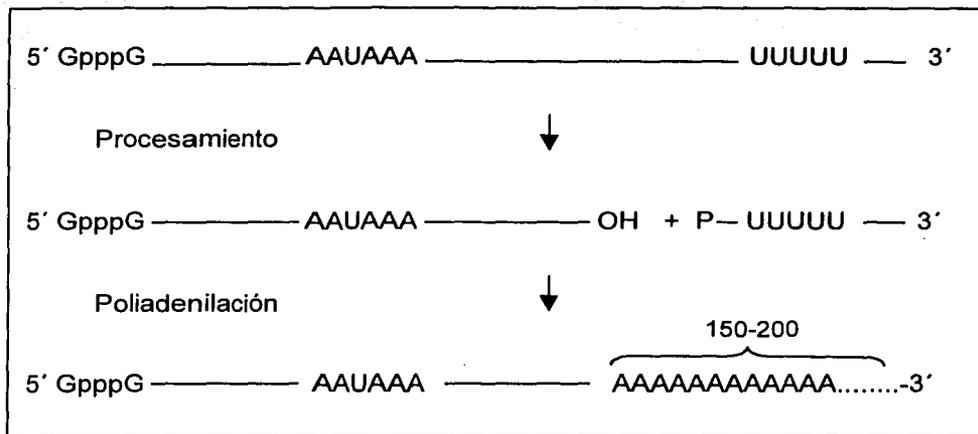


Fig. 4. Esquema del proceso de poliadenilación. En la primera reacción se lleva a cabo un corte endonucleolítico entre la secuencia AAUAAA y el elemento rico en Us conocido como "downstream element" generándose dos fragmentos. Posteriormente, uno de los fragmentos se poliadenila y el otro se degrada (Wahle y Keller, 1996).

2.6.1. SEÑALES DE POLIADENILACIÓN EN MAMÍFEROS.

El hexanucleótido AAUAAA, localizado en la mayoría de los transcritos a una distancia de 10 a 30 nucleótidos río arriba al sitio de procesamiento, es una señal altamente conservada para la poliadenilación en mamíferos y es esencial para el procesamiento de los extremos 3' de los mRNAs. Se ha reportado que la delección del elemento AAUAAA suprime el procesamiento y poliadenilación de transcritos y las mutaciones puntuales en su secuencia reducen en gran medida la eficiencia del procesamiento en el extremo 3' (Sheets, 1990).

Sin embargo, la señal AAUAAA por si sola no es suficiente para inducir el procesamiento y la poliadenilación de transcritos. Un segundo elemento que juega un papel importante en este proceso ha sido denominado elemento "downstream" (DSE) por estar está situado río abajo del sitio de corte de los transcritos, a una distancia no mayor de 30 nucleótidos; su secuencia es pobremente conservada, pero han sido descritos dos tipos de elementos: uno que consiste en una secuencia de por lo menos cuatro o cinco uridinas y otro que es una secuencia rica en GU (Wahle y Kühn, 1997). Se ha visto que en algunos casos solo uno de estos elementos es suficiente para la poliadenilación, sin embargo, también se ha observado que si están presentes los dos tipos de elementos hay un efecto de sinergismo (Gil y Proudfoot, 1987).

La distancia que existe entre la señal AAUAAA y el elemento "downstream" en el transcrito determina una región dentro de la cual puede tener lugar el corte. Dentro de esta región, existe preferencia para cortar en el extremo 3' después de un residuo de A, frecuentemente después del dinucleótido CA, sugiriendo que este podría jugar un papel en la selección del sitio de procesamiento (Chen y col., 1995).

Por otra parte, secuencias denominadas elementos "upstream" (USE) localizadas río arriba de la señal AAUAAA pueden incrementar la eficiencia del procesamiento; estas secuencias son ricas en Us y su mecanismo de acción es todavía controversial (Wahle y Kühn; 1997) (figura 5).

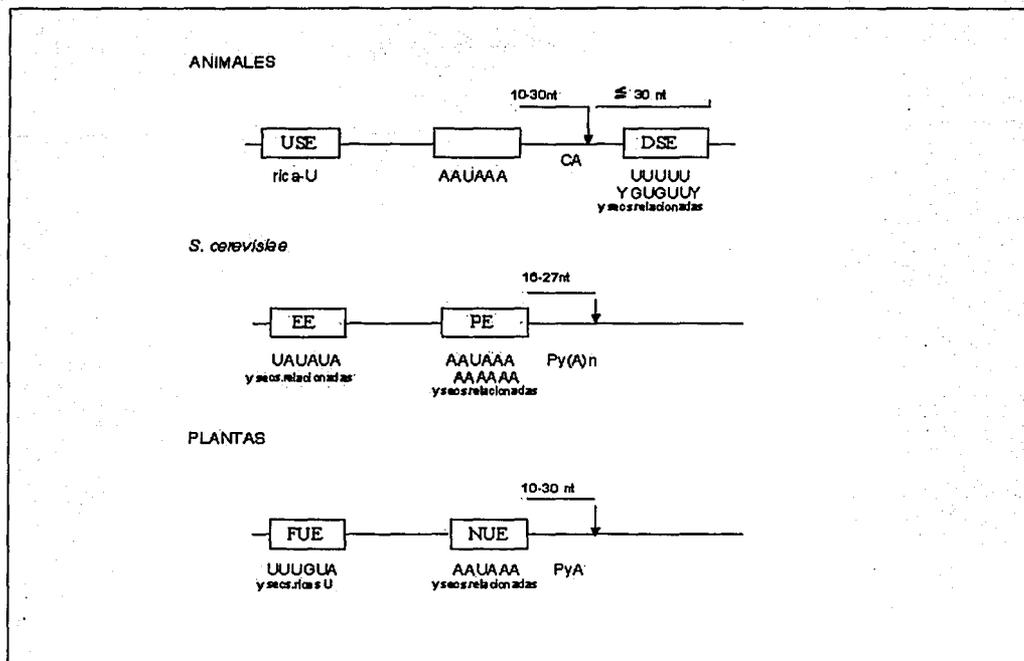


Fig. 5 Comparación de las señales de poliadenilación en animales, levaduras y plantas. Los nombres de los elementos en los recuadros son: USE, "upstream element"; DSE, "downstream element"; EE, "efficiency element"; PE, "positioning element"; FUE, "far-upstream element"; NUE, near-upstream element. Debajo de los recuadros están las secuencias (secs) posibles de cada elemento. La señal de poliadenilación de animales no tiene un nombre particular, probablemente corresponde al elemento PE en levaduras y al elemento NUE en plantas. Las flechas indican los sitios de corte del transcrito, que generalmente es precedido de una pirimidina (Py). (Wahle y Kühn, 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.6.2. FACTORES QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE POLIADENILACIÓN.

El factor específico de corte y poliadenilación (CPSF, "cleavage and polyadenylation specificity factor"), como su nombre lo indica es esencial para el procesamiento y poliadenilación de los pre-mRNA. Este factor está formado por cuatro subunidades de 160, 100, 70 y 30 kDa; la subunidad de 160 kDa es la responsable del reconocimiento del motivo AAUAAA, la función de las subunidades de 100 y 70 kDa se desconoce y la subunidad de 30 kDa no es esencial (Keller y col., 1991).

El factor de estimulación de corte (CstF, "cleavage stimulation factor") es un complejo formado por tres subunidades de 64, 77 y 50 kDa. Este factor se requiere para procesar de manera eficiente los pre-mRNAs y para que se lleve a cabo la poliadenilación. La subunidad de 64 kDa se une a regiones ricas en Us (DSE), localizadas en las regiones río abajo del sitio de corte de pre-mRNA (MacDonald y col., 1994).

Los factores de corte CFI, CFII y la enzima poli(A)polimerasa son también requeridos para el corte endonucleolítico de los transcritos primarios. La enzima poli(A)polimerasa es la enzima que genera la cola de poli(A); su función en la reacción de corte es desconocida pero se sugiere que esta enzima estabiliza al complejo CPSF-RNA. (Wahle y Keller, 1996).

Hasta el momento se desconoce cual polipéptido (entre los muchos componentes del complejo de procesamiento) es el que rompe el enlace fosfodiéster. En la figura 6 se muestra un modelo del complejo de procesamiento propuesto por Wahle y Keller (1996).

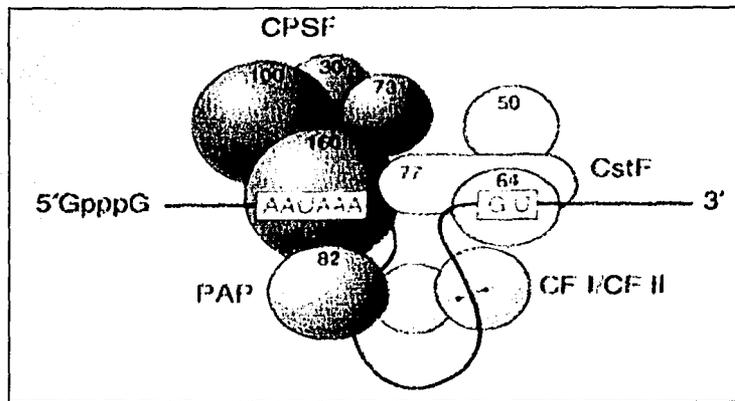


Fig. 6. Modelo del complejo molecular para el procesamiento de pre-mRNAs. Las secuencias que dirigen el procesamiento y la poliadenilación son mostradas en rojo; CPSF, Factor específico de corte y poliadenilación; CstF, Factor de estimulación de corte. Algunas de las interacciones tienen bases experimentales y otras son hipotéticas. La posición de los factores CFI y CFII es especulativa. Se desconoce si la poli(A)polimerasa (PAP) se une al RNA antes de que ocurra el procesamiento (Wahle y Keller, 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.6.3. LA POLIADENILACIÓN ESTÁ ACOPLADA AL PROCESAMIENTO DE TRANSCRITOS.

En las células de mamíferos, cualquier molécula de RNA que ha sido procesada es inmediatamente poliadenilada. Los RNA intermediarios que han sido cortados pero no poliadenilados no se encuentran en niveles detectables. La explicación probable para el acoplamiento de los dos eventos anteriores es la presencia de la poli(A)polimerasa en el complejo de corte: el complejo parece estar diseñado de tal forma que la reacción de rompimiento del enlace fosfodiéster no puede darse si la protección inmediata del nuevo extremo 3' no está garantizada por medio de la adición de poli(A) (Wahle y Keller, 1996).

Cuando el corte endonucleolítico ha ocurrido, los factores CstF, CFI y CFII se vuelven dispensables. El segundo paso de la reacción de poliadenilación depende del CPSF y la poli(A)polimerasa. Además, la proteína II de unión a poli(A) (PAB II, "poly(A) binding protein II") se une al complejo de poliadenilación cuando su sitio de unión, una cola de por lo menos diez residuos de adenilato, ha sido generado incrementado así la procesividad de la reacción. Por lo tanto, CPSF y PAB II juntos, unen la polimerasa al RNA de tal manera que una cola de poli(A) completa es sintetizada en un evento procesivo independiente de templado (Wahle y Keller, 1996) (figura 7).

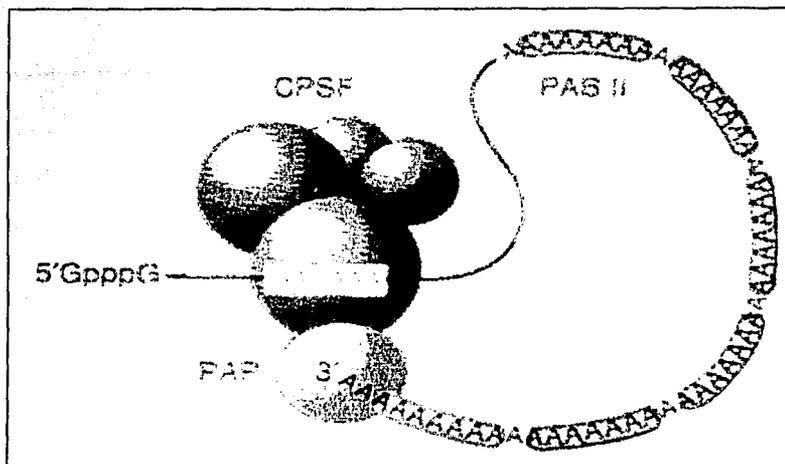


Fig. 7. Modelo del complejo de poliadenilación. Se asume que el factor específico de corte y poliadenilación (CPSF) permanece unido a la secuencia AAUAAA mientras la proteína II de unión a poli(A) (PAB II) se une a la cola de poli(A) en crecimiento. La estructura de la cola de poli(A) como se muestra aquí podría no ser real. La interacción entre la poli(A) polimerasa (PAP) y la subunidad más grande del CPSF ha sido demostrada y se asume que es mantenida durante la extensión de la cola de poli(A). La interacción entre PAP y PAB II es hipotética (Wahle y Keller, 1996).

2.6.4. ESTRUCTURA SECUNDARIA.

Las señales de poliadenilación se presentan generalmente en forma de estructura primaria como una cadena de nucleótidos. Sin embargo, se ha visto que la estructura secundaria del transcrito primario podría estar participando de manera importante en el procesamiento de aquellos transcritos en donde la señal AAUAAA está separada del sitio de corte y poliadenilación por más de 250 nucleótidos, al acercar los elementos AAUAAA y el elemento "downstream". Un ejemplo de este caso es el procesamiento de transcritos del virus de la leucemia de la célula T humana tipo (Brown y col., 1991).

2.7. PROCESO DE POLIADENILACIÓN EN LEVADURAS.

En el proceso de poliadenilación en levaduras se han identificado dos elementos: el primer elemento se denomina elemento de eficiencia (EE, "efficiency element") y está ubicado a una distancia variable, río arriba del sitio de poliadenilación; su secuencia puede ser UAUUAUA o secuencias relacionadas. Múltiples copias de esta secuencia actúan de manera aditiva (Guo y col., 1995; Egli y col., 1995.). El segundo elemento llamado elemento posicionador (PE, "positioning element"), está presente a una distancia de entre 16 y 27 nucleótidos río arriba del sitio de corte endonucleolítico. Una de las secuencias que funcionan como elemento posicionador es AAUAAA. Sin embargo, pueden utilizarse variaciones de esta secuencia sin modificar de manera importante el proceso. Por otra parte, la secuencia T/C(A)_n está presente frecuentemente en el sitio de corte (Wahle y Keller, 1996; Wahle y Kühn, 1997). Recientemente, se ha descrito en levaduras la importancia de secuencias ricas en Us presentes río arriba y río abajo al sitio de corte endonucleolítico que participan en la elección del sitio de procesamiento, con lo que se sugiere que los mecanismos de procesamiento en

esos organismos son similares a los descritos en mamíferos (Dichtl y Keller, 2001).

2.8. PROCESO DE POLIADENILACIÓN EN PLANTAS.

La maduración de extremos 3' de los mRNAs de plantas requiere de dos tipos de elementos: al primero se le ha llamado elemento cercano río arriba (NUE, Near-Upstream element) y está presente a una distancia de aproximadamente 20 nucleótidos río arriba del sitio de corte endonucleolítico. Este elemento puede tener la secuencia AAUAAA, pero también se han descrito motivos relacionados como por ejemplo AAUGGAAAUG. El segundo elemento descrito se denomina elemento lejano río arriba (FUE, far-upstream element) y consiste en secuencias pobremente definidas ricas en Us; está localizado aproximadamente a 100 nucleótidos río arriba del sitio de corte. El corte endonucleolítico se presenta frecuentemente después de una secuencia C/TA y muchos genes utilizan múltiples sitios de corte. Al parecer no son esenciales los elementos situados río abajo al sitio de corte (Wahl y Kühn, 1997).

En la figura 5 se comparan las señales descritas para la poliadenilación de mRNAs en mamíferos, levaduras y plantas.

2.9. PROCESO DE POLIADENILACIÓN EN PROCARIONTES.

En los organismos procariontes, el proceso de poliadenilación de los RNA mensajeros (mRNA) presenta diferencias significativas con el proceso de poliadenilación descrito en eucariontes superiores. Se ha visto que solo una fracción (1-40%) del total de los mRNAs están poliadenilados y no se requiere una secuencia consenso que funcione como señal de poliadenilación. Se ha reportado

que los sitios de poliadenilación son independientes de la secuencia y la estructura secundaria de los transcritos. Estos sitios se han localizado en los extremos 3' de transcritos primarios, en sitios de procesamiento endonucleolítico de las regiones 3' no traducidas, en regiones intercistrónicas y dentro de regiones codificadoras de productos de degradación del mRNA. Las colas de poli(A) en los mRNA son generalmente cortas, agregándose de 14 a 60 residuos de adenilato. El proceso de poliadenilación en procariontes esta implicado en funciones diversas como son promover la degradación de un RNA regulatorio que inhiba la replicación de plásmidos, promover la degradación de mRNA(s) y dar estabilidad al mRNA (Sarkar, 1997).

2.10. PROCESO DE POLIADENILACIÓN EN PROTISTAS.

Los estudios sobre el proceso de poliadenilación en protistas son aun incipientes y esta reacción solo se ha estudiado en algunas especies. Los datos que se tienen hasta el momento sugieren que los protistas no utilizan la señal de poliadenilación descrita en eucariontes superiores (AAUAAA) y se han reportado distintas secuencias que podrian funcionar como señales de poliadenilación en estos organismos (tabla 1).

ESPECIE	MOTIVO	REFERENCIA
<i>Oxytricha fallax</i>	UAAAC	Williams, K.R., 1991.
<i>Entodinium caudatum</i>	AAUAA O AUUAA	McEwan, N.R., 2000.
<i>Stylonychia lamnae</i>	UAAAC	Conzelmann, K.K., 1987
<i>Euplotes raikovi</i>	AACAÁA	Miceli, D., 1989.
<i>Giardia lamblia</i>	AGUPuAA	Que, X., 1996
<i>Entamoeba histolytica</i>	UA ^À /uUU	Urban, B., 1996.
<i>Trypanosoma cruzi</i>	AUSENTE Proceso acoplado a trans-splicing	Teixeira, S.M.R., 1998

Tabla 1. Señales de poliadenilación en protistas.

En la especie *Oxytricha fallax* se ha propuesto la secuencia UAAAC como señal de poliadenilación, lo cual concuerda con los reportes de otros protozoarios ciliados donde se han propuesto pentanucleótidos relacionados (UAAAC, AGAAC y UGAAC) como señales de poliadenilación (Williams y Herrick, 1991).

En el protozoario ciliado *Stylonychia lamnae* la secuencia UAAAC se presenta en posiciones similares en los extremos 3' de los genes de β -tubulina ($\beta 1$ y $\beta 2$), así como también en el gene de α -tubulina, lo cual sugiere que esta secuencia podría estar involucrada en el procesamiento de los RNA mensajeros (Conzelmann y Helftenbein, 1987). En el ciliado *Euplotes raikovi* se ha reportado que en el gen Er-1 (mating pheromone) la secuencia AACAAA podría ser la señal de poliadenilación (Miceli y col., 1989). En *Entodinium caudatum* los mensajeros analizados tienen las secuencias AAUAA o AUUAA entre la posición -35 a -10 río arriba del sitio de procesamiento. Dichas señales son muy semejantes a la señal de poliadenilación descrita para mamíferos (McEwan y col., 2000).

La secuencia AGUPuAA ha sido propuesta como señal de poliadenilación en *Giardia* spp. Esta señal está presente entre 6 y 19 nucleótidos río abajo del codón de terminación y a su vez se encuentra entre 7 y 10 bases río arriba del sitio de corte, a diferencia de eucariontes superiores en donde se encuentra de 10 a 30 nucleótidos río arriba del sitio de procesamiento (Adam,1991). Que y colaboradores (Que y col., 1996) reportaron que los 3' UTRs de dos transcritos de ENC6 son inusualmente largos y utilizan dos señales de poliadenilación: el motivo AGUAAA localizado a 87 y 107 nt río abajo del codón de terminación; en este caso la segunda señal de poliadenilación resultó ser la utilizada con mayor frecuencia. Por otra parte, Svärd y col. (Svärd y col., 1999) observaron que en la subunidad alfa del receptor SR (a signal recognition particle receptor) la señal AGUAAA se sobrelapa con el codón de terminación (UAA) y el sitio de corte se

localiza 9 nt después del mismo, por lo que este transcrito tiene una región 3' no traducida muy corta.

En *Entamoeba histolytica* se ha propuesto el motivo UAAUU como señal de poliadenilación y ha sido identificado en los genes de adenilato cinasa, uridilato cinasa (Sánchez y Müller, 1998) y en la cinasa de proteínas de residuos de serinas y treoninas (Urban y col., 1996).

