



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA Y TERMINADORA DE  
LA TRANSCRIPCIÓN DEL CISTRÓN RIBOSOMAL DE *Trichomonas vaginalis*.

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

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

LIBB. BERNARDO FRANCO BÁRCENAS

**DIRECTORA DE TESIS**

DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR

**MÉXICO, D.F.**

**2012**

**ESTA TESIS SE DESARROLLÓ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO BAJO LA ASESORÍA DE LA DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR Y FORMARON PARTE DEL COMITÉ TUTORAL LOS DOCTORES LETICIA ROCHA ZAVALA, ROBERTO CORIA ORTEGA, ÁNGEL ZARAÍN HERZBERG, Y ABRAHAM LANDA PIEDRA.**

## **DEDICATORIA**

A mi Elizabeth, compañera de vida, que le da luz a los días más oscuros, que le da alegría a los días más tristes y que cada día me enseñas a ser un musaraño feliz.

A mis padres (el Viejo e Igor) que sin su amor y apoyo no hubiera logrado todo lo que he hecho.

A Frank y Vero, su ayuda y cariño siempre me acompañan.

A mis suegros quienes siempre han estado acompañándome.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la casa de estudios en la que me formé como Biomédico y más tarde pude realizar estudios en un posgrado de excelencia.

A la Dra. María Imelda López Villaseñor. Por ser una excelente tutora comprometida con la formación de mi quehacer científico de manera dedicada, ética, y responsable. Por transmitirme los valores universitarios de calidad y calidez, tanto en el ámbito humano como en el profesional. Por apoyarme con su comprensión y motivación en los momentos más oscuros y por celebrar los días luminosos.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por darme una formación sólida desde la licenciatura hasta el posgrado.

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas por ser un portal comprometido hacia la investigación.

Al comité tutorial conformado por los profesores: María Imelda López Villaseñor, Leticia Rocha Zavaleta, Roberto Coria Ortega, Ángel Zarain Herzberg, y Abraham Landa Piedra, por todo su tiempo y dedicación para ayudarme a crecer como estudiante y cumplir la meta de terminar el trabajo de doctorado. Deseo especialmente agradecerle al Dr. Roberto Coria por permitirme compartir varios años a su lado en la docencia, así como por su inquebrantable confianza y apoyo a lo largo de varios años.

A Karla López Pacheco por su apoyo en el trabajo cotidiano y su amistad.

A mis queridos compañeros del laboratorio, la Dra. Ana Lilia Torres Machorro y el Dr. Pablo Hernández Romano por su apoyo y amistad. A Vanesa Fuentes Morales, quien me enseñó tantas cosas y me apoyó mucho en el trabajo experimental, además de ser una excelente amiga. A mis amigos Lluvia Rosas Hernández, Erick Amador Gaytán y Erik Alejandro Arce por una amistad y un trabajo cotidiano cordial y ameno. A Lluvia especialmente por estudiar la proteína TBP.

Al Dr. Roberto Hernández y su grupo, por todo su apoyo y enseñanzas. El Dr. Roberto Hernández siempre hace comentarios formativos muy importantes y siempre me apoyó en todo el desarrollo del presente trabajo.

A la M en C. Patricia de la Torre por la secuenciación de los plásmidos generados en el presente trabajo.

Al CONACyT por la beca de Doctorado (No. de registro 199648).

Finalmente un agradecimiento especial a los profesores asignados como jurado por su tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

## Índice:

<b>Resumen</b>	7
<b>Abstract</b>	8
<b>Abreviaturas</b>	9
<b>I. Introducción.</b>	10
I.1 Cuadro clínico.	11
I.2 Epidemiología.	12
I.3 Morfología.	13
I.4 Ciclo Biológico.	18
I.5 Patogenia.	19
I.6 Diagnóstico.	21
I.7 Tratamiento.	23
I.8 Organización de genes ribosomales.	26
I.9 Genes ribosomales y estudios filogenéticos.	28
I.10 Síntesis de RNA ribosomal.	28
I.11 Terminación de la transcripción de genes ribosomales.	34
I.12 Procesamiento de los transcritos ribosomales.	35
<b>II. Justificación.</b>	36
<b>III. Hipótesis.</b>	36
<b>IV. Objetivo general</b>	36
<b>V. Objetivos particulares.</b>	36
<b>VI. Materiales y Métodos.</b>	37
<b>VII. Resultados.</b>	74
VI.1 Desarrollo de un sistema reportero transcripcional para el estudio de la región promotora de la transcripción.	74
VI.2 El sistema reportero es funcional <i>in vivo</i>	76
VI.3 Efectos de las deleciones en la región intergénica.	78
VI.4 Análisis por mutagénesis de la región del sitio de inicio de la transcripción.	80

VI.5 Otros elementos potencialmente reguladores.	82
VI.6 Búsqueda de posibles elementos moduladores en la región intergénica	85
VI.7 Demostración de la especificidad de los productos amplificados por RT-PCR.	86
VI.8 Análisis de la secuencia terminadora.	87
VI.9 Efecto de las mutaciones de las corridas de U's sobre la terminación de la transcripción.	92
VI.10 Identificación de elementos adicionales en la secuencia terminadora de la transcripción	93
VI.11 Análisis <i>in silico</i> de las subunidades de la Pol I de <i>T. vaginalis</i>	98
<b>VIII. Discusión.</b>	108
<b>IX. Conclusiones</b>	114
<b>X. Perspectivas.</b>	115
<b>XI. Anexos.</b>	116
Tabla S1	116
Tabla S2	119
<b>XII. Referencias.</b>	132
<b>XIII. Artículo.</b>	146

## **Resumen.**

*Trichomonas vaginalis* es un protozoario parásito de humanos que tiene relevancia médica y biológica. Las señales de inicio y terminación de la transcripción del RNA ribosomal (rRNA) no han sido caracterizadas. En prácticamente todas las células, el transcrito celular más abundante es el rRNA. En eucariontes los genes que codifican el rRNA de manera muy conservada se encuentran arreglados de forma 18S, 5.8S y 28S en eucariontes. La transcripción del rRNA depende de dos factores fundamentales: el número de copias de los genes y la secuencia promotora. Su transcripción es llevada a cabo por la RNA polimerasa I (Pol I) y la transcripción depende tanto de las secuencias vecinas al sitio de inicio de la transcripción como de elementos reguladores hacia el extremo 5', también llamado río arriba como río abajo los cuales participan en la modulación de la expresión del rRNA.. El estudio de la transcripción de genes en *T. vaginalis* se ha enfocado principalmente en los promotores para RNAs mensajeros (mRNA) los cuales son transcritos por la RNA polimerasa II (Pol II), y en consecuencia poco se sabe de los elementos necesarios para el reclutamiento de Pol I y de la RNA polimerasas III. La Dra. Imelda López Villaseñor y su grupo han determinado el sitio de inicio de la transcripción del rRNA o cistrón ribosomal de *T. vaginalis* (López-Villaseñor, *et al*, 2004). En el presente trabajo, se desarrolló un sistema reportero transcripcional para estudiar los elementos promotor y terminador de la transcripción del cistrón ribosomal de *T. vaginalis*. Los resultados sitúan a la región promotora entre a las bases -128 y +50 respecto al inicio de la transcripción, con una posible secuencia reguladora de tipo Upstream Control Element (UCE). Esta región carece de elementos repetidos y regulatorios típicos que se han encontrado en otros promotores de tipo Pol I. La secuencia terminadora de la transcripción se acotó a un fragmento de 34 pb y se encontró que su función depende de tanto de una estructura de tallo y asa como de una corrida de T's. Los elementos genéticos identificados son compactos, en concordancia con otros elementos de regulación de la transcripción en *T. vaginalis*, como son los promotores para Pol II y las señales de poliadenilación de mRNAs.

## **Abstract**

*Trichomonas vaginalis* is a parasitic protozoan of both medical and biological relevance. Transcriptional studies in this organism have focused mainly on type II pol promoters, whereas the elements necessary for transcription by polII or polIII have not been investigated. Here, with the aid of a transient transcription system, we characterised the rDNA intergenic region, defining both the promoter and the terminator sequences required for transcription. We defined the promoter as a compact region of approximately 180 bp. We also identified a potential upstream control element (UCE) that was located 80 bp upstream of the transcription start point (TSP). A transcription termination element was identified within a 34 bp region that was located immediately downstream of the 28S coding sequence. The function of this element depends upon polarity and the presence of both a stretch of uridine residues (U's) and a hairpin structure in the transcript. Our observations provide a strong basis for the study of DNA recognition by the polII transcriptional machinery in this early-divergent organism.

## Abreviaturas

**CAT:** cloranfenicol-acetil transferasa.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**dsDNA:** DNA de doble cadena.

**rDNA:** DNA que codifica para el rRNA.

**cDNA:** DNA complementario, sintetizado a partir de RNA mediante transcripción reversa.

**DEPC:** Dietil pirocarbonato.

**EST:** Secuencias Expresadas (por sus siglas en inglés Expressed Sequence Tags).

**ETS:** Espaciador Externo Transcrito (por sus siglas en inglés External Transcribed Spacer).

**GFP:** Proteína Verde Fluorescente (por sus siglas en inglés Green Fluorescent Protein).

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

**LB:** Medio de cultivo Luria-Bertani.

**MOPS:** Ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico.

**ORF:** Marco abierto de lectura (por sus siglas en inglés Open Reading Frame).

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction).

**RNA:** Ácido ribonucleico.

**mRNA:** RNA mensajero.

**rRNA:** Ácido ribonucleico ribosomal.

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

**SDS:** Dodecilsulfato sódico.

**SSC:** Amortiguador salino de citrato sódico.

**TSP:** Sitio de inicio de la transcripción (por sus siglas en inglés Transcription Start Point).

**TAE:** amortiguador Tris-Ácido acético-ácido Etilendiamino tetraacético.

**TE:** amortiguador Tris- Ácido Etilendiamino tetraacético.

**UCE:** Región de control río arriba (por sus siglas en inglés Upstream Control Element).

**VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana.

## I. Introducción.

En el artículo “Animalcules observés dans les matières purulentes et le produit des sécrétions des organes génitaux de l’homme et de la femme” (Animálculos observados en las materias purulentas y los productos secretados por los órganos genitales del hombre y de la mujer) publicado en 1836, Alexandre Donné expone la primera descripción microscópica del organismo causante de la tricomoniasis humana, enfermedad que es transmitida por vía sexual (Donné, 1836). El nombre de este protozooario parásito, *Trichomonas vaginalis* (inicialmente *vaginale*) fue acuñado por la similitud con dos protozoarios flagelados conocidos de la época: los Tricodes y las Monas, ambos protozoarios flagelados. Lo que llamó la atención de este organismo fue su movilidad, con un movimiento similar al batir de un látigo, y que es capaz de sobrevivir en las condiciones ambientales de la mucosa vaginal (Bell, 1930; Hajdu, 1998). Como un dato curioso adicional relacionado a las técnicas microscópicas de la época, Donné fue el primero en describir las plaquetas de la sangre (Hajdu, 2008). El estudio de este *T. vaginalis* comenzó a mediados del siglo XX con un enfoque en los efectos que tenía sobre la salud, su tratamiento y los determinantes de su patogenicidad. Recientemente se logró obtener la secuencia completa del genoma de *T. vaginalis* y se han clasificado los genes según su función (Carlton *et al*, 2007).

*T. vaginalis* pertenece al grupo de los parabasálidos. Este grupo comprende eucariontes flagelados unicelulares (protistas) e incluye comensales intestinales, parásitos de humanos, parásitos de animales, endosimbiontes de termitas y especies de vida libre. En el ámbito veterinario un organismo relacionado evolutivamente es *Tritrichomonas foetus*, que causa una enfermedad de transmisión sexual en el ganado bovino, la cual provoca importantes pérdidas económicas. La clasificación de *Trichomonas* se ha basado clásicamente en caracteres morfológicos, pero ha sido redefinida molecularmente a partir de la secuencia de algunos genes, y recientemente por la secuenciación del genoma de *T. vaginalis* (Malik *et al*, 2011; Delgado-Viscogliosi *et al*, 2000; Carlton *et al*, 2007).

La tricomoniasis causada por *T. vaginalis*, tiene una alta incidencia a nivel mundial. Dentro de las enfermedades de transmisión sexual no viral la tricomoniasis ocupa el primer lugar con cerca de 180 millones de nuevos contagios anualmente (WHO, 2001; Schwebke, 2002). Aproximadamente la mitad de las mujeres infectadas son sintomáticas, mientras que

en hombres la infección es asintomática y de corta duración. La tricomoniasis generalmente es concomitante con otras infecciones de transmisión sexual y se ha observado que facilita la entrada de algunos virus (como el virus del papiloma humano o el virus de la inmunodeficiencia humana) debido al daño ocasionado por el parásito a la mucosa y al epitelio vaginal (Petrin *et al*, 1998). La tricomoniasis puede llevar a complicaciones generales en el estado de salud de la persona afectada y durante el embarazo puede provocar parto prematuro y efectos adversos en el recién nacido; también puede producir esterilidad y puede favorecer el desarrollo de cáncer de cérvix.

El método de diagnóstico más utilizado es la observación directa del parásito en muestras frescas, especialmente por microscopía óptica. Actualmente las técnicas moleculares han permitido un diagnóstico cada vez más sensible, rápido y exitoso, aunque costoso y limitado. Sin embargo, un gran número de pacientes que presentan infección con *T. vaginalis* no son diagnosticados o no son contabilizados en las estadísticas globales, ya que no hay obligación de reportar los casos clínicos de tricomoniasis como ocurre con otras infecciones de transmisión sexual, y en ocasiones los pacientes son tratados sin una identificación apropiada del agente infeccioso. El metronidazol es el medicamento más utilizado, sin embargo la resistencia a esta droga ha ido en aumento aunque hay pocos datos epidemiológicos a este respecto. Para estudios más detallados de los procesos de adherencia, patogenicidad y funcionales es necesario cultivar al organismo; es posible preparar cultivos axénicos utilizando agentes bactericidas y antifúngicos en el medio de cultivo, lo que también ha resultado útil como método de diagnóstico (Clark *et al*, 2002).

### **I.1 Cuadro clínico**

La infección por *T. vaginalis* puede presentar un rango amplio de manifestaciones clínicas. El parásito se establece principalmente en el epitelio escamoso del tracto genital, y puede persistir por períodos largos en la mujer (Petrin *et al*, 1998). De acuerdo a la severidad de la infección, la tricomoniasis puede clasificarse como aguda, crónica o asintomática. En las mujeres las manifestaciones pueden ir desde asintomáticas hasta una franca vaginitis. Durante la infección aguda se presenta una copiosa leucorrea mucopurulenta, de color amarillo verdoso y olor desagradable, irritación e inflamación de la vulva, dolor en abdomen bajo y disuria. En algunos casos se presentan pequeños puntos

hemorrágicos en el cérvix, lo que se conoce como “cérvix de fresa”. Estos signos y síntomas son recurrentes y se exacerban con la menstruación. En la infección crónica los síntomas son menos graves y se presenta prurito y disuria con poca secreción vaginal. Esta forma de infección es relevante desde el punto de vista epidemiológico, ya que esos individuos son la fuente más importante para la transmisión del parásito (Petrin *et al*, 1998). Frecuentemente, en las mujeres se presentan complicaciones más severas como enfermedad pélvica inflamatoria, neoplasia intraepitelial cervical y secuelas en la salud reproductiva que incluyen la ruptura prematura de membranas e infantes de bajo peso al nacer. Quizá la complicación más preocupante de la tricomoniasis es que se ha asociado con un incremento en la transmisión del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Johnston *et al*, 2008; Thurman *et al*, 2011).

En los hombres la tricomoniasis es menos frecuente y generalmente es asintomática, por lo que pueden ser portadores sin saberlo. Cuando se presentan las manifestaciones pueden ser descargas mucopurulentas, disuria, prurito, uretritis, prostatitis, balanopostitis, epididimitis e incluso infertilidad (Johnston *et al*, 2008; Petrin *et al*, 1998).

## **I.2 Epidemiología**

Como antes se dijo, los seres humanos son los únicos hospederos naturales conocidos de *T. vaginalis*. El trofozoíto se transmite de persona a persona por contacto sexual, aunque se han reportado algunos casos de transmisión por vías no sexuales (Petrin *et al*, 1998); por ejemplo, se ha reportado que este parásito es capaz de sobrevivir en agua proveniente de albercas aunque se considera que su propagación por este medio es muy poco probable (Pereira-Neves *et al*, 2008).

La distribución de *T. vaginalis* es cosmopolita y afecta a personas de todos los estratos socioeconómicos. La Organización Mundial de la Salud estima que cada año ocurren aproximadamente 180 millones de nuevos contagios por *T. vaginalis*, de los cuales 154 millones ocurren en zonas marginales, y se presenta asociada a otras enfermedades de transmisión sexual (WHO, 2001; Johnston *et al*, 2008). Los datos epidemiológicos locales pueden variar según los factores que se tomen en cuenta: la zona geográfica y el grupo social estudiado, la sintomatología, y si el estudio se realiza por género o por edad, afecta también la fuente clínica evaluada (clínicas generales o clínicas especializadas en

enfermedades de transmisión sexual). Además hay variación dependiendo del método utilizado para el diagnóstico, es decir, si es por PCR o por métodos de microscopía y cultivo (Rughooputh *et al*, 2005). En general, se ha encontrado que la incidencia de *T. vaginalis* es mayor en zonas de bajos recursos económicos, en poblaciones de alto riesgo (asociados a prostitución) y entre adolescentes.

No existen datos precisos sobre su asociación a complicaciones más severas como uretritis, esterilidad, nacimientos prematuros y complicaciones en los recién nacidos, pero se conoce que es un factor importante en estos padecimientos. Es especialmente importante el diagnóstico en mujeres embarazadas por el daño potencial a la salud del embrión y del recién nacido. Como el tratamiento es efectivo y rápido muchas veces los casos son tratados sin ser analizados y diagnosticados.

### **I.3 Morfología**

Las células de *T. vaginalis* en suspensión son piriformes y miden 9 por 7  $\mu\text{m}$ , pero cambian dramática y rápidamente a una forma ameboide cuando entran en contacto con células del epitelio vaginal, formando interdigitaciones con la membrana plasmática de la célula hospedero (Arroyo *et al*, 1993; Benchimol, 2004). El parásito presenta cinco flagelos, uno de ellos asociado a la membrana ondulante y a una estructura no contráctil que le da soporte, llamada *costa* (Figura 1).

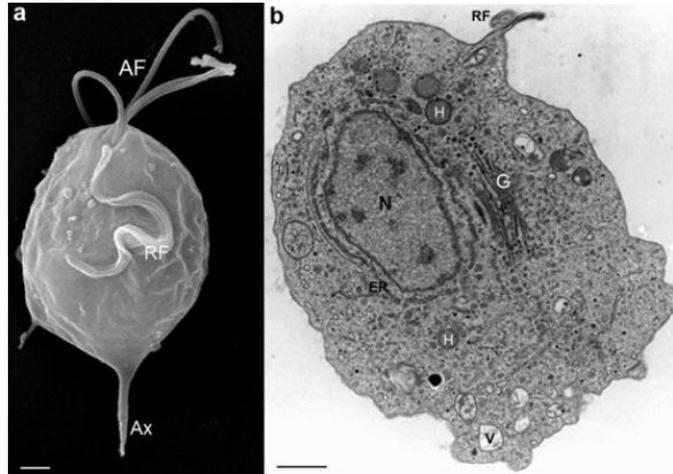


Figura 1. Estructuras más importantes de *T. vaginalis*. En el Panel **a** se muestra una microscopía de barrido. En el Panel **b** una microscopía de transmisión. Se indican las estructuras como Ax, axostilio; AF, flagelo anterior; RF, flagelo recurrente; N, núcleo; G, complejo de Golgi; H, hidrogenosoma y V, vacuola. Barra de escala: 1  $\mu\text{m}$ . Tomado de Midlej, 2010.

*T. vaginalis* carece de mitocondrias y peroxisomas, organelos encargados de la generación de energía y de reacciones de oxidación. De hecho, una de las características más sobresalientes de *T. vaginalis* y de organismos similares es la presencia de organelos llamados hidrogenosomas, las cuales son estructuras especializadas en la producción de ATP por oxidoreducción del piruvato formado en la glicólisis, mediante la piruvato-ferredoxin oxidoreductasa. Esta enzima es central en el metabolismo del parásito, participa en la captura de calcio, y es relevante en el mecanismo de acción del metronidazol, antibiótico usado para combatir a *T. vaginalis* (Mentel *et al*, 2008). Los hidrogenosomas son organelos casi esféricos de 0.3  $\mu\text{m}$  de diámetro que pueden verse ligeramente elongados durante la división celular. Estas estructuras parecen estar próximas o en algunos casos en asociación con el retículo endoplásmico (Benchimol, 2004). En *T. vaginalis* el hidrogenosoma no contiene un genoma propio (Clemens *et al*, 2000), todas sus proteínas provienen del genoma nuclear y son importadas de un modo similar al proceso de importación de proteínas a las mitocondrias (Bradley *et al*, 1997). Esto sugiere que se podría tratar de un organelo análogo a la mitocondria, con un origen tipo endosimbionte, pero con un proceso evolutivo diferente en donde los genes hidrogenosomales fueron incorporados al genoma nuclear. Pero, el origen y evolución de los hidrogenosomas continúa en debate.

En la Figura 1 se muestran los elementos ultraestructurales más relevantes de *T. vaginalis*, tanto por microscopía electrónica de barrido como por microscopía de transmisión. El aparato de Golgi de *T. vaginalis* es un sistema de membranas y forma parte del complejo parabasal, al cual el Golgi está unido mediante delgados filamentos. El tamaño del Golgi en *T. vaginalis* es de 6  $\mu\text{m}$  de largo por 1  $\mu\text{m}$  de ancho, mayor en comparación con otros protozoarios parásitos y contiene de 8 a 12 cisternas, el Golgi de *T. vaginalis* no es sensible a los fármacos que comúnmente afectan su estructura en otras células (como el nocodazol). En *T. vaginalis* el Golgi no se fragmenta durante la mitosis pero se divide antes del inicio de ésta por elongación lateral formando dos listones pequeños que son el origen del nuevo Golgi (Benchimol *et al*, 2001). Un dato interesante es que el Golgi se tiñe intensamente con anticuerpos dirigidos a dos adhesinas asociadas a patogenicidad, la AP65 y la AP51 (Benchimol *et al*, 2001). Por otra parte, el retículo endoplásmico en *T. vaginalis* se encuentra asociado a la membrana nuclear como en otros eucariontes, pero se encuentra también en asociación con el axostilio y con los hidrogenosomas, probablemente a causa de la importación directa de las proteínas hidrogenosomales (Benchimol *et al*, 2001).