En los tripanosomatidos (*Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania*) el proceso de poliadenilación no se modula por medio de secuencias consenso como en otros eucariontes, sino por la localización del sitio aceptor de "splicing" (AG) que se encuentra río abajo al sitio de poliadenilación. Esto es, en los tripanosomatidos los procesos de "trans-splicing" y poliadenilación están acoplados (Texeira, 1998., Ullu y col., 1996). En *T. brucei* experimentos con mutantes en donde se deletaron fragmentos de regiones intergénicas han apoyado la importancia de estas regiones en la regulación del "trans-splicing" y la poliadenilación. La presencia de una secuencia rica en polipirimidinas es también crucial, ya que solo el dinucleótido AG situado río abajo de una secuencia rica en polipirimidinas puede ser usado como sitio aceptor de "splicing" (Schurch y col., 1994). Por lo tanto, la secuencia rica en polipirimidinas dirige la poliadenilación río arriba y el "trans-splicing" río abajo, llevándose a cabo primero la reacción de "trans-splicing".

En *T. vaginalis* como lo habíamos mencionado anteriormente, se ha propuesto que los motivos AAUAAA y AAUAA (utilizadas en eucariontes superiores) podrían funcionar como señales de poliadenilación en este organismo, debido a que estas secuencias se encontraron en las regiones 3' no traducidas en los genes de ferredoxina y β -succinil coenzima A sintetasa (Johnson y col., 1990; Lahti y col., 1992). Sin embargo, estas propuestas no presentan datos experimentales que las apoyen.

En este trabajo se presentan los resultados de estudios moleculares realizados en *T. vaginalis*, enfocados fundamentalmente en dos aspectos: por una parte en el artículo "Differences between coding and non-coding regions in the *Trichomonas vaginalis* genome: an actin gene as a locus model" [Acta Tropica. 78 (2001) 147-154], se presenta la organización de un fragmento genómico de 3.5 kb de *T. vaginalis* que contiene tres marcos de lectura abiertos, incluyendo uno de los genes de actina. Se analiza la distribución de las regiones codificadoras y no codificadoras, así como la variación en el contenido de bases de estas regiones. Debido a la marcada diferencia en el contenido de bases de estas regiones (49% vs 29%, ej. ORF de actina y regiones intergénicas adyacentes) se propone que este tipo de análisis es una herramienta valiosa para identificar posibles regiones codificadoras en este parásito. Por otra parte en el trabajo: "Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs" [Gene. 289 (2002) 81-86], se analizan de manera detallada por primera vez en la literatura las señales involucradas en el proceso de poliadenilación en *T. vaginalis*. Se estudian las regiones 3' no traducidas tanto de 10 cDNAs de actina como de otros siete cDNAs de *T. vaginalis*. Se sugieren tres motivos que podrían participar en el proceso de poliadenilación en este organismo: a) se propone el motivo UAAA como la señal de poliadenilación en este parásito, en donde el codón de terminación de la traducción (UAA) está casi siempre involucrado; b) una secuencia novedosa $Py^1(A)_{0-3}AAUU$ que marca el sitio de procesamiento del transcrito, situada río abajo y adyacente al sitio de corte y poliadenilación y c) se propone también la presencia de una secuencia rica en Us que se localiza río abajo del sitio de corte. Se propone que en *T. vaginalis* el motivo UAAA se seleccionó evolutivamente para señalar tanto el fin de la traducción como el procesamiento de transcritos en el extremo 3', acoplando así los dos procesos en este organismo de evolución temprana.

3. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

El estudio molecular del sistema génico de actina y de sus transcritos en *Trichomonas vaginalis*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar el número de genes que codifican para actina en *T. vaginalis*.
2. Estudiar la organización génica de *T. vaginalis* utilizando como modelo una clona genómica de actina.
3. Caracterizar la región 3' no traducida de los transcritos de actina de *T. vaginalis* y determinar las señales involucradas en el proceso de poliadenilación.

4. METODOLOGÍA.

4.1. CULTIVO DE *Trichomonas vaginalis*.

En la realización de esta investigación se utilizó el aislado CNCD147 de *Trichomonas vaginalis*, donado amablemente a nuestro laboratorio por la Dra. Rossana Arroyo Verástegui del Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN.

Los parásitos se cultivan en tubos de vidrio de 10 ml con tapa de rosca a 37 °C, en medio TYM ("trypticase-yeast extract-maltose") (Apéndice A), suplementado con 10% de suero de caballo (GIBCO) previamente inactivado a 56 °C por 30 min. Para el mantenimiento del parásito se realizan subcultivos cada 2 días, tomando como inóculo inicial 0.5×10^5 parásitos por ml.

4.2. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.

Los cultivos de 50 ml *T. vaginalis* crecidos en cajas de cultivo marca Nunc de 75 cm², se cosechan en fase logarítmica por medio de centrifugación a 3,000 rpm durante 10 min a 4 °C, y se lavan en dos ocasiones con 20 ml de PBS (pH 7.4). El botón celular se resuspende en 2 ml de PBS y se transfiere a 2 tubos Eppendorf de 1.5 ml; posteriormente se agregan a cada tubo 300 µl de amortiguador de lisis (0.2% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH = 8) y 300 µl de fenol, se agita suavemente en vortex por 30 seg y se centrifuga a 14,000 rpm durante 3 min en microcentrifuga. Se toma la fase superior cuidadosamente, sin tomar la interfase, se coloca en un tubo Eppendorf con 300 µl de fenol y 300 µl de cloroformo, se agita y centrifuga de la misma forma que en el paso anterior. Se coloca la fase superior en un tubo Eppendorf

con 500 µl de cloroformo, se agita y se centrifuga. Se coloca la fase superior en otro tubo Eppendorf limpio y el DNA se precipita con 1 ml de etanol absoluto y 40 µl de acetato de sodio 3 M (2½ veces de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3 M), a -20 °C durante 2 h y se centrifuga a 14,000 rpm durante 15 min para obtener el DNA. Se retira el sobrenadante y el botón de DNA se lava con 1 ml de etanol al 70% frío, se retira el etanol y se seca el botón de DNA, el cual se resuspende en 50 µl de amortiguador TE (Tris 10 mM, EDTA 0.2 mM). Finalmente, se agrega 0.5 µl de RNAsa (2 mg/ml) y se incuba a 37 °C durante 30 min. El DNA se almacena a -20 °C. Esta metodología esta basada en la descrita por Chou y Tai (Chou y Tai, 1996), pero con modificación en el amortiguador de lisis.

4.3. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.

La extracción de RNA total se realizó de acuerdo al protocolo recomendado para la utilización del reactivo TRIzol (GIBCO BRL). Esta metodología fue seleccionada después de que se comparó con dos técnicas distintas y se observó que el RNA obtenido con TRIzol es de buena calidad.

A partir de cultivos de *T. vaginalis* en fase logarítmica, se toman 8×10^6 parásitos totales y se cosechan por centrifugación a 3,000 rpm durante 10 min a 4 °C; el botón formado se lava con 1 ml de PBS/DEPC estéril y se transfiere a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se centrifuga 1 min a 4 °C, se deshecha la solución de lavado y se resuspende en 1 ml de TRIzol (GIBCO BRL), lisando las células por medio de pipeteo repetitivo. A continuación se incuba la muestra durante 5 min a temperatura ambiente, se agregan 0.2 ml de cloroformo y se mezcla invirtiendo el tubo durante 15 seg; el tubo se incuba durante 3 min a temperatura ambiente y luego se centrifuga a 14000 rpm durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, se transfiere la fase acuosa (fase superior, incolora) a un tubo limpio y el RNA se precipita con 0.5 ml de alcohol isopropílico, a temperatura ambiente durante 10

min. La muestra se centrifuga a 14,000 rpm durante 10 min a 4 °C, se elimina el sobrenadante, se lava el botón de RNA con 1 ml de etanol al 75%, se centrifuga a 10,000 rpm durante 5 min a 4 °C. Finalmente, se seca el botón de RNA, dejando el tubo abierto y ya seco se disuelve en agua bidestilada tratada con DEPC. Para facilitar la resuspensión el tubo con RNA se incubaba a 55 °C durante 10 min.

4.4. OBTENCIÓN DE RNA POLI A+.

El RNA poli A+ se aisló a partir de RNA total de *T. vaginalis* utilizando el estuche "Poly(A) quick mRNA isolation" (Stratagene), que emplea una columna de oligo d(T)-sefarosa. Al RNA total se mezcla con amortiguador de muestra 10 X (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA y 5 M NaCl), para llevarlo a una concentración final 1 X. La columna se lava dos veces con 200 µl de amortiguador de alta sal (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA y 0.5 M NaCl), procurando que la velocidad de salida del líquido de la columna sea de 1 gota cada 2 seg. Después se aplica el RNA a la columna y se recupera en un tubo Eppendorf a la velocidad mencionada, se vuelve a pasar la muestra recuperada con el RNA para asegurar que todo el RNA mensajero (mRNA) se pegue a la resina y se colecta en un tubo Eppendorf limpio para análisis (tubo 1). Posteriormente, se lava la columna en 2 ocasiones con 200 µl de amortiguador de alta sal, a una velocidad de salida de 1 gota por seg y se colecta el lavado (tubo 2). Nuevamente, se lava la columna en tres ocasiones con 200 µl de amortiguador de baja sal (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA y 0.1 M NaCl) y el amortiguador de lavado se colecta en un tubo limpio (tubo 3). Se procede a eluir el RNA poli A+ con 200 µl de amortiguador de elusión (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) precalentado a 65 °C, que se colecta en un tubo limpio (tubo M1); este paso se repite dos veces para asegurarse de que todo el mRNA se eluya (tubos M2 y M3). Finalmente, el RNA poli A+ se cuantifica por medio de espectrofotometría y se congelan las muestras a -80 °C.

4.5. OBTENCIÓN DE DNA DE PLÁSMIDOS.

Se toma con un palillo estéril una colonia de las bacterias transformantes, se coloca en tubos de vidrio estériles con tapa, que contienen 3 ml de medio LB con el antibiótico apropiado y se incuban a 37 °C durante toda la noche con agitación (5,000 rpm). Se transfieren las bacterias crecidas a tubos Eppendorf de 1.5 ml, se centrifuga a 12,000 rpm durante 30 seg, se retira el sobrenadante y se coloca el cultivo restante en el mismo tubo y se vuelve a centrifugar en la misma forma. Se retira el sobrenadante, el botón celular se resuspende con agitación en vortex, se agregan 100 µl de solución I fría (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) y se vortexea nuevamente. Se agregan 200 µl de solución II fresca (0.2 N NaOH, 1% SDS), se mezcla el contenido invirtiendo el tubo en 5 ocasiones y se incuba en hielo durante 5 min. Se agregan 150 µl de solución III fría (6 ml de acetato de potasio 5 M, 1.1 ml de ácido acético glacial y 2.85 ml de agua bidestilada estéril), se vortexea suavemente y se incuba en hielo durante 5 min. Después se centrifuga a 12,000 rpm durante 5 min, se transfiere el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio y se agregan 250 µl de fenol y 250 µl de cloroformo, se vortexea, se centrifuga a 12,000 durante 2 min. Se transfiere la fase superior, sin tomar la interfase, a un tubo limpio y se agregan 500 µl de cloroformo, se vortexea y se centrifuga igual que en el paso anterior. Se transfiere nuevamente la fase superior a un tubo limpio y el DNA se precipita con 1 ml de etanol absoluto, se vortexea y se deja a temperatura ambiente durante 10 min. Por último se centrifuga a 12,000 rpm durante 5 min, se retira el sobrenadante y se lava el botón de DNA con etanol al 70% frío, se vuelve a centrifugar, se retira la solución de lavado y el botón de DNA se seca al aire durante 5 min. El DNA plasmídico se resuspende en 50 µl de amortiguador TE con RNAsa (20 µg/ml), se incuba a 37 °C durante 30 min y se guarda a -20 °C.

4.6. PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.

Las células de *Escherichia coli* JM109 se mantienen a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en glicerol. Para utilizarse en el laboratorio se estria una asada de bacterias provenientes de glicerol en una caja con medio LB y se incuba durante la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. En un matraz de 2 lt con 250 ml de medio SOB (Apéndice B) se inoculan de 10 a 12 colonias de bacterias, se incuba a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación moderada (250 rpm) hasta que alcancen una densidad óptica de 0.6 (600 nm). El tiempo puede variar entre 20 a 22 h. Se separa el cultivo en dos botellas para centrifuga de 250 ml y se centrifuga en el rotor GSA a 4,000 rpm durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, en una centrifuga Sorvall. Se decanta el sobrenadante y se resuspende la pastilla en 80 ml de TBS (Apéndice B), agitando suavemente con movimientos circulares en hielo. Se centrifuga en la misma forma antes mencionada y se decanta el sobrenadante. Se agrega a la pastilla 18.6 ml de TBS frío y 1.4 ml de DMSO y se resuspende agitando suavemente con movimientos circulares en hielo. Las células se guardan en alícuotas de 200 μl en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se incuban 20 min en hielo y se congelan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizadas.

4.7. PREPARACIÓN DE BACTERIAS PARA ELECTROPORACIÓN.

Las células se descongelan y se crecen en cajas de Petri como en el inciso anterior. En un matraz de 500 ml, con 50 ml de medio SOB sin Mg^{2+} (Apéndice B), se inoculan 5 colonias de bacterias crecidas el día anterior en la caja Petri, se incuba durante toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación continua. En un matraz de 2.8 lt con 500 ml de medio SOB sin Mg^{2+} inocular 0.5 ml del cultivo de toda la noche, incuban a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 2 a 3 h con agitación vigorosa, hasta que el cultivo alcance una densidad óptica de 0.8 (550 nm). Se separa el cultivo en dos botellas para centrifuga de 250 ml, se centrifuga en un rotor GSA a 5,000 rpm durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, en una centrifuga Sorvall. Se resuspende la pastilla en 500 ml de solución

WB estéril frío (10% glicerol ultrapuro y 90% agua bidestilada). Se centrifuga como se describió en el paso anterior y se realiza un segundo lavado en la misma forma. Se resuspende la pastilla en 2 ml de solución WB fría, para que las bacterias queden a una densidad óptica aproximada de entre 200 y 250 a 550 nm. Se alicuotan 200 µl de las bacterias en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se incuban 20 min en hielo y se guardan en congelación a -80°C hasta ser utilizadas.

4.8. "SOUTHERN BLOT" GENÓMICO DE *T. vaginalis*.

Se digirieron 3 µg de DNA genómico de *T. vaginalis* con las enzimas de restricción *EcoRI*, *PstI* y una doble digestión *EcoRI* y *PstI*, se utilizaron 20 u de enzima (10u/µl) por reacción y se incubó a 37°C durante toda la noche. El DNA se precipitó con 1/10 de vol de acetato de sodio 3 M y 2.5 vol de etanol absoluto y se dejaron a -20°C durante 3 h. Enseguida, se lavó la pastilla con etanol al 70% frío, se dejó secar y se resuspendió en 10 µl de TE. Para la doble digestión, primero se digirió el DNA con la enzima *PstI*, después se extrajo la enzima con fenol, fenol-cloroformo y cloroformo, el DNA se precipitó con 1/10 de vol de acetato de sodio 3 M y 2.5 vol de etanol absoluto. La segunda digestión con la enzima *EcoRI*, se realizó a continuación bajo las mismas condiciones arriba mencionadas y al final se resuspendió el DNA en 10 µl de amortiguador TE. Antes de colocar las digestiones en el gel, se agregó amortiguador de muestra (amortiguador TAE 5 X, glicerol al 50%, azul de bromofenol y xilen-cianol) a los tubos y se incubaron durante 15 min a 56°C y 15 min a 4°C .

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% de 11 x 14 cm y 6 mm de grosor, se colocaron las muestras de DNA sin digerir y digerido, se corrió el gel con amortiguador TAE 1 X a 17 volts durante 16 h. Después, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió. Posteriormente, se preparó el gel para transferir el DNA a una membrana de nylon (Zetaprobe, BioRad) de acuerdo con la técnica

descrita por Southern (Southern, 1975). Primero se incubó el gel en dos ocasiones con 250 ml de HCl 0.25 N durante 7 min, después se incubó el gel en 250 ml de solución desnaturalizante (43.83 g de NaCl, 25 ml NaOH 10 N en un vol final de 500 ml) durante 15 min (2 veces), finalmente se incubó el gel en 250 ml de solución de neutralización (125 ml de Tris/HCL 2 M pH=7.5, 87.66 g de NaCl, en un vol final de 500 ml) durante 30 minutos (2 veces). El gel se transfirió durante toda la noche utilizando la solución de transferencia (1 M Acetato de amonio, 1 M hidróxido de amonio y 0.02 N hidróxido de sodio) recomendada por Rigaud (Rigaud y col., 1987). Después de la transferencia, la membrana se lavó con 2 X SSC durante 10 min, se dejó secar al aire durante 1 h y se horneó durante 2 h a 80 °C en un horno de vacío.

Posteriormente, la membrana se prehibridó durante 2 h a 37 °C con 10 ml de solución de prehibridación (50% (v/v) formamida, 5 X SSC, 50 mM Tris pH 7.4, 5 X solución de Denhard's, 1% (wt/vol) SDS). Enseguida, se hibridó con una sonda heteróloga obtenida de la clona de actina AA3 de *Acanthamoeba castellanii* (Nellen y Gallwitz, 1982). La hibridación se realizó durante 17 h a 37 °C.

Las membranas se lavaron dos veces con 2 X SSC, 0.5% SDS a temperatura ambiente, durante 15 min c/u, dos veces con 2 X SSC, 0.5% SDS a 37 °C durante 30 min c/u y una vez con 0.2 X SSC, 0.2% SDS durante 30 min a 42 °C, se hicieron exposiciones entre los diferentes lavados, utilizando película Kodak X-Omat.

4.9. CLONACIÓN DE FRAGMENTOS GENÓMICOS *EcoRI* - *PstI* DE *T. vaginalis*.

Para la clonación de fragmentos genómicos de *T. vaginalis* se utilizó el vector pUC18 digerido con las enzimas *EcoRI* y *PstI*. El DNA genómico de

T. vaginalis, se digirió utilizando 15 u de enzima por μg de DNA; primero se digirió con la enzima *Pst*I y posteriormente con la enzima *Eco*RI. El DNA se extrajo con fenol-cloroformo entre los dos pasos de digestión, se precipitó con etanol-acetato de sodio y se resuspendió en un vol final de 20 μl de amortiguador TE. El DNA genómico se ligó con el vector en las siguientes condiciones: 100 ng de vector con extremos *Eco*RI/*Pst* I, 100 ng de DNA de *T. vaginalis* con extremos *Eco*RI - *Pst*I, 4 μl de amortiguador de ligasa 5 X, 11.65 μl de agua bidestilada estéril, 1 μl de enzima T4 DNA ligasa (1u/ μl , Gibco BRL), 1 μl de 10 mM ATP (Gibco BRL), en un vol final de 20 μl . Para la ligación control se pusieron los mismos reactivos con excepción del DNA de *T. vaginalis*. Las reacciones anteriores se incubaron a 14 °C durante 17 h. Con estas ligaciones se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa JM109 (inciso 4.6.) como se describe a continuación: descongelar dos tubos Eppendorf de 1.5 ml, que contienen 200 μl de bacterias competentes colocando los tubos en hielo, agregar 10 μl de la reacción de ligación a los tubos con células competentes (ligación control y problema), incubar los tubos a 4 °C durante 30 min, realizar un choque térmico a las bacterias incubando los tubos a 42 °C durante 2 min, después colocarlos en hielo. Agregar 800 μl de medio SOC (Apéndice B) e incubar a 37 °C durante 45 min. Sembrar las bacterias transformadas con la ligación problema en 20 cajas Petri de LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), poniendo 50 μl de bacterias por caja (1/20) y sembrar 50 μl de bacterias transformadas con la ligación control en una caja Petri. Por último, incubar las cajas Petri a 37 °C durante toda la noche. Se obtuvieron un total de 56,000 colonias transformantes.

Para identificar aquellas colonias que tuvieran insertos relacionados con actina se hizo una hibridación en colonia como se describe a continuación: las colonias crecidas en las 20 cajas fueron transferidas a membranas de nylon Hybond-N (Amersham), las membranas se trataron sucesivamente con las siguientes soluciones: 1) SDS 10%; 2) 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl; 3) 0.5 M Tris pH 7.4, 1.5 M NaCl; 4) 0.5 M Tris pH 7.4, 1.5 M NaCl y 5) 2 X SSC. Para el paso

anterior, se prepararon 5 cajas Petri con papel filtro, en el cual se agregó un poco de cada solución (suficiente para saturar el papel filtro) y después se fueron colocando las membranas de nylon encima del papel filtro sin que la solución tapara la membrana (con las colonias hacia arriba). Las membranas se dejaron 5 min en cada solución. Al final del proceso, las membranas se secaron al aire y se hornearon a 80 °C en horno de vacío durante 2 h para fijar el DNA. A continuación, las membranas se lavaron con solución de lavado (5 X SSC, 0.5% SDS y 1 mM EDTA) para quitar los restos celulares. Posteriormente, las membranas se colocaron en dos tubos de hibridación, 10 membranas por tubo, en solución de prehibridación (50% (v/v) formamida, 5 X SSC, 50 mM Tris pH 7.4, 5 X solución de Denhard's, 1% SDS) durante 2 h a 37 °C en el aparato "Hybridization oven/shaker" (Amersham). Las membranas se hibridaron con una sonda heteróloga para actina (clona AA3 de actina de *Acanthamoeba castellanii*, (Nellen y Gallwitz, 1982) durante 17 h a 37 °C. Enseguida, las membranas se lavaron 3 veces durante 20 min cada vez, en una solución de 0.5 X SSC, 1% SDS, a temperatura ambiente y se expusieron en películas Kodak. Después de revelar las autorradiografías se identificaron las señales positivas y se seleccionaron las colonias positivas en las cajas Petri. Con las colonias positivas se realizaron otras dos rondas de selección de la forma descrita, hasta obtener clones positivos individuales.

4.10. SECUENCIACIÓN.

La secuenciación del fragmento genómico de *T. vaginalis* con un tamaño de 3489 pb, se hizo en nuestro laboratorio utilizando la técnica descrita por Sanger (Sanger y col., 1977), con la adaptación de Murphy and Kavanagh para secuenciar templados de doble cadena (Murphy y Kavanagh, 1988). Se utilizó el estuche "Sequenase versión 2.0 DNA Sequencing Kit" (USB). El fragmento secuenciado contiene la región codificadora para un gen de actina, las dos regiones intergénicas adyacentes a este gen y dos marcos de lectura abiertos

incompletos. El fragmento se secuenció completamente en ambas cadenas con los 19 oligonucleótidos que se enlistan en la tabla 2.

En un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se colocan 10 μ l de DNA del plásmido pACTINA2 (300 ng/ μ l aprox.), 2.5 μ l de solución desnaturalizante (1 M NaOH, 1 mM EDTA) y 2.5 μ l de agua bidestilada estéril y se incuban a 37 °C durante 15 min. Mientras transcurre la incubación se prepara una columna neutralizadora, de la siguiente manera: a un tubo Eppendorf de 0.5 ml se le hace un orificio en la parte inferior y se le ponen perlas de vidrio Sigma estériles, al tubo se agregan 750 μ l aprox. de sepharosa CL6B (Farmacia) y se centrifuga 3,000 rpm durante 3 min dentro de un tubo Eppendorf de 2 ml. Se cambia el tubo donde se recibe la muestra, poniendo un tubo Eppendorf limpio de 1.5 ml, enseguida se agrega la muestra de DNA desnaturalizado a la columna y se centrifuga en las mismas condiciones. Posteriormente, se procede al acoplamiento del DNA con el oligonucleótido: en un tubo Eppendorf limpio se colocan 8 μ l de DNA neutralizado (recuperado de la columna), 1 μ l de oligonucleótido (10 μ g/ml) y 2 μ l de amortiguador de Sequenasa 5 X y se incuba a 37 °C durante 15 min. Mientras tanto, en un tubo Eppendorf de 1.5 ml se prepara una mezcla que contiene 5.6 μ l de amortiguador TE, 1.1 μ l de 0.1 M DTT, 0.45 μ l de mezcla de marcaje (dGTP), 0.3 μ l de la enzima Sequenase, 0.5 μ l de 35 S dATP (Amersham Farmacia) y 1 μ l de amortiguador de dilución de la enzima. En una cajita para secuencia (Nunclon) se alicuotan 2.5 μ l de las mezclas de terminación ddNTPs (ddA, ddC, ddG, ddT), en cada pozo por separado y se incuba a 37 °C. Por otra parte, a los tubos que contienen el DNA y el oligonucleótido acoplados, se agregan 8 μ l de la mezcla que contiene la enzima Sequenasa y el 35 S dATP para que inicie la reacción de marcaje y se incuba a temperatura ambiente durante 3 min. Para la extensión de la síntesis de las cadenas de DNA se ponen 4 μ l de la reacción anterior en cada pozo de la cajita de secuenciación (ddA, ddC, ddG, ddT) y se incuba a 37 °C durante 3 min. Finalmente, la reacción se detiene con 4 μ l de la solución de terminación en cada uno de los pozos y se coloca la caja en hielo si el gel de

secuenciación se va a correr el mismo día, ó se guarda la caja de secuenciación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes de colocar las muestras en el gel de acrilamida-urea, se desnaturalizan colocándolas sobre un termoblock a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 2 min y después se coloca inmediatamente sobre hielo.

Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de acrilamida-urea 6% (Apéndice C) y amortiguador TBE 1 X a 60 watts. Se utilizó un aparato de secuenciación Modelo S2, (Life Technologies, GIBCO, BRL). Las muestras ($2.5\text{ }\mu\text{l}$) se colocaron en el gel en tiempos de corridas de 2, 4, 6 y 8 h. El gel se secó en el aparato Savant GDS100 "Gel Drying System" (Amersham) y se expuso durante un día en un cassette con película Kodak.

NOMBRE DEL OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO	T_m 50 mM Na⁺
ACT10	GGA CGG CCG ACA ACG GAT G	52
ACT11	CAA TTT TCA AGG GAC AAT	36
ACT13	CCA ATA TTC TGA CAT TCG	38
ACT14	AAG TAT GGC TTG AAG AGC	41
ACT15	AGC ATA TGC CGA CAC ATC	43
ACT16	TAT CAA GGT TGT CGA AGC	41
ACT20	CTC GCT ACA TTC CCA CAG	45
ACT22	TTT ATA GTA AGT TAA TCA	29
ACT23	CCT CAT GTT CGA CAC ATT	41
ACT24	AGA AGG CCG CTA CAG ACT	45
ACT26	TGC ACA ATA TCC TAC GGA	41
ACT27	CAG AAT ATG TCA GGC ACT	41
ACT28	TGA TGT CTG ATG TGA AAT	36
ACT112	AGA TCT GAC GAC TCT AGC	43
M13Forward	CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG	52
M13Reverse	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG	48
TVACTIN3'	TTG CGG TGA ACG ATG GAT GGG	51
TVACTIN5'	ATA ACG GCT CTG GTA TGT GCA	47

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para secuenciar el fragmento genómico de *T. vaginalis*.

4.11. "NORTHERN BLOT".

El estudio de los transcritos de actina de *T. vaginalis* se realizó mediante la técnica de "Northern blot", utilizando RNA total, RNA poli A+ y RNA poli A- de *T. vaginalis*. El RNA se separó de acuerdo a su peso molecular en un gel desnaturante de agarosa con formaldehído al 1.75 % (wt/vol), (Apéndice D). Las muestras de RNA se prepararon como se describe a continuación: RNA TOTAL: 5 µg de RNA (1 µl), 2.5 µl de agua bidestilada tratada con DEPC, 1.55 µl de MOPS 5 X, 2.72 µl de formaldehído y 6.8 µl de formamida.

RNA poli A-: 5 µg de RNA (2 µl), 1.5 µl de agua bidestilada tratada con DEPC, 1.55 µl de MOPS 5 X, 2.72 µl de formaldehído y 6.8 µl de formamida.

RNA poli A+: 500 ng de RNA (5 µl), 1.5 µl de agua bidestilada tratada con DEPC, 2.17 µl de MOPS 5 X, 3.8 µl de formaldehído y 9.52 µl de formamida.

Las muestras de RNA y los marcadores de bajo y alto peso molecular (0.16-1.77 kb RNA Ladder y 0.24-9.5 kb RNA ladder, GIBCO) se incuban durante 15 min a 65 °C y se pasan a hielo. Después se les agrega 4.5 µl de amortiguador de muestra 6 X para RNA (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilen-cianol, 30% glicerol, 1.2% SDS y 60 mM de fosfato de sodio pH 6.8) y se cargan en el gel. La electroforesis se llevó a cabo durante 3 h a 80 volts. A continuación se cortó la sección del gel teñida con bromuro de etidio y la sección restante del gel se transfirió a una membrana de nylon (nytran, Schleicher & Schuell) durante toda la noche con una solución de SSC 10 X. Después de la transferencia, la membrana se dejó secar al aire durante 1 h y se horneó durante 2 h a 80 °C en un horno de vacío.

Posteriormente, la membrana se prehibridó durante 2 h a 42 °C con 10 ml de solución de prehibridación [50% (v/v) formamida, 5 X SSC, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 X solución de Denhard's, 1% (wt/vol) SDS]. Enseguida, la membrana se hibridó con una sonda homóloga de actina. La hibridación se realizó durante 20

h a 42 °C. A continuación, la membrana se lavó dos veces con 2 X SSC, 0.5% SDS a temperatura ambiente, durante 15 min c/u, dos veces con 2 X SSC, 0.5% SDS a 37 °C durante 30 min c/u y una vez con 2 X SSC, 0.5% SDS durante 30 min a 42 °C. Se hicieron exposiciones entre los diferentes lavados, utilizando película Kodak.

Para el estudio de la expresión del gen similar a adenilato ciclasa, se realizó otro "Northern blot" con RNA total de *T. vaginalis*, en la misma forma antes descrita. La membrana se hibridó con una sonda homóloga obtenida por medio de PCR utilizando el oligonucleotido M13 Forward (Gibco BRL) y el oligonucleotido 5'-TATCAAGGTTGTCGAAGC-3' correspondiente a la región 379-396 de la clona genómica de 3.5. Kb de *T. vaginalis*, que en este trabajo describiremos. Las condiciones de prehibridación e hibridación fueron semejantes al "Northern blot" de actina, pero en esta ocasión, la membrana se lavó una vez con 2 X SSC, 0.5% SDS a temperatura ambiente, durante 15 min, y dos veces con 2 X SSC, 0.5% SDS a 37 °C durante 15 min c/u. También se hicieron exposiciones entre los diferentes lavados, utilizando película Kodak.

Un tercer "Northern blot" con RNA total de *T. vaginalis*, preparado en condiciones similares a las mencionadas anteriormente, se hibridó con una sonda homóloga perteneciente al fragmento genómico similar a la proteína hipotética YER082c de *S. cerevisiae*. Se utilizaron los oligonucleótidos M13 Reverse (Gibco BRL) y 5'-TTTATAGTAAGTTAATCA-3' correspondiente a la posición 3076-3093 de la clona genómica de *T. vaginalis* para amplificar la sonda mediante PCR. Las condiciones de lavado fueron similares a lo descrito en el párrafo anterior.

4.12. AMPLIFICACIÓN RÁPIDA DE EXTREMOS 3' (3' RACE).

La técnica de 3' RACE incluye los procesos de: a) síntesis de cDNA a partir de RNA poli A+ de *T. vaginalis*, b) amplificación por medio de PCR del gen a

estudiar utilizando como templado el cDNA sintetizado y c) clonación del producto de PCR purificado, que a continuación detallamos por separado.

a) SÍNTESIS DE cDNA DE *T. vaginalis*. Se realizó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, al que se agregó 1 µl (500 ng) de RNA poli A+ de *T. vaginalis*, 1 µl (10 picomoles) del oligonucleótido AP (adapter primer) 5'-GGCCACGCGTCTGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' y 10 µl de agua bidestilada tratada con DEPC, se incubó a 70 °C durante 10 min y se pasó a hielo durante 1 min. Después se agregaron 2 µl de amortiguador 10 X Expand HF (Boehringer Mannheim), 1 µl de dNTPs 10 mM (Gibco BRL), 2 µl de MgCl₂ 25 mM (Boehringer Mannheim) y 2 µl de DTT 0.1 M (Amersham Life Science), se mezcló y se preincubó durante 5 min a 42 °C, después se adicionó 1 µl de enzima transcriptasa reversa (200 u/µl, Superscript II BRL) y se incubó durante 50 min a 42 °C, se inactivó la enzima incubando durante 15 min a 70 °C. Posteriormente, se agregó 1 µl de RNasa H (1.5 u/µl, Stratagene) y se incubó a 37 °C durante 10 min para degradar el RNA.

b) AMPLIFICACIÓN DE LOS EXTREMOS 3' DE cDNAs DE ACTINA POR MEDIO DE PCR.

Primera amplificación con el oligonucleótido específico ACT23. En un tubo Eppendorf de 0.5 ml para PCR se colocaron, 2 µl de cDNA de *T. vaginalis*, 5 µl amortiguador Expand HF 10 X, 3 µl de dNTPs 10 mM (Gibco, BRL), 6 µl de MgCl₂ 25 mM, 30.3 µl de agua bidestilada, 2 µl (40 picomoles) del oligonucleótido AUAP-B, 5'-GGATCCGGCCACGCGTCTGACTAGTAC-3', 1.2 µl (40 picomoles) del oligonucleótido ACT23, 5'-CCTCATGTTTCGACACATT-3', 0.5 µl de la enzima Expand High fidelity PCR system (3.5 x 10³ u/ml). La reacción se llevó a cabo en un vol total de 50 µl y consistió de 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 2 min de acoplamiento a 42 °C y 3 min de extensión a 72 °C, seguidos por 5 min de extensión a 72 °C.

Segunda amplificación con el oligonucleótido específico ACT24: PCR anidado (NESTED PCR). En un tubo Eppendorf de 0.5 ml para PCR se colocaron, 0.5 μ l de producto de PCR de la primera amplificación, 5 μ l de amortiguador Expand HF 10X (Boehringer Mannheim), 3 μ l de dNTPs 10 mM (Gibco, BRL), 6 μ l de $MgCl_2$ 25 mM (Boehringer Mannheim), 31.8 μ l de agua bidestilada, 2 μ l (40 picomoles) del oligonucleótido AUAP-B 5'-GGATCCGGCCACGCGTCGACT-AGTAC-3', 1.2 μ l (40 picomoles) del oligonucleótido ACT24, 5'-AGAAGGCCGCTACAGACT-3', 0.5 μ l de la enzima Expand High fidelity PCR system (3.5×10^3 u/ml). La reacción se llevó a cabo en un vol total de 50 μ l y consistió de 35 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de acoplamiento a 55 °C y 1 min de extensión a 72 °C, seguidos por 5 min de extensión a 72 °C.

c) CLONACIÓN DE LOS EXTREMOS 3' DE LOS cDNAs DE ACTINA.

Los productos de PCR obtenidos en la primera y segunda amplificación, se separaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% y las bandas correspondientes al tamaño esperado (800 y 500 pb aprox.), se cortaron del gel, se purificaron con el estuche "Concert Gel Extraction system" (Gibco BRL) y el DNA se resuspendió en 20 μ l de amortiguador TE (10-0.2). Después se trataron con la enzima Klenow para obtener extremos romos y se fosforilaron con la enzima T4 polynucleotide kinase (T4 PK). La reacción se realizó de la siguiente manera: 19 μ l de producto de PCR purificado, 5 μ l amortiguador Klenow 10 X, 25 μ l rATP 100 μ M (Stratagene), 1 μ l de dNTPs 2.5 mM (Gibco, BRL), 1 μ l de enzima Klenow (1u/ μ l) (Gibco, BRL) y 0.2 μ l (2 u) de T4 PK (Stratagene). La reacción se incubó a 37 °C durante 30 min y se inactivaron las enzimas a 65 °C por 15 min. Posteriormente, el DNA se purificó a través de columnas de Qiagen. El DNA se resuspendió en 10 μ l de agua bidestilada.

Para la clonación de los extremos 3' de los cDNAs de actina se utilizó el vector pUC18 digerido con la enzima de restricción *Sma*I (Gibco BRL) y desfosforilado con la enzima "Bacterial Alkaline Phosphatase" (BAP, Gibco BRL). A un tubo Eppendorf de 1.5 ml se agregaron 17 µl de vector pUC18 (2.5 µg), 2 µl de amortiguador 4 (10 X), 0.5 µl de agua bidestilada y 0.5 µl de enzima *Sma*I (5u); la reacción se incubó a 37°C durante 1 h. Después, a 19 µl del vector digerido en el paso anterior se le agregó 3 µl de amortiguador de desfosforilación 10 X, 6.7 µl de agua bidestilada estéril y 1.3 µl de la enzima BAP (195 u), se incubó durante 1 h a 65 °C, después se agregó 1 µl de EDTA 0.5 M pH 8 y se dejó durante 10 min a 50 °C para inactivar la enzima. Finalmente, se llevó a cabo una reacción de ligación del vector consigo mismo para descartar el vector que se puede religar, colocando los siguientes reactivos: 29 µl de pUC18 tratado con *Sma*I y BAP, 8 µl de amortiguador de ligasa 5 X y 1 µl de la enzima T4 DNA ligasa (1 u/µl, Gibco BRL), se incubó a 22 °C durante 2 h. La banda correspondiente al vector linealizado-defosforilado se separó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y se purificó con el estuche "Concert Gel Extraction system" (Gibco BRL).

Los extremos 3' de los cDNAs de actina y el vector pUC18 digerido con *Sma*I y desfosforilado con BAP, preparados como se describió anteriormente se ligaron de la siguiente manera: 1 µl de vector pUC18 (30 ng), 4 µl cDNAs de actina, 2 µl de amortiguador DNA ligasa 5 X, 1 µl de la enzima T4 DNA ligasa (1 u/µl, Gibco, BRL) y 2 µl de agua bidestilada. Se incubaron a 16 °C durante 16 h. El DNA se precipitó con etanol absoluto y acetato de sodio 3 M, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 10 µl de agua bidestilada estéril.

Para la transformación de bacterias con los plásmidos recombinantes, se agregaron 2 µl de la reacción de ligación a tubos Eppendorf que contenían 200 µl de células para electroporación (eficiencia: 1.8×10^6 / ml) (4.7), se mezcló y las células se transfirieron a una celda para electroporación (0.25-cm "gap

disponible microelectroporation chamber"). A continuación, se llevó a cabo la electroporación en el aparato "Cell-porator *E. coli* electroporation system" (Gibco, BRL), a un voltaje de 2.5 kV. Después del pulso eléctrico, se agregó a las células 800 μ l de medio SOC (apéndice B) y se incubó a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, se sembró en cajas de Petri con medio LB con ampicilina y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Las colonias transformantes que crecieron de 13 tubos electroporados (1032 colonias) se sembraron por duplicado en cajas de Petri con LB con ampicilina, se transfirieron a membranas de nylon (Zeta-probe, BIORAD) y se hizo una hibridación en colonia para seleccionar aquellas colonias que contenían los cDNAs relacionados con actina (como se describió en el inciso 4.9.) utilizando en la hibridación una sonda homóloga de actina. Todas las clonas positivas se secuenciaron como se describió en el inciso 4.10., utilizando el oligonucleótido ACT20 5'-CTCGCTACATTCACAG-3' que se ancla en la región codificadora de actina 81 nt río arriba del codón de terminación de la traducción.

4.13. AMPLIFICACIÓN DE LOS EXTREMOS 3' DE LOS cDNAs DE CALMODULINA, METIONINA GAMA-LIASA, SUPEROXIDO-DISMUTASA (GENE 6) Y UN cDNA DESCONOCIDO DE *T. vaginalis*.

La obtención de los extremos 3' de los cDNAs de los transcritos de calmodulina, metionina gama-liasa, superoxido dismutasa (gene 6) y de un gene desconocido de *T. vaginalis*, se realizó con el mismo procedimiento utilizado para los mRNAs de actina (ver inciso 4.12) . Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos (tabla 3), utilizando las secuencias genómicas accesadas en GeneBank: calmodulina (no. de acceso U38786); metionina gama-liasa (no. de acceso AJ000486); superoxido-dismutasa (no. de acceso AF022423).

NOMBRE DEL OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO	Tm 50 mM Na⁺
AP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T	56
AUAP-B	GGA TCC GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	61
ACT23	CCT CAT GTT CGA CAC ATT	41
ACT24	AGA AGG CCG CTA CAG ACT	45
CALM180	GAT TAC AGC TGC AGA GCT TGC TCA	52
CALM380	CGA TAA GGA TGG TGA TGG CCG TAT	52
MGL1-200	CCT CGA CAA CCT CAA GCT TAT CAC	52
MGL1-400	AGG CTG ACC TCC TTC AAC AGA TTC	52
SOD200	TAC AAG ACA AAG GAC GGC AAG CTT	51
SOD400	CAA GCT TAT CGT TGG CTC TGG CTT	52
TVDES200	GGT TAC CTC AAC CTC TTC CGT TAC	52
TVDES400	CCA ATG CTC TAA GGC TAC ATC TCG	52

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en el ensayo 3' RACE.

4.14. ANÁLISIS DE SECUENCIAS.

Las secuencias estudiadas fueron analizadas utilizando los programas de DNASIS 2.6 (LKB) y PCGENE (Intelligenetics).

5.1. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE GENES QUE CODIFICAN PARA ACTINA EN *T. vaginalis*.

Utilizando el ensayo tipo "Southern blot" mediante el cual se pueden identificar fragmentos de DNA relacionados a una secuencia de nucleótidos conocida, determinamos el número de genes que codifican para actina en *T. vaginalis*. El DNA genómico se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI*, *PstI*, y una doble digestión con ambas enzimas. El panel A de la figura 8 muestra un gel de agarosa con DNA genómico sin digerir y digerido, teñidos con bromuro de etidio. En el panel B se muestra la autorradiografía con las bandas de hibridación después de que el DNA se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con una sonda heteróloga de actina de 2.4 kb, preparada a partir de la clona AA3 de *Acanthamoeba castellanii* (Nellen y Gallwitz, 1982). En los carriles con las digestiones de *EcoRI*, *PstI* y de la doble digestión *EcoRI* y *PstI* se observaron once, siete y nueve bandas de hibridación, respectivamente. Si tomamos en cuenta que las regiones codificadoras de actina de *T. vaginalis* no tienen sitios de restricción internos para *EcoRI* (datos obtenidos posteriormente por secuencia), podemos sugerir que actina en *T. vaginalis* está codificada por una familia multigénica formada por al menos 9 genes. Lo anterior fue corroborado en experimentos posteriores, utilizando una sonda homóloga de actina.