En la Tabla 1 se describen algunas de las estructuras fibrilares de *T. vaginalis* y las funciones que se conocen, así como aquellas de las cuales aún no se conoce su función. Entre las principales estructuras que caracterizan al organismo se encuentran el complejo axostilio-pelta y la costa. Estas estructuras aparentemente no son contráctiles, es decir, no participan en el movimiento celular pero participan en la división celular y aparentemente dan soporte rígido. Los flagelos tienen el típico arreglo eucarionte de microtúbulos 9+2 (es decir nueve pares de microtúbulos periféricos fusionados que rodean a dos pares de microtúbulos centrales) que son ensamblados a partir de un cuerpo basal y emergen por un canal flagelar en la parte más anterior de la célula. El flagelo recurrente que forma la membrana ondulante emerge también por un canal flagelar anterior, pero en diferente posición relativa a los otros cuatro flagelos, y protruye hacia la parte posterior de la célula (Benchimol, 2004).

**Tabla 1:** Estructuras fibrilares en *Trichomonas*. Tomado de Benchimol, 2004.

<b>Estructura</b>	<b>Características</b>	<b>Función</b>
Axostilio	Listón de microtúbulos.	Eje de la célula. Participa en la división celular.
Pelta	Hojas de microtúbulos sobrepuestos al axostilio; región anterior de la célula.	Refuerza la pared del canal periflagelar.
Costa	Estructura proteica, periódica, recorre la superficie celular, une cuerpos basales.	Apoya el movimiento del flagelo recurrente.
Peine	Estructura proteica periódica, localizada entre la Costa y el cuerpo basal del flagelo recurrente.	Función desconocida.
Cuerpos basales	Nueve tripletes de microtúbulos.	Origen de los axonemas flagelares.
MTOC (atractoro)	Material electrodensito encontrado en el origen de los filamentos parabasales.	Origen de los microtúbulos del huso mitótico.
Axonemas	Estructuras móviles de los flagelos, con un arreglo de microtúbulos 9+2.	Participan en el movimiento y división celular.
Filamentos parabasales	Estructuras periódicas que siguen al aparato de Golgi.	Probablemente dan soporte al aparato de Golgi.
Filamentos sigmoidales	Filamentos con una distribución curva, unen el cuerpo basal 2 con la Pelta	Función desconocida, son positivos a centrina.
Cuerpo infrabasal o infracinetosomal	Estructura grande y densa ubicada debajo del complejo de cuerpos basales.	Función desconocida.
Cuerpo suprabasal o supracinetosomal	Estructura en forma de tallo cercano al cuerpo basal 2.	Función desconocida
Filamentos en forma de gancho	Estructuras curvadas que emanan del cuerpo basal 1 y 3 con estructura periódica.	Función desconocida, son positivos a centrina.

*T. vaginalis* posee mecanismos por los que puede destruir células epiteliales e internalizar los nutrientes necesarios para su metabolismo y reproducción. Los lisosomas son capaces de degradar tanto restos celulares como bacterias y se ubican preferentemente en la parte posterior de la célula. Se ha demostrado la inducción de necrosis en las células epiteliales por estrés mecánico para más tarde fagocitar los restos celulares (Figura 2) (Midlej *et al*, 2010).

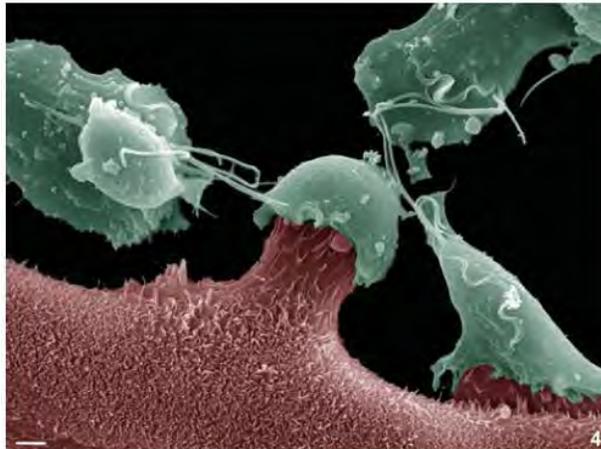


Figura 2. Evidencia de la capacidad fagocítica de *T. vaginalis* en el epitelio vaginal. Se muestra una imagen de microscopía pseudocoloreada SEM en la que se observa una célula de *T. vaginalis* fagocitando una célula epitelial de oviducto bovino. Barra de escala: 2  $\mu$ m. Imagen tomada de Midlej *et al*, 2010.

Los tricomonádidos presentan un solo núcleo localizado en la parte anterior de la célula, con numerosos poros nucleares y un solo nucléolo que no se desensambla durante la mitosis. La matriz nuclear se compone de fibras muy delgadas con origen y función desconocidos (Benchimol, 2004). *T. vaginalis* tiene 6 cromosomas y no se ha podido identificar la presencia de lámina nuclear y láminas (Benchimol, 2004).

En *T. vaginalis* no se han descrito quistes de resistencia capaces de infectar, o que en condiciones sin estrés sean capaces de recuperar la morfología de trofozoito. Lo que se ha observado son células de morfología deformada no móviles en las que los flagelos se pierden y la morfología cambia a una forma redondeada, pero no se observa una pared quística. Cambios semejantes pueden ser inducidos por fármacos como colchicina, dimetil sulfóxido, citocalacina D, taxol, y nocodazol, así como por temperaturas por debajo de los 37°C. El único dato que sugiere que las formas inducidas de pseudoquistes mediante estrés

por temperaturas bajas son capaces de infectar y establecer la tricomoniasis fue reportado por Hussein y Atwa en un modelo de infección en ratón (Hussein *et al*, 2008); se desconoce si estos efectos también pueden darse en humanos.

#### **I.4 Ciclo biológico**

El ciclo de vida de *T. vaginalis* ocurre en los humanos. El trofozoíto (que es la única forma hasta ahora conocida del parásito) se divide por fisión binaria mediante una mitosis a la que se le llama cerrada o primitiva, ya que los cromosomas no hacen contacto directo con microtúbulos extranucleares o husos mitóticos y la membrana nuclear no desaparece durante la división celular. No es fácil identificar las fases de la mitosis, pero se han descrito de manera general siguiendo algunas variaciones ultraestructurales que participan en la separación de las células hijas. Hasta ahora no se ha podido identificar algún evento de reproducción sexual en este organismo, a pesar de que se han encontrado varios genes relacionados exclusivamente con la meiosis (Malik *et al*, 2007). El proceso de división celular comienza cuando se observa un axostilio normal y uno más pequeño asociado a un cinetosoma aparentemente duplicado mientras que el resto de las estructuras y la morfología se mantienen sin cambios; a esta fase se le llama G1. La entrada a la fase S/G2 no tiene cambios evidentes que sugieran una mitosis como la que se observa en otras células u otros organismos unicelulares (con aumento del volumen celular y formación de estructuras fibrilares para el inicio del proceso de división), pero se observan flagelos, axostilios, costa y cuerpos basales en proceso de ensamblaje o duplicados. La mitosis se considera iniciada cuando se han duplicado por completo estas estructuras y cuando los cinetosomas, junto con las estructuras centrosomales, comienzan a desplazarse a los polos anteriores de la célula. Esto conlleva un cambio en la morfología del parásito de periforme a triangular, y cambia el movimiento de los flagelos o reduce su movimiento. En esta etapa comienza la condensación de los cromosomas, y se ha podido registrar el cariotipo completo formado por seis cromosomas en *T. vaginalis* (Torres-Machorro *et al*, 2009). La cariocinesis inicia con la elongación nuclear y separación de los axostilios que se mueven a la parte anterior de la célula. También se presenta un cambio en la morfología hacia una estructura similar a la de un cilindro y el axostilio tuerce a la célula para iniciar la división celular entre las dos células hijas. Cuando las estructuras alcanzan el punto máximo de

separación, la elongación se detiene y el movimiento del flagelo ayuda a la separación final de las dos células hijas (Ribeiro *et al*, 2002; Benchimol, 2004).

### **I.5 Patogenia**

Se sabe que la patogenia de *T. vaginalis* involucra mecanismos físicos de adhesión, mecanismos de protección contra el sistema inmune y efectos citotóxicos sobre las células del epitelio vaginal. Aun así, la patogenia de *T. vaginalis* es un proceso que no está del todo claro aunque se han encontrado varios factores involucrados en la infección como son las adhesinas, las proteasas secretadas y de superficie, el citoesqueleto que participa en los procesos de endocitosis y en la secreción de proteínas de membrana (Midlej *et al*, 2010). En parte, el estudio de la patogenia de *T. vaginalis* ha sido limitado por la falta de modelos animales capaces de presentar una infección persistente, respuesta inflamatoria e inmune, y sintomatología equivalente a la humana. No obstante, existen algunos modelos animales que permiten la adhesión del parásito al epitelio vaginal pero no presentan síntomas; incluyen monos, ratas, hámsteres, cerdos de guinea y ratón. El mejor modelo es el de ratón que, una vez tratado con estrógenos, se puede infectar experimentalmente y presentar una reacción inmune al parásito (Petrin *et al*, 1998). Pero para el estudio de los fenómenos de adherencia y citotoxicidad se prefiere el análisis *in vitro* con células en cultivo.

Los factores más relevantes para la patogenicidad de *T. vaginalis* están relacionados con la adhesión a las células del epitelio vaginal, ya que este paso es necesario para establecer la parasitosis, adquirir nutrientes y evadir la respuesta inmune del hospedero. La citoadherencia a las células del epitelio vaginal es un evento temprano y crítico para el establecimiento de la parasitosis y está mediado por adhesinas, proteínas de la superficie del parásito que aumentan su expresión en presencia de hierro. Esto es relevante ya que durante la menstruación los parásitos tienen mayor capacidad para adherirse al epitelio vaginal y ello disminuye su probabilidad de ser expulsados (Alderete *et al*, 1988; Lehker *et al*, 1991). Se ha sugerido que parte del proceso de invasión es regulado por proteínas multifuncionales como las adhesinas AP51 y AP65, que además de participar en la adhesión del parásito al epitelio vaginal son capaces de unir hemoglobina y hierro (Ardalan *et al*, 2009).

Para que *T. vaginalis* pueda adherirse a las células epiteliales requiere atravesar la mucosa vaginal o uretral, la primera barrera con la que el parásito se encuentra en el tracto genital. Se ha encontrado que la actividad mucinolítica del parásito es necesaria para este evento inicial (Lehker *et al*, 1999). Las proteasas de *T. vaginalis*, principalmente las pertenecientes a la familia de cisteín-proteasas, están involucradas de manera importante en los procesos de invasión y citotoxicidad. Estas proteasas son secretadas por el parásito tanto *in vitro* (en cultivos axénicos) como *in vivo* (detectadas en secreciones vaginales de individuos infectados) y se ha visto que pueden degradar una gran cantidad de proteínas como hemoglobina, laminina e inmunoglobulinas (Alderete *et al*, 1991; Provenzano *et al*, 1995). La expresión de estas enzimas puede estar regulada por la disponibilidad o por la falta de hierro, que depende de la presencia de sangre durante el ciclo menstrual de las pacientes. Se ha sugerido que estos cambios están involucrados en las infecciones persistentes (Ryu *et al*, 2001; Kummer *et al*, 2008). Algunas proteasas son secretadas al medio y pueden ser inmunogénicas. Un caso particular es el de la proteasa glicosilada TvCP39, a la que se ha involucrado tanto en la citotoxicidad como en la adhesión (Ramón-Luing *et al*, 2011). Se ha descrito también la presencia de serin-proteasas en la superficie de *T. vaginalis*, aunque su función aún no ha sido establecida (Hernández-Romano *et al*, 2010).

En general, los antígenos más abundantes en organismos patógenos son los lipofosfoglicanos, moléculas que forman parte de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune y que son necesarios para la adhesión a los tejidos (Singh *et al*, 2009). Una propiedad de los lipofosfoglicanos de *T. vaginalis* es que tienen unidades repetidas de N-acetil-lactosamina, lo que sugiere una interacción entre estas moléculas con las lectinas de galactósidos expresadas en la superficie de las células del epitelio vaginal. También se sabe que estas moléculas son capaces de activar la secreción de citocinas de las células epiteliales del tracto genitourinario femenino, probablemente por su semejanza estructural con el lípido A de las bacterias Gram negativas, que son activadores de la respuesta inflamatoria mediada por los receptores TLR4, MD2 y CD14. Sin embargo, aún falta identificar las posibles lectinas involucradas en la interacción del parásito con las células epiteliales para entender mejor la adhesión de parásito y como éste induce la respuesta inflamatoria. Se podría bloquear la adhesión y así prevenir el establecimiento de la

infección, siendo un tratamiento complementario al ya existente (ver **Tratamiento**) (Fichorova *et al*, 2006; Singh *et al*, 2009). Tanto las proteasas como los lipofosfoglicanos de *T. vaginalis* se han llegado a proponer como blancos terapéuticos en dos sentidos: ya sea inhibiéndolos como un mecanismo protector para evitar el establecimiento de la parasitosis y el daño al epitelio, o empleándolos como inmunógenos para generar una vacuna contra la tricomoniasis. Algunas de estas moléculas se han identificado como potentes inmunógenos, aunque de modo natural no producen inmunidad como resultado de infecciones anteriores (Hernández *et al*, 2005).

Por otra parte, se sabe que la presencia de una flora vaginal normal es capaz de prevenir el desarrollo de algunas enfermedades de transmisión sexual. En la vagina viven de manera natural lactobacilos productores de moléculas que pueden prevenir la vaginosis bacteriana y la infección por otros organismos como levaduras y protistas. Entre los metabolitos que se producen están el acidolin, el lactacidin, el lactacin B y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estas moléculas tienen efectos importantes: permiten el desarrollo normal de la flora vaginal y los peróxidos son virucidas. El pH vaginal juega también un papel relevante en el mantenimiento de la flora normal, inhibe la activación de linfocitos CD4+, reduciendo la posible entrada del VIH a éstas células (Torok *et al*, 2007; Thurman *et al*, 2011).

## **I.6 Diagnóstico**

Debido a la rapidez con la que se propagan las enfermedades de transmisión sexual es necesario que el diagnóstico sea rápido, eficiente y de bajo costo para dar tratamiento y evitar su diseminación. En el caso de *T. vaginalis* hay varios métodos que se han empleado para el diagnóstico, aunque no siempre es sencillo desde el punto de vista clínico ya que por la sintomatología puede confundirse con enfermedad pélvica inflamatoria de otro origen ya que por ejemplo puede ser causada por una infección recurrente de tricomoniasis o por infecciones bacterianas. Se ha reportado que los síntomas por sí solos no son indicador de la infección ya que en muchos casos otros parásitos pueden provocar síntomas similares, o bien que el origen de las lesiones no sea causado exclusivamente por un agente infeccioso. Se ha estimado que cerca del 88% de las mujeres que acuden al médico por algún síntoma de infección vaginal o molestia asociada no serán diagnosticadas con *T. vaginalis*, mientras que el 29% serán diagnosticadas y tratadas como falso positivo

solamente por la presencia de síntomas (Fouts *et al*, 1980; Petrin *et al*, 1998). La toma de muestra en varones resulta incómoda ya que implica una toma de muestra directa de la uretra, por lo que también se utilizan otros métodos como análisis por sedimentación de orina, inmunológicos o moleculares, o en muchos casos simplemente el diagnóstico no se realiza (Petrin *et al*, 1998).

La primera estrategia diagnóstica es la observación microscópica de muestras (frotis en fresco) de pacientes que presentan algún síntoma o bien en muestras de la primera orina mediante sedimentación y observación del sedimento. Es un método muy sensible ya que en la muestra se buscan protozoarios móviles y si se puede observar inmediatamente al microscopio, es un método muy confiable. Sin embargo, el diagnóstico depende de la velocidad con que las muestras sean observadas, ya que los parásitos pueden dejar de moverse con el cambio de temperatura. Los parásitos también pueden teñirse (naranja de acridina o HEMA 3) en preparaciones para microscopía haciendo así más clara su identificación (Afzan *et al*, 2010). Se ha visto que el método de Papanicolau también permite la identificación de estos parásitos. Otra prueba diagnóstica es el cultivo de *T. vaginalis*, un método muy preciso pero que requiere tiempo. Esta técnica es sensible ya que un inóculo que contenga 300 a 500 parásitos por mililitro es suficiente para obtener un resultado positivo, pero requiere entre 2 y 7 días obtener un dato confiable. Existen varias formas para la preparación de los cultivos, pero tienen la desventaja del tiempo de incubación, los costos, y la necesidad de tener acceso a un laboratorio de diagnóstico con incubadoras y formas de manejar las muestras en condiciones estériles (Petrin *et al*, 1998).

Se han desarrollado tres estrategias que permiten el diagnóstico de una manera más rápida y eficiente: mediante el uso de anticuerpos contra antígenos de *T. vaginalis*, por la presencia de antígenos del parásito en muestras tomadas directamente del paciente (por el método de ELISA) y por detección de ácidos nucleicos (Petrin *et al*, 1998).

En cuanto a los métodos que utilizan anticuerpos capaces de reconocer inmunógenos del parásito, se han desarrollado ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-trichomonas, y ensayos de ELISA (Petrin *et al*, 1998). El inconveniente que pueden presentar todas estas técnicas son las limitaciones inherentes al manejo y al estado de la muestra analizada, por ejemplo si la muestra se fijó o se inactivó por calor y la cantidad de parásitos presentes. El

estado inmunológico del paciente también puede afectar los resultados pues con una alta estimulación inmune podrían encontrarse pocos parásitos. En cuanto a los análisis por aglutinación en donde se utilizan anticuerpos, existen kits comerciales que permiten el procesamiento rápido y eficiente de las muestras como es el caso del kit FemPure que es capaz de identificar de manera simultánea varias de las infecciones vaginales más comunes (*T. vaginalis*, *Candida* spp. y *Gardnerella vaginalis*). Este método se basa en la agregación de perlitas de látex unidas a anticuerpos específicos dirigidos a inmunógenos de cada parásito, es muy eficiente y requiere de muy poco equipo para realizar las pruebas (Bravo *et al*, 2009).

El diagnóstico se complica cuando se requiere transportar las muestras al centro de salud donde serán analizadas ya que pueden sufrir daño como se mencionó anteriormente. Por ello se han desarrollado técnicas basadas en la detección específica de genes de *T. vaginalis* que permiten tener un diagnóstico rápido y confiable. Se cuenta actualmente con sondas para PCR en tiempo real que son capaces de reconocer de manera específica el gen de  $\beta$ -tubulina y el gen 18S ribosomal. También se tienen sondas específicas que permiten la identificación por hibridación fluorescente *in situ* (FISH por sus siglas en inglés) (Simpson *et al*, 2007; Muresu *et al*, 1994). Para pacientes del sexo masculino se cuenta ahora con el diagnóstico por PCR a partir de la primera orina y sedimentación, logrando así resultados confiables (Ingersoll *et al*, 2008). Las principales limitaciones de estas técnicas son la necesidad de especialistas para realizarlas, no son económicas, y requieren tiempo para el procesamiento y análisis de resultados, sin embargo, estas metodologías son muy eficientes. Se ha propuesto también el uso de sondas radiactivas, y aunque la sensibilidad es mayor implica un cierto riesgo profesional así como el manejo apropiado de los desechos radiactivos. Por lo tanto las sondas fluorescentes, la hibridación *in situ* y el uso de PCR son herramientas novedosas, muy sensibles y de elección para dar un diagnóstico confiable y rápido de *T. vaginalis*.

### **I.7 Tratamiento**

Desde 1836 se reconoció a *T. vaginalis* como el agente causal de la tricomoniasis, pero no fue sino hasta 1957 que se utilizó el metronidazol ( $\alpha,\beta$ -hidroxiethyl-2-metil-5-nitroimidazol) como un fármaco eficiente en contra de esta infección. Este antibiótico es un

derivado de la azomicina, producido por cepas de *Streptomyces*. Otros compuestos de la familia de los nitroimidazoles (tinidazole, ornidazole, secnidazole, flunidazole, nimorazole, carnidazole) también se han usado en el tratamiento de infecciones causadas por protozoarios, entre ellos *T. vaginalis* (Petrin *et al*, 1998). El mecanismo de acción de estos fármacos es mediante la formación de especies reactivas de nitrógeno generadas en el hidrogenosoma de protozoarios anaerobios mediante la acción de la piruvato ferredoxina oxidoreductasa. El metronidazol por sí mismo no es citotóxico, debe primero entrar a la célula por difusión y luego ser activado en el hidrogenosoma. La efectividad del tratamiento radica en que la mitocondria de mamíferos no es capaz de metabolizar el metronidazol para generar el radical libre nitroso que es citotóxico para la célula. El efecto causado sobre el parásito es el retraimiento de los flagelos y disminución de movimiento, variación de la forma y contenido de los hidrogenosomas, ruptura del DNA y autofagia; *in vitro*, la muerte celular comienza a ser evidente una hora después de agregar el antibiótico y en 8 horas el parásito aparece completamente lisado (Benchimol, 2009). Existen algunas desventajas en cuanto al uso de compuestos de la familia de los 5-nitroimidazoles ya que se ha visto que en modelos murinos pueden ser teratogénicos y se ha observado un ligero efecto en pruebas de mutagénesis en bacterias, por lo que su uso en mujeres embarazadas está prohibido (Petrin *et al*, 1998). En el caso de existir una infección por *T. vaginalis* durante el embarazo éste se vuelve potencialmente de riesgo, aunque no se han observado efectos en personas tratadas por tiempos prolongados con estos medicamentos. Aun así, solamente se permite el uso del metronidazol en el último trimestre del embarazo y no se han identificado defectos de nacimiento asociados directamente al uso del metronidazol (Upcroft *et al*, 2001). El tratamiento estándar utilizado es una dosis de 250 mg tres veces al día por 7 días, o bien una dosis única de 2 gramos. Esta última es la opción más empleada debido a que los pacientes no presentan molestias ni efectos secundarios ya que se utiliza una menor cantidad del fármaco en el tratamiento. En el caso de mujeres embarazadas se han usado óvulos de metronidazol (100 mg cada dosis) en la noche por 14 días con un éxito del 50%. En caso de que se requiera de un tratamiento posterior debido a la persistencia de la enfermedad se administra una dosis única de dos gramos hasta el tercer trimestre del embarazo. En el caso de mujeres en período de lactancia se utiliza también la dosis de 2 gramos y se suspende la lactancia por 24 horas. El curso de acción más eficiente es aquel en

el que se tratan tanto al paciente como a su pareja para prevenir la reinfección sin importar si presentan o no los síntomas, ya que lo más probable es que ambas personas se encuentren infectadas (Petrin *et al*, 1998).