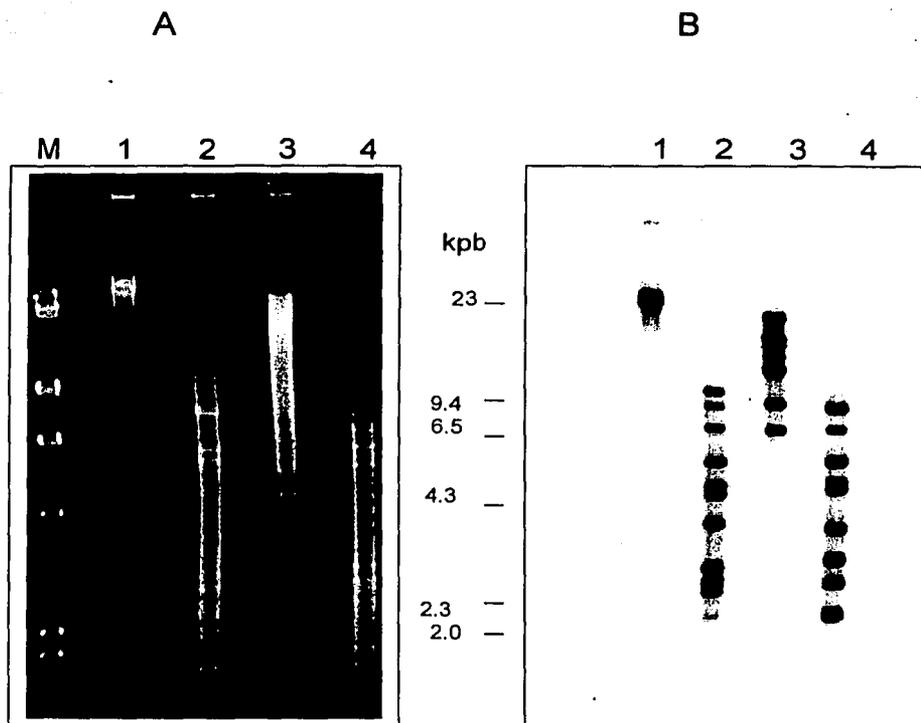


Fig. 8. "Southern blot" genómico de *T. vaginalis*. Panel A. Electroforesis de DNA de *T. vaginalis* separado en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Carril M: DNA de fago λ digerido con *Hind* III, utilizado como marcador de peso molecular; Carril 1: DNA de *T. vaginalis* sin digerir; carriles 2, 3 y 4: DNA de *T. vaginalis* digerido con *Eco*RI, *Pst*I y una doble digestión con *Eco*RI y *Pst*I respectivamente. Panel B. El DNA del panel A se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con una sonda heteróloga de actina de *Acanthamoeba castellanii*. El contenido de los carriles es el mismo que el descrito para el panel A.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2. CLONACIÓN DE FRAGMENTOS GENÓMICOS CON EXTREMOS *EcoRI* y *PstI* DE *T. vaginalis*.

La primera estrategia utilizada en el laboratorio para buscar genes de actina fue clonar fragmentos genómicos de *T. vaginalis* obtenidos mediante digestiones dobles con (*EcoRI* + *PstI*) y clonados en el vector pUC18 que contenía extremos complementarios. Con esta ligación se transformaron bacterias JM109 y se obtuvieron colonias conteniendo plásmidos recombinantes.

5.2.1. SELECCIÓN DE CLONAS CONTENIENDO INSERTOS RELACIONADOS A ACTINA DE *T. vaginalis*.

La selección de clonas de actina se hizo por medio de hibridación en colonia, utilizando la sonda heteróloga de actina de *Acanthamoeba castellanii* antes mencionada. El análisis de cuatro clonas seleccionadas (dos positivas y dos negativas) se muestra en la figura 9. Los plásmidos se sometieron a una doble digestión con *EcoRI* y *PstI* para liberar los insertos clonados (panel A). El gel se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con la sonda heteróloga para actina. En el panel B se muestran los resultados de la hibridación: en los carriles 1 y 3 (clonas 4BGA y 9BGA) se obtuvieron bandas de hibridación de 2200 y 3600 pb aproximadamente, que tienen el tamaño esperado para fragmentos obtenidos por doble digestión, de acuerdo con los resultados del Southern genómico de actina (figura 8).

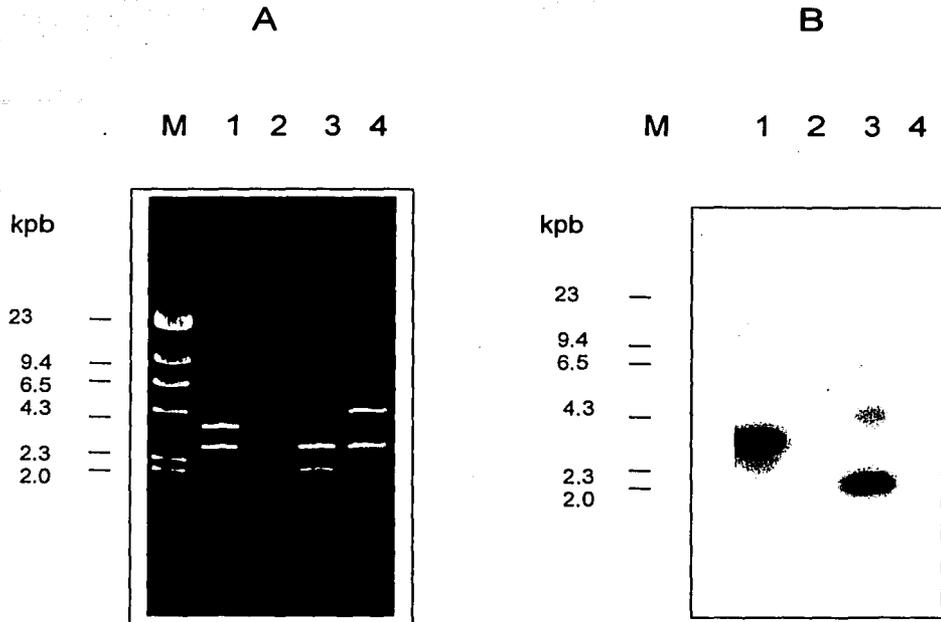


Fig. 9. Southern blot de clonas genómicas de actina con insertos (*EcoRI* + *PstI*). En el panel A se muestra un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio. Carril M: marcador de peso molecular (λ *Hind III*); carriles 1, 2, 3 y 4: clonas 4BGA, 7BGA, 9BGA y 13BGA, digeridas con (*EcoRI* + *PstI*). Panel B: hibridación de los fragmentos de DNA del panel A con una sonda heteróloga para actina. El contenido de los carriles es el mismo que el descrito para el panel A.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CLONAS DE ACTINA MEDIANTE AMPLIFICACIÓN POR PCR.

Para localizar y orientar el gene de actina dentro de los insertos de las clonas 4BGA y 9BGA, se amplificaron mediante PCR tanto las regiones codificadoras de actina como las regiones 5' y 3' adyacentes a estas (tabla 4). Se utilizaron los oligonucleótidos M13 forward y M13 reverse que se anclan en el vector y cuatro oligonucleótidos específicos para actina (Tvactin5', Tvactin3', ACT10 y ACT20) diseñados en el laboratorio; estos últimos se diseñaron a partir de secuencias parciales de la región codificadora de actina de *T. vaginalis* de reciente aparición en las bases de datos de GeneBank (Nos. de acceso: U63123, U63124, U63125 y U63126).

COMBINACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA AMPLIFICACIÓN POR PCR	9BGA CLONA ACTINA 2200 pb TAMAÑO APROXIMADO DEL PRODUCTO	4BGA CLONA ACTINA 3600 pb TAMAÑO APROXIMADO DEL PRODUCTO
M13 Forward + TVACTIN3'	2300 pb	3000 pb
M13 Forward + ACT10	1000 pb	1900 pb
M13 Forward + TVACTIN5'	no se obtuvo producto	no se obtuvo producto
M13 Forward + ACT20	no se obtuvo producto	no se obtuvo producto
M13 Reverse + TVACTIN5'	1000 pb	2200 pb
M13 Reverse + ACT20	no se obtuvo producto	1000 pb
M13 Reverse + ACT10	no se obtuvo producto	no se obtuvo producto
M13 Reverse + TVACTIN3'	no se obtuvo producto	no se obtuvo producto

TABLA 4. Caracterización del tamaño de las regiones 5' y 3' de las clonas 4BGA y 9BGA.

El tamaño de los productos de PCR indica que la clona 9BGA (con el inserto de 2200 pb), tiene una región 5' (río arriba de actina) de aproximadamente 1100 pb seguida por la región codificadora de actina de aprox. 1100 pb; no se obtuvo producto de amplificación de la región 3', lo que sugiere que esta clona se encuentra incompleta en el extremo 3'. La clona 4BGA (inserto de 3600 pb) posee además de la región codificadora completa de actina, las regiones 5' y 3' adyacentes con tamaños aproximados de 1800 y 700 pb, respectivamente (figura 10). Por lo anterior decidimos secuenciar la clona más grande lo que nos permitiría obtener mayor información acerca de un gen de actina y su contexto genómico.

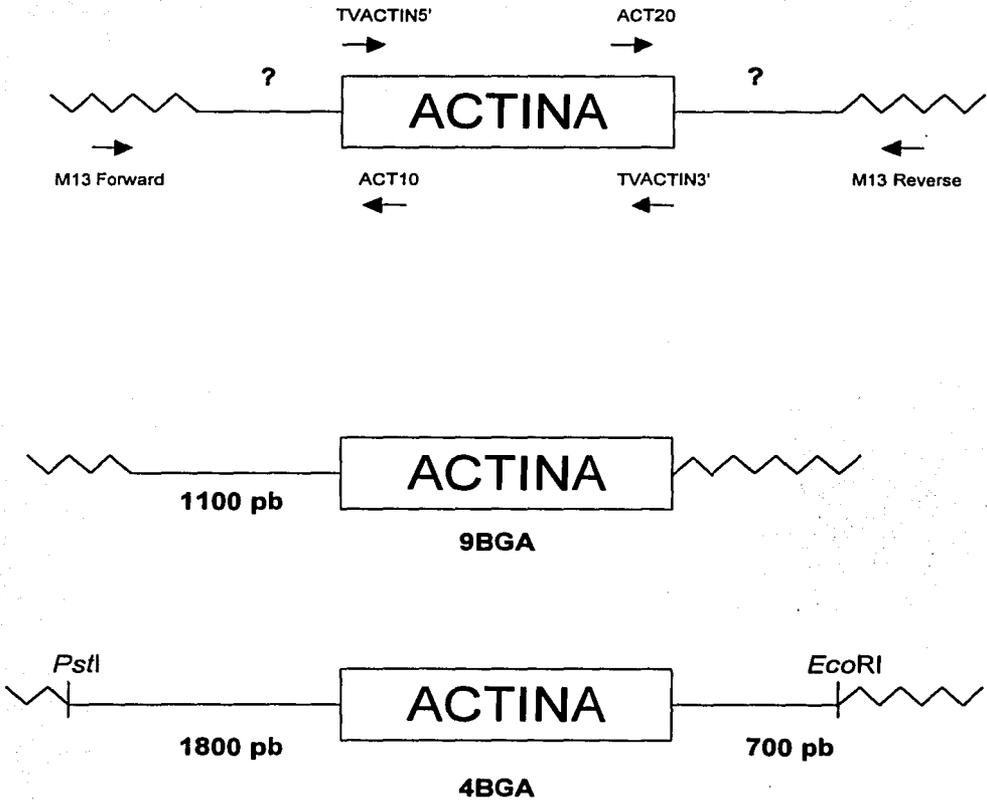


Fig. 10. Mapas de tamaños de las clonas 4BGA y 9BGA obtenidas por medio de PCR. Los flechas indican el oligonucleótido que fue utilizado para amplificar y su orientación; línea continua: fragmento genómico de *T. vaginalis*; línea quebrada: vector pUC18.

5.3. Los resultados obtenidos del análisis de la clona genómica 4BGA de actina fueron reportados en el artículo: "Differences between coding and non-coding regions in the *Trichomonas vaginalis* genome: an actin gene as a locus model", que se anexa a continuación.

Differences between coding and non-coding regions in the *Trichomonas vaginalis* genome: an actin gene as a locus model

Norma Espinosa ^{a,1}, Roberto Hernández ^b, Lorena López-Griego ^a,
Rossana Arroyo ^c, Imelda López-Villaseñor ^{a,*}

^a Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-228, CP 04510 México D.F., Mexico

^b Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-228, CP 04510 México D.F., Mexico

^c Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN, Av. IPN 2508, CP 07300 México D.F., Mexico

Received 20 March 2000; received in revised form 6 November 2000; accepted 20 November 2000

Abstract

The sequence of a cloned genomic fragment of *Trichomonas vaginalis* containing a complete actin gene was determined. An uninterrupted open reading frame of 1128 nucleotides was found that codes for an actin gene. Two overlapped consensus promoter sequences for *T. vaginalis* were found 12 nucleotides upstream the actin initiation codon. In addition to actin, two incomplete open reading frames were found at the 5' and 3' ends of the clone. These two sequences are expressed and showed similarity to adenylate cyclase genes and a yeast hypothetical protein. The overall sequence showed a higher G + C content and a lower frequency of repeated sequences in the coding regions when compared with the non-coding regions. A similar unequal nucleotide distribution was found in various *T. vaginalis* genes retrieved from data bases. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Genome organization; G + C content; Open reading frames; Adenylate cyclase; Actin

1. Introduction

Trichomonas vaginalis is a flagellated protozoan parasite, responsible for one of the most common sexually transmitted diseases in humans. Its life cycle includes only one stage, the trophozoite, and its only known habitat is the urogenital tract of humans. Based on phylogenetic studies using large and small subunit ribosomal RNAs (Gun-

* Corresponding author. Tel.: +52-562-23849; fax: +52-555-00048.

E-mail address: ilopez@servidor.unam.mx (I. López-Villaseñor).

¹ Data deposition: The sequence reported in this paper has been deposited in the GeneBank database under the accession no. AF237734.

derson et al., 1995; Viscogliosi et al., 1993) and actin genes (Bricheux and Brugerolle, 1997), trichomonads have been located among the earliest-diverging lineages within eukaryotes. The study of the genome of these parasites is therefore relevant for both medicine and biology. In this work we have used a genomic fragment containing a whole actin gene as a locus model to analyze the distribution of coding and non-coding regions as well as the base composition of these sequences in *T. vaginalis*.

Sequence comparisons of the open reading frames (ORFs) flanking the actin gene showed that the putative adenylate-cyclase encoding sequence is present 1024 nucleotides (nts) upstream from and in the same polarity as the actin gene. Another ORF was found 413 nts downstream the actin sequence and with the inverse polarity. A remarkable difference of G+C content was found among coding and non-coding regions in this locus. Moreover, a similar unequal distribution of bases was found when other published sequences were analyzed. A comparison of the frequency of repeated sequences among coding and non-coding regions showed a difference in their distribution as well.

2. Material and methods

2.1. Parasites and culture conditions

The *T. vaginalis* isolate CND147 isolated in one of our laboratories was used throughout this work. Parasites were grown in trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated horse serum as described (Diamond, 1957).

2.2. General molecular biology techniques

Trichomonads cultures from late logarithmic phase of growth were collected by centrifugation and washed with phosphate buffered saline. High molecular weight DNA was prepared essentially as described (Chou and Tai, 1996), with a modification of the lysis buffer being 0.2% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH = 8.

For Southern hybridization analysis, genomic DNA (3 µg) was digested with restriction endonucleases and the restriction fragments separated on 0.8% (wt./vol.) agarose gels. Transfer of DNA from the gel to a nylon filter (Zetaprobe, Bio-Rad) was done as described by Southern (Southern, 1975) with a modification of an ammonium acetate buffer (Rigaud et al., 1987). The membranes were hybridized (at 37°C for the heterologous probe and 42°C for the homologous probes) to random-primed ³²P-labeled DNA probes in 50% (vol./vol.) formamide, 5 × SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% (wt./vol.) SDS, 5 × Denhardt's solution. The filters were washed three times for 20 min in 0.5 × SSC, 1% (wt./vol.) SDS at room temperature for heterologous hybridizations or 42°C for homologous hybridizations.

For a plasmid library construction, *T. vaginalis* genomic DNA was digested with *EcoRI* and *PstI* and cloned in the pUC18 vector digested with the same enzymes. This library was screened with the *Acanthamoeba castellanii* actin clone AA3 (Nellen and Gallwitz, 1982). A clone of 3489 base pairs (bp) was isolated and completely sequenced.

Total RNA was prepared using the TRIZOL reagent (Life Technologies), an improvement to the single-step RNA isolation method developed by Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987). The RNA samples were fractionated on 1.75% (wt./vol.) formaldehyde agarose gels and transferred to nylon membranes (Nytran, Schleicher & Schuell) using 10 × SSC as the transfer buffer. The filters were prehybridized, hybridized and washed as described for the Southern blot hybridizations. Each lane on the gel contained 7 µg of total RNA as quantified by A₂₆₀ spectrophotometric assays supplemented by comparison of ribosomal RNAs on ethidium bromide stained agarose gels.

2.3. Probes

The complete *Acanthamoeba castellanii* actin clone AA3 (Nellen and Gallwitz, 1982) was used as a heterologous probe for screening the *T. vaginalis* genome.

A homologous probe for the putative adenylate cyclase was obtained by PCR amplification of the

T. vaginalis genomic clone here described, using the following oligonucleotides: the M13 Forward 23-base sequencing primer (Gibco BRL) as the sense oligonucleotide, and 5'TATCAAGGTTGTCGA-AGC3' (corresponding to position 379–396) as the antisense oligonucleotide. A homologous probe for the ORF3 region was obtained by PCR amplification of the clone using the M13 Reverse 23-base sequencing primer (Gibco BRL) as the antisense oligonucleotide and 5'TTTATAGTAAGTTA-ATCA3' (corresponding to position 3076–3093) as the sense oligonucleotide.

2.4. DNA sequence and sequence analysis

Both strands of the clone were completely sequenced using the dideoxy chain termination method (Sanger et al., 1977) and an adaptation thereof for double-stranded templates (Murphy and Kavanagh, 1988). The sequences were analyzed using both the DNASIS package (LKB) and the PCGENE package (IntelliGenetics).

3. Results

3.1. Isolation and characterization of a genomic actin clone

It has been recently described that the actin gene family in *T. vaginalis* is composed of at least nine members (Bricheux and Brugerolle, 1997; our unpublished data). Using an heterologous *A. castellanii* actin gene as a probe, a *T. vaginalis* genomic fragment was cloned and completely sequenced. As it is shown in Fig. 1, the fragment of 3489 base pairs (bp) contains one complete plus two incomplete open reading frames (ORFs) separated by non-coding sequences. The complete central ORF (1128 nts) was found to be actin by sequence comparison. The identity between this *T. vaginalis* actin sequence and those already reported (Bricheux and Brugerolle, 1997) ranges from 98.75 to 98.18% at the nucleotide level and 99.73–99.18% at the amino acid level. The sequences of the two incomplete ORFs were compared in the Genebank database using the BLAST program. The 186 aminoacids ORF located at the 5' end of

the clone and in the same polarity of actin showed between 19 and 26% identical and 39 and 46% conserved amino acids with adenylate cyclase genes from mammals and *Dictyostelium discoideum*. The 115 amino acids ORF located at the 3' end of the clone, and encoded in the complementary strand, showed 32% identical and 47% conserved amino acids with the *Saccharomyces cerevisiae* hypothetical protein YER082c. The intergenic non-coding regions span 1024 nt upstream, and 413 nt downstream from the actin gene. The former contains the consensus promoter sequence (Inr element) identified for the *T. vaginalis* protein-encoding genes (Liston and Johnson, 1998). In fact, two overlapped putative Inr elements located 12 and 17 nt upstream the actin ATG were found (Fig. 1). Whether either one or both of these sequences function as a promoter for this actin gene remains to be determined.

3.2. Genome organization of the region flanking the actin gene

The distribution of the G + C content throughout the genomic clone was analyzed using a DNA analysis system (DNASIS package, LKB) with a window size of ten nucleotides. The G + C content is clearly lower throughout both non-coding regions (Fig. 2(A)). A similar search was performed on several reported genomic sequences coding for different *T. vaginalis* mRNAs or rRNAs. This is illustrated with the analysis of the calmodulin-ubiquitin intergenic sequence (Keeling et al., 1996) which is shown in Fig. 2(B). In all of the cases analyzed, the distribution of the G + C content is higher in the coding regions as found in this work. In addition, a search was carried out in the sequence here described for the presence of direct repeats, inverse repeats and palindromic sequences using the PCGENE package (IntelliGenetics) set to a minimum length of ten bases. The sequences identified and their distribution are shown in Fig. 3 and Table 1. It can be seen that the non-coding region upstream the actin gene contains a higher number of repeated elements, 2.5 times as many as found in the rest of the sequence (ORFs and actin 3' intergenic re-

gion). Although the high A + T content of the intergenic region can raise the probability of the occurrence of AT repeats, it remains to be deter-

mined whether or not these repeated sequences have a structural function for the expression and/ or recombination of the *T. vaginalis* genome.

1 CTGCAGTTCGACGGATGTGTTTGAACCAAGTCAAGAAATGTTCTCAGAAGTAGTGATCTTCTGTGATGTTGATATAACCAAGCTGTATCTCAAATGCGCAAAAGTACTTGTA
 AVAAAMCLKPKSQEIVPQDSDLDDDCDITQVVCISIVDKVLL

121 GTTATCAAGATATTCAAGATCAGAACTTTAAGCGAACTTTTATTTGGTACATCATTATCAATGATGATGAGAAACTGATAAGGTACTACTCTACTCCTGGGAAAG
 SYQDIDISIRIRITFNGNPLFLFVTSFLFNDDDEKKTDKVTVYLLSFLLEE

241 CTGCGCGAAGAAATTAACAATATATGATGTTCAAATGCTTGTTCATGCACAATATCCTACGGAGGACCTTATGATGATATAACAGGCATTTCCAGACAATGTCGATGTTTGA
 AAAEINKYMHMFKHLVSCCTISYGGPIIYACITGIGISKTFMFDVL

361 GCAATGAATGACTGACTCTCGACACCTTGATGTTGCCACAGGTAAGATATTTTACAAGTAGAAGCATATGATAGGATGAAAGATCCTCAATCAAGTCAATTCATACCGG
 GNEFLTLEAETDNLIDIVPPGKIIFTS EAYDRMKDHSISSSQFIIP

481 CAAGCGAGTGAAGAAAAGTTTATATAAGAAATATTTAGGAATGAATTCATAGTGTATCACCTGAGTGTGAACAATTTCAATATTATATATTTTTGTATGTTTTATGTA
 PRQLKRLKVVYIHNHYLGHMNFNSVSPLEL*

601 CATTITTTATGTAATAATTTATCATGCTTTATCGAAAAGAACTGTCATGAATACGATACTAGTGTITTTATATAATTTATCGACGGAGCTTAGCAATGAGACCGTAGCGAA
 721 ATCAATCTATCAGAATATGTCAGGCACCTGGCTATTCTCATTATTTTTGATGTCGCGGATGCTCAAAAAGTTAAATAATTTGATTTGACACTTTTAGATGTTCAATATTGATCTA
 841 AACATAAATCAATATATACAGTAACCAATCAAAATAGTGTITATGAAAAGATAGACCAACTATCTTTGGGTACTATAATTCGAATGATATCATATTTTTAACTTTTTAGCGAAGC
 961 GTAGTTTTGCAATATTTTGTATTAAGCATACTGCTTCTCAAAAATTTATGTTTTGGGACTTAACCGATGTCAGATATTTGGAAGAAATATGAGGACTTTTGTACT
 1081 AAATAACAAGTTTGTACTTATATGACGTTTAACTTCTGAAATCAAGCGTAAATTCGAAATGGTAAGATAATCGTGATGCTGTGTAATATTGTAATAAAGAAATAAAATTTTATG
 1201 AATGGTCTTTGATATGAATCCATTGATGATAATCGTTATAAATTTATAAAAACATTTTGTATTCAGTCAATCAATATTGCGAATTTCTCAAAATTTGAGAGCAAT
 1321 TGATGGAAATGAAGATAGAAAATATATTTATGATAGAAATAGCAAAATTTGGCCAGATATAATTCGAAAATAAAATGACATCACTTCCACTTTGCAAAATTTGATCTTTGA
 1441 GGAATAATTTCCGAAACCAATATATGATATATTCGAAAGATTAATAAATTAACAGGACCTTAGATGCTCGTGGTATAAATTTGAGGACTCTAACCTGCTCTAAGAAAGTGA
 1561 AATGATGGAATGTACTCTAATTCATTTCTGGATGCTGAAAGACGTTCCAGACTGTTGATGATAACCGCTCGTATGCGAAGCCGCTCTCTGGCATGAGCCCA
 1 MAEEDVQTLVIDNNGSGMKKAGFSGD EAP

1681 CGCTCTGTTTCCCATCCGTTGTGGCCGTCAAAAGTCAAAACAACAAATAGTTGGTGGCAAGCCGAAGATGCTCTGTCGGTGAAGCTTGTCCCAAGGCTGGTCTCATCCTC
 29 RSVFPPSVVGRPKKYKQQLVGGGNAKDFVFLVGEACSKRAGVLLTL

1801 AAGTACCPAATGAAACGGTATGTCACCAACTGGGATGATAGAAAAGATGTCGCAACACACATCTACAGCAACTCTGTTGACCCAAACAGGACCCAGCTCTCTTACAGAA
 69 KYPIELHGIENNVNNDWDEKGIWHHTFYNEHLRVDPTHEHPVLLTTE

1921 GCCCCACTTAACCCAAAGGCTAACCGTGAGAAAATGATCTGCCATGTTGCGACAACTCAAGCCCACTCTTCTATGTCGGCATCAGGCTGTTCTTCCCTACTCCTCTGGCCGT
 109 AFLNLFKANEKHEKHSLEHFDTFNAPSFYVGIQAVLGLTLYSSGR

2041 ACAACAGGATCGTTTCKAGNRGKGTGATGTTTCCACACAGTCCAAATTTAGCAAGCTACTCCCTTCCACAGCCCAATCATGAGACTTAACTCGTGGCCGCTGATCTCAGGCC
 149 TTTGIVFDAGDGVSHVPIXYEYGLSPLHAIMRLNLNLAGRDLTAA

2161 TCGATGTCAGCTCTCTCAGACGGTGGCAATGCTTTCAACAACAGCCGAAAGAAATCGTTGCGTACATCAAGGAGGCTTTGCTATGTCGCCCTCAGCTCTGATGCTGAAATG
 189 WHVVKLLTERGNAFNTTAEKEIVRDIKEKLLCYVALDFDAEH

2281 GAGAAGCCGCTACAGACTCCCTCAACTCAAGTCAATTAACACACTCCAGATGGCAAGCTCATCAAAATGGCAAGTGGCCCTCCGCTGCCCAAAATGCTCTCAAGCCATCTCTCGAT
 229 EKAATDSISINVFYVTLDFVGGNAKDFVFLVGEACSKRAGVLLTL

2401 GGTATGGAATACGATGGTATGCAACAGACTCTTGACTCCATCAAGTGGCAATTCGATGTTTGGTAAAGTCTCTACAGTAAACATCGTCTTCTTGGGGCAACAATGTTTCAAG
 269 GHEYIDGIDFDLSIMKCDIDVRLDLYANAVLTVGCGGCAACAATGTTTCAAG

2521 GGCATCGCCGAGCTCTGCAAGGAAATCACAGCTCTTGTCTCAACAACAAATGAAGTCAAGATCGTTGCTCCAGAAAGCGCTAAGTACGCCGTTTGGGTCGGTGGCTCCATCTTGTCT
 309 GIAERLDKEITALLAPPTMKVKIVTAFEERKYAVVMVGGSLLA

2641 TCCCTCGCTACATTCOCACAGATGGTTATCACCAGGAGGAAATCAGCAGGCGTGGCCATCGTCTGACCGAAGTGGCTCTAAACAATTCGGTATAATATTTCAAATTAACCT
 349 SLATFPQHMVITKEEYDEAGGSPSIVHRKCF*

2761 AACCTTTTTTCTAGTGAACCTATTTGAAATCACTTCAATATATGTTTAAATGGTTTATATGTCACCAATACGATGACCCCTGAACATTTCTTTTCAAATGATTTTTACT
 2881 TTCCCAAAATCAAGTATCATGCTAAATTAAGTGGCTGATTTGCAATGATTTCTTAACTATACATAATTAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATTTGATGATTTTCTTTGATTTAA
 3001 AAGAAATCTTTGATATTTGAAATTAATTAATTTCTTCAATCAATCATAGATAAAGTAAACCAAGACATTTATAGTAACTAATCAATTAATTAATAAATAAATAAATTTAA
 3121 TAATAACAAAATCAATTAATGAAATGCTGTCAGCAATTTCAATCTTCTTGAACATGAGAAGTGGAGGATCAATCTCTCATCAAGTCTCGATGAGCAATGTCGATGATGAGCT
 * e n v m g l k l v n l l q p d i g e d l e y h a i q s y s a

3241 AGAGTCTCAGATCTATGTCATCTATCCAAAGGACTGAAATGGTCTAGGAAATCGCAAGACATCAATAGGAAAGCATTTGCAATTTCCGATCTCTCATCAATTAATCAATTTTC
 s d d s r n d d r l p s e i p r p i a s v d i p v i n n a n e c k w m y d n e

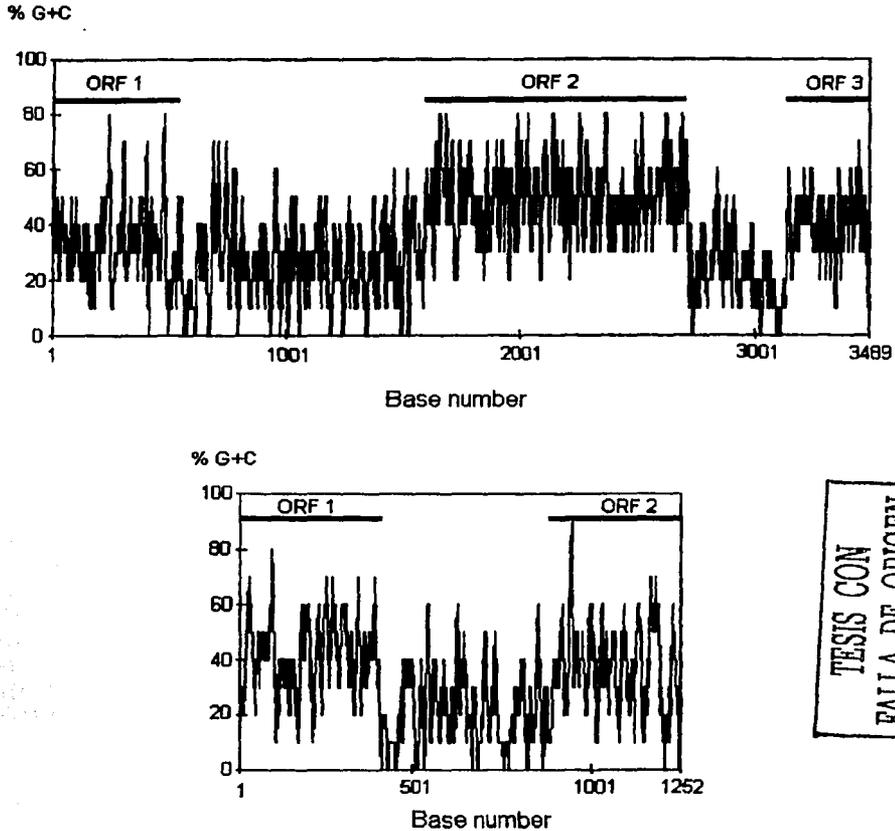
3361 GTGGCTCAATCTATCATCGTTATCTCAACGAATGACAGCAATCTCTGTACTCTGGTACGATCTCTGTAGCTCAACCTGTGTGGTGGTCTTGACTTTGTCGGCTTTTCGTTTGA
 h s l r d d t i e v f s l r k y e e y s r k y s l r n h q d k v k d s n e n s

3481 GCTGAATC
 s f e

Fig. 1. Nucleotide sequence of the *Trichomonas vaginalis* genomic region bearing the complete actin gene and its adjacent regions containing two partial ORFs. The deduced amino acid sequences are shown under the nucleotide sequence. Capital letters indicate the amino acid sequence encoded by the strand shown here, while small letters are used for the amino acid sequence encoded by the complementary strand. An asterisk has been placed under the stop codons. Nucleotide and actin amino acid numbers are shown. Two putative overlapped promoter elements for the actin gene are shown: the distal one in italics, and the proximal one underlined. The partial ORF located at the 5' end of the clone, encoded in the same strand as actin, has similarity with adenylate cyclase genes. The partial ORF located at the 3' end of the clone is encoded in the complementary strand and showed similarity with the *Saccharomyces cerevisiae* hypothetical protein YER082c.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

65-8



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Fig. 2. (A) G+C nucleotide content in the *T. vaginalis* actin genomic *PstI-EcoRI* fragment. The three ORFs are identified by horizontal bars: ORF1, adenylate cyclase (partial sequence); ORF2, actin type 6; ORF3, hypothetical protein YER082c. (B) G+C nucleotide content in the *Trichomonas vaginalis* calmodulin-ubiquitin genomic region (Keeling et al., 1996). The ORFs are identified by bars: ORF1, calmodulin (partial sequence); ORF2, ubiquitin (partial sequence).

3.3. Gene copy number and expression of the ORFs that flank actin

To estimate the gene copy number of the putative adenylate cyclase gene in *T. vaginalis* (ORF1, Fig. 1), Southern blots of genomic DNA cleaved with restriction enzymes were hybridized to a PCR product corresponding to the *T. vaginalis* putative adenylate cyclase cloned sequence. The appearance of one band in each lane of the South-

ern blot is consistent with the hypothesis that adenylate cyclase is present as a single copy in the *T. vaginalis* genome (Fig. 4(A)). The 3.5 kb band observed in the *EcoRI* lane was one of several identified with the actin probe, as expected (data not shown). To determine whether this gene is expressed, a northern blot containing total RNA from *T. vaginalis* was probed with the putative adenylate cyclase PCR probe. A single band representing a transcript of 5.5 kb was identified

(Fig. 4(B)), which is in good agreement with the range size of adenylate cyclases from other organisms. Similar experiments regarding gene copy number and expression of the ORF3 sequence (Fig. 1) were carried out. This sequence was found to be unique in the *T. vaginalis* genome and expressed as a 1.4 kb transcript (data not shown).

4. Discussion

Early diverging eukaryotes represent potential living fossil-cells to analyze presumptive successful strategies of cellular structures and genome organization in primitive eukaryotic lineages. Actin is one of the fundamental proteins of the eukaryotic cytoskeleton. In *T. vaginalis*, this protein is encoded within a gene family of at least nine members. In this work, a *T. vaginalis* genomic fragment containing an actin gene was cloned and characterized. This actin clone sequence was found to be different from those previously reported by Bricheux and Brugerolle.

Gene families can include the presence of pseudogenes. We have evidence that the cloned actin gene herein analyzed is an expressed member of the family since its 3' UTR sequence is present in cDNA actin clones isolated in our laboratory (Espinosa et al., manuscript in preparation). A

basic question regarding the organization of gene families is whether the different members of the family are linked or dispersed throughout the genome. The sequence obtained here shows that in *T. vaginalis* at least one actin gene is not linked to other genes of the same family. The relative location of the other members of this family is currently being analyzed in our group.

The *T. vaginalis* locus here analyzed shows a genomic linkage between an actin gene and the putative adenylate cyclase gene. We don't know whether this linkage has any structural or functional implication, but the fact that cAMP (the product of the reaction catalyzed by adenylate cyclase) induces actin polymerization in other parasites (Condeelis, 1993) poses interesting questions.

It has been previously observed that the region adjacent to the coding sequence in some *T. vaginalis* genes is AT rich (Keeling et al., 1996; Musatovova and Alderete, 1998), but a systematic base-content analysis of coding and non-coding regions has not been done. To our knowledge, the sequence reported here is the first sequenced fragment of the *T. vaginalis* genome that contains more than two linked ORFs. The G + C content analysis performed on *T. vaginalis* sequences has shown a consistent picture: the intergenic regions in the *T. vaginalis* genome are A + T rich. This

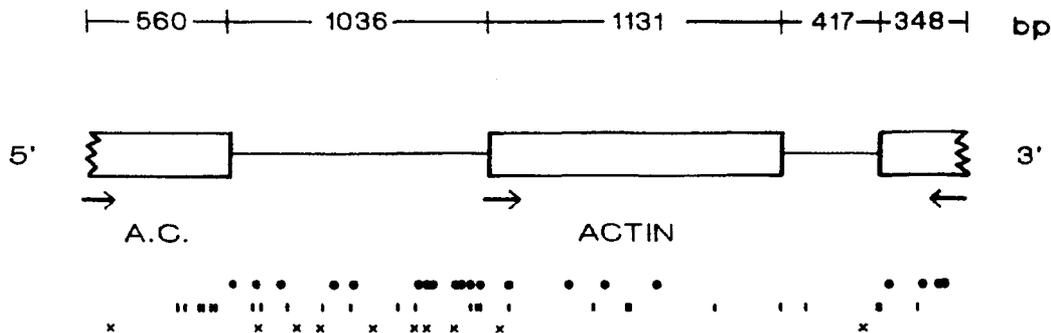


Fig. 3. Distribution of repeated sequences in the *Trichomonas vaginalis* actin genomic fragment. Dots (●) indicate the position of direct repeated sequences; vertical lines (|), the position of inverse repeated sequences; crosses (x) show the position of palindromes. A.C., adenylate cyclase.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

65-F

Table 1
Nucleotide sequence and position of the repeated sequences shown in Fig. 3(A)^a

Repeated sequences in the <i>T. vaginalis</i> actin clone			
Repeated sequence (5' → 3')	Type	Position 1	Position 2
ATTATTTTGT	dir	577	759
TGAATAACGAT	dir	650	984
AAAAAAAAATTA	dir	1052	1488
AAATTTTGAG	dir	1305	1524
TGATTGGAAT	dir	1321	1563
TATAATATCG	dir	1380	1471
GAAGCCCCAC	dir	1672	1918
TTCGATGCTG	dir	2056	2266
ATTCCTTCATC	dir	3194	3336
ATCTCTTGT	dir	3402	3423
ATGAATTGACT	inv	364	465
CTTGATATTG	inv	390	457
AAGAAAAAAG	inv	492	2764
ACAATTATTA	inv	514	796
ATAACGATTA	inv	653	1232
GCTAAAAAAGTTA	inv	785	940
AA			
ATTATGAAAA	inv	1044	2859
CTCAAAATTT	inv	1301	1524
TCTAAAGAAG	inv	1548	3163
GATTGGAATG	inv	1564	3154
CCACGCTCTGT	inv	1678	2179
CATCCAGGCTGT	inv	2004	2155
AACATCGTTC	inv	2485	3315
TTGTCGACAA	pal	100	
TTATATATAA	pal	672	
TCAATATTGA	pal	827	
ATGATATCAT	pal	926	
ATTTCGAAAT	pal	1132	
TCTCAAAATTTTGA	pal	1300	
GA			
AAATATATTT	pal	1342	
ACATATATATGT	pal	1460	
CGTTATCGATAACG	pal	1623	
TTTATTAATAAA	pal	3095	

^a The type of repetition is as follows: dir, direct repeated sequence; inv, inverse repeated sequence; pal, palindromic sequence.

unequal nucleotide content could be due to accumulated spontaneous point mutations through the deamination of cytosine to form uracil, which leads to a mutant cell in which a T–A pair replaces a C–G pair. Additionally, a malfunction of a DNA polymerase during the replication of

DNA can also modify the AT content in the genome (Lewin, 1997). These mutations could become fixed in noncoding regions of low selective pressure. In this context, small G + C rich motifs embedded within intergenic regions could represent conserved domains of potential regulatory elements for genomic functions, which would be worth to point out and analyze. Finally, we propose that the G + C content profile of *T. vaginalis* genomic sequences could be used as a simple search tool to identify potential coding regions in this ancient organism.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Wolfgang Nellen for kindly providing the *Acanthamoeba castellanii* actin clone, and Juliana Herrera López for techni-

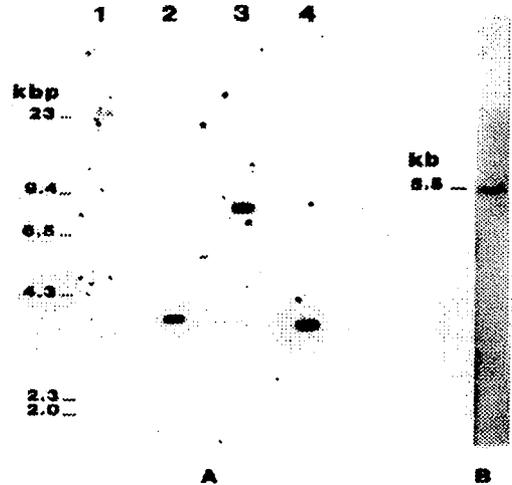


Fig. 4. Panel A. Southern blot of *Trichomonas vaginalis* genomic DNA probed with the adenylate cyclase homologous genomic coding region. Lanes: 1, uncut DNA; 2, *EcoRI*-digested DNA; 3, *PstI*-digested DNA; 4, *EcoRI* plus *PstI* digested DNA. Panel B. Northern blot containing 7 µg of *Trichomonas vaginalis* total RNA probed with a PCR fragment from the adenylate cyclase homologous genomic coding region.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

65-G

cal assistance. This work was supported by grants IN-201196 from the DGAPA, UNAM, and 28036-M from CONACYT, México.