Hay ocasiones en que el tratamiento contra la tricomoniasis falla. Esto puede deberse a varios motivos: el tratamiento probablemente no se llevó a cabo completamente o se realizó de manera inapropiada, pudo ocurrir una reinfección o bien pueden existir factores en el paciente que evitan que el medicamento llegue a los tejidos deseados. Este último punto parece ser multifactorial y podría deberse a bajos niveles de zinc en la sangre, poca absorción del medicamento, o bien podrían existir infecciones vaginales bacterianas que inactivan el medicamento (Petrin *et al*, 1998).

Por otra parte se ha descrito que existen aislados de *T. vaginalis* resistentes al medicamento. Aún falta conocer mejor el mecanismo de resistencia al metronidazol ya que éste no es un fenómeno genético de resistencia a antibióticos como en bacterias, sino que es un fenómeno que involucra la disminución de las enzimas que metabolizan al metronidazol y generan especies reactivas de nitrógeno. Entre estas enzimas se encuentra principalmente la Piruvato-Ferredoxin Oxidoreductasa (PFO) y otras enzimas que contienen el grupo ferredoxin y que en menor grado son capaces de activar el fármaco. Se sabe que en algunos aislados que son resistentes a metronidazol disminuye la transcripción de la PFO (Quon *et al*, 1992). En algunos casos se ha visto que repitiendo el tratamiento estándar o administrando hasta 800 mg en tres dosis (cuando un segundo tratamiento de 2 gramos no haya funcionado), el paciente queda libre de parásitos (Das *et al*, 2005). En algunos casos de pacientes con enfermedad resistente a los tratamientos se pueden emplear tratamientos tópicos con furazolidona (Goldman *et al*, 2009).

Sin duda, es necesario desarrollar nuevos medicamentos con los cuales controlar eficientemente la tricomoniasis y eliminar tanto la resistencia como los efectos adversos que se pueden presentar al utilizar dosis altas de metronidazol. Recientemente se analizaron los efectos ultraestructurales y de viabilidad de células de *T. vaginalis* expuestas a azasteroles (inhibidores de enzimas de la vía de síntesis de esteroides), ya que la enzima  $\Delta^{24(25)}$  esterol metil transferasa está ausente en mamíferos y solamente se encuentra en hongos y protistas. Se encontró que estos compuestos podrían ser una opción de

tratamiento, pero aún se requiere más investigación y validación en distintos modelos experimentales para que puedan ser empleados en humanos (Rosa Ide *et al*, 2011).

### ***1.8 Organización de genes ribosomales***

La secuenciación del genoma de *T. vaginalis* (Carlton *et al*, 2007) reveló que este organismo haploide tiene un genoma de alrededor de 176 Mb, aunque es difícil calcular el tamaño exacto debido a la gran cantidad de copias de transposones y elementos repetidos que posee. En el año de 1985 se estimó el tamaño total del genoma utilizando métodos cuantitativos con DNA aislado de *T. vaginalis* y se concluyó que el tamaño es cerca de la mitad de lo que se considera por la secuencia del genoma (Wang *et al*, 1985). Con la medición por citometría de flujo del contenido de DNA, se encontró que en general son organismos con genomas de gran tamaño (~86-177 Mb) (Zubáková *et al*, 2008). En comparación con los genomas secuenciados de otros protozoarios parásitos (cuyos genomas oscilan en su tamaño entre 2.9 y 60 Mb), el de *T. vaginalis* es un genoma muy grande (TrichDB, 2012). Se han encontrado solamente 65 genes con intrones en *T. vaginalis* del total de los genes anotados. Según lo descrito por Carlton *et al*, este es uno de los organismos eucariontes con mayor capacidad codificadora, se estiman 99 mil genes codificantes para proteínas (Carlton *et al*, 2007 y TrichDB, 2012). También se han identificado genes para componentes de la vía de RNA de interferencia (RNAi), lo que podría ser una poderosa herramienta para manipular la expresión génica en *T. vaginalis*. Se han identificado también genes con un posible origen procarionte que podrían haber sido adquiridos por transferencia horizontal, la mayoría de ellos relacionados con enzimas metabólicas. Entre los genes identificados llaman la atención aquellos relacionados con la meiosis. Si bien este organismo no parecen tener un ciclo sexual de reproducción, es posible que los mecanismos de recombinación de DNA le permitan llevar a cabo eventos de recombinación homóloga e intercambio genético (Malik *et al*, 2008).

El grupo de trabajo de la Dra. Imelda López Villaseñor ha estado interesado en el estudio de algunos aspectos de la transcripción en *T. vaginalis* entre los cuales está la regulación de la expresión de los genes ribosomales por Pol I. Su grupo determinó la secuencia completa de una unidad del cistrón ribosomal así como el sitio del inicio de la transcripción (TSP por sus siglas en inglés para Transcription Start Point) (López-

Villaseñor *et al*, 2004). El tamaño del rRNA 18S de *T. vaginalis* es semejante a un rRNA 16S bacteriano (algunas veces llamado en tricomonádidos como 16S-like, Sogin 1991). No se han encontrado motivos fácilmente identificables como posibles promotores, y el análisis exhaustivo de la secuencia intergénica no reveló elementos modulares o secuencias repetidas que son comunes a los promotores reconocidos por la Pol I en otros eucariontes. En general, los promotores de Pol I presentan divergencia en la secuencia de las regiones regulatorias pero mantienen una organización modular reconocible (Grummt, 2003). En *T. vaginalis* aún no se han identificado las subunidades que forman a la Pol I funcional, aspecto que se discutirá más adelante.

Los genes ribosomales tienen un arreglo genómico variable de un organismo a otro. En casi todos los organismos el rDNA está arreglado en varias copias: en una célula pueden existir desde unas pocas copias hasta miles, dispuestas en tándem y, generalmente, en el orden que se muestra en la Figura 3 (Torres-Machorro *et al*, 2010 y Sollner-Webb *et al*, 1991). Sin embargo, existe una gran variación en cuanto a la organización génica y al número de copias de los genes ribosomales en microorganismos eucariontes, así como en su regulación (Torres-Machorro *et al*, 2010). En el caso particular de *T. vaginalis*, se conoce la secuencia y de manera experimental se ha demostrado que posee entre 12 y 14 copias (Torres-Machorro *et al*, 2009), lo cual presenta una discordancia con las 250 copias propuestas por el proyecto de secuenciación del genoma de *T. vaginalis* (Carlton *et al*, 2007). En la Figura 3 se muestran los elementos que conforman el cistrón ribosomal de *T. vaginalis* en el que se destacan las secuencias codificadoras, los espaciadores (externos e internos) así como el arreglo genómico que tiene cada unidad.

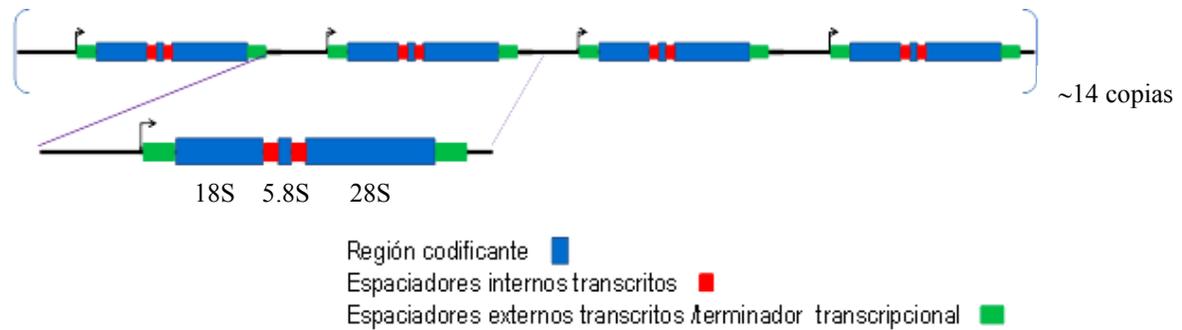


Figura 3. Elementos en el cistron ribosomal de *T. vaginalis*. En la región intergénica se encuentra la secuencia promotora. En el espaciador externo transcrito del extremo 3' del gene 28S se localiza la secuencia que dirige la terminación de la transcripción. Figura basada en Torres-Machorro *et al*, 2009.

### ***I.9 Los genes ribosomales y estudios filogenéticos***

El uso de las secuencias de rDNA ha demostrado ser también una poderosa herramienta, en conjunto con caracteres morfológicos y criterios ultraestructurales, para clasificar y determinar las relaciones filogenéticas entre los diferentes grupos de organismos. Las secuencias más empeladas han sido los genes 18S y 16S eucariontes y bacterianos, respectivamente, así como secuencias espaciadoras del cistron ribosomal que han sido útiles no solamente por la secuencia sino por la presencia de estructuras secundarias únicas asociadas a cada una de las moléculas de RNA. Por la variación de las secuencias entre organismos distantes y su conservación entre especies relacionadas, el rRNA ha sido una poderosa herramienta para clasificar a los seres vivos y poder establecer sus relaciones evolutivas (Woese *et al*, 1990).

### ***I.10 Síntesis de RNA Ribosomal***

El nucléolo es el compartimento nuclear donde se concentra la mayor actividad transcripcional celular. Aquí se concentran una gran cantidad de elementos para sintetizar el rRNA y para modificarlo para hacerlo biológicamente activo (Shaw *et al*, 2005). En el nucléolo se encuentran los genes que codifican para los transcritos del rRNA 18S que se ensambla en la partícula 40S ribosomal y los transcritos del rRNA 5.8S y 28S que se ensamblan en la partícula 60S de los ribosomas. El gene que codifica para el transcrito del rRNA 5S se localiza fuera de la región nucleolar y también se encuentra arreglado en tándem y es transcrito por Pol III (Sollner-Webb *et al*, 1991); este transcrito se integra en la

partícula 60S de los ribosomas maduros. Los genes ribosomales 18S, 5.8S y 28S son transcritos por la Pol I como un RNA policistrónico que posteriormente es procesado. Recientemente hay un interés creciente en la biogénesis de los ribosomas y la regulación de la Pol I debido a su estrecho vínculo con la proliferación celular. La biogénesis de los ribosomas se ha propuesto como un posible blanco terapéutico en el cáncer (Drygin *et al*, 2010). En el caso de algunos protozoarios parásitos, la Pol I también se ha propuesto como blanco farmacológico debido a la presencia de subunidades que hasta el momento solamente se han descrito en éstos organismos (Nguyen *et al*, 2007).

En la biogénesis de los ribosomas eucariontes participan los productos de las tres RNA polimerasas celulares (Cramer *et al*, 2008): la síntesis de las proteínas que conforman al ribosoma depende de la producción de los mRNAs sintetizados por la RNA polimerasa II (Pol II), los rRNA 18S, 5.8S y 28S son transcritos por Pol I y el rRNA 5S es transcrito por la RNA polimerasa III (Pol III) (Nazar, 2004).

La Pol I es un complejo multiprotéico compuesto por unas 24 subunidades. La Pol I de *T. vaginalis* no ha sido caracterizada experimentalmente. En la Tabla 2 se muestran algunos de los componentes de la Pol I identificados en el presente trabajo en *T. vaginalis*, mediante el programa BLAST. El análisis se hizo usando las secuencias anotadas de las subunidades para la Pol I de levadura (*S. cerevisiae*). La Pol I de *T. vaginalis* tiene una propiedad inversa a la que se observa en mamíferos: la alta resistencia al fármaco  $\alpha$ -amanitina. La resistencia observada en *T. vaginalis* es similar a la observada en levaduras e insectos. Se conocen mutaciones en la Pol I de ratón y rata que modifican la sensibilidad al fármaco  $\alpha$ -amanitina, las cuales serían interesantes de investigar en las subunidades que conforman la Pol I de *T. vaginalis* (Bartolomei *et al*, 1995 y Crerar *et al*, 1983).

Tabla 2. Subunidades que componen la Pol I

<b>Subunidades de RNA Polimerasa I<sup>a</sup></b>			
<b>Complejo</b>	<b>Subunidad</b>	<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<b><i>T. vaginalis</i></b>
DNA dependiente- RNA polimerasa I	A12.2	YJR063W	TVAG_482170 <sup>Δ</sup>
	A135	YPR010C	TVAG_353520 <sup>Δ</sup>
	A14	YDR156W	? <sup>b</sup>
	A190	YOR341W	TVAG_172240 <sup>Δ</sup> TVAG_247430 <sup>c,Δ</sup>
	A34.5	YJL148W	? <sup>b</sup>
	A43	YOR340C	TVAG_415700? <sup>d,Δ</sup>
	A49	YNL248C	? <sup>b</sup>
	RPB10	YOR210W	TVAG_434510 <sup>e,Δ</sup>
	RPB5	YBR154C	TVAG_113600 <sup>e,f</sup>
	RPB8	YOR224C	TVAG_186530 <sup>e,Δ</sup>
	RPB12	YHR143W-A	TVAG_283180? <sup>d,e</sup>
	AC19	YNL113W	TVAG_190340 <sup>g,Δ</sup>
	AC40	YPR110C	TVAG_016650 <sup>g</sup>
	RPB6	YPR187W	TVAG_221960 <sup>e</sup>
RNA polimerasa I complejos del core	RRN11	YML043C	? <sup>b</sup>
	RRN6	YBL014C	? <sup>b</sup>
	RRN7	YJL025W	? <sup>b</sup>
	RRN3 <sup>h</sup>	YKL125W	TVAG_416970
	RRN10	YBL025W	? <sup>b</sup>
	RRN5	YLR141W	? <sup>b</sup>
Factores activadores río arriba (UAF o UBF)	Subunidad del UAF	RRN9	TVAG_008690? <sup>d,e</sup>
	SPT15 (TBP)	YER148W	TVAG_291560 * TVAG_285070
	Subunidad del UAF	YOR295W	TVAG_283630
Exclusiva de protozoarios**	TbRPA31	Ausente	TVAG_352310

Leyendas: **a.** Identificación de las secuencias de *T. vaginalis* usando como referencia las secuencias anotadas de cada subunidad de *S. cerevisiae* usando el programa BLAST. Se obtuvieron correspondencias con *S. cerevisiae*, se muestra el nombre sistemático de cada uno de los genes en *S. cerevisiae*. **b.** No se identificó secuencia homóloga en el genoma de *T. vaginalis*. **c.** Secuencia con similitud equivalente, se proponen dos proteínas que no parecen ser duplicaciones o errores en la anotación del genoma. **d.** Proteínas con baja homología que pudieran ser el homólogo de *T. vaginalis*. **e.** Proteínas comunes a las RNA polimerasas I, II y III. **f.** Proteína que hace contacto directamente con el DNA. **g.** Proteínas comunes únicamente a las RNA polimerasas I y III. **h.** Proteína requerida para el reclutamiento de la RNA polimerasa al rDNA \* Gene clonado y expresado en el presente trabajo (ver **Materiales y Métodos** así como **Resultados**), los dos genes que codifican para TBP fueron también identificados en la secuenciación del genoma de *T. vaginalis* previamente [Carlton *et al*, 2007 y Smith *et al*, 2011(B)]. \*\* La ausencia de éste gene en *T. brucei* es letal, pero se desconoce su función en la RNA polimerasa I (Nguyen *et al*, 2007). Δ. Hay datos de expresión como EST, depositados en NCBI.

En general los mecanismos de inicio de la transcripción del rRNA son especie específica (Heix *et al*, 1995 y Eberhard *et al*, 1996), sin embargo, se han reportado excepciones, como es el caso en que extractos nucleares de ratón son capaces de transcribir los genes ribosomales de *Xenopus* (Culotta *et al*, 1987). En experimentos *in vitro*, extractos nucleares de células de ratón y de humano no son capaces de iniciar la transcripción de los genes ribosomales de forma cruzada, únicamente con sus respectivas secuencias (Ishikawa *et al*, 1991). El mismo fenómeno ha sido documentado en plantas, en las que solamente se puede iniciar la transcripción mutagenizando la secuencia de modo que se parezca más a la relativa del organismo heterólogo (Doelling *et al*, 1996). Se ha pensado que las variaciones tanto en la secuencia del promotor ribosomal como en las proteínas que lo reconocen, se han especializado de manera que ha llevado a una divergencia tal que la maquinaria de una especie ya no es capaz de reconocer la de otra especie y viceversa. Factores tan conservados como la TBP (por sus siglas en inglés de TATA-box Binding Protein) parecen ser intercambiables, pero su asociación a otros factores transcripcionales hacen a TBP indirectamente responsable de la especificidad del reconocimiento del promotor en una especie determinada mediante interacciones proteína-proteína, a pesar de ser una proteína altamente conservada en todos los reinos (inclusive a la que se encuentra en Arqueobacterias) (Rudloff *et al*, 1994).

En los genes ribosomales hay un sitio de inicio de la transcripción y muy cercano a éste se localiza el elemento promotor central proximal (CP por sus siglas en inglés para Core Promoter). Róo arriba del inicio de la transcripción se ha descrito un elemento regulatorio distal (UCE, por sus siglas en inglés para Upstream Control Element), así como promotores espaciadores, enhancers, silenciadores y terminadores de la transcripción, todos ellos localizados en la región intergénica cuyo tamaño suele variar entre 2 y 30 kpb (ver **Discusión**) (Grummt I, 2003). Además, ha sido posible visualizar el proceso transcripcional de manera directa a través de microscopía electrónica al evidenciar estructuras llamadas “Árboles de Navidad”, mediante la técnica de Miller Spreads, mostradas en la Figura 4 (para una revisión general ver Raska *et al*, 2004).

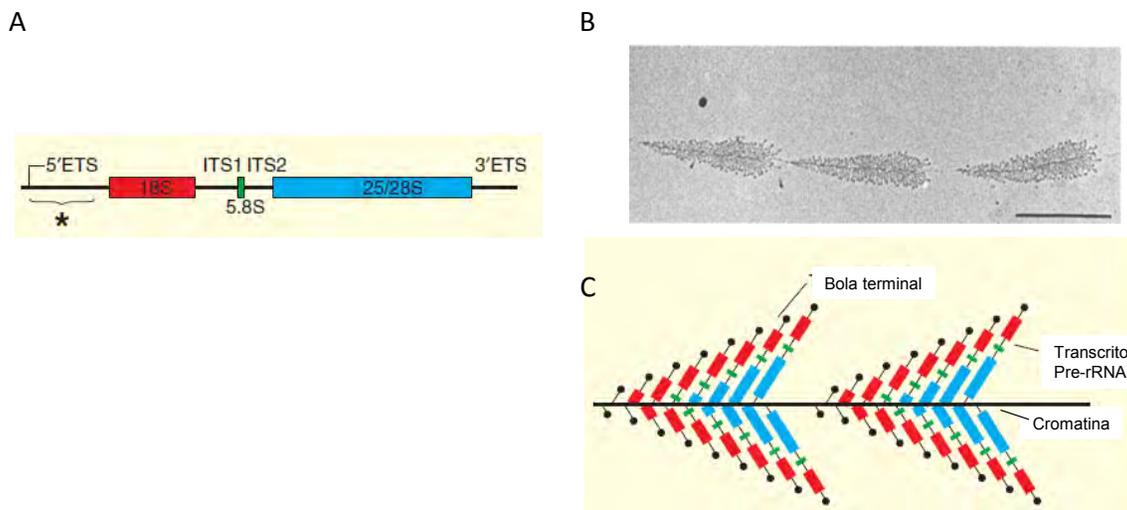


Figura 4. El proceso transcripcional de los genes ribosomales se puede registrar por microscopía electrónica. Panel **A**: se muestra un esquema de un clúster ribosomal eucarionte típico. Se muestran las secuencias codificadoras, los espaciadores internos transcritos (ITS) y los espaciadores externos transcritos (ETS). Panel **B**: se muestra la imagen de microscopía electrónica de los complejos transcripcionales o “Árboles de Navidad”, en donde se observan los transcritos nacientes de RNA. Panel **C**: se muestra un esquema que representa las unidades de cada “Árbol de Navidad”. La “Bola Terminal” corresponde al extremo 5’ asociado a ribonucleoproteínas que están asociadas al procesamiento del rRNA y el ensamblaje en ribosomas maduros. En estas imágenes de microscopia electrónica se muestra la organización génica de los genes ribosomales y la manera en la que se transcriben (Imágenes tomadas y modificadas de Weisenberger *et al*, 1995 y Peculis, 2002).

La transcripción dependiente de Pol I en *T. vaginalis* no ha sido explorada, mientras que la transcripción por Pol II se ha caracterizado en mayor detalle (Schumacher *et al*, 2003). Lo que se conoce, en cuanto a la regulación de la expresión de los genes ribosomales, se esquematiza en la Figura 5.