References

- Bricheux, G., Brugerolle, G., 1997. Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 205-213.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Chou, C.F., Tai, J.H., 1996. Simultaneous extraction of DNA and RNA from nuclease-rich pathogenic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *BioTechniques* 20, 790-791.
- Condeelis, J., 1993. Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9, 411-444.
- Diamond, L.A., 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 43, 488-490.
- Gunderson, J., Hinkle, G., Leipe, D., Morrison, H.G., Stickel, S.K., Odelson, D.A., Breznak, J.A., Nerad, T.A., Müller, M., Sogin, M.L., 1995. Phylogeny of trichomonads inferred from small-subunit rRNA sequences. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42 (4), 411-415.
- Keeling, P.J., Doherty-Kirby, A.L., Teh, E.M., Doolittle, W.F., 1996. Linked genes for calmodulin and E2 ubiquitin-conjugating enzyme in *Trichomonas vaginalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43, 468-474.
- Lewin, B., 1997. *Genes*. Oxford University Press, New York, pp. 89-91.
- Liston, D.R., Johnson, P.J., 1998. Gene transcription in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Today* 14, 261-265.
- Murphy, G., Kavanagh, T.A., 1988. Speeding-up the sequencing of double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* 16, 5198.
- Musatovova, O., Alderete, J.F., 1998. Molecular analysis of the gene encoding the immunodominant phenotypically varying P270 protein of *Trichomonas vaginalis*. *Microb. Pathog.* 24 (4), 223-239.
- Nellen, W., Gallwitz, D., 1982. Actin genes and actin messenger RNA in *Acanthamoeba castellanii* nucleotide sequence of the split actin gene I. *J. Mol. Biol.* 159, 1-18.
- Rigaud, G.F., Grange, T., Pictet, R., 1987. The use of NaOH as transfer solution of DNA onto nylon membrane decreases the hybridization efficiency. *Nucleic Acids Res.* 15, 857.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Viscogliosi, E., Philippe, H., Baroin, A., Perasso, R., Brugerolle, G., 1993. Phylogeny of trichomonads based on partial sequences of large subunit rRNA and on cladistic analysis of morphological data. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40, 411-421.

2

5.4. Los resultados de los análisis tipo "Southern" y "Northern blot" del ORF con similitud a la proteína hipotética YER082c de *Saccharomyces cerevisiae*, no se incluyeron en el artículo anterior y se presentan en la figura 11. Se observa que en *T. vaginalis* el gene con similitud a la proteína hipotética YER082c se encuentra como copia única (panel B), y su transcrito tiene un tamaño aproximado de 1.4 kb (panel C).

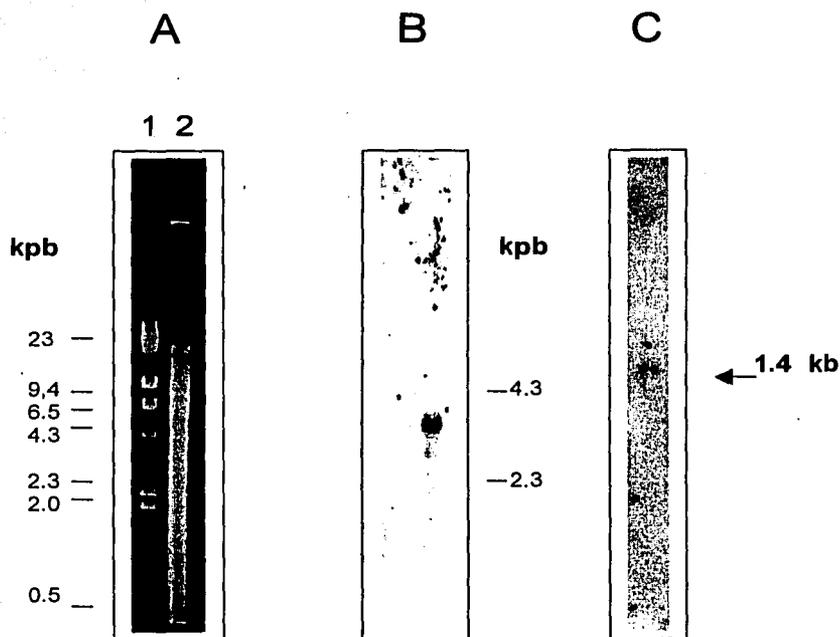


Fig. 11. Análisis tipo "Southern" y "Northern blot" para el ORF con similitud a la proteína hipotética YER082c de *S. cerevisiae*. Panel A: gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: marcador de peso molecular (λ Hind III); carril 2: DNA de *T. vaginalis* digerido con *EcoRI*. Panel B: el DNA del panel A se transfirió a membrana de nylon y se hibridó con una sonda homóloga para la proteína hipotética YER082c obtenida por medio de PCR. Panel C: RNA total de *T. vaginalis* hibridado con la sonda homóloga que se utilizó en B.

5.5. CARACTERIZACION DE LOS TRANSCRITOS DE ACTINA.

En un artículo publicado por Brugerolle y col., (Brugerolle y col., 1997) se menciona que los transcritos de actina de *T. vaginalis* no están poliadenilados. Para corroborar dicha información, en nuestro laboratorio hicimos un "Northern blot" con RNA total, RNA poli A+ y RNA poli A- de *T. vaginalis* que se hibridó con una sonda homóloga de actina. A diferencia del reporte anterior, nuestros datos indican que los transcritos de actina si están poliadenilados. El análisis de los transcritos de actina y nuestra propuesta de cuales son las señales necesarias para la poliadenilación de transcritos en *T. vaginalis* se presentan en el artículo "Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs" que se anexa a continuación.

Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs

Norma Espinosa, Roberto Hernández, Lorena López-Griego, Imelda López-Villaseñor*

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
Apartado Postal 70-228, 04510 Mexico D. F., Mexico

Received 17 July 2001; received in revised form 23 January 2002; accepted 8 February 2002

Received by R. Di Lauro

Abstract

3' Untranslated region processing and polyadenylation in *Trichomonas vaginalis* was analyzed by 3' rapid amplification of cDNA ends and sequence analysis of *T. vaginalis* mRNAs. A putative polyadenylation signal with the sequence UAAA was found 11–30 nucleotides upstream from the cleavage site. The motif pyrimidine(A)_{n-3}AAUU is proposed to be the cleavage site for polyadenylation of transcripts. This potential sequence defining the cleavage site for polyadenylation in eukaryotes is a novel finding. As in other eukaryotes, runs of several U's downstream from the cleavage site were identified. A working hypothesis is proposed which couples the UAA translation stop codon with the signaling for the 3' end processing of transcripts in this early divergent parasitic protozoa. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Transcription; Parasite; Actin; 3' untranslated region; Evolution

1. Introduction

The protozoan parasite *Trichomonas vaginalis* is the aetiologic agent for trichomonosis, one of the most common sexually transmitted diseases in humans. Its life cycle includes only one stage, the trophozoite, and its only known habitat is the urogenital tract of humans. Several studies regarding cellular and epidemiological aspects of this parasite have been carried out. Nevertheless, the detailed mechanisms of gene expression have not been thoroughly analyzed. Most studies regarding gene transcription in *T. vaginalis* have been focused on promoters and upstream regulatory sequences (Liston and Johnson, 1998; Liston et al., 1999). In contrast, the mechanisms involved in the processing of transcripts on the 3' end are virtually unknown.

Posttranscriptional processing of precursor transcripts is an obligatory step in the synthesis of functional eukaryotic

mRNAs. The poly(A) tails at the 3'-end of mRNA molecules have been involved in initiation of translation, mRNA stability and export of mRNA from the nucleus to the cytoplasm. The basic 3'-end processing reaction is essentially the same from yeast to man. The typical pathway for 3' end formation consists of two reactions, a specific endonucleolytic cleavage of the mRNA precursor downstream of the coding sequence followed by template-independent addition of a poly(A) tail to the upstream cleavage product. Exceptions to this rule are the major histone mRNAs in metazoan cells. Most of the studies regarding polyadenylation of mRNAs have been done in higher eukaryotes (for reviews see Wahle (1995); Wahle and Rueggsegger (1999); Wahle and Kuhn (1997)). Three sequence motifs in the pre-mRNA have been involved in the 3'-end formation: (1) the hexanucleotide AAUAAA (or closely related sequences) is located 10–30 nucleotides (nt) upstream of the cleavage site; (2) a so-called downstream element described as 'U-rich' or 'GU rich' is usually located within the first 30 nt downstream of the cleavage site; and (3) there is no strict requirement for the precise sequence at which cleavage occurs, but the phosphodiester bond on the 3'-side of an A is preferred.

Concerning the polyadenylation site recognition in parasitic protozoa, just few cases have been analyzed. In *Giardia lamblia*, the heptanucleotide AGUPuAAA has been

Abbreviations: cDNA, DNA complementary to RNA; dNTP, deoxyribonucleoside triphosphate; DTT, dithiothreitol; nt, nucleotide(s); oligo, oligodeoxyribonucleotide; Py, pyrimidine; RACE, rapid amplification of cDNA ends; RNase, ribonuclease; SDS, sodium dodecyl sulfate; URF, unidentified open reading frame; UTR, untranslated region(s)

* Corresponding author. Tel.: +52-55-5622-3849; fax: +52-55-5550-0048.

E-mail address: ilopez@servidor.unam.mx (I. López-Villaseñor).

0378-1119/02/\$ - see front matter © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

PII: S0378-1119(02)00476-6

proposed as a giardial polyadenylation signal. This motif has been located at various distances beyond the stop codon and between 10 and 20 nt upstream from the cleavage and polyadenylation site (Peattie et al., 1989; Que et al., 1996). Modification of cytoplasmic mRNAs in trypanosomes is a complex process in which the presence of RNA polycistronic units couple the trans-splicing of a non-coding minixon (39 bases) at the 5' end with the 3' end processing of the precursor mRNA. No specific sequences for 3'-end processing and polyadenylation seem to be present in trypanosomatid mRNAs. The only common feature among poly(A) sites is the presence of an A residue before or after the poly(A) addition site. On the other hand, the position of the poly(A) site apparently depends on a downstream trans-splicing acceptor site (see Stiles et al. (1999) for review). The study of the molecular machinery for polyadenylation in *T. vaginalis* has not been addressed and very little is known about the polyadenylation process in this organism. It has been proposed that the hexanucleotides AAUAAA or AAUAAA may act as the polyadenylation signal (Lahti et al., 1992). Here we present data on polyadenylation of the *T. vaginalis* actin transcripts as well as seven other genes. A putative polyadenylation signal in this organism is proposed, where the UAA translation stop codon is almost always involved. In addition, we give evidence of the existence of a novel cleavage site that consists of at least four nt downstream of and adjacent to the cleavage and polyadenylation site.

2. Materials and methods

2.1. Parasites and culture conditions

The *T. vaginalis* isolate CNCD147 (Espinosa et al., 2001) was used throughout the experimental work. Parasites were grown in trypticase – yeast extract – maltose medium supplemented with 10% (v/v) heat – inactivated horse serum as described (Diamond, 1957).

2.2. General molecular biology techniques

Trichomonads from late logarithmic phase of growth were collected by centrifugation and washed with phosphate buffered saline. High molecular weight DNA was prepared essentially as described (Chou and Tai, 1996), with a modification of the lysis buffer being 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris–HCl pH = 8.

For Southern hybridization analysis genomic DNA (3 µg) was digested with restriction endonucleases and the restriction fragments separated on 0.8 % (wt/vol) agarose gels. Transfer of DNA from the gel to a nylon filter (Zetaprobe, Bio-Rad) was performed as described by Southern (Southern, 1975) using an ammonium acetate buffer (Rigaud et al., 1987). The membranes were hybridized at 42°C to randomly labeled ³²P-labeled DNA probes in 50% (vol/vol) forma-

amide, 5 × SSC, 50 mM Tris–HCl (pH 7.4), 1% (wt/vol) SDS, 5 × Denhardt's solution. The filters were washed three times for 20 min in 0.5 × SSC, 1% (wt/vol) SDS at 42°C and exposed to Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia biotech).

Total RNA was prepared using the TRIzol reagent (Life Technologies), an improvement to the single-step RNA isolation method developed by Chomczynski and Sacchi (1987). The RNA poly(A)⁺ fraction was isolated from total RNA using a commercial oligodeoxyribonucleotide (oligo)-dT kit (Stratagene). The RNA samples were fractionated on 1.75% (wt/vol) formaldehyde agarose gels and transferred to nylon membranes (Nytran, Schleicher & Schuell) using 10 × SSC as the transfer buffer. The filters were prehybridized, hybridized and washed as described for the Southern blot hybridizations. Each lane on the gel contained either 7 µg of total RNA or 500 ng of RNA poly(A)⁺ as quantified by A₂₆₀ spectrophotometric assays supplemented by comparison of ribosomal RNAs on ethidium bromide stained agarose gels (for the total RNA).

2.3. Probes

A homologous probe for actin was obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the *T. vaginalis* genomic DNA, using the following oligos: tvactin3' (5'-TTGCGGTGAACGATGGATGGG-3') and tvactin5' (5'-ATAACGGCTCTGGTATGTGCA-3'). A PCR product of the expected size was gel purified, cloned, sequenced and used as a homologous probe for Southern and Northern analyzes.

2.4. Amplification of 3' cDNA ends

In order to capture the 3' end information of mRNA we used the 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) System (Life Technologies) for the rapid amplification of cDNA ends. The procedure was done as recommended by the manufacturer. Briefly, for the cDNA synthesis 500 ng of poly(A)⁺ RNA plus 10 pmol of adapter primer (5' GGC-CACGGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT 3') were heat denatured and used for the reverse transcriptase reaction (1 × Expand HF Buffer, 1 mM ea deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs), 2.5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 200 units of reverse transcriptase). The reaction was carried out for 50 min at 42°C, the enzyme was heat inactivated and the RNA was degraded with ribonuclease H. The actin 3' cDNA ends were amplified from the cDNA pool using the actin23 primer (5' CCTCATGTTTCGACACATT 3') and the AUAP-B adapter primer (5' GGATCCGGCCACGGTC-GACTAGTAC 3') in a 100 µl PCR reaction (40 pmol of each primer, 1 × Expand HF buffer, 0.6 mM each dNTP, 3 mM MgCl₂, 1.75 U of Expand High fidelity PCR System enzyme, Boehringer Mannheim). The amplification reaction consisted of 30 cycles of 94°C denaturing for 1 min, 42°C annealing for 2 min, and 72°C extension for 3 min, all followed by a 5 min extension at 72°C. A second (nested)

PCR amplification was performed on the PCR product using the actin24 primer (5' AGAAGGCCGCTACAGACT-3') and the AUAP-B adapter primer under similar conditions. The same procedure was used for the amplification of the cDNA ends of the following genes: Calmodulin (Keeling et al., 1996) (oligo1: 5'-CGATAAGGATGGTGATGGCCGCTAT-3'; nested oligo: 5'-GATTACAGCTGCAGAGCTTGCTCA3'). Methionine gamma-lyase (McKie et al., 1998) (oligo1: 5'-AGGCTGACCTCCTTCAACAGATTTC-3'; nested oligo: 5'-CCTCGACAACCTCAAGCTTATCAC-3'). Superoxide dismutase gene 6 (Viscogliosi et al., 1998) (oligo1: 5'-CAAGCTTATCGTTGGCTCTGGCTT-3'; nested oligo: 5'-TACAAGACAAAGGACGGCAAGCTT-3'). The PCR products of the expected size were purified through agarose gel, rendered blunt-ended with Klenow enzyme (Gibco BRL) and the ends were phosphorylated with T4 polynucleotide kinase (Stratagene). These PCR products were cloned in pUC18 digested with *Sma*I and treated with Bacterial Alkaline Phosphatase (Gibco BRL).

2.5. DNA sequence and sequence analysis

The complete cloned PCR products were sequenced using the dideoxy chain termination method (Sanger et al., 1977) and an adaptation thereof for double-stranded templates (Murphy and Kavanagh, 1988). The sequences were analyzed using the DNASIS 2.6 package (LKB). The *T. vaginalis* published sequences were retrieved from databases by means of the ENTREZ search and retrieval system (NCBI).

3. Results and discussion

3.1. Polyadenylation of actin gene family transcripts

We have previously reported the cloning and sequencing of a *T. vaginalis* genomic fragment containing an actin gene (Espinosa et al., 2001). Fig. 1A shows a genomic Southern blot probed with a homologous actin sequence. At least ten different bands can be observed. This pattern is very similar to that already reported (Bricheux and Brugerolle, 1997) which indicates an apparent genetic conservation in the actin gene family among different isolates. In a former report it is proposed that actin transcripts lack a poly(A) tail in the 3' end (Bricheux and Brugerolle, 1997). To test the actual polyadenylation status of actin transcripts in *T. vaginalis*, we performed a northern blot analysis of total and oligodT-fractionated RNA with an homologous actin probe. Fig. 1B shows hybridization bands in both the lanes loaded with poly(A)⁺ and total RNA. This experiment suggests that in *T. vaginalis*, actin messages are polyadenylated.

As mentioned above, the polyadenylation process of mRNAs has been scarcely studied in *T. vaginalis*. Our first approach was to characterize the 3' untranslated regions (UTRs) of actin transcripts (see Section 2.4). Ten different actin cDNA clones were isolated by 3' RACE. The recov-

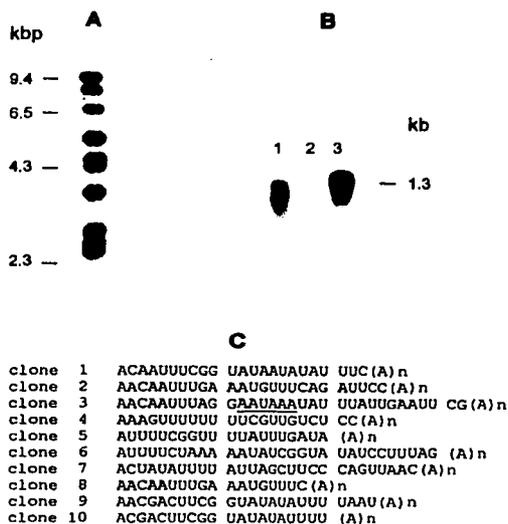


Fig. 1. Panel A. Southern blot of *Trichomonas vaginalis* genomic DNA digested with *Eco*RI and probed with a homologous actin coding region. Panel B. Northern blot of *Trichomonas vaginalis* RNA probed with a homologous actin coding region. Lanes: 1, RNA poly(A)⁺; 2, RNA poly(A)⁻; and 3, total RNA. Panel C. Sequence of the 3' UTRs from different actin cDNA clones. The poly(A) tail is represented by (A)n. The numbering of the clones is arbitrary. The consensus signal for polyadenylation in eukaryotes (AAUAAA) is underlined in clone 3.

ered lengths of their poly-A tails ranged from 20 to 40 adenine residues in accordance with what has been previously described (Meade et al., 1997). However, only in one out of ten cases was the consensus eukaryotic polyadenylation motif AAUAAA observed (Fig. 1C). We then searched for the presence of other conserved motifs in the 3' UTR, but no common element could be found other than the AU richness of this region as has been previously described for intergenic sequences (Espinosa et al., 2001). The apparent lack of the hexanucleotide AAUAAA or other conserved motifs in the 3' UTR sequence motivated the analysis described below.

3.2. Cleavage and polyadenylation motifs

In order to identify the cleavage site and to analyze the sequence downstream from it in different *T. vaginalis* transcripts, we used data from three sources: (1) several members of the actin gene family were cloned, and their 3' non-coding region was sequenced. (2) The sequence of four reported *T. vaginalis* genes were used to determine the polyadenylation site of their mRNAs by 3' RACE. (3) Both genomic and cDNA sequences from another three *T. vaginalis* genes were retrieved from databases (see legend from Fig. 2).

68-C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

codon, and the other one is placed 5 nt further downstream. The distance between these UAAA motifs and the cleavage site is 36 and 27 nt, respectively. We propose that as the first motif could be located too far away from the cleavage site to be functional, the second motif – positioned at the appropriate distance – could in turn be evolutionary selected as the polyadenylation signal. A similar situation could also occur in the *act11* transcript (line 6, Fig. 2).

3.2.3. The Succinyl CoA synthetase beta subunit (β -SCS) case

The polyadenylation of β -SCS transcripts was analyzed using previously published data (Lahti et al., 1992). Our analysis of the 3'UTR sequence identifies two potential polyadenylation signals and three possible cleavage sites, depicted respectively as bold and underlined (line 13, Fig. 2). The usage of this signals in the β -SCS transcripts can be deduced from the data presented in Lahti's report: the authors map the 3' end of the β -SCS transcript by RNA protection assays and define the end of the transcript 64 nt downstream from the stop codon. The authors point out that the sequence AAUAAA, located 28 nt upstream from the cleavage site, is the polyadenylation signal. In the RNA protection analysis (see Fig. 5 in Lahti et al. (1992)) several bands can be observed: two larger bands that run very close together and a smaller one that maps 'within an A + T-rich region' and has been described by the authors as probably

the result of breathing of the duplex. Our interpretation of this data is that in the β -SCS transcripts two polyadenylation motifs and three cleavage sites are used. The β -SCS transcripts could be processed as a collection of mRNAs of three different sizes: the shorter transcript would be the result of the first polyadenylation signal (containing the stop codon) acting upon cleavage site 1. The second polyadenylation signal (30 nt downstream from the stop codon) could act upon cleavage sites 2 and 3 (Fig. 2), thus giving rise to the two larger transcripts with very similar sizes. Our interpretation of these data agrees with the cis-acting sequences we proposed above for polyadenylation and cleavage of *T. vaginalis* pre-mRNAs.

Summarizing, in *T. vaginalis* the tetranucleotide sequence UAAA is apparently necessary but not sufficient to direct the polyadenylation of transcripts. This signal needs to be positioned at the appropriate distance (11–30 nt) from the cleavage site. On the other hand, more than one polyadenylation and cleavage motifs can be present in some *T. vaginalis* genes, thus giving rise to mRNAs with different lengths in their 3' termini. Whether transcription termination is coupled to polyadenylation in this organism is a question that remains to be addressed.

3.3. Downstream elements

Another sequence required for polyadenylation in eukaryotes has been vaguely described as a 'U-rich' or 'GU-rich'

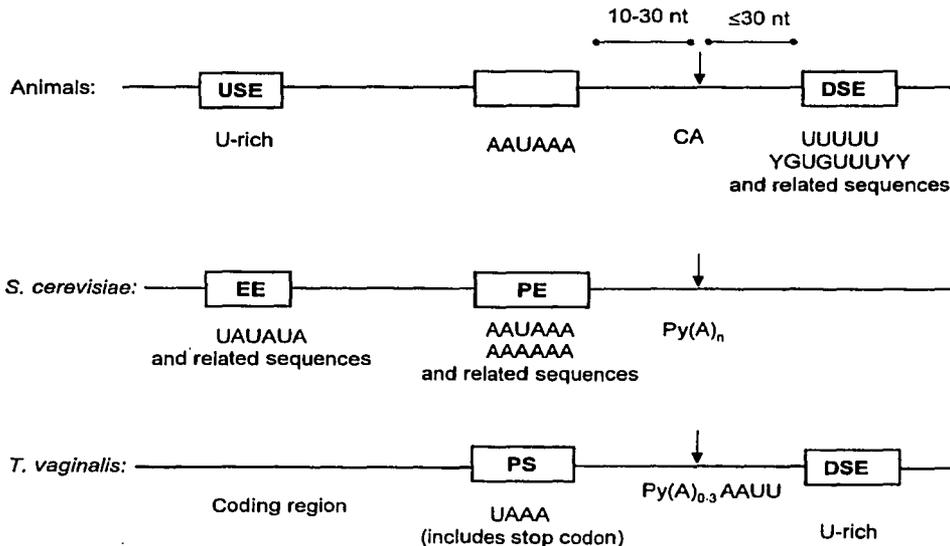


Fig. 3. A comparison of 3' processing signals in animals, yeast and *T. vaginalis*. Names of sequence elements are given in the boxes: USE, upstream element; DSE, downstream element; EE, efficiency element; PE, positioning element; and PS, polyadenylation signal. Possible sequences of these elements are given below the boxes. The vertical arrows indicate the cleavage sites. (Adapted from Wahle and Kuhn (1997)).

68-E

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

element downstream from the polyadenylation site. We also identified in *T. vaginalis* the presence of one or more U-rich regions 3–8 nt in length downstream from the cleavage site (Fig. 2). Fig. 3 shows the comparison of the 3' processing signals herein proposed for *T. vaginalis* transcripts with those described for animal and yeast cells.

4. Conclusions

1. In *T. vaginalis*, ten different actin transcripts are polyadenylated and have a similar size of about 1.3 kb.

2. The stop codon UAA is generally found in *T. vaginalis* mRNAs.

3. The sequence UAAA is here proposed as the polyadenylation signal in the *T. vaginalis* mRNA precursors. The stop codon UAA is usually found as part of this signal.

4. The sequence $Py^1(A)_n-3AAUU$ is proposed to be the cleavage site for polyadenylation of *T. vaginalis* mRNAs.

5. One or several U-rich regions are found downstream from the cleavage site.

6. The polyadenylation signal UAAA in *T. vaginalis* is similar to the consensus heptanucleotide polyadenylation signal AAUAAA in eukaryotes. Could it be that the stop codon UAA has been selected to seed the polyadenylation signal in an ancestor of the eukaryotic lineage? This process in *T. vaginalis* might reflect an early evolutionary strategy to signal both the end of a coding region and the processing of transcripts at their 3' ends.

Acknowledgements

The authors wish to thank Alejandro Alagón and Rosana Sánchez for helpful discussions, Sumana Datta and Marco V. José for critical reading of the manuscript and Juliana Herrera for technical assistance. This work was supported by grant IN212199 from DGAPA, UNAM and grant 28036M from CONACYT, México. Norma Espinosa was supported by a DGEF (UNAM) fellowship.

References

Bricheux, G., Brugerolle, G., 1997. Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 205–213.

Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.

Chou, C.F., Tai, J.H., 1996. Simultaneous extraction of DNA and RNA from nuclease-rich pathogenic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Biotechniques* 20, 790–791.

Diamond, L.A., 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 43, 488–490.

Espinosa, N., Hernandez, R., Lopez-Griego, L., Arroyo, R., Lopez-Villasenor, I., 2001. Differences between coding and non-coding regions in the *Trichomonas vaginalis* genome: an actin gene as a locus model(1). *Acta Trop.* 78, 147–154.

Keeling, P.J., Doherty-Kirby, A.L., Teh, E.M., Doolittle, W.F., 1996. Linked genes for calmodulin and E2 ubiquitin-conjugating enzyme in *Trichomonas vaginalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43, 468–474.

Lahti, C.J., d'Oliveira, C.E., Johnson, P.J., 1992. Beta-succinyl-coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *J. Bacteriol.* 174, 6822–6830.

Liston, D.R., Johnson, P.J., 1998. Gene transcription in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Today* 14, 261–265.

Liston, D.R., Carrero, J.C., Johnson, P.J., 1999. Upstream regulatory sequences required for expression of the *Trichomonas vaginalis* alpha-succinyl CoA synthetase gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 104, 323–329.

McKie, A.E., Edlind, T., Walker, J., Mottram, J.C., Coombs, G.H., 1998. The primitive protozoan *Trichomonas vaginalis* contains two methionine gamma-lyase genes that encode members of the gamma-family of pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes. *J. Biol. Chem.* 273, 5549–5556.

Meade, J.C., Li, C., Moate, M.E., Davis-Hayman, S.R., Lushbaugh, W.B., Finley, R.W., 1997. Molecular characterization of a sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca²⁺ + 2 ATPase gene from *Trichomonas vaginalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44, 480–486.

Murphy, G., Kavanagh, T., 1988. Speeding-up the sequencing of double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* 16, 5198.

Peattie, D.A., Alonso, R.A., Hein, A., Caulfield, J.P., 1989. Ultrastructural localization of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. *J. Cell. Biol.* 109, 2323–2335.

Que, X., Svard, S.G., Meng, T.C., Hetsko, M.L., Aley, S.B., Gillin, F.D., 1996. Developmentally regulated transcripts and evidence of differential mRNA processing in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 81, 101–110.

Rigaud, G., Grange, T., Pictet, R., 1987. The use of NaOH as transfer solution of DNA onto nylon membrane decreases the hybridization efficiency. *Nucleic Acids Res.* 15, 857.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.

Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503–517.

Stiles, J.K., Hicoock, P.I., Shah, P.H., Meade, J.C., 1999. Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 93, 781–807.

Viscogliosi, E., Delgado-Viscogliosi, P., Gerbod, D., Dauchez, M., Gratepanche, S., Alix, A.J., Dive, D., 1998. Cloning and expression of an iron-containing superoxide dismutase in the parasitic protist, *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 161, 115–123.

Wahle, E., 1995. 3'-end cleavage and polyadenylation of mRNA precursors. *Biochim. Biophys. Acta* 1261, 183–194.

Wahle, E., Kuhn, U., 1997. The mechanism of 3' cleavage and polyadenylation of eukaryotic pre-mRNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 57, 41–71.

Wahle, E., Rueggsegger, U., 1999. 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 277–295.

6. DISCUSIÓN.

Trichomonas vaginalis es un organismo que divergió tempranamente en la línea de los eucariontes, antes de la divergencia de la mayoría de otros linajes de protistas. El estudio de la organización y regulación génica en éstos parásitos nos puede proporcionar datos interesantes de esos procesos en organismos de aparición temprana en la rama de los eucariontes, relevantes para estudios filogenéticos. Este trabajo se enfocó en el estudio de la organización génica y la caracterización tanto de las regiones 3' no traducidas de los mRNAs, como de secuencias genómicas importantes para el proceso de poliadenilación en *T. vaginalis*.

En lo referente a la organización génica se presentó el análisis de un fragmento genómico de 3.5 kb en el cual se localiza la región codificadora completa de un gen de actina (proteína constituyente del citoesqueleto de este organismo). Este fragmento contiene también dos regiones codificadoras incompletas localizadas en los extremos 5' y 3' de la clona, que tienen similitud con la enzima adenilato ciclasa y la proteína hipotética de levadura (YER082c). Respecto al análisis del gen de actina, se identificó la secuencia promotora consenso (elemento Inr) reportada para *T. vaginalis* (Liston y Johnson, 1998). De hecho, se observaron dos probables elementos Inr sobrelapados localizados 12 y 17 nucleótidos río arriba del codón de inicio ATG de la región codificadora de actina. Para conocer si una o ambas secuencias tienen actividad promotora se deberá llevar a cabo un análisis de tipo "primer-extension" para determinar el sitio de inicio de la transcripción, ya que se ha reportado que este sitio se ubica dentro del motivo consenso que funciona como elemento iniciador (Quon y col., 1994).

El análisis del contenido de G + C en regiones codificadoras y no codificadoras de esta clona genómica de *T. vaginalis*, nos mostró que el contenido

de G + C en las regiones codificadoras es mayor que en las regiones no codificadoras (49% vs 29% en actina y en las regiones intergénicas adyacentes).

Esta relación se observa también en otros fragmentos genómicos de *T. vaginalis* que hemos analizado: calmodulina-ubiquitina (Keeling y col., 1996), metionina gama-liasa (McKie, A.E. y col; 1998), e histona 1. El análisis del contenido G + C de secuencias de *T. vaginalis* ha mostrado un cuadro consistente: las regiones intergénicas en el genoma de *T. vaginalis* son ricas en A + T y se observa un incremento marcado en el contenido de G + C en las regiones codificadoras. Proponemos que la distribución del contenido de G + C podría ser una herramienta útil para identificar regiones potencialmente codificadoras en este organismo. En el fragmento analizado también observamos que las regiones intergénicas contienen 2.5 veces más elementos repetidos (secuencias repetidas directas, secuencias repetidas inversas y secuencias palindrómicas) que los encontrados en las regiones codificadoras. Aun queda por determinarse si estas secuencias repetidas tienen algún papel funcional y/o estructural en el genoma de *T. vaginalis*.

Por otra parte, determinamos que actina en *T. vaginalis* esta codificada por una familia multigénica de por lo menos 9 miembros. Este patrón es similar al ya reportado (Bricheux y Brugerolle, 1997), lo cual indica una conservación genética entre diferentes aislados de este parásito. En este trabajo hemos demostrado que todos los transcritos de actina están poliadenilados, basados en dos tipos de evidencia: por una parte, los ensayos tipo "Northern blot" muestran claramente que la señal de hibridación con la sonda de actina se localiza en la fracción de RNA total y RNA poliA+ y no se detectó hibridación en la fracción de RNA poliA-; por otra parte, mediante ensayos de 3'RACE pudimos clonar diez secuencias distintas de cDNA de actina. Estos resultados contrastan con lo mencionado por Bricheux (Bricheux y Brugerolle, 1997), quienes sugieren que los mensajeros de actina carecen de colas de poliA, ya que en las clonas de cDNA de actina que ellos aislaron no encontraron esta secuencia.

El otro aspecto estudiado fue el procesamiento de las regiones 3' no traducidas importante para el proceso de poliadenilación de los transcritos, el cual se inició con el estudio de la familia génica de actina. Como señalamos anteriormente, hemos clonado diez secuencias distintas de cDNA de actina con regiones 3' no traducidas de entre 20 y 40 nucleótidos, éstas regiones tienen tamaño similar a los que han sido observados en otros protozoarios parásitos como *Giardia* spp. (Adam, 1991) y *Entamoeba histolytica* (Battacharya, 2000).

En *T. vaginalis* se ha propuesto que la secuencia AAUAAA, descrita como la señal de poliadenilación en eucariontes superiores (Wahle y Kühn, 1997), podría ser la señal utilizada para el proceso de poliadenilación en este parásito (Johnson y col., 1990; Lahti y col., 1992). Sin embargo, solamente una de las 10 clonas de cDNA de actina analizadas por nosotros tiene la secuencia AAUAAA en la región 3' no traducida, lo que nos hizo pensar que en este parásito esta secuencia tal vez no es la señal utilizada en el proceso de poliadenilación.

Para buscar aquellos motivos que pudieran estar implicados en el proceso de poliadenilación, hicimos un análisis comparativo de las regiones 3' no traducidas de los cDNAs de actina con las regiones intergénicas de nueve clonas genómicas de actina aisladas de una biblioteca genómica de *T. vaginalis* construida en el laboratorio. Asimismo utilizamos la secuencia de cuatro genes de *T. vaginalis* reportados y se identificaron los sitios de procesamiento de estos transcritos mediante 3' RACE. También analizamos las secuencias genómicas y de cDNA de otros tres genes de *T. vaginalis* reportados. El análisis de los datos nos mostró que en la mayoría de los transcritos de *T. vaginalis* estudiados, el codón de terminación de la traducción es UAA y este es seguido por una adenina, formándose el motivo UAAA, el cual generalmente está localizado entre 11 y 30 nucleótidos río arriba del sitio de procesamiento de los transcritos. Cabe mencionar que en *T. vaginalis* el codón de terminación UAA es utilizado en el 93% de los casos, de acuerdo con el análisis de uso de codones reportado por el grupo

de Lushbaugh (Meade, y col., 1997). Observamos también que en algunos transcritos [actina11 (act11), β -succinil-coenzima A sintetasa (β -SCS), calmodulina (cam) y de la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico (TvCA1)], el motivo UAAA puede presentarse en más de una ocasión en las regiones 3' no traducidas, las cuales tienen un contenido alto de A+T lo que hace que se incremente la probabilidad de que este presente dicha secuencia.

La ubicación del motivo UAAA resulta interesante debido a que nos remite directamente a lo descrito para la señal de poliadenilación en eucariontes superiores, en los que el motivo AAUAAA tiene una posición semejante (10 a 30 nucleótidos río arriba del sitio de procesamiento de los transcritos) y esta distancia es relevante para el proceso de poliadenilación. Por lo tanto, proponemos que el tetranucleótido UAAA es la señal de poliadenilación en *T. vaginalis*. Esta señal es similar a la señal de poliadenilación consenso AAUAAA en eucariontes superiores. ¿Podría ser entonces que el codón de terminación UAA haya sido seleccionado evolutivamente como semilla de la señal de poliadenilación en un ancestro del linaje eucariótico? Este proceso en *T. vaginalis* podría reflejar una estrategia de evolución temprana para señalar el final de una región codificadora y el sitio de procesamiento de transcritos en sus extremos 3'.

Hemos identificado una secuencia conservada (AAUU) que señala el sitio de corte y procesamiento de los precursores de mRNAs en *T. vaginalis*, ya que en 14 de 16 casos esta secuencia se encuentra adyacente y río abajo del sitio de procesamiento. Casi siempre este motivo es precedido por una pirimidina (C ó U) y por varias adeninas, por lo que el motivo podría ser propuesto como $Py\downarrow(A)_n$ AAUU. La identificación de un motivo conservado (AAUU) adyacente y río abajo del sitio de corte de los transcritos, es un hallazgo novedoso en el proceso de poliadenilación de eucariontes.

En *T. vaginalis* observamos que puede haber más de un motivo $\text{Py}\downarrow(\text{A})_{0-3}\text{AAUU}$, lo que daría lugar a más de un sitio de procesamiento, es decir, podrían existir sitios alternativos de poliadenilación. La propuesta anterior la confirmamos con el análisis de los transcritos de metionina gama liasa y de la subunidad beta de succinil CoA sintetasa. No sabemos si existe preferencia para la elección entre los dos sitios de poliadenilación, pero es posible que en esta elección podrían estar participando factores de poliadenilación como ha sido observado en *Sacharomyces cerevisiae*. En este organismo algunos transcritos presentan sitios alternativos de poliadenilación y en particular el factor CF IB de poliadenilación esta involucrado con la elección de sitios alternativos. La presencia o ausencia de dicho factor o su concentración influyen de manera importante para que se seleccione un sitio preferente de poliadenilación (Minvielle-Sebastia y col., 1998).

En conclusión, este trabajo sugiere que en *T. vaginalis* el motivo UAAA es la secuencia que actúa como señal de poliadenilación y se ubica a una distancia de entre 11 y 30 nucleótidos río arriba del sitio de procesamiento del transcrito, pudiéndose encontrar más de una señal de poliadenilación en las regiones 3' no traducidas de los transcritos. Es importante destacar que el codón de terminación de la traducción casi siempre forma parte de este motivo. Proponemos que el motivo UAAA no es suficiente para dirigir el proceso de poliadenilación de este organismo y es necesaria la secuencia $\text{Py}\downarrow(\text{A})_{0-3}\text{AAUU}$ para señalar el sitio de procesamiento del transcrito. Otra región rica en Us, localizada río abajo del sitio de procesamiento del transcrito, podría estar implicada en este proceso.

La propuesta anterior deberá ser corroborada con estudios de mutagénesis dirigida utilizando un vector de transfección para *T. vaginalis* construido en el laboratorio, en el cual se han colocado las regiones intergénicas 5' y 3' de un gen de actina que contienen las señales para la transcripción y la poliadenilación en *T. vaginalis*.

7. CONCLUSIONES.

- En *Trichomonas vaginalis*, actina esta codificada por una familia multigénica de por lo menos 9 miembros.
- La clona de actina estudiada:
 - tiene un marco de lectura de 1128 pb que codifica para actina.
 - no presenta intrones.
 - el contenido de G + C en las regiones codificadoras es mayor que en las no codificadoras (49% vs. 29%).
 - se encontraron dos marcos de lectura abiertos (incompletos) que flanquean al gen de actina y que codifican por adenilato ciclasa y una proteína hipotética. Estos dos genes son copias únicas en el genoma y se expresan.
- Proponemos que el contenido de G + C es una herramienta valiosa para identificar regiones codificadoras en *T. vaginalis*.
- Hemos identificado 10 transcritos distintos de actina, poliadenilados que tienen una tamaño similar de 1.3 kb.
- Proponemos a la secuencia UAAA como señal de poliadenilación en los precursores de mRNA en *T. vaginalis*. El codón de terminación UAA es casi siempre parte de esta señal.
- Proponemos la secuencia $Py^1(A)_{0-3}AAUU$ como señal de corte para la poliadenilación de los mRNAs de *T. vaginalis*.
- Una o varias regiones ricas en U se encuentran río abajo del sitio de procesamiento.

8. BIBLIOGRAFIA.

- Adam, R.D. 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbial. Rev.* 55: 706-732.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Rogerts, K. and Watson, J.D. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. pp. 787-840. 3ra. Edición. Garland Publishing. Inc. New. York.
- Alderete, J.F., Lehker, M.W. and Arroyo, R. 1995. The mechanisms and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Today*. 11:70-74.
- Álvarez-Sánchez, M.E., Avila-González, L., Becerril-Garcia, C., Fattel-Facenda, L.V., Ortega-López, J. and Arroyo, R. 2000. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis*. 28:193-202.
- Arroyo, R. 2000. *Biología molecular de la trichomonosis*. *Genética y Biomedicina Molecular*. Edit. Limusa, Noriega. Cap. 19. p.p. 287-304.
- Arroyo, R. and Alderete, J.F. 1989. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect. Immun.* 57(10):2991-2997.
- Arroyo, R. Engbring, J. and Alderete, J.F. 1992. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Microbiol.* 6(7):853-862.
- Arroyo, R., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A. and Alderete, J.F. 1993. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Mol. Microbiol.* 7(2):299-309.
- Arroyo, R., Engbring, J., Nguyen, J., Musatovova, O., López, O., Lauriano, C. and Alderete, J.F. 1995. Characterization of cDNAs encoding adhesin proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Archives of Medical Research*. 26(4):361-369.
- Ayscough, K.R. 1998. In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:102-111.
- Baroin, A., Perasso, R., Qu, L.H., Brugerolle, G., Bachellerie, J.P. and Adoutte, A. 1988. Partial phylogeny of the unicellular eukaryotes based on rapid sequencing of a portion of 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 3474-3478.