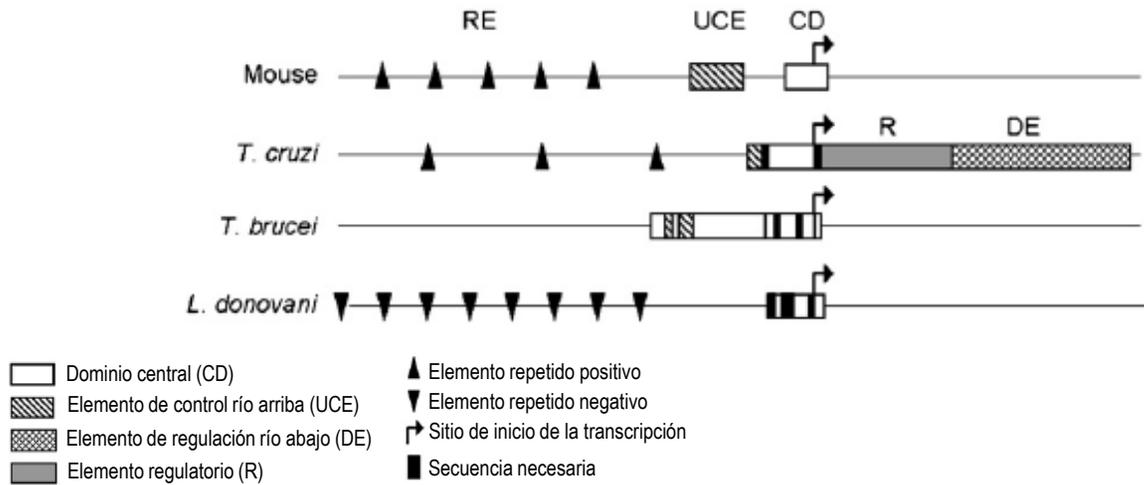


Figura 5. Elementos regulatorios de los genes ribosomales en diferentes organismos. El esquema no está a escala. Los elementos regulatorios presentes en las regiones intergénicas de algunos organismos se presentan esquematizados. Se consideraron los protozoarios mostrados por ser los que se han caracterizado y que guardan más cercanía con *T. vaginalis* respecto a otros organismos. La lista adicional indica otros elementos considerados en la regulación de los genes ribosomales, caracterizados sobre todo en ratón y mamíferos superiores. Tomado y modificado de Figueroa-Angulo *et al*, 2006).

Como se muestra en la Figura 5, existen muchos elementos regulatorios descritos en los promotores ribosomales. En ellos no es común encontrar el mismo arreglo ni conservación de secuencias, y la funcionalidad de los elementos también diverge entre organismos, ya que en algunos casos se encuentran elementos repetidos que pueden ser activadores o represores y en conjunto todas estas características hacen que los promotores sean regulados de manera específica para cada organismo (Heix *et al*, 1995). La arquitectura modular, en la que hay elementos repetidos o vecinos al elemento central o Core, suele estar conservada en todos los organismos (Figura 5). Los dos elementos más importantes son el Core y el UCE, donde el UCE no es indispensable para el inicio de la transcripción, pero se sabe que es necesario para el correcto reclutamiento y posicionamiento de la Pol I (Paule *et al*, 2000).

Dentro de los factores que modulan la actividad de la Pol I destaca el factor UBF (Upstream Binding Factor). El UBF al ser fosforilado en el dominio de unión a DNA, recluta otros factores que en conjunto se le llama “Enhancesome” que incrementa la incorporación y activación de la Pol I. El UBF es fosforilado por factores mitogénicos o proliferativos que son percibidos por las cinasas Raf-MEK (cinasas activadas por mitógenos o MAPK por sus siglas en inglés Mitogen Activated Protein Kinase)/ERK (o cinasa regulada por señal extracelular, por sus siglas en inglés, Extracellular-signal Regulated Kinase). El UBF de mamífero posee sitios de fosforilación reconocidos por la cinasa ERK en su dominio de unión a DNA generando un complejo más estable, lo que también permite la elongación del transcrito del rRNA (Moss *et al*, 2006).

### **I.11 Terminación de la transcripción de los genes ribosomales**

Por la naturaleza modular de los genes ribosomales, el inicio y término de la transcripción definen a cada unidad. Para la terminación de la transcripción se requieren elementos tanto en *cis* como en *trans*. Dentro de los elementos en *cis* se han caracterizado dos. El primero son secuencias con corridas de U's en el transcrito que se han propuesto como diagnóstico para identificar secuencias terminadoras (Lang *et al*, 1995). En el caso de levaduras se presentan dos corridas de U's, uno inmediatamente al final del gene 28S y otro 157 pb río abajo, el cual se ha caracterizado como un mecanismo “a prueba de fallas” o como terminador secundario en caso de que la transcripción no se detenga en el primer terminador (Reeder *et al*, 1999). El segundo es una estructura secundaria que se forma en el transcrito, generalmente variable entre especies y que suele ser además el sitio de unión para un factor terminador (Reb1p en levaduras y TTF1 en mamíferos). Una cualidad importante de las secuencias terminadoras es que son sensibles a la orientación, ya que al estar en orientación inversa se transcribe la secuencia complementaria y no se forma la estructura secundaria (Reeder *et al*, 1994 y Reeder *et al*, 1997). En el caso de humanos y ratones se han identificado de 8 a 10 secuencias asociadas a la terminación llamadas cajas *Sal*; son secuencias repetidas de 18 pb cuya característica es la presencia de un sitio de restricción para la enzima *SalI* y en mamíferos es la secuencia que reconoce el factor TTF1. Se ha visto que una sola caja *Sal* es suficiente para llevar a cabo la terminación, aunque entre más cajas estén presentes, la terminación es más eficiente. Estos elementos también

son sensibles a la orientación (Grummt *et al*, 1986). En la mayoría de los terminadores se encuentra una corrida de T's previo a las secuencias que unen a los factores de terminación y cuyo papel, aparentemente, es el de llevar a cabo un deslizamiento de la polimerasa que induce una pausa; esto a su vez propicia la interacción de la proteína de terminación con su secuencia y finalmente permite la liberación tanto del templado como del transcrito naciente (Lang *et al*, 1995 y Richard *et al*, 2009). Entre otros elementos en *trans*, destacan la subunidad de la Pol I Rpa12, una pequeña subunidad esencial en la terminación transcripcional que está asociada al corte del extremo 3' una vez alcanzada la secuencia terminadora (Prescott *et al*, 2004) y Rat1p, endonucleasa similar a la RNAsa III, que libera el transcrito. Este proceso aparentemente ocurre co-transcripcionalmente (Lang *et al*, 1993, Kawauchi *et al*, 2008 y Mason *et al*, 1997).

### **I.12 Procesamiento de los transcritos ribosomales**

Una vez terminada la transcripción de los genes ribosomales, los transcritos son procesados y modificados para generar las moléculas que serán ensambladas para formar los ribosomas maduros. La maduración de los transcritos requiere de muchos pasos. Los más importantes son los cortes endoribonucleicos en el transcrito. De estos se han descrito al menos 10 (Nazar *et al*, 2004). Destacan aquellos que remueven los espaciadores externos en primer lugar y después los espaciadores internos. La maduración del extremo 3' del gene 28S requiere de la acción de Rat1p, que actúa como exonucleasa (similar a la RNAsa III bacteriana). El término de la transcripción y la eliminación de los espaciadores internos se ha propuesto como el primer paso de maduración de los RNA ribosomales. Una vez cortados los RNA ribosomales, son modificados químicamente. En mamíferos se sabe que alrededor de 200 bases son O-metiladas o pseudo uridiniladas, la mayoría de ellas ocurren durante la transcripción, y el resto una vez que han sido procesadas las moléculas. Una vez procesados y modificados los RNA ribosomales, se requieren de al menos 100 proteínas distintas para el ensamblaje de las moléculas maduras en las partículas ribosomales maduras (Nazar *et al*, 2004, Fromont-Racine *et al*, 2003 y Peculis, 2002).

## **II. Justificación:**

Hasta la fecha no se ha descrito la secuencia del promotor del cistrón ribosomal de *T. vaginalis*, ni de otros elementos en *cis* que controlen tanto el inicio como el termino de su transcripción.

## **III. Hipótesis:**

Secuencias aledañas al TSP forman parte de un promotor central (core promoter) para la RNA polimerasa I. Es posible que existan también elementos adicionales que estimulen la transcripción, como el UCE (por sus siglas en inglés Upstream Control Element) o secuencias tipo enhancer, presente en otros eucariontes. Por otra parte, en el extremo 3' del gene 28S se propone al menos una secuencia que dirige la terminación de la transcripción del cistrón ribosomal de *T. vaginalis*.

## **IV. Objetivo general:**

Caracterizar las secuencias que dirigen la transcripción y la terminación de la transcripción del cistrón ribosomal de *T. vaginalis*.

## **V. Objetivos particulares:**

- Desarrollar un sistema reportero transcripcional para la Pol I en *T. vaginalis*.
- Identificar y acotar la región que contenga el elemento promotor de la transcripción del cistrón ribosomal de *T. vaginalis*.
- Determinar los elementos en *cis* necesarios para que se lleve a cabo la transcripción del cistrón ribosomal.
- Identificar la región encargada de dirigir la terminación de la transcripción de los genes ribosomales de *T. vaginalis*.

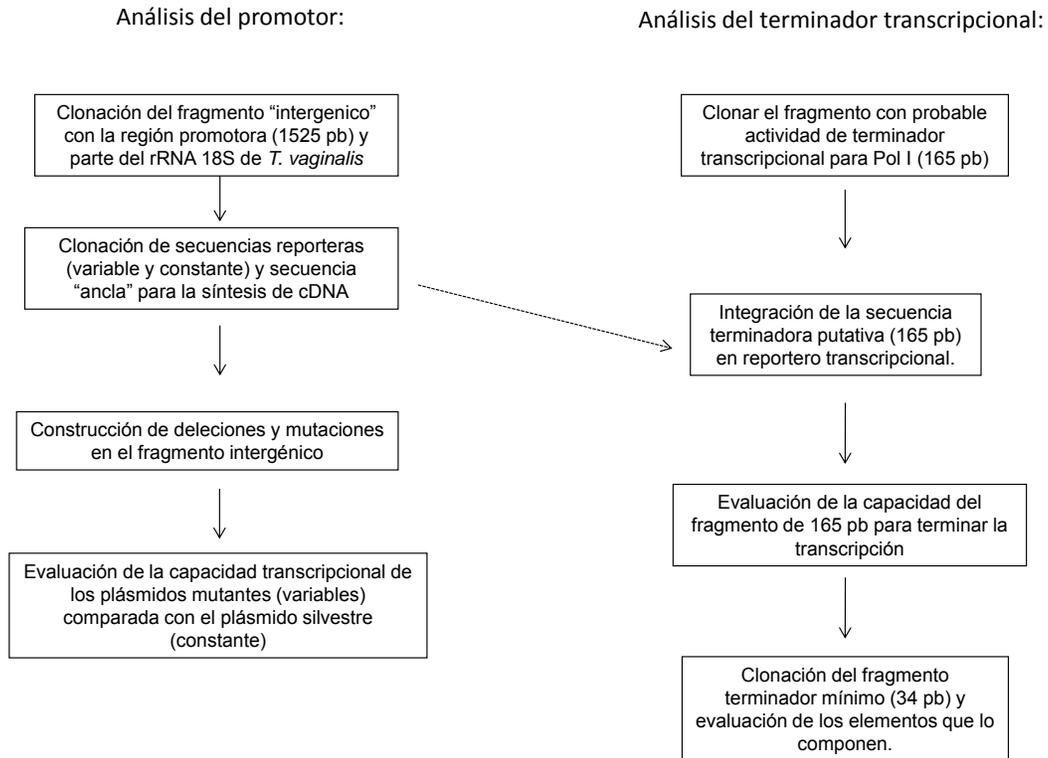
## VI. Materiales y Métodos.

*Reactivos empleados.* Todos los reactivos químicos y enzimas usados en este trabajo fueron de grado “Biología Molecular” o de mayor de pureza. Las fuentes de los reactivos usados fueron: Sigma Chemical Co, Research Organics, Gibco BRL y J.T. Baker. Las enzimas de restricción, modificación, polimerasas y ligasas fueron obtenidas de Invitrogen (Carlsbad Ca., USA). Los kits empelados fueron obtenidos de QIAGEN (Germany).

*Cultivo de parásitos y bacterias.* La cepa de *T. vaginalis* CNCD 147 se cultivó como se describió previamente (Diamond, 1957 y Clark *et al*, 2002) en el medio de cultivo TYM (por sus siglas en inglés de Trypticase-Yeast extract-Maltose) suplementado con suero de caballo inactivado por calor al 10% (concentración final V/V). Las células se crecieron en tubos de vidrio con tapa de rosca o en cajas de plástico Corning de 75 cm<sup>2</sup>, dependiendo del volumen necesario de células, a 37° C. Las células de *Escherichia coli* fueron cultivadas en medio LB (líquido o con 1.5% de agar) a 37° C en presencia o en ausencia de los antibióticos necesarios (ampicilina o kanamicina).

*Manipulación de DNA y RNA.* Todos los procedimientos de biología molecular fueron realizados con métodos estándar (Sambrook *et al*, 1989).

*Construcción de los plásmidos reporteros.* En el presente trabajo se desarrolló un sistema dual de transfección para determinar el efecto de mutaciones y deleciones en la región intergénica sobre la transcripción por Pol I. La construcción de los plásmidos empleados en el presente estudio requirió de una serie de pasos que a continuación se muestran en el diagrama de flujo y se describen en las siguientes secciones.



El primer paso fue obtener el fragmento que contuviera la región intergénica y parte del gene 18S. Los fragmentos considerados son 1247 pb de la región intergénica y 277 pb del espaciador externo transcrito (ETS por sus siglas en ingles, External Transcribed Spacer), fragmento que comprende los sitios de restricción *HindIII* y *NruI*. También se incluyó una parte de la región codificadora del gene 18S, fragmento de 1524 pb. En la secuencia codificante del 18S se insertaron los fragmentos correspondientes a dos secuencias reporteras (Constante y Variable) para generar los dos plásmidos reporteros cada uno con una secuencia reportera diferente. El fragmento que incluye los dos elementos mencionados, la secuencia intergénica y el fragmento del gen 18S se obtuvieron por restricción para evitar hacer reacciones de PCR de fragmentos grandes y así evitar la incorporación de mutaciones. En el laboratorio se cuenta con un plásmido que contiene una unidad transcripcional completa del cistrón ribosomal, ya secuenciado, que es el plásmido p921 (ver Tabla S1 al final de la sección de **Materiales y Métodos**). A partir del p921 se obtuvo un fragmento con los sitios de restricción *HindIII* para el extremo 5' y *XbaI* para el extremo 3' para obtener el fragmento con la secuencia intergénica y el fragmento del gene 18S. Con esta estrategia fue posible delimitar, por separado, la posible secuencia terminadora, también contenida en la región intergénica. Las deleciones en la región

intergénica y en el ETS fueron creadas mediante PCR. El sitio de restricción *NruI* facilitó la estrategia para clonar los fragmentos generados por PCR, ya que son los últimos 6 nucleótidos previos al gene 18S. El extremo 3' del gene 28S contiene dos corridas del nucleótido T, que potencialmente podrían ser la señal de termino de la transcripción; por ello aislamos (ver más adelante) esa secuencia de las pruebas del promotor para posteriormente, analizar solamente esas 165 pb para determinar *in vivo* su funcionalidad como terminador transcripcional.

A continuación se describen con mayor detalle los pasos descritos previamente para la construcción de cada plásmido.

*Generación del plásmido pI18S.* Lo primero fue obtener del p921 el fragmento *HindIII-XbaI* que contiene el fragmento de la región intergénica, el ETS y un fragmento de la secuencia codificante del gene 18S y clonarlo en el plásmido comercial pUC18 (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc, Canada). Los elementos tienen los siguientes tamaños: 1525 pb de la región intergénica (se eliminaron 165 pb del posible terminador transcripcional) y 1524 pb del gene 18S generando un total de 3049 pb de inserto, el plásmido pUC18 mide 2686 pb, dando un total de 5735 pb de la construcción deseada (linearizada). En la Figura 6 se muestra el mapa de restricción del plásmido pI18S con los sitios de restricción relevantes para la generación de las posteriores modificaciones sobre éste. También se muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los fragmentos empleados para la construcción del plásmido pI18S, así como el análisis de restricción para comprobar que la clona obtenida tiene los elementos deseados. La combinación de los sitios de restricción *HindIII* y *EcoRI*, así como *HindIII* y *XbaI* permiten liberar el fragmento que comprende la región intergénica-ETS y el fragmento del gene 18S. Mientras que la digestión con el sitio *NruI* lineariza el plásmido ya que el único sitio *NruI* presente y se encuentra entre la región intergénica y la secuencia codificante del gene 18S.

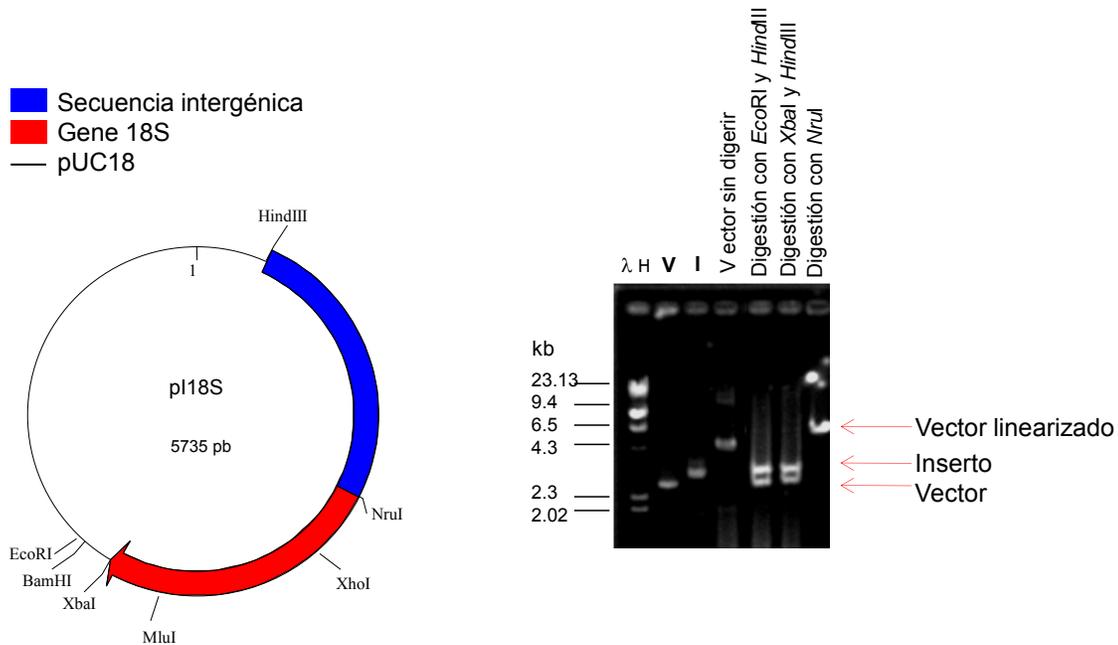


Figura 6. Generación del plásmido pI18S que contiene la región intergénica y parte de la secuencia codificante del gene 18S. Se muestra en la figura digestiones con las enzimas que liberan el inserto de dos formas distintas. La digestión con *NruI* lineariza el plásmido (último carril). **V**= plásmido pUC18 digerido con *HindIII* y *XbaI* purificado y usado en la ligación. **I**= Inserto proveniente del p921, fragmento de interés digerido también con *HindIII* y *XbaI*.  $\lambda$  H= marcador de peso molecular: DNA del fago lambda digerido con la enzima *HindIII*.

*Generación del plásmido pI18S Ter.* Al plásmido pI18S se le añadió en el extremo 3' del fragmento del gene 18S la secuencia que podría constituir el terminador transcripcional del cistron ribosomal, es decir, las 165 pb río abajo del gene 28S del cistron ribosomal. Esto se hizo ya que se ha reportado que, en ensayos de transfección transitoria, la terminación de la transcripción en los plásmidos reporteros es importante para la correcta iniciación de la transcripción (Panigrahi *et al*, 2009). Para ello, mediante PCR se amplificó el fragmento de 165 pb con los oligonucleótidos TerFw y TerRv (Tabla S1). El producto de PCR se clonó en el plásmido pCR II Blunt TOPO para permitir la digestión completa con ambas enzimas y para usarlo posteriormente en las construcciones en las que se evaluó su papel como secuencia terminadora de la transcripción. El fragmento terminador de 165 pb se escindió del pCR II Blunt TOPO Ter y se clonó en el plásmido pI18S con la orientación natural mediante el uso de sitios de restricción (*XbaI* y *BamHI*). En la Figura 7 se muestra

el mapa de restricción del plásmido pI18STer con los sitios de restricción relevantes para su generación. En el Panel **A** se muestra el producto de PCR con la secuencia putativa terminadora de la transcripción y que fue clonada previamente en el plásmido pCR II Blunt TOPO. Se muestra el producto de PCR de la secuencia terminadora y la digestión con *EcoRI* del pCR II Blunt TOPO con la secuencia terminadora, ganando 18 pb extras del sitio múltiple de clonación del plásmido pCR II Blunt TOPO. En el Panel **B** se muestra la digestión del plásmido final con las enzimas que liberan el inserto del terminador, es decir *XbaI* y *BamHI*.

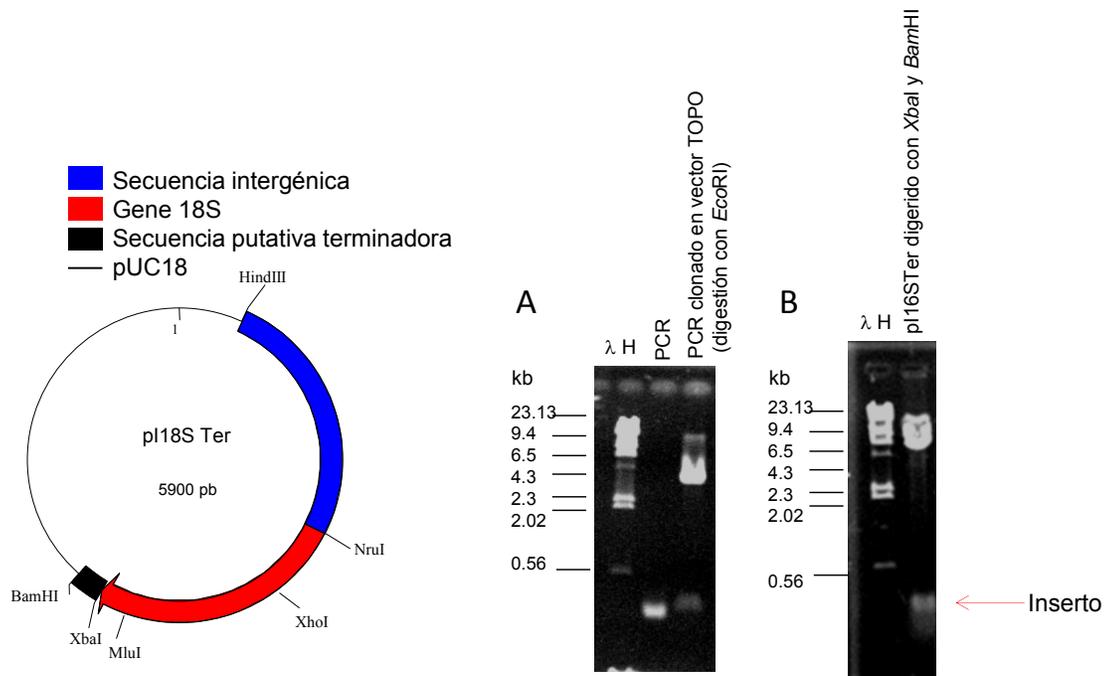


Figura 7. Generación del plásmido pI18S Ter que contiene la región intergénica, parte de la secuencia codificante del gene 18S y la secuencia terminadora de la transcripción putativa. En el Panel **A** se muestra la digestión del plásmido pCR II Blunt TOPO-Ter con *EcoRI*, que libera un fragmento de 179pb. En el Panel **B** se muestra la digestión del plásmido pI18S Ter con las enzimas que liberan el inserto del terminador, es decir *XbaI* y *BamHI*.  $\lambda$  H= marcador de peso molecular: DNA del fago lambda digerido con la enzima *HindIII*. El plásmido pI18S Ter linearizado mide 5900 pb.

*Generación de los plásmidos reporteros pConst y pVar.* Para generar los plásmidos reporteros se empleó el plásmido pI18STer. Para incorporar las secuencias reporteras se empleó PCR para amplificar fragmentos de los genes *cat* y *gfp* y usarlos como las secuencias reporteras Constante y Variable respectivamente. Cada fragmento de PCR tiene

incorporado en el extremo 3' del oligonucleótido reversa una secuencia que denominamos ancla. Esta secuencia se usó como punto de anclaje para la síntesis de cDNA mediante un oligonucleótido específico. Para el reportero Constante se amplificó un fragmento del gene *cat* con los oligonucleótidos CATFw y CATcltRv (Tabla 3) y se generó un producto de 655 pb. Para el reportero Variable se amplificó un fragmento del gene *gfp* con los oligonucleótidos GFPFw y GFPcltRv (Tabla S1) y se generó un producto de 734 pb. Los tamaños de cada producto se estimaron considerando los sitios de restricción *XhoI* y *MluI* para clonarlos, así como la secuencia ancla para la síntesis de cDNA. La secuencia ancla empleada fue la región *clt* (por sus siglas en inglés de *cis*-locus of transfer) del plásmido pJV1 de *Streptomyces phacromogenes* (número de acceso NC\_001759, posiciones 11075 – 220). Se escogió esta secuencia por que no tiene regiones de homología en el genoma de *T. vaginalis* y tiene un alto contenido de nucleótidos G+C, con lo que se asegura la especificidad en la síntesis de cDNA. En la Figura 8 se muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en el que se muestran los productos amplificados de los fragmentos de los genes *cat* y *gfp* que se usaron para su posterior clonación en el plásmido pI18S Ter. Estos productos fueron clonados directamente en los sitios *XhoI* y *MluI* del plásmido pI18S Ter sin clonarlos primero en el plásmido pCR Blunt II TOPO.

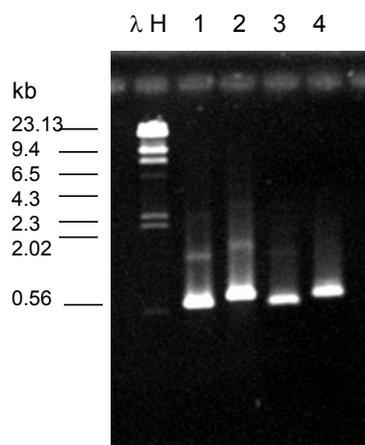


Figura 8. Productos de PCR para generar las secuencias reporteras. Carril 1: producto de PCR reportero Constante sin purificar. Carril 2: producto de PCR reportero Variable sin purificar. Carril 3: producto de PCR reportero Constante purificado y digerido con *XhoI* y *MluI*. Carril 4: producto PCR reportero Variable purificado y digerido con *XhoI* y *MluI*.  $\lambda$  H= marcador DNA del fago lambda digerido con la enzima *HindIII*. Se indican que los productos que fueron corridos sin purificar y aquellos que se digirieron con las enzimas *XhoI* y *MluI* y luego fueron purificados.

La clonación de las secuencias reporteras en el plásmido pI18STer fue mediante la digestión con las enzimas *XhoI* y *MluI*, de éste modo se reemplazó un fragmento de 891 pb del gene 18S con los fragmentos reporteros Constante y Variable (655 pb y 734 pb respectivamente) que se muestran en la Figura 8. En la Figura 9 se muestran los mapas de los plásmidos pConst y pVar finales con los sitios de restricción relevantes para su generación. El gel de agarosa teñido con bromuro de etidio muestra el análisis de restricción de los fragmentos incorporados, que en resumen son: 1525 pb de la región intergénica (1247 pb de la región intergénica, el TSP y 277 pb del ETS) y en el extremo 3' del gene 18S el fragmento de 165 pb del posible terminador transcripcional. Se reemplazó un fragmento del gene 18S usando las enzimas de restricción *XhoI* y *MluI*, eliminando un fragmento de 891 pb con los productos de PCR del reportero Constante y Variable, generando un total de 2978 pb de inserto para el plásmido reportero Constante y uno de 3057 pb para el reportero Variable, considerando también la secuencia terminadora de la transcripción. El plásmido pUC18 mide 2686 pb. El plásmido linearizado del reportero pConst mide 5664 pb y el plásmido pVar mide 5743 pb. Se hicieron dos digestiones: una para liberar la secuencia reportera junto con la secuencia putativa terminadora de la transcripción (*XhoI/XbaI*) y una segunda para liberar únicamente las secuencias reporteras (*XhoI/MluI*). Los plásmidos resultantes fueron también verificados por secuenciación automática (datos no mostrados).

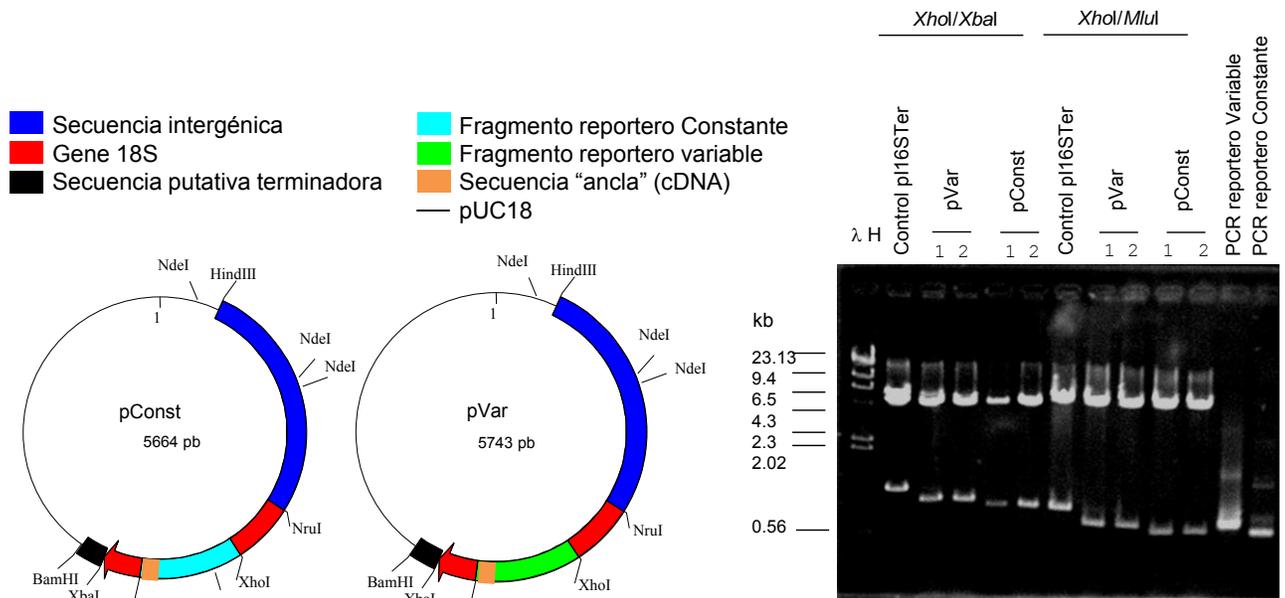


Figura 9. Generación de los plásmidos pVar y pConst.  $\lambda$  H= marcador de peso molecular: DNA del fago lambda digerido con la enzima *HindIII*. Se muestran dos clonas positivas para cada construcción (números en la parte superior de los pozos) digeridas con dos pares de enzimas de restricción, por un lado *XhoI* y *XbaI* y por el otro *XhoI* y *MluI*. Para liberar la secuencia reportera junto con la secuencia terminadora de la transcripción, se digirió con las enzimas *XhoI* y *XbaI*. Con estas digestiones se libera un fragmento de 1070 pb del plásmido pConst y uno de 1149 pb en el caso del plásmido pVar. Para liberar el fragmento reportero se usó la digestión *XhoI* y *MluI*. En el caso del pConst se libera un fragmento de 655 pb y en el caso del pVar uno de 734 pb. Se compararon los dos patrones con el generado por el plásmido parental pI18STer. Como control se muestran los PCRs tanto del reportero Variable y el Constante (extrema derecha del gel) sin purificar ni digerir. Los plásmidos resultantes fueron también verificados por secuenciación automática

*Generación de los plásmidos reporteros pVar(-INT)*. Como control negativo de transcripción se generó un plásmido reportero pVar que no tuviera la región intergénica ni el ETS, y para determinar también que el plásmido pUC18 no contuviera una secuencia críptica capaz de iniciar la transcripción de la secuencia reportera. Para ello se eliminó toda la secuencia intergénica del plásmido reportero Variable. Se utilizaron los sitios de restricción naturales que se encuentran en la región intergénica, *HindIII* y *NruI* (Figura 9), removiendo las 1525 pb de bases que comprenden 1247 pb de la región intergénica, el TSP y las 277 pb del ETS. El plásmido pVar fue digerido con ambas enzimas y luego se trató con DNA polimerasa I (fragmento Klenow) para eliminar los extremos salientes y

finalmente se re-ligó con T4 ligasa, generando el plásmido pVar(-Int). En la Figura 10 se muestra el mapa de restricción del plásmido pVar(-INT) y el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en el que se analizó el plásmido generado. El plásmido linearizado del reportero pVar(-Int) consta de 4218 pb. Para hacer un análisis detallado se tomó en cuenta la presencia de un sitio *NdeI* en la región intergénica que se pierde al remover toda la secuencia intergénica. En el gel se muestra la linearización del plásmido (banda de 4218 pb) con *EcoRI* o con *NdeI* (existe dos sitios contiguos en la región intergénica para *NdeI*, pero al eliminar la región intergénica se pierden). Se hizo también la doble digestión con *EcoRI* y *NdeI* liberando dos fragmentos: uno de 1800 pb (conjunción entre el fragmento del gene 18S, la secuencia del reportero variable y la secuencia posible terminadora de la transcripción) y otro de 2418 pb (proveniente del pUC18).

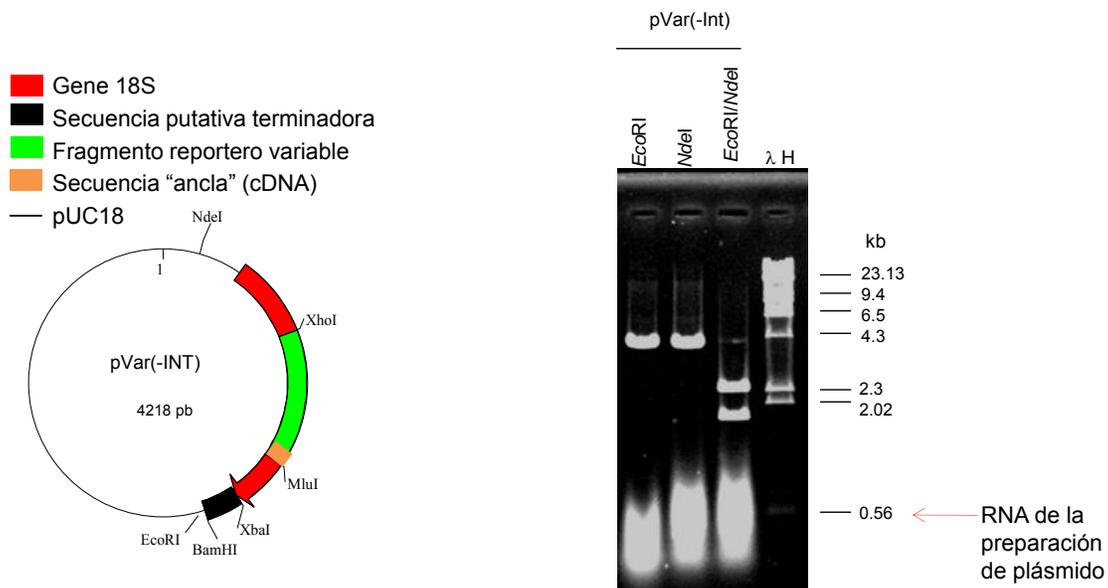


Figura 10. Generación del plásmido pVar(-Int).  $\lambda$  H= marcador de peso molecular: DNA del fago lambda digerido con la enzima *HindIII*. Se muestra la linearización del plásmido (banda de 4218 pb) con *EcoRI* y *NdeI*. Se hizo la doble digestión con *EcoRI* y *NdeI* liberando dos fragmentos uno de 1800 pb y otro de 2418 pb.

*Deleciones en la región intergénica.* Se generaron varios derivados del pVar con deleciones secuenciales de la región intergénica, cada una de aproximadamente 200 pb, para delimitar el fragmento más pequeño con actividad de promotor. La estrategia que se siguió fue amplificar por PCR cada uno de los fragmentos deseados con el uso de oligonucleótidos específicos flanqueados por sitios de restricción *HindIII* y *NruI*.

La clonación de cada fragmento se hizo usando los sitios naturales de la secuencia intergénica (*HindIII* y *NruI*) los cuales también fueron añadidos artificialmente en los oligonucleótidos delantero y reversa, respectivamente. Cada fragmento fue clonado en el plásmido pVar usando los mismos sitios de restricción, reemplazando así la región intergénica completa con cada una de los fragmentos acortados.

Los diferentes fragmentos correspondientes a cada una de las deleciones se amplificaron por PCR, usando como plantilla el plásmido pVar. Los fragmentos fueron clonados en el plásmido pCR Blunt II TOPO, escindidos con *HindIII* y *NruI* y subclonados en el plásmido pVar digerido también con *HindIII* y *NruI*. En la Figura 11 se muestran los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio en los que se analizaron las diferentes clonas obtenidas de los derivados del pVar con las diferentes deleciones; se muestra el producto de PCR junto a cada plásmido digerido con las enzimas *HindIII* y *NruI*. Los tamaños esperados son los siguientes (incluyendo los sitios de restricción): fragmento -991/+277=1268 pb, fragmento -748/+277= 1025 pb, fragmento -448/+277= 725 pb, fragmento -231/+277= 508 pb, fragmento -128/+277= 405 pb, fragmento +1/+277= 277 pb, fragmento -1247/+129= 1376 pb, fragmento -1247/+1=1248 pb, fragmento -128/+129= 257 pb, fragmento -128/+50= 178 pb y finalmente el fragmento -50/+50= 100 pb. Todas las construcciones fueron confirmadas por secuenciación automática. El mapa de las deleciones se muestra en la Figura 29.

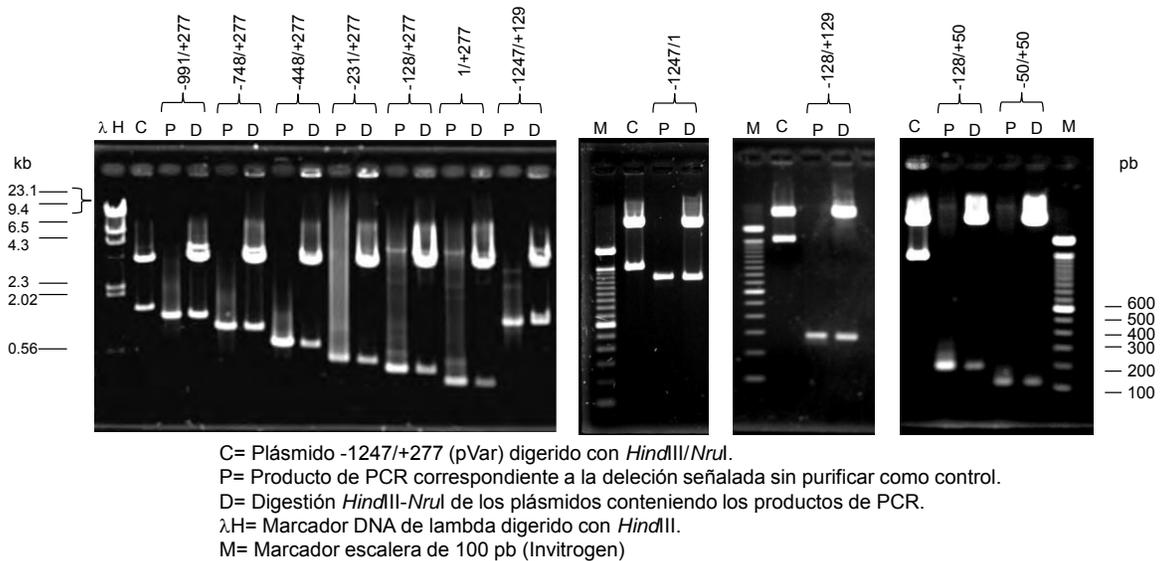


Figura 11. Generación de delecciones en la región intergénica. Geles de agarosa que muestran el patrón de restricción de los plásmidos derivados del pVar con delecciones en la región intergénica. Se muestra la digestión (*HindIII* y *NruI*) de cada clona y se compara con el producto de PCR correspondiente.

*Mutagénesis.* Las secuencias del TSP, del UCE putativo y de las corridas de 7 U's y 4 U's de la secuencia terminadora de la transcripción fueron mutadas usando el kit Quick Change Mutagenesis kit (Stratagene, USA) con los oligonucleótidos listados en la Tabla S1. Las condiciones de reacción fueron: buffer de reacción para *Pfu* Turbo 1X, 20 ng de templado, 10 ng del oligonucleótido sentido, 10 ng del oligonucleótido complementario, 0.5 mM del mix de dNTPs. El programa de termociclador fue el siguiente. Calentar a 95°C por 30 segundos y añadir 2.5 U de la enzima *Pfu* Turbo. Ciclar 18 veces el siguiente segmento de programa: 95°C 30 segundos, 55°C por 1 minuto y 68°C 12 minutos (en función del tamaño del templado a extender). Terminados los ciclos, incubar a 4°C hasta sacar las reacciones del termociclador. A cada reacción se le añadieron 2.5 U de la enzima *DpnI* y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Terminada la incubación, se tomaron 2 µl de la reacción y se transformaron en células competentes de *E. coli*.

*Plásmidos para el estudio de la secuencia terminadora.* Se empleó el plásmido pConst para construir una serie de derivados a partir de este para hacer el estudio de la secuencia terminadora de la transcripción. Se decidió emplear este plásmido ya que la secuencia del gene *cat* contiene un sitio *EcoRI* que divide el fragmento en dos partes, una

de 206 pb y otra de 434 pb, con lo cual se podía clonar en él la secuencia terminadora de la transcripción, usando el fragmento del posible terminador de la transcripción de 165 pb, clonado en el plásmido pCR Blunt II TOPO, descrito en la previamente. Además, se diseñó una serie de oligonucleótidos complementarios a las dos regiones que flanquearían a la secuencia terminadora de la transcripción para analizar los productos de la transcripción de la secuencia reportera, y discriminar si la secuencia terminadora era funcional o no (ver Tabla S1). Las modificaciones realizadas para construir el plásmido reportero fueron las siguientes. El pConst cuenta con una secuencia terminadora en el extremo 3' del gene 18S y en el sitio múltiple de clonación del pUC18 cuenta con un sitio adicional para la enzima *EcoRI*, por lo cual ambos elementos tuvieron que ser removidos para poder clonar el terminador en el sitio *EcoRI* interno del reportero Constante. En la Figura 12 se muestran los mapas de restricción del pConst y del pConstΔ*EcoRI*. El plásmido pConstΔ*EcoRI* carece de la secuencia terminadora de la transcripción de 165 pb en el extremo 3' de la secuencia reportera. Usar el sitio *EcoRI* permite clonar la secuencia terminadora de la transcripción de 165 pb tanto en orientación 5'→3' como 3'→5'. Este fragmento fue obtenido del pCR Blunt II TOPO en el que previamente fue clonado (Figura 7, Panel A).

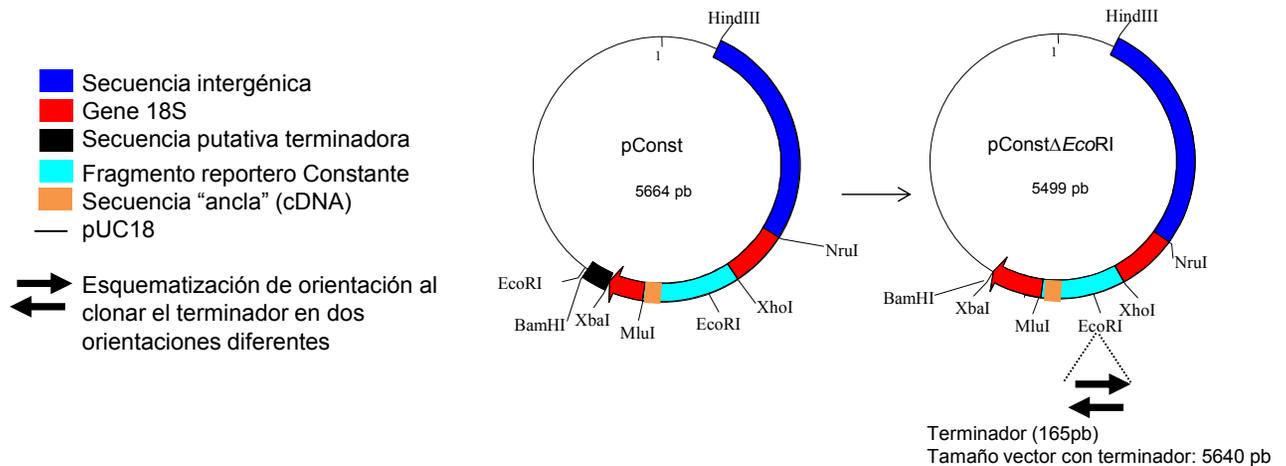


Figura 12. Generación del plásmido reportero para evaluar la actividad de la secuencia terminadora de la transcripción. En el esquema se muestran los cambios hechos en el plásmido pConst con el fin de usar el sitio *EcoRI* interno de la secuencia reportera Constante para clonar la secuencia terminadora de la transcripción. Así mismo, se eliminó el fragmento terminador clonado en los sitios *XbaI* y *BamHI*, para no tener dos secuencias terminadoras en el mismo plásmido.

Para realizar las modificaciones necesarias, se generó primero un plásmido pUC18 carente del sitio *EcoRI* y en él se clonó el fragmento *HindIII-XbaI* del plásmido pConst para generar el plásmido pConst $\Delta$ *EcoRI*. La eliminación del sitio *EcoRI* se hizo mediante la digestión con *EcoRI*, tratamiento con la DNA polimerasa I (fragmento Klenow), religación con T4 ligasa y transformación.

En la Figura 13 se muestra una serie de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, en los que se muestran los pasos para eliminar en el pUC18, del sitio múltiple de clonación, el sitio *EcoRI*. Asimismo, se muestran las modificaciones del plásmido pConst en pConst $\Delta$ *EcoRI*, en el cual se clonó la secuencia terminadora de 165 pb para obtener dos clonas, cada una con orientación distinta. Panel **A**: pUC18 y el pUC18 $\Delta$ *EcoRI* sin digerir. Panel **B**: análisis por digestión de los plásmidos pUC18 y pUC18 $\Delta$ *EcoRI*; el pUC18 $\Delta$ *EcoRI* ha perdido el sitio de restricción pero conserva su tamaño original (2686 pb). Panel **C** digestión comparativa entre los plásmidos pConst digerido con *EcoRI* (libera un fragmento de 915 pb) y pUC18 $\Delta$ *EcoRI* (5499 pb). Panel **D** fragmento de 165 pb que corresponde al terminador de la transcripción clonado en el plásmido pCR II Blunt TOPO (3519 pb) comparado con el producto de PCR amplificado de la secuencia terminadora de la transcripción. Al clonar el terminador en pCR Blunt II TOPO y escindido con *EcoRI* el fragmento gana 18 pb, dando un fragmento de 183 pb. Panel **E** perfil de digestión de varias clonas del plásmido pConst $\Delta$ *EcoRI*Ter. De estas clonas se seleccionaron dos que tuvieran la polaridad 5' a 3' y 3' a 5'.

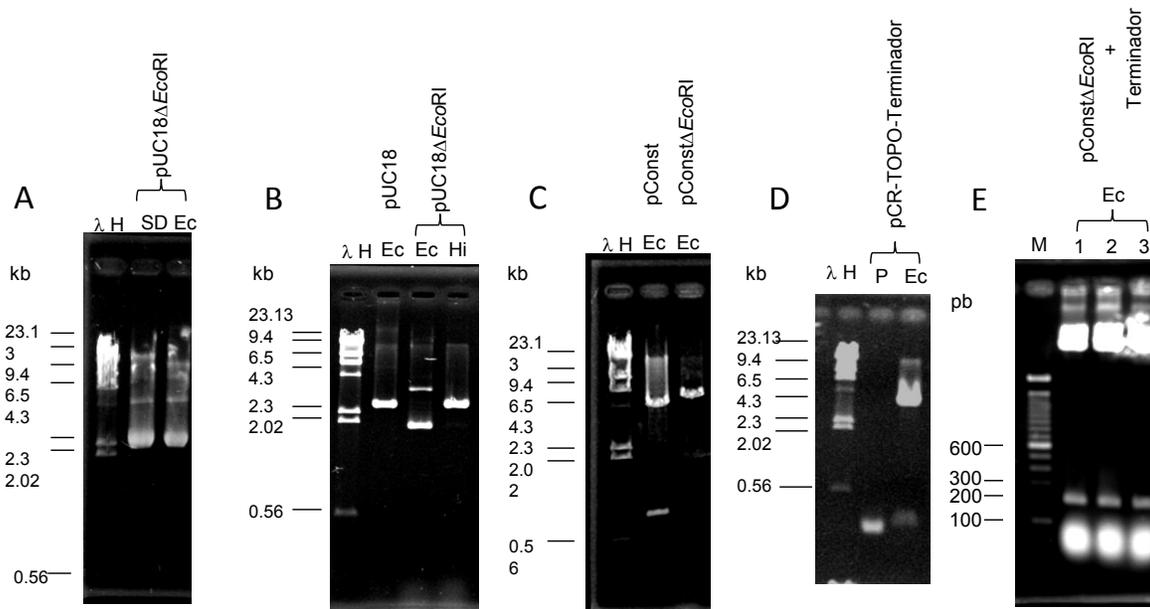


Figura 13. Generación del plásmido reportero para determinar actividad de terminador transcripcional. SD= plásmido sin digerir. Ec=Digestión con EcoRI. Hi=Digestión con HindIII. P=Producto de PCR de la secuencia terminadora de la transcripción de 165 pb sin purificar ni digerir. λH= Marcador de peso molecular: DNA de lambda digerido con *HindIII*. M= Marcador escalera de 100 pb (Invitrogen).

*Generación de los plásmidos pTer53 y pTer35.* Con la secuencia terminadora de la transcripción clonada en el plásmido pConstΔEcoRI, se seleccionaron dos construcciones: una en que la orientación de la secuencia terminadora fuera de 5' a 3', como en la secuencia natural y otra en la orientación contraria (3' a 5'), debido a que los terminadores suelen ser sensibles a la orientación (Reeder *et al*, 1997). La orientación fue determinada mediante PCR utilizando una combinación de oligonucleótidos específicos tanto para la secuencia terminadora como para el plásmido en el que fue clonada. En la Figura 14 se muestra la estrategia seguida y el resultado experimental. Panel A: se muestra un fragmento, no a escala, de lo esperado para los plásmidos pTer53 o pTer35 (Ter53= orientación 5'→3' y Ter35= orientación 3'→5'). La reacción se hizo usando el oligonucleótido CatFw que se ancla en el reportero constante en combinación con el oligonucleótido TerFw (reacción 1) o el oligonucleótido TerRv (reacción 2), en reacciones independientes (Tabla S1). El fragmento amplificado es de 377 pb. Panel B: análisis de las 2 clonas mostradas en el Panel E de la Figura 13. Se encontró que la clona 1 tiene la orientación Ter35 (3'→5') y la clona

2 la orientación Ter53 (5'→3'). Los plásmidos fueron confirmados por secuenciación automática (Figura 39).

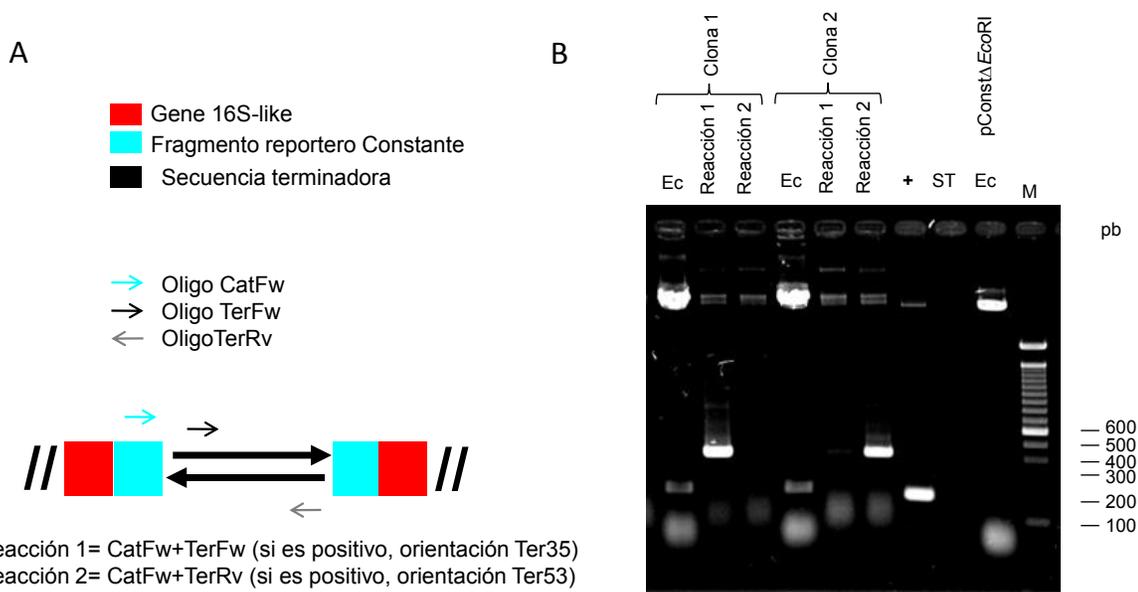


Figura 14. Generación de los plásmidos reporteros para determinar la actividad del terminador transcripcional. Estrategia y resultados de la verificación de la orientación para cada fragmento del terminador. Ec= digestión de cada clona con *EcoRI*. += Reacción hecha con los oligonucleótidos específicos del terminador (TerFw y TerRV con el plásmido pCR Blunt II TOPO Ter como plantilla). ST= control de reacción de PCR sin templado. M= marcador de 100 pb de Invitrogen.

*Generación de los plásmidos pParental min, pStem-Swap y pStem-Swap 7A's.* Las secuencias mínimas terminadoras de la transcripción que se diseñaron son muy pequeñas para poderlas amplificarlas por PCR y clonarlas (34 pb sin incluir los sitios de restricción), por lo que para clonarlas se siguió la siguiente estrategia: Por lo que para clonarlos, se sintetizaron oligonucleótidos complementarios para la secuencia deseada de cada terminador (Parental min, Stem-Swap y Stem-Swap 7A's, Tabla S1). A los oligos se les añadieron nucleótidos en los extremos para que, al ser alineados, se generaran fragmentos de doble cadena con los extremos iguales a los generados por las enzimas *XbaI* y *BamHI*. De esta manera se sustituyó el fragmento terminador de 165 pb de pTer53 con los fragmentos mínimos de terminación (Tabla S1).

Para llevar a cabo la construcción de los plásmidos con los terminadores mínimos, fue necesario crear un plásmido que contuviera el fragmento ya secuenciado de Ter53 pero que el plásmido pUC18 careciera de los sitios *EcoRI*, *XbaI* y *BamHI* del sitio múltiple de

clonación. Para ello se utilizó el plásmido pConstΔEcoRI en el cual se eliminaron los sitios *XbaI* y *BamHI* y posteriormente se reemplazó el fragmento *XhoI* y *MluI* del pConstΔEcoRI, por el fragmento obtenido con las mismas enzimas pero del plásmido pTer53, que ya se encuentra secuenciado. En la Figura 15 se muestra el esquema de estos plásmidos con las modificaciones necesarias para incorporar las secuencias terminadoras de la transcripción de 34 pb. Se muestra el plásmido pTer53ΔEΔBΔX que carece de los sitios *EcoRI*, *BamHI* y *XbaI*. La eliminación de los sitios se logró mediante la digestión consecutiva del plásmido pConstΔEcoRI con las enzimas correspondientes (*BamHI* y *XbaI*) seguida de tratamiento con la DNA polimerasa I (fragmento Klenow), a continuación se ligó con T4 ligasa y finalmente se transformó en *E. coli*. El plásmido pConstΔEΔBΔX así generado fue digerido con las enzimas *XhoI* y *MluI* para reemplazar ese fragmento con el fragmento equivalente del plásmido pTer53 para generar finalmente el plásmido pTer53ΔEΔBΔX que se muestra en la Figura 15.

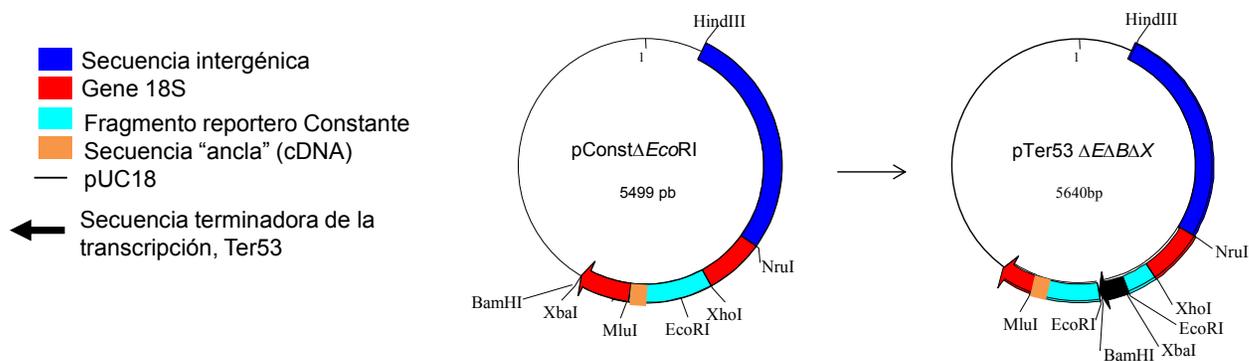


Figura 15. Mapa para generar el plásmido pTer53ΔEΔBΔX. Se removieron los sitios *BamHI* y *XbaI* del plásmido pConstΔEcoRI. Se muestran los elementos que contiene cada plásmido.

Los pasos experimentales se muestran en la Figura 16. Panel **A** eliminación los sitios *XbaI* y *BamHI* del plásmido pConstΔEcoRI para generar el plásmido pConstΔEΔBΔX. Panel **B**: fragmentos empleados para realizar el reemplazo del fragmento de la secuencia reportera del plásmido pConstΔEΔBΔX (655 pb) por el fragmento equivalente del pTer53 que incluye la secuencia terminadora de la transcripción (838 pb). Los fragmentos purificados fueron ligados para generar el plásmido pTer53ΔEΔBΔX.

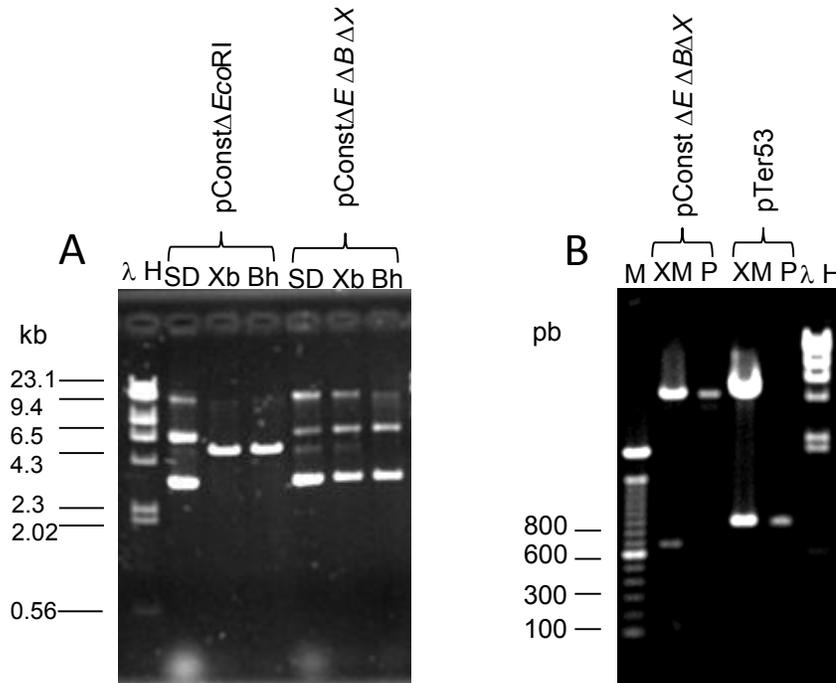


Figura 16. Generación del plásmido pConstΔEΔBΔX. SD= sin digerir. Xb= digestión con *Xba*I. Bh= digestión con *Bam*HI. XM= digestión con *Xho*I y *Mlu*I. P=fragmento purificado. λ H= DNA de lambda digerido con *Hind*III. M= marcador de 100 pb de Invitrogen.

*Generación del plásmido pTer53ΔEΔBΔX.* En la Figura 17 se muestran los resultados del análisis del pTer53ΔEΔBΔX. Se muestra la digestión con *Xba*I y *Bam*HI del pTer53ΔEΔBΔX donde se puede observar la liberación del fragmento de 165 pb de la secuencia terminadora de la transcripción y ningún otro fragmento, debido a la ausencia de los otros sitios de restricción. Se purificó el plásmido (carril P) y se usó para la clonación de las secuencias terminadoras mínimas (34 pb).

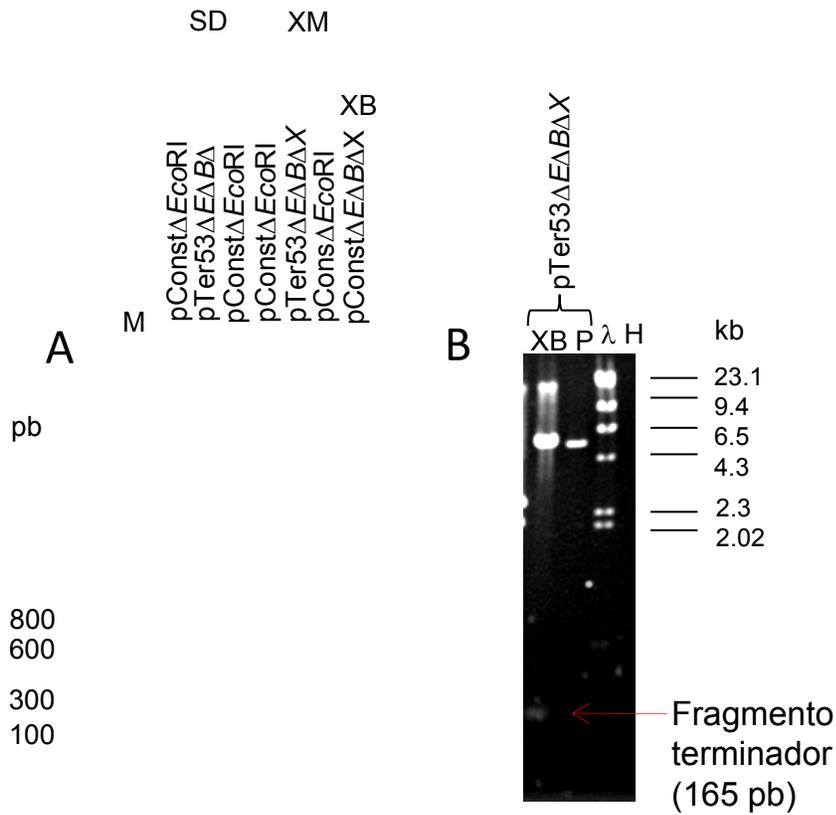


Figura 17. Análisis del plásmido pTer53ΔEΔBΔX. XM= digestión con *Xba*I y *Mlu*I. XB= digestión con *Xba*I y *Bam*HI. XM= digestión con *Xho*I y *Mlu*I. P=fragmento purificado. λ H= DNA de lambda digerido con *Hind*III. M= marcador de 100 pb de Invitrogen.

En la Figura 18 se muestra el esquema general de los plásmidos generados con las variantes de la secuencia mínima terminadora de 34 pb.

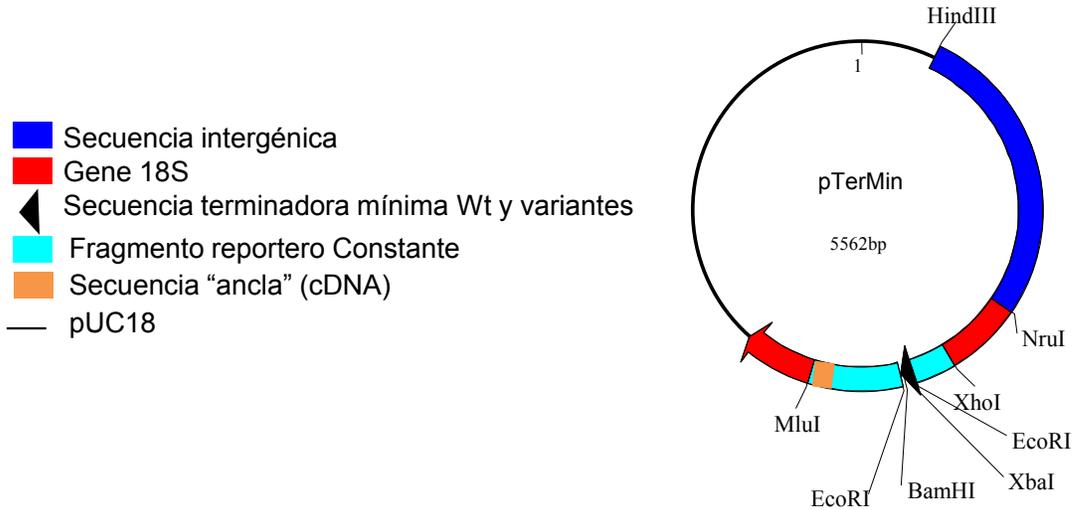


Figura 18. Generación del plásmido pTerMin. La estructura es similar para los plásmidos pParental min, pStem-Swap y pStem-Swap 7A's.

En la Figura 19 se muestra la secuencia de un fragmento (Parental min) alineado, así como las secuencias del resto de los oligonucleótidos usados para generar los fragmentos Stem-Swap y Stem-Swap 7A's.

XbaI		BamHI
T*CTAGA		G*GATCC
AGATC*T		CCTAG*G
<b>5'</b> <u>CTAGA</u>	GGATTTTTTTTCAAGTGTAAGTGTCACCTTTTATAT	<u>G</u> <b>3'</b>
	<u>T</u> CCTAAAAAAGTTCACATTCACAGTGAAAATATA	<u>CCTAG</u>
Parental min sense	CTAGAGGATTTTTTTTCAAGTGTAAGTGTCACCTTTTATATG	
Parental min comp	GATCCATATAAAAAGTGACACTTACACTTGAAAAAAATCCT	
Stem swap sense	CTAGAGGATTTTTTTTCTTCAGTAAGTGCTGAATTATATG	
Stem swap comp	GATCCATATAAATTCAGACACTTACTGAAGAAAAAAATCCT	
Stem swap 7A's sense	CTAGAGGAAAAAAACTTCAGTAAGTGCTGAATTATATG	
Stem swap 7A's comp	GATCCATATAAATTCAGACACTTACTGAAGTTTTTTTTTCT	

Figura 19. Estrategia para generar los terminadores mínimos. La secuencia de 34 nucleótidos fue delimitada por las bases del sitio *XbaI* o *BamHI* ya digeridas. En el esquema se muestran la secuencia de los dos sitios de restricción empleados, señalando con un asterisco el sitio de corte por cada enzima. Con ello se

reemplazó la secuencia Ter53 por las secuencias terminadoras de la transcripción de 34 pb en el plásmido pTer53 $\Delta$ E $\Delta$ B $\Delta$ X usando las enzimas *Xba*I y *Bam*HI.

Los oligonucleótidos se alinearon de la siguiente manera: 200 ng de cada oligonucleótido fueron incorporados a una reacción de 20  $\mu$ l totales con buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 0.1 mM), la solución se calentó en el termociclador a 94°C por 2 minutos. La reacción fue enfriada bajando 1.5°C cada 30 segundos hasta llegar a 40°C. Los oligonucleótidos alineados se transfirieron al hielo y se usaron 2  $\mu$ l en una reacción de ligación de la siguiente forma: 3  $\mu$ l de plásmido pTer53 $\Delta$ E $\Delta$ B $\Delta$ X digerido con *Xba*I y *Bam*HI (120 ng totales), 5  $\mu$ l de buffer de ligasa 2X (Promega) y 0.5  $\mu$ l de T4 ligasa (Promega). Las reacciones se incubaron a 4°C toda la noche y luego se transformó la totalidad de la ligación en *E. coli*. El éxito de la ligación depende de dos cosas: que la concentración de oligonucleótidos alineados sea baja (no más de 20 ng finales) y que el plásmido receptor esté completamente digerido. Ya que los oligonucleótidos tienen distintos sitios de restricción, se facilita la obtención de clonas con la orientación deseada. En la Figura 20 se muestra el análisis por restricción de las clonas obtenidas. Se analizaron los plásmidos usando las dos enzimas que se usaron para clonar los fragmentos, ya que se regeneraran los sitios de restricción al ligar los oligonucleótidos alineados. Se muestra como control el primer grupo de digestiones que corresponde al plásmido pTer53 $\Delta$ E $\Delta$ B $\Delta$ X como referencia parental (fragmento de 165 pb), seguido por el análisis de las tres construcciones con las secuencias terminadoras de la transcripción de 34 pb. La digestión con *Eco*RI libera el inserto ya que queda bordeado por este sitio de restricción, como se indicó para los plásmidos pTer53 y pTer35. Las digestiones sencillas con *Xba*I o *Bam*HI linearizan los plásmidos.

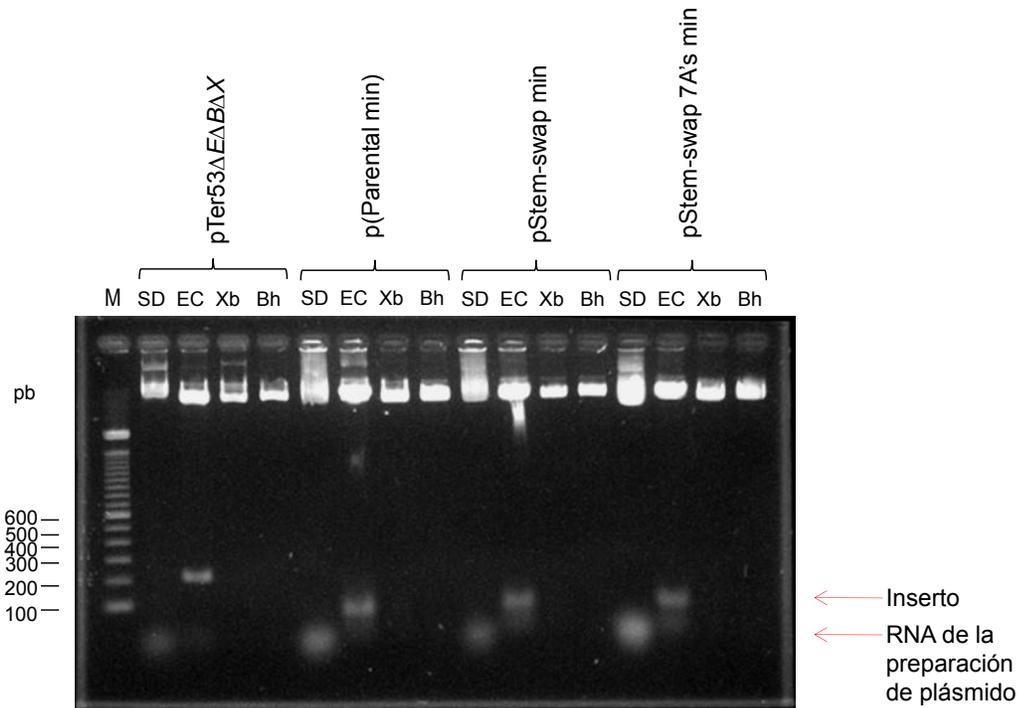


Figura 20. Generación de los plásmidos pParental min, pStem-Swap y pStem-Swap 7A's. Análisis de las clonas obtenidas. Se muestra el patrón de digestión para cada plásmido construido. SD= sin digerir. Xb= digestión con *XbaI*. Bh= digestión con *BamHI*. M= marcador de 100 pb de Invitrogen.

Para confirmar tanto la orientación como la incorporación de la secuencia correcta se hizo un análisis por PCR en el que se emplearon los oligonucleótidos que generaron las secuencias terminadoras de 34 pb. Para ello se usó la estrategia que se muestra en la Figura 21. El oligonucleótido sentido específico para cada terminador mínimo se usó junto con el oligonucleótido reverso, complementario al reportero Constante (oligonucleótido RvCAT RT-PCR, Tabla S1). Se muestra un control con el oligonucleótido delantero del terminador Ter53 (FwTer, Tabla S1) y el oligonucleótido RvCAT RT-PCR, en cuyo caso amplificaría un producto de mayor tamaño usando como plantilla el plásmido pTer53, de 445 pb, en contraste con los terminadores mínimos (313 pb en cada caso). Se muestra el PCR para cada caso. Todas estas clonas fueron positivas, por lo que se confirmaron por secuenciación (ver **Resultados**).

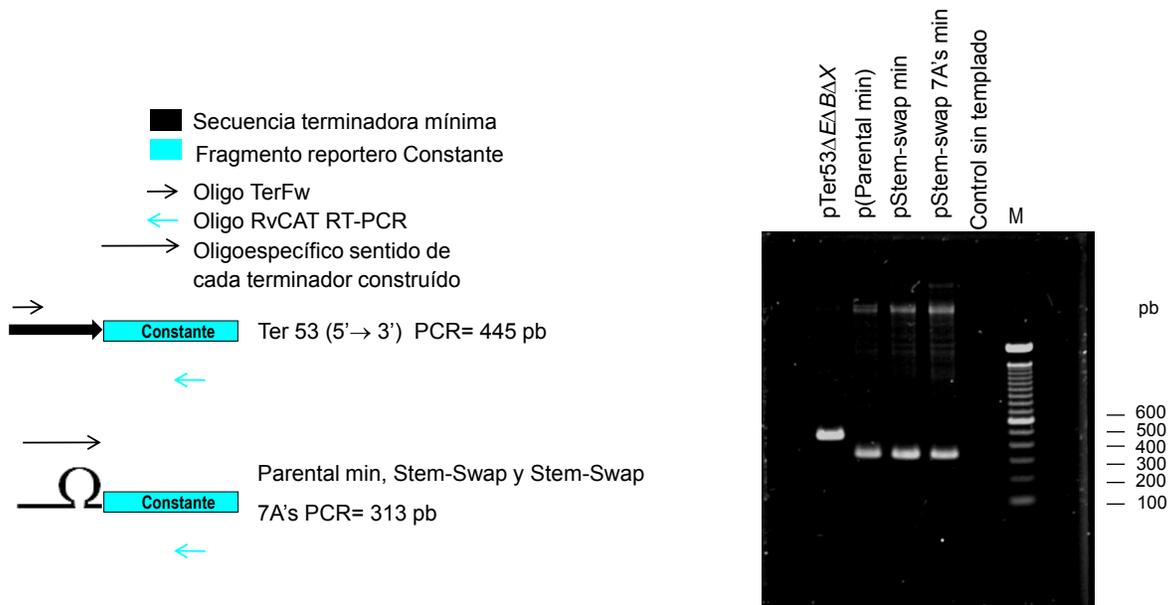


Figura 21. Generación de los plásmidos p(Parental min), pStem-swap min y pStem-swap 7A's min. Análisis de las clonas obtenidas por PCR para determinar la orientación y que se haya incorporado la secuencia correcta de cada construcción mínima. Se utilizó como control el PCR con la construcción del Ter53.

*Transfecciones.* Los estudios realizados en el presente trabajo fueron hechos mediante transfección transitoria de *T. vaginalis* con plásmidos circulares. Para ello se siguió el protocolo previamente establecido en el laboratorio y ya reportado (Delgadillo *et al*, 1997). El método es el siguiente: Los parásitos fueron crecidos en medio de cultivo TYM, adicionado con suero de caballo inactivado por calor al 10%, en cajas Corning de 75 cm<sup>2</sup>. Se usaron los parásitos a una densidad de 1.5X10<sup>6</sup> células por mililitro. Para cada transfección se utilizaron 2.4X10<sup>8</sup> células en un volumen final de 400 μl de solución de lavado (solución Zimmerman: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, NaCl 132 mM, KCl 8 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, Mg(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 0.5 mM y Ca(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 90 μM), mantenida a 4°C. Para alcanzar esa densidad celular, se colectaron las células por raspado de las cajas de cultivo en un frasco de vidrio frío (4°C) y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. El total de células se determinó por conteo de parásitos usando un hemocitómetro. A partir del volumen total de células, se calculó la densidad final celular. Las células se lavaron dos veces en solución Zimmerman (20 ml por vez), cada lavado se hizo resuspendiendo los paquetes celulares y volviendo a centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron suavemente evitando hacer espuma. Una vez lavadas se resuspendieron a la densidad

deseada ( $2.4 \times 10^8$  células en un volumen final de 400  $\mu$ l de solución Zimmerman), se incubaron durante 5 minutos con el (o los) plásmidos a transfectar (se utilizaron 50  $\mu$ g de plásmido cada plásmido por transfección) ajustando el volumen final a 50  $\mu$ l de solución (el volumen total se ajustó con agua estéril) o bien se añadieron 50  $\mu$ l de agua estéril en el caso de la transfección Mock. Los parásitos incubados con los plásmidos fueron transferidos a celdas de electroporación BTX frías y fueron transfectados con las siguientes condiciones: 360 V, 13  $\Omega$  y 1500  $\mu$ F, usando un electroporador BTX. Para el análisis del promotor ribosomal, se hizo una cotransfección entre el plásmido pConst (como control interno) y pVar que es el plásmido de prueba tanto de delecciones como de mutaciones. En el caso del estudio de los terminadores, solamente se transfectó el plásmido de prueba para cada construcción, ya que se hizo el control interno mediante la síntesis de cDNA y análisis por PCR de la secuencia previa a la secuencia terminadora. (Figura 38)

Las células después de transfectadas fueron recuperadas en 30 ml de medio TYM con 10% de suero de caballo inactivado por calor durante 22 horas a 37 °C. Pasado este tiempo de recuperación, las células fueron recuperadas por centrifugación a 3000 rpm. Los paquetes celulares fueron lavados en PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y el RNA total fue extraído usando el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo al protocolo siguiente:

- 1.- Colectar en un tubo de 50 ml nuevo el cultivo electroporado. Centrifugar a 3,000 rpm durante 10 min. a 4°C.
- 2.- Se tira el sobrenadante y se resuspende cada pellet con 1ml de PBS/DEPC estéril y transferir a un tubo eppendorf de 1.5 ml, centrifugar 1 min. a 4°C.
- 3.- Desechar la solución de lavado y resuspender en 1 ml de Trizol (Invitrogen) y lisar las células por pipeteo repetitivo.
- 4.- Incubar la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir una disociación completa de complejos nucleoproteicos.
- 5.- Agregar 0.2 ml de cloroformo y mezclar por medio de inversión durante 15 segundos e incubar a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos. Centrifugar las muestras a 14,000 rpm, (12,000 xg), durante 15 minutos a 4°C.
- 6.- Trasferir la fase acuosa (superior sin color, ~0.5 ml de Trizol) donde se encuentra el RNA a un tubo limpio y precipitar con 0.5 ml de alcohol isopropílico.

7.- Incubar la muestra a temperatura ambiente durante 10 min.

8.- Centrifugar a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

NOTA: El precipitado de RNA frecuentemente forma un botón transparente parecido a un gel.

9.- Quitar el sobrenadante. Lavar el botón de RNA con 1 ml de etanol al 75% en AGUA DEPC (agua bidestilada tratada con DEPC).

10.- Mezclar la muestra en vortex y centrifugar a no más de 10,000 rpm, (7,500 xg), durante 5 minutos a 4°C.

11.- Secar el botón de RNA. Disolver el RNA en 10µl AGUA/DEPC, y almacenar a -80 °C.

Se verificó la integridad del RNA en todos los casos mediante electroforesis de geles de agarosa desnaturalizantes. En la Figura 22 se muestran geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio representativos de algunas de las transfecciones hechas con todas las construcciones probadas en el presente trabajo. La imagen está compuesta de geles realizados en distintos días que corrieron durante tiempos diferentes, pero son muestras ilustrativas del RNA empleado y su integridad. En cada caso se corrieron de 1 a 5 µg de RNA. Se muestra el RNA de una transfección en cada caso. Mock se refiere a la transfección hecha únicamente con el vehículo en el que se solubilizan los plásmidos (agua en todos los experimentos). +INT se refiere a la transfección en la que los dos plásmidos contienen la región intergénica completa (pConst y pVar) y -INT se refiere a la transfección en la que el plásmido con la secuencia reportera Variable no tiene la región intergénica [pVar(-Int)], pero el reportero con la secuencia Constante tiene la región intergénica completa. Se muestra el RNA proveniente de las transfecciones hechas con los plásmidos que contienen las deleciones en el promotor ribosomal, mutaciones en el TSP o en el UCE putativo (Box1, 2 y 1-2) así como las transfecciones de las diferentes construcciones de las secuencias terminadoras de la transcripción, tanto de 165 pb como las de 34 pb.

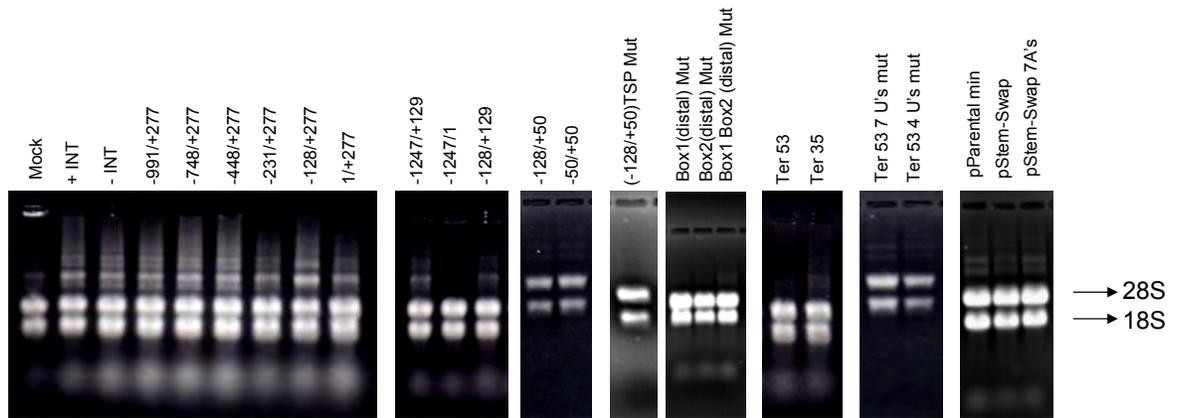


Figura 22. Perfil de RNA total obtenido de las transfecciones transitorias hechas con todas las construcciones analizadas en el presente trabajo.

*Análisis transcripcional.* Una vez obtenido el RNA total de cada transfección, se determinaron los niveles de expresión de las secuencias reporteras mediante RT-PCR semicuantitativo. Primero se sintetizó el cDNA a partir de 1  $\mu$ g de RNA total (en todos los casos). El RNA se incubó con los oligonucleótidos para sintetizar cDNA, en el caso del los estudios del promotor ribosomal, se utilizó el oligonucleótido cDNAclt (Tabla S1), que es complementario a la secuencia ancla de cada plásmido. En el caso del estudio de los terminadores se empelaron simultáneamente los oligonucleótidos cDNAclt para analizar si había transcripción después de la secuencia terminadora y el oligonucleótido RvCATRT-PCR2 (Tabla S1) para generar el control interno, es decir anclándose antes de la secuencia terminadora de la transcripción. Si la secuencia terminadora de la transcripción es funcional, la transcripción no alcanzaría a transcribir la secuencia ancla, por ello el control previo a la secuencia terminadora de la transcripción es fundamental. Cada reacción de síntesis de cDNA fue hecha de la siguiente manera: 1  $\mu$ g de RNA total, 1X first strand buffer para SuperScript III (Invitrogen), 1 mM dNTP's, 100 ng de cada oligonucleótido, mezclar bien. La reacción se calentó a 65°C por 5 minutos y después fue transferida a hielo por 1 minuto. A cada reacción se le añadió DTT a una concentración final de 10 mM y 100 U de transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen). Las reacciones fueron incubadas a 42°C por 15 minutos y luego a 50°C por 30 minutos. Las reacciones fueron detenidas incubando a 70°C por 15 minutos. Se centrifugaron brevemente las reacciones, se les añadió 1 U de RNAsa H (Invitrogen) y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Se hicieron controles idénticos pero a los que no se les añadió transcriptasa reversa ni RNAsa H

(controles –RT). Si estos controles no presentan amplificación, validan entonces que las bandas amplificadas usando de plantilla cDNA son amplificadas a partir de transcritos y no de DNA contaminante.

Para eliminar el problema de incubar el RNA con DNAsa I y no tener amplificación debida a la presencia de DNA por los plásmidos transfectados, tanto para las reacciones con transcriptasa reversa como los controles sin ella (-RT) el cDNA fue digerido con dos enzimas de restricción (*EcoRI* y *HhaI*) que cortan entre los sitios de anclaje de los oligonucleótidos empleados para el análisis por PCR. El cDNA es de cadena sencilla y por lo tanto las enzimas de restricción no son capaces de digerirlo, pero el DNA de los plásmidos sí; de esta manera se elimina la posible contaminación de DNA. Las digestiones se hicieron en un solo paso, diluyendo la reacción de síntesis de cDNA 2 veces en buffer 1X de reacción para las enzimas de restricción (React 2, Invitrogen) y se usaron 2.5 U de cada enzima. Las reacciones se incubaron toda la noche a 37°C, luego se extrajeron una vez con fenol-cloroformo (1:1 v/v) y se precipitaron con 1 volumen de isopropanol y 1/10 de volumen de acetato de sodio, en presencia de tRNA de levadura como acarreador. Se resuspendieron en 10 µl de agua y se usó 1 µl de cDNA ya purificado como templado por reacción de PCR.

Para demostrar que no se trata de un artefacto durante la transfección y que los dos plásmidos fueron co-transfectados, se utilizó 1 µg de RNA total aislado de cada uno de los experimentos de transfección anteriores y se analizó en un ensayo de PCR multiplex para los dos amplicones de cada reportero (el Constante de 513 pb y el Variable de 380 pb). En todos los casos, se pudo amplificar ambas secuencias reporteras, por lo que las diferencias que se observan en los ensayos transcripcionales no se deben a diferencias en la eficiencia de transfección entre los plásmidos (datos no mostrados).

*PCR.* Los productos de transcripción fueron analizados por PCR multiplex para el estudio del promotor ribosomal y amplificación de producto único para el análisis de la secuencia terminadora de la transcripción. Cada reacción de PCR fue hecha en 20 µl de volumen final en las cuales se empleó 1X reaction buffer (*Pfx*, Invitrogen), 1X enhancer solution (*Pfx*, Invitrogen), 1 mM dNTP's, 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 ng de cada oligonucleótido, 0.625 U de polimerasa termoestable *Pfx* (Invitrogen) y 1 µl de cDNA como plantilla. Se

usó el siguiente programa para el termociclador: 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 30 segundos y 68°C por 30 segundos, con un paso final de 68°C por 10 minutos y finalizando a 4°C. El programa del termociclador fue el mismo para todos los análisis transcripcionales hechos, así como el PCR control para confirmar que en todos los casos ambos plásmidos hubieran sido transfectados, confirmación muy importante en el caso que las mutaciones o deleciones tuvieran un efecto sobre la actividad del promotor, dato mostrado en la sección de **Resultados**. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2% usando TAE como amortiguador de corrida y teñidos con bromuro de etidio. En la Tabla S1 se muestran los oligonucleótidos empleados para el presente estudio, tanto los usados en las construcciones como aquellos usados en los análisis transcripcionales.

*Confirmación de los productos de PCR por Southern blot.* Los productos de PCR se analizaron por Southern blot usando como sonda los fragmentos clonados y confirmados por secuenciación de cada secuencia reportera (ya sea la Variable por un lado o la Constante por otro). El método empleado fue el siguiente:

I. Preparación y corrida del gel para transferir.

1.- Preparar el gel al 2% en buffer TAE 1X. Gel: 11 X 14 cms; grosor aprox. 6 mm.

2.- Correr el gel a 80 volts hasta que el azul de bromofenol haya migrado 3/4 partes.

3.- Utilizar como marcador de peso molecular la escalera de 100 pares de bases de Invitrogen.

4.- Teñir el gel con Bromuro de Etidio por 20 minutos. (Stock 1000 X: 10 mg/ml), y después lavar el gel 10 min en agua destilada.

5.- Tomar fotografía, asegurándose de poner una regla para después estimar el peso de cada una de las bandas del gel.

6.- Cortar el exceso del gel. Hacer una muesca en la parte superior derecha del gel para saber la orientación (importante), pero cuidando de no exponer demasiado el gel a la luz UV.

7.- Transferir a un recipiente apropiado para los pasos de depurinización, desnaturalización y neutralización que se describen a continuación (un pyrex cuadrado es apropiado).

## II. Tratamiento del gel para la transferencia.

1.- Incubar el gel en 250 ml de HCl 0.25N (10.4 ml de HCl concentrado en 500 ml de agua), durante 7 minutos. Mover muy suavemente la charola para mezclar. Descartar la solución y repetir.

2.- Incubar el gel en 250 ml de solución desnaturalizante (43.83 g de NaCl, 25 ml NaOH 10N en un volumen final de 500ml) durante 15 min. Descartar la solución y repetir.

3.- Incubar el gel en 250 ml de solución de neutralización (125 ml de Tris/HCl 2M pH=7.5, 87.66 g de NaCl, en un volumen final de 500ml), durante 30 minutos. Descartar la solución y repetir.

## III. Transferencia del DNA a una membrana de nylon.

Solución de transferencia: 1M NH<sub>4</sub>Ac, 1M NH<sub>4</sub>OH, 0.02N NaOH.

Se prepara de la siguiente manera:

57.5 ml de ácido acético 17.4 M (stock).

140.8 ml de hidróxido de amonio 7.1M (stock).

2 ml de NaOH 10 N

Aforar a 1 lt con agua bidestilada.

Preparar la transferencia en la campana de extracción.

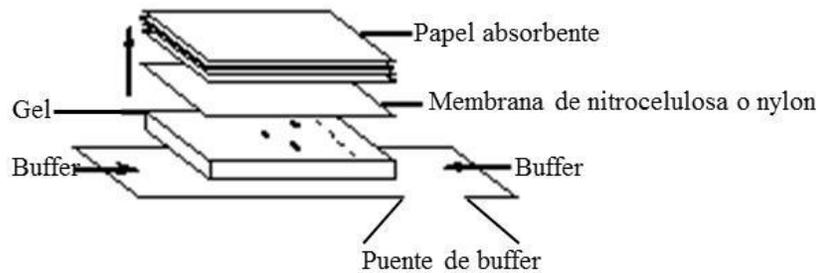
Para la transferencia de un gel de 11X14cm se requiere de:

1 papel whattman de 23X11cm

2 papeles whattman de 11X14 cm

1 membrana de nylon de Z-probe de 14.2X11.2cm

Transferir a membrana Zeta probe GT (Bio Rad), durante toda la noche de la siguiente manera, el gel debe quedar con los pozos viendo hacia el puente de buffer (papel whattman de 23X11 cm):



Después de la transferencia, se marcan con tinta y lápiz los pozos del gel en la membrana, y se corta la esquina correspondiente que ha sido marcada en el gel. La membrana se lava con agitación suave en SSC 2X durante 10 minutos, luego se seca al aire entre 40 min y 1 hora.

Fijar el DNA en la membrana de nylon por medio de crosslinker con luz UV a 1200 joules.

#### IV. Marcaje de sonda radiactiva.

1. Diluir el DNA a ser marcado a una concentración 50 ng en 45  $\mu$ L (final) de Tris-HCl pH=8 10 mM/EDTA 1mM (Buffer T.E)
2. Desnaturalizar la muestra de DNA por calentamiento a 95-100°C por 5 minutos en baño de agua.
3. Transcurrido el tiempo, pasar las muestras a hielo durante 5 min. Es recomendable que sea hielo/agua.
4. Centrifugar unos segundos para mantener la reacción al fondo del tubo.
5. Añadir el contenido del tubo (45  $\mu$ L) al tubo de reacción (Kit de marcado, Rediprime II, GE-Amersham). **NO MEZCLAR EN ESTE PASO.**
6. Añadir 2  $\mu$ L [<sup>32</sup>P]dCTP (~10  $\mu$ Ci) y mezclar por medio de pipeteo lento de 5 a 10 veces. (La solución puede cambiar a morado o violeta cuando el pellet azul liofilizado se ha disuelto y mezclado por completo con la radiactividad).
7. Incubar 2 h a temperatura ambiente.
8. Transcurrido el tiempo, el protocolo del Kit indica detener la reacción con 5  $\mu$ L de EDTA 0.2M, pero también se puede hacer de la siguiente forma para eliminar los nucleótidos no incorporados:
  - Añadir 2  $\mu$ L tRNA (5  $\mu$ g/  $\mu$ L)
  - 1/10 parte de Acetato de Sodio 3M (5  $\mu$ L)

- 2.5 partes de Etanol absoluto (125  $\mu$ L)
- Dejar toda la noche precipitando a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Desnaturalización de la Sonda

9. Centrifugar 10 min. a velocidad máxima. Descartar el sobrenadante y resuspender en 100  $\mu$ L de TE.

10. Desnaturalizar el DNA marcado por adición de 1/10 vol de NaOH 3N (10  $\mu$ L) e incubar 5 min. a temperatura ambiente.

11. Añadir 10  $\mu$ L de HCl 3N (para neutralizar) y 10  $\mu$ L de Tris 1M pH=7.4 (para amortiguar). Incubar 5 min. a temperatura ambiente.

12. Añadir la sonda radiactiva a la solución de hibridación (ver sección V), mezclar y poner a hibridar con los filtros.

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

Después fijar el DNA, la membrana se prehibridiza durante por lo menos 1 hora en 15 ml (ajustar de acuerdo al tamaño del filtro) de solución de hibridación, a la temperatura apropiada ( $42^{\circ}\text{C}$  para sondas homólogas).

Solución de hibridación:

[Final]:	[stock]:	15 ml.
Formamida 50%	100%	7.5 ml
SSC 5X	20X SSC	3.75 ml
Tris 50 mM pH7.4	1M	0.75 ml
Denhardt's 5X	50X Denh.	1.5 ml
SDS 1%	SDS 10%	1.5 ml

Una vez hibridada la sonda con la membrana, se lavó con una solución 2XSSC y 0.5% SDS a  $42^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos y luego 1 hora con 0.2XSSC y 0.5% SDS a  $42^{\circ}\text{C}$ . Una vez terminados los lavados, se expuso la membrana a una película de autoradiografía.

*Protocolo de transformación de E. coli.* El método que se empleó para todas las transformaciones fue el siguiente (tomado de Inoue *et al*, 1990):

Soluciones requeridas:  
-Medio líquido LB

- Cajas con LB
- DMSO al 100% estéril
- Buffer TB.

Buffer TB, 100 mL:

Pipes-----0.30 g  
CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O----0.22 g  
KCl-----1.86 g

Ajustar el pH a 6.7 con KOH, adicionar:

MnCl<sub>2</sub>-----1.09 g  
y filtrar para esterilizar.

Método:

1. Día 1. Poner un pre-cultivo de la cepa de *E. coli* a transformar en 4 ml de LB (con el antibiótico correspondiente si es que es necesario), crecer toda la noche a 37°C.
2. Día 2. Inocular, por duplicado, 20 ml de LB con 1/100 de volumen de las células anteriores (200 µl). Los cultivos se colocan en 2 matraces de 250 ml, y se crecen a temperatura ambiente con agitación constante hasta que alcancen una O.D.600 0.6 aproximada.
3. Día 3. Cuando el cultivo llegue a la O.D. indicada, colocar los matraces en hielo por 10 min.
4. Transferir los cultivos a tubos para centrifuga de 50 ml fríos y centrifugar a 3000 rpm a una temperatura de 4°C por 10 min.
5. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet formado en 6.4 ml de Buffer TB.

Es importante que cuando se resuspenda el pellet hacerlo de manera suave, sin hacer espuma y regresar los tubos al hielo por momentos para evitar el cambio de temperatura.

6. Colocar los tubos en hielo por 10 min.
7. Centrifugar a 3000 rpm a una temperatura de 4°C por 10 min.
8. Desechar el sobrenadante y resuspender suavemente en 1.6 ml de TB, una vez resuspendido completamente adicionarle 112 µL de DMSO (DMSO 7% concentración final)

Es importante que cuando se resuspenda el pellet hacerlo de manera suave, sin hacer espuma y regresar los tubos al hielo por momentos para evitar el cambio de temperatura.

9. Juntar las células de ambos tubos y mezclar.
10. Repartir rápidamente alícuotas de 100  $\mu$ L de células en tubos de 1.5 ml, e ir colocando los tubos en hielo.

Este paso se debe de realizar rápidamente. Se pueden enfriar, a 4°C, los tubos de 1.5 ml antes de colocar las células. Para evitar calentar el tubo con la mano, procurar no tomarlo del fondo donde serán colocadas las células.

11. Congelar los tubos con las células competentes en nitrógeno líquido, se pueden ir colocando en un recipiente con hielo, y guardarlos rápidamente a -70°C.

Transformación:

1. Descongelar lentamente las células en hielo.
2. Añadir el producto de la ligación sin pipetear.
3. Colocar el tubo en hielo por 30 min.
4. Dar un choque térmico a 42°C por 30 seg.
5. Regresar el tubo al hielo.
6. Adicionar 1 mL de LB.
7. Recuperar las células a 37°C por 1 hora.
8. Sembrar en medio LB con 1.5% de agar y los antibióticos apropiados.

*Construcción del plásmido para expresar TBP de T. vaginalis.* Para producir la TBP con número de acceso TVAG\_291560 se siguieron los siguientes pasos: Se amplificó el marco de lectura abierto a partir de DNA genómico (aislado previamente y donado amablemente por la Dra. Ana Lilia Torres Machorro). Para ello se diseñaron dos oligonucleótidos, TBP30Fw y TBP30Rv (Tabla S1) para amplificarlo por PCR; estos oligonucleótidos tienen los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III respectivamente, apropiados para poder clonarlo en el plásmido de expresión pQE30 (QIAGEN). En la Figura 23 se muestra el mapa de la construcción que se hizo en el plásmido pQE30 (QIAGEN).

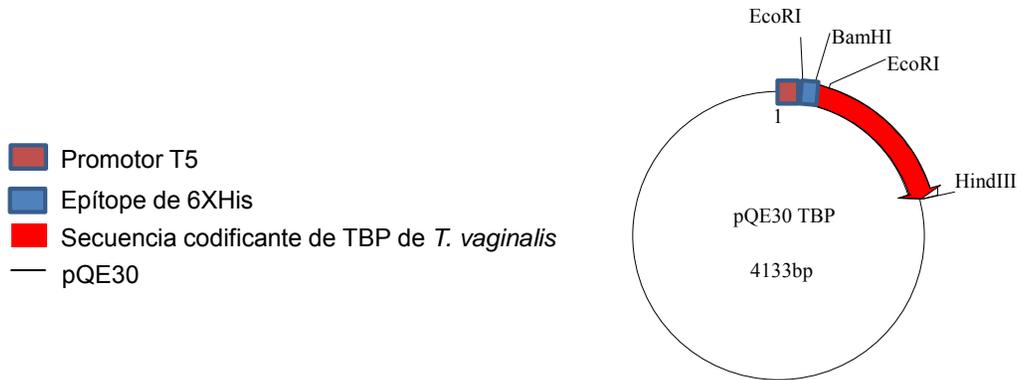


Figura 23. Mapa del plásmido pQE30 TBP construido mediante la amplificación del marco abierto de lectura completo de la TBP de *T. vaginalis* a partir de DNA total. Se usaron los oligonucleótidos TBP30Fw y TBP30Rv.

En la Figura 24 se muestran los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio de los pasos seguidos para obtener el plásmido pQE30 TBP. Panel A muestra el producto de amplificación por PCR del marco de lectura completo de TBP (714 pb). Panel B muestra la digestión del plásmido pCR Blunt II TOPO TBP digerido con *EcoRI* o con *BamHI-HindIII*. Se muestra también la digestión del plásmido pQE30 TBP con *BamHI* y *HindIII*, que son las enzimas con las que se hizo la clonación final en el plásmido pQE30.

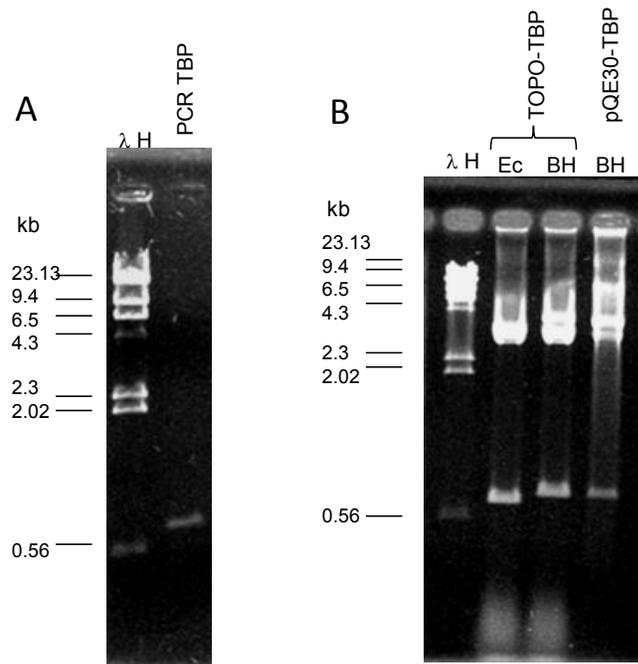


Figura 24. Pasos para la construcción del plásmido pQE30 TBP. λH= Marcador de peso molecular, DNA de lambda digerido con *Hind*III. Ec= digestión con *Eco*RI. BH= digestión con *Bam*HI y *Hind*III.

El plásmido se confirmó por secuenciación automática utilizando los oligonucleótidos comerciales para secuenciar la región promotora del plásmido, así como el extremo 3'. En la Figura 25 se muestra el inicio de la transcripción y de la traducción del plásmido pQE30 TBP. Se cuenta con la secuencia completa del marco de lectura, pero solamente se muestra la primera parte para confirmar que se encuentra en fase el producto de PCR de TBP clonado y que la traducción de la proteína es correcta a partir del codón de inicio del plásmido. En esta clona se encuentran dos cambios respecto a la secuencia depositada en el genoma pero son silenciosos (TrichDB, 2012).

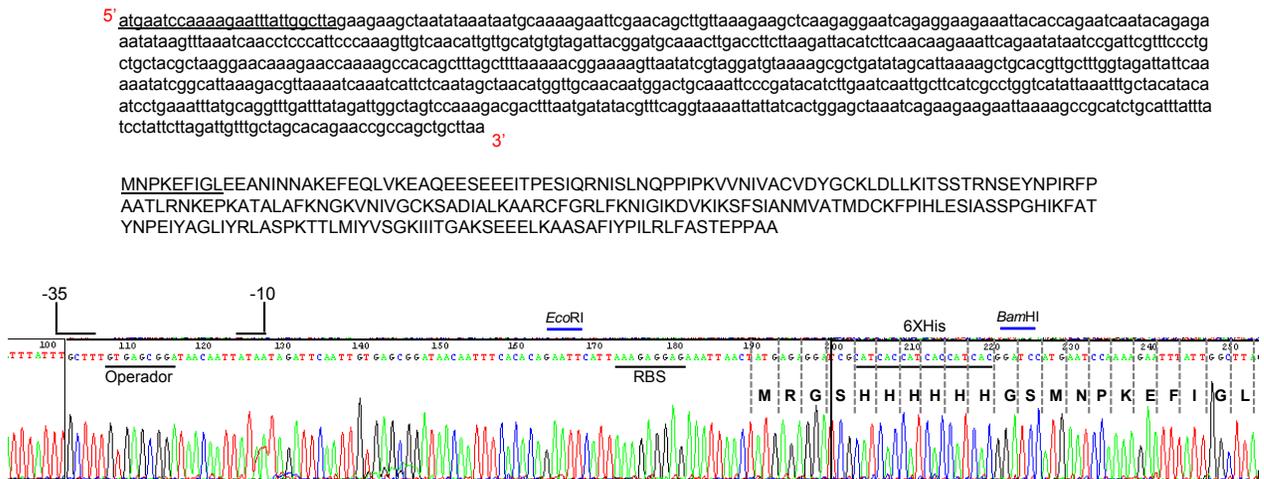


Figura 25. Secuenciación del plásmido pQE30 TBP. Panel superior: muestra las secuencias depositadas en la base de datos del genoma de *T. vaginalis* tanto en nucleótidos como en aminoácidos. Panel inferior: muestra el electroferograma de la secuencia del plásmido pQE30 TBP, destacando las secuencias más importantes: El promotor del plásmido con su operador (-35 y -10), el sitio de unión a ribosomas (Ribosom Binding Sequence o RBS) y el epítipo de 6 histidinas (6XHis) y los aminoácidos adicionales que añade el plásmido a la proteína recombinante. Se muestra como queda en fase marcando los tripletes con líneas verticales punteadas. Peso molecular teórico de la proteína tomando en cuenta los aminoácidos adicionales que añade el plásmido y el epítipo de 6XHis: 26.7 kDa.

Una vez obtenido el plásmido de expresión pQE30 con la secuencia de TBP clonada en fase, se transformó en la cepa M15/pREP4 y BL21 (rosseta) para iniciar los experimentos de inducción de la expresión de la proteína recombinante. Para hacer la inducción de la proteína recombinante se crecieron las cepas sin transformar (como control negativo) y transformadas con el plásmido pQE30 TBP en medio LB. Se dejaron crecer a

una OD<sub>600</sub> de ~0.8 y se indujo con 1mM de IPTG (concentración final) durante 5 horas. La proteína esperada es de 26.7 kDa, tomando en cuenta el epítoto de seis histidinas y los aminoácidos adicionales que añade el plásmido de expresión.

*Análisis de la expresión de TBP.* El cDNA se sintetizó con el oligonucleótido AP (Tabla S1) que contiene una porción de poliT (complementaria a la cola de poliA de los mRNAs maduros y una secuencia constante). Para el análisis por RT-PCR se empleó el oligonucleótido AUAPB que es complementario a la secuencia constante en el oligonucleótido de poli T (AP) en combinación con el oligonucleótido TBPFw.

*Modelos estructurales de las proteínas.* Los modelos de estructura terciara de proteínas presentados en el presente trabajo, fueron realizados con el programa en línea Phyre2, cuyo sitio Web es el siguiente: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> (Kelley *et al*, 2009). Se utilizaron los parámetros predeterminados para encontrar los moldes que mejor que ajustaran a la secuencia de aminoácidos de las proteínas para los cuales se buscaban sus modelos estructurales.

*Alineamiento de secuencia y otras herramientas usadas.* Para el análisis de secuencias se emplearon algunas herramientas adicionales, como fue el PRALINE para el alineamiento y ClustalW para el generar cladogramas, cuyos sitios Web son los siguientes: <http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/> y [http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web\\_clustalw2/toolform.ebi](http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustalw2/toolform.ebi), respectivamente. También se empleó el programa TCOFFE cuyo sitio Web es: [http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee\\_cgi/index.cgi?stage1=1&daction=TCOFFEE::Regular](http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi?stage1=1&daction=TCOFFEE::Regular).

A continuación se presenta la Tabla 4 que contiene una descripción breve de todos los plásmidos utilizados en el presente estudio, en el Anexo 1 se muestra la Tabla S2 en la que se enumeran los plásmidos empleados en el presente estudio, pero además los nombres que se usaron de rutina y posiciones en el respaldo a -80° C.

Tabla 3. Plásmidos finales empelados en el presente trabajo.

Nombre	Características*
pUC18	Plásmido de clonación comercial (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc, Canada).
P921	Plásmido que contiene el fragmento <i>EcoRI</i> del cistrón ribosomal de <i>T. vaginalis</i> (López-Villaseñor <i>et al.</i> , 2004).
pConst	pUC18 que contiene el fragmento <i>HindIII</i> y <i>XbaI</i> obtenido del p921 y que comprende la región intergénica (excepto las 165 bp que corresponden a la secuencia terminadora) y un fragmento casi completo del gene 18S. Incluye un reportero transcripcional que comprende un fragmento de la secuencia codificante del gene <i>cat</i> y una secuencia ancla para la síntesis de cDNA y estos elementos reemplazan un fragmento <i>XhoI</i> y <i>MluI</i> del gene 18S. Incluye también en el extremo 3' del gene 18S-like la secuencia de 165 bp terminadora, clonada como <i>XbaI</i> and <i>BamHI</i> .
pVar	Similar al plásmido pConst, pero el fragmento <i>XhoI</i> y <i>MluI</i> del gene 18S fue