- Bastos, F.M. and Benchimol, M. 1998. Observation of membrane fusion on the interaction of *Trichomonas vaginalis* with human vaginal epithelial cells. *Parasitol. Res.* 84:213-220.
- Bhattacharya, A., Satish, S., Bagchi, A. and Battacharya, S. 2000. The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Parasitol.* 30:401-410.
- Beelman, C.A. and Parker, R. 1995. Degradation of mRNA in Eukaryotes. *Cell.* 81(2):179-183.
- Bernal, B. y Hernández, G. 1997. Las enfermedades de transmisión sexual ETS: otro reto para la prevención y control de la epidemia del VIH/SIDA. *SIDA-ETS.* 3(3):63-67.
- Biangini, G.A., Finlay, B.J. and Lloyd, D. 1997. Evolution of the hydrogenosome. *FEMS Microbiol. Lett.* 155:133-140.
- Bricheux, G. and Brugerolle, G. 1997. Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 153:205-213.
- Brugerolle, G., Bricheux, G. and Coffe, G. 1996. Actin cytoskeleton demonstration in *Trichomonas vaginalis* and in other trichomonads. *Biol. Cell.* 88:29-36.
- Cappuccinelli, P., Sellito, C., Zicconi, D. and Juliano, C. 1986. Structural and molecular organization of *Trichomonas vaginalis* cytoskeleton. *Acta Universitatis Carolinae Biol.* 30:211-217.
- Chen, F., MacDonald, C.C. and Wilusz, J. 1995. Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucl. Acids Res.* 23(14):2614-2620.
- Chou, C.F. and Tai, J.H. 1996. Simultaneous extraction of DNA and RNA from nuclease-rich pathogenic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *BioTechniques.* 20:790-791.
- Cohen, M.S., Hoffman, I.F., Royce, R.A., Kazembe, P., Dyer, J.R., Costello Dali, C., Zimba, D., Vernazza, P.L., Maida, M., Fiscus, S.A., Eron, J.J. Jr. and the AIDSCAP Malawi Research Group. 1997. Reduction of concentration of HIV-1-1 in semen after treatment of urethritis: implications for prevention of sexual transmission of HIV-1. *The Lancet.* 349:1868-1873.
- Conzelmann, K.K. and Helftenbein, E. 1987. Nucleotide sequence and expression of two B-tubulin genes in *Stylonychia lemnae*. *J. Mol. Biol.* 198:643-653.

Cotch, M.F., Pastorek, J.G., Nugent R.P., Hillier, S.L., Gibbs, R.S., Martin, D.H., Eschenbach, D.A., Edelman, R., Carey, J.C., Regan, J.A., Krohn, M.A., Klebanoff, M.A., Rao, A.V. and Rhoads, G.G. 1997. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and prematurity study group. Sex. Trans. Dis. 24(6):353-360.

Dichtl, B. and Keller, W. 2001. Recognition of polyadenylation sites in yeast pre-mRNAs by cleavage and polyadenylation factor. EMBO J. 20(12): 3197-3209.

Drummond, D.R., Peckham, M., Sparrow, J.C. and White, D.C.S. 1990. Alteration in crossbridge kinetics caused by mutations in actin. Nature. 348:440-442.

Eckner, R., Ellmeier, W. and Birnstiel, M. L. 1991. Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from the nucleus. EMBO J. 10(11):3513-3522.

Egli, C., Springer, C. and Braus, G. H. 1995. A complex unidirectional signal element mediates GCN4 mRNA 3' end formation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 15:2466-2473.

Fiori, P.L., Rappelli, P., Rocchigiani, A.M. and Cappuccinelli, P. 1993. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. FEMS Microbiol. Lett. 109:13-18.

Garber, G.E., Lemchuk-Favel, L.T. and Bowie, W.R. 1989. Isolation of a cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. J. Clin. Microbiol. 27(7):1548-1553.

Garber, G.E. and Lemchuk-Favel, L.T. 1990. Association of production of cell-detaching factor with the clinical presentation of *Trichomonas vaginalis*. J. Clin. Microbiol. 28(11):2415-2417.

Germot, A., Philippe, H. and Le Guyeader, 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. 93:14614-14617.

Gil, A. and Proudfoot, N.J. 1987. Position-dependent sequence elements downstream of AAUAAA are required for efficient rabbit b-globin mRNA 3' end formation. Cell. 49:399-406.

Gómez-Conde, E., Mena-López, R., Hernández-Jauregui, P., González-Camacho, M. and Arroyo, R. 2000. *Trichomonas vaginalis*: Chromatin and mitotic spindle during mitosis. Exp. Parasitol. 96:130-138.

- González-Robles, A., Lázaro-Heller, A., Espinosa-Castellano, M., Anaya-Velázquez, F. and Martínez-Palomo, A. 1995. *Trichomonas vaginalis*: ultrastructural bases of the cytopathic effect. *J. Euk. Microbiol.* 42(5):641-651.
- Guo, Z. and Sherman, F. 1995. 3' end-forming signals of yeast mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 15(11):5983-5990.
- Hartwing, J.H. and Kwiatkowski, D.J. 1991. Actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 3:87-97.
- Hashimoto, T., Sánchez, L.B., Shirakkura, T., Muller, M. and Hasegawa, M. 1998. Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6860-6865.
- Häusler, T., Stierhof, Y.D., Blattner, J. and Clayton, C. 1997. Conservation of mitochondria targetin sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal proteins from the early-branching eukaryotes *Crithidia*, *Trypanosoma* and *Trichomonas*. *E. J. Cell Biol.* 73:240-251.
- Heath, B. 1980. Variant mitosis in lower eukaryotes: indicators of the evolution of mitosis? *Int. Rev. Cytol.* 64:6-81.
- Hirose, Y. and Manley, J.L. 1998. RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature.* 395:93-96.
- Huang, Y. and Carmichael, G. G. 1996. Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 16(4):1534-1542.
- Jackson, D.J., Rakwar, J.P., Bwayo, J.J., Kreiss, J.K. and Moses, S. 1997. Urethral *Trichomonas vaginalis* infection and HIV-1 transmission. *The Lancet.* 350:1076.
- Janmey, P.A. and Chaponnier C. 1995. Medical aspects of the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7:111-117.
- Johnson, P.J., D'Oliveira, C. E., Gorrell, T. E. and Müller, M. 1990. Molecular analysis of the hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6097-6101.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F. and Holmes, K.C. 1990. Atomic structure of the actin:DNAse I complex. *Nature* 347:44-49.
- Kelling, P.J., Doherty-Kirby, A.L., The, E.M., Doolittle, W.F. 1996. Linked genes for calmodulin and E2 ubiquitin-conjugating enzyme in *Trichomonas vaginalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43:468-474.

Keller, W., Bienroth, X., Lang, K.M. and Christofori, G. 1991. Cleavage and polyadenylation factor CPF specifically interacts with the pre-mRNA 3' processing signal AAUAAA. *10(13):4242-4249.*

Kreis, T. and Vale, R. 1994. *Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins.* Oxford New York, Oxford University Press.

Krieger, J.N., Poisson, M. and Rein, M. 1983. Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infect. Immun.* 41:1291-1295.

Krieger, J.N., Ravdin, J.I., Rein, M.F. 1985. Contact dependent cytopathogenic mechanism of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 50:778-786.

Laga, M., Manoka, A., Kivuvu, M. et al. 1993. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *Aids.* 7:95-102.

Lahti, C.J., D'Oliveira, C.E. and Johnson, P.J. 1992. β -Succinyl-coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *J. Bacteriol.* 174(21):6822-6830.

Leipe, D.D., Genderson, J.H., Nerad, T.A. and Sogin, M.L. 1993. Small subunit ribosomal RNA of *Hexamita inflata* and the quest for the first branch in the eukaryotic tree. *Mol. Bioch. Parasitol.* 59:41-48.

Liston, D.R. and Johnson, P.J. 1998. Gene transcription in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Today.* 14(7):261-265.

Liston, D.R. and Johnson, P.J. 1999. Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element. *Mol. Cell. Biol.* 19(3):2380-2388.

Liston, D.R., Carrero, J-C. and Johnson, P.J. 1999. Upstream regulatory sequences required for expression of the *Trichomonas vaginalis* α -succinyl CoA synthetase gene. *Mol. Bioch. Parasitol.* 104:323-329.

Liston, D.R., Lau, A.O.T., Ortiz, D., Smale, S. T. and Johnson, P.J. 2001. Initiator recognition in a primitive eukaryote: IBP39, an initiator-binding protein from *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Cell. Biol.* 21(22):7872-7882.

Lushbaugh, W.B., Turner, A.C., Gentry, G.A. and Klykken, P.C. 1989. Characterization of a secreted cytoactive factor from *Trichomonas vaginalis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41(1):18-28.

- MacDonald, C.C., Wilusz, J. and Shenk, T. 1994. The 64-kilodalton subunit of the CstF polyadenylation factor binds to pre-mRNAs downstream of the cleavage site and influences cleavage site location. *Mol. Cell. Biol.* 14(10):6647-6654.
- Marquardt, W.C., Demaree, R.S. and Grieve, R.B. 2000. *Parasitology Vector Biology*. Second Edition. Harcourt. Academic Press. pp. 74.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballentyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S. D., Wickens, M. and Bentley, D.L. 1997. The C-terminal domain of RNA processing to transcription. *Nature*. 385: 357-361.
- McEwan, N.F., Eschenlauer, S.C.P., Calza, R.E., Wallace, R.J. and Newbold, J. 2000. The 3'untranslated region of messages in the rumen protozoan *Entodinium caudatum*. *Protist*. 151:139-146.
- McKie, A.E., Edlind, T., Walker, J. Mottram, J.C. and Coombs, G.H. 1998. The primitive protozoon *Trichomonas vaginalis* contains two methionine γ -lyase genes that encode members of the γ -family of pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes. *J. Biol. Chem.* 273(10):5549-5556.
- Meade, J.C., Shah, P.H. and Lushbaugh, W.B. 1997. *Trichomonas vaginalis*: Analysis of Codon Usage. *Exp. Parasitol.* 87:73-74.
- Meysich, K. and Garber, G. E. 1995. *Trichomonas vaginalis*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 8:22-25.
- Miceli, C., La Terza, A. and Melli, M. 1989. Isolation and structural characterization of cDNA clones encoding the mating pheromone Er-1 secreted by the ciliate *Euplotes raikovi*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:3016-3020.
- Minvielle-Sebastia, L., Beyer, K., M.Krecic, A., Hector, R. E., Swanson, M.S. and Keller, W. 1998. Control of cleavage site selection during mRNA 3' end formation by a yeast hnRNP. *EMBO J.* 17(24):7454-7468.
- Müller, M. 1993. The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* 139:2879-2889.
- Murphy, G., Kavanagh, T.A. 1988. Speeding-up the sequencing of double-stranded DNA. *Nucl. Acids. Res.* 16:5198.
- Nellen, W. and Gallwitz, D. 1982. Actin genes and actin messenger RNA in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Mol. Biol.* 159:1-18.
- Proudfoot, N.J. 1989. How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends Bioch. Sci.* 14:105-110.

Que, X., Svärd, S.G., Meng, T.C., Hetsko, M.L., Aley, S.B. and Gillin, F.D. 1996. Developmentally regulated transcripts and evidence of differential mRNA processing in *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 81:101-110.

Quon, V.K.D., Delgadillo, M.G., Khachi, A., Smale, S.T. and Johnson, P.J. 1994. Similarity between a ubiquitous promoter element in an ancient eukaryote and mammalian initiator elements. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:4579-4583.

Rendón-Maldonado, J.G., Espinosa-Castellano, M., González-Robles, A. and Martínez-Palomo, A. 1998. *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes and erythrocytes. Exp. Parasitol. 89:241-250.

Ribeiro, K.C., Monteiro-Leal, L.H. and Benchimol, M. 2000. Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. J. Eukaryot. Microbiol. 47(5):481-492.

Rigaud, G.F., Grange, T., Pictet, R. 1987. The use of NaOH as transfer solution of DNA onto nylon membrane decreases the hybridization efficiency. Nucl. Acids Res. 15:857.

Roger, A.J., Clark, C.G. and Doolittle, W.F. 1996. A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 93:14618-14622.

Teixeira, S.M.R. 1998. Control of gene expression in Trypanosomatidae. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 31:1503-1516.

Sánchez, L.B. and Müller, M. 1998. Cloning and heterologous expression of *Entamoeba histolytica* adenylate kinase and uridylate kinase. Gene. 209:219-228.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:5463-5467.

Sarkar, N. 1997. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. Annu. Rev. Biochem. 66:173-197.

Schmidt, G.D., Roberts, L.S. 1989. Foundations in parasitology. Fourth Edition. 35-54, 87-90.

Schurch, N., Hehl, A., Vassella, E., Braun, R. and Roditi I. 1994. Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. Mol. Cell. Biol. 14:3668-3675.

Sheets, M. D., Ogg, S, C. and Wickens, M. P. 1990. Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation *in vitro*. Nucl. Acids Res. 18(19):5799-5805.

Shortle, D., Haber, J.E. and Botstein, D. 1982. Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative DNA transformation. Science. 217:371-373.

Silva Filho, F.C., de Souza, W. and Lopes, J.D. 1988. Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:8042-8046.

Sogin, M.L. 1991. Early evolution and the origin of eukaryotes. Curr. Opin. Gen. Dev. 1:457-463.

Sorvillo, F. and Kerndt, P. 1998. *Trichomonas vaginalis* and amplification of HIV-1 transmission. The Lancet. 351:213-214.

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.

Svärd, S.F., Rafferty, C., McCaffery, J.M., Smith, M.W., Reiner, D.S. and Gillin F.D. 1999. A signal recognition particle receptor gene from the early-diverging eukaryote, *Giardia lamblia*. Mol. Bioch. Parasitol. 98:253-264.

Tsai, C.D., Liu, H.W. and Tai, J.H. 2002. Characterization of an iron-responsive promoter in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. J. Biol. Chem. 277(7): 5153-5162.

Ullu, E., Tschudi, C. y Günzl, A. 1996. Trans-splicing in trypanosomatid protozoa. In Molecular Biology of Parasitic Protozoa. Eds. Smith, D.F., Parsons, M. YRL Press at Oxford University Press. New York. pp. 115-133.

Urban, B., Blasig, C. Förster, B, Hamelmann, C., and Horstmann, R.D. 1996. Putative serine/threonine protein kinase expressed in complement-resistant forms of *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. 80:171-178.

Vigilancia Epidemiológica Semana 1, 2001. Dirección General de Epidemiología. Cuadro 8.3. Casos acumulados por entidad federativa de Enfermedades de Transmisión Sexual hasta la semana epidemiológica 51, 2002.

Vigilancia Epidemiológica Semana 2, 2002. Dirección General de Epidemiología. Cuadro 6.1. Casos acumulados por entidad federativa de Enfermedades de Transmisión Sexual hasta la semana epidemiológica 52, 2001.

Vigilancia Epidemiológica Semana 19, 2002. Dirección General de Epidemiología. Cuadro 6.1. Casos acumulados por entidad federativa de Enfermedades de Transmisión Sexual hasta la semana epidemiológica 17 del 2002.

Viikki, M. Pukkala, E., Nieminen, P. and Hakama M. 2000. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncol.* 39(1):71-75.

Wang, A. and Wang, C. 1985. Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14:323-335.

Wahle, E. and Keller, W. 1996. The biochemistry of polyadenylation. *TIBS.* 21:247-250.

Wahle, E. and U. Kühn. 1997. The mechanism of 3' cleavage and polyadenylation of eukaryotic pre-mRNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 57:41-71.

Weiss, E.A., Gilmartin, G.M. and Nevins, J.R. 1991. Poly(A) site efficiency reflects the stability of complex formation involving the downstream element. *EMBO J.* 10(1):215-219.

Williams, K.R. and Herrick, G. 1991. Expression of the gene encoded by a family of macronuclear chromosomes generated by alternative DNA processing in *Oxytricha fallax*. *Nucl. Acids Res.* 19(17):4717-4724.

Whitelaw, E. and Proudfoot, N. 1986. α -thalassaemia caused by a poly(A) site mutation reveals that transcriptional termination is linked to 3' end processing in the human $\alpha 2$ globin gene. *EMBO J.* 5(11):2915-2922.

WHO. 1996. Sexually Transmitted Diseases (STDs). Fact Sheets No. 110. March.

Yeong-Seng, Y., Jah-Yao, L. and Men-Fang, S. 1997. Chromosome number of *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.* 83:551-553.

Yeong-Seng, Y., Jah-Yao, L. and Men-Fang, S. 1998. Chromosome number of *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.* 84:28.

APENDICE A.

MEDIO DE CULTIVO PARA *Trichomonas vaginalis*.

MEDIO TYM ("Trypticase-yeast extract-maltose").

Composición:

Triptosa	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Maltosa	2.5 g
L-cisteína	0.5 g
Acido ascórbico	0.1 g
Fosfato de potasio dibásico (KH_2PO_4)	0.4 g
Fosfato de potasio monobásico (K_2HPO_4)	0.4 g

Se disuelven los componentes en agua bidestilada, se ajusta el pH a 6.2, se afora a 500 ml y se esteriliza a 15 psi durante 15 min. Antes de usarse se suplementado con 10% de suero de caballo inactivado.

APENDICE B.

MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS.

PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.

MEDIO Luria Broth (LB).

Triptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
NaOH 10 M	0.3 ml
Tris 1 M pH 8	10.0 ml

Disolver en 800 ml de agua bidestilada, ajustar el volumen a 1 lt y esterilizar.

MEDIO LB-AGAR.

Triptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
NaOH 10 M	0.3 ml
Tris 1 M pH 8	10.0 ml
"Select agar"	15.0 g

Disolver en 800 ml de agua bidestilada, ajustar el volumen a 1 lt y esterilizar.

MEDIO SOB.

Triptona	10.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
NaCl	0.29 g
KCl	0.09 g
MgCl ₂	1.02 g
MgSO ₄	1.23 g

Disolver en 300 ml de agua bidestilada, ajustar el volumen a 500 ml y esterilizar.

MEDIO TB.

Pipes	0.45 g
MnCl ₂	1.63 g
CaCl ₂	0.33 g
KCl	2.80 g

Disolver en 100 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 6.7 con KOH 10 M, agregar el MnCl₂ y llevar el volumen a 150 ml con agua bidestilada y esterilizar por medio de filtración.

MEDIO SOC.

Se prepara agregando 100 µl de glucosa 1 M estéril a 5 ml de medio SOB.

PREPARACIÓN DE BACTERIAS PARA ELECTROPORACIÓN.

MEDIO SOB SIN MAGNESIO.

Triptona	20.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	0.584 g
KCl	0.186 g

Disolver en 800 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 7 con NaOH y aforar el volumen a 1 lt y esterilizar.

MEDIO WB.

Glicerol ultrapuro	100 ml
Agua bidestilada estéril	900 ml

APENDICE C.

SECUENCIACIÓN. PREPARACIÓN DE GELES DE ACRILAMIDA-UREA.

ACRILAMIDA 40%.

Acrilamida	190 g
Bisacrilamida	10 g
Agua bidestilada	300 ml

Disolver en 300 ml de agua bidestilada, ajustar el volumen a 500 ml con agua bidestilada y filtrar.

MEZCLA ACRILAMIDA-UREA.

Acrilamida 40%	37.5 ml
Urea	115.0 g
TBE 5 X	50.0 ml
Agua bidestilada	75.0 ml

Disolver en baño maría y filtrar.

AMORTIGUADOR TBE 5 X.

Tris-HCl	54.0 g
Acido bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M	20.0 ml

Disolver en 750 ml de agua bidestilada y ajustar el volumen a 1 lt.

PREPARACIÓN DEL GEL DE ACRILAMIDA-UREA AL 6%.

Acrilamida-urea	60.0 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.5 ml
TEMED	25.0 μ l

Mezclar e inmediatamente agregar a los vidrios, dejar polimerizar mínimo 2 h.

APÉNDICE D.

GEL DESNATURALIZANTE PARA EL ENSAYO TIPO "NORTHERN BLOT".

Se disuelve 1 g de agarosa en 73 ml de agua bidestilada tratada con DEPC, cuando la agarosa tiene una temperatura de 60 ° C aprox., se agregan 10 ml de amortiguador 10X de 0.5 M MOPS y 0.01 M EDTA, pH 7, 16.2 ml de formaldehído al 37%, se mezcla, se vierte en la cámara de electroforesis para RNA, después se deja gelificar durante 2 h.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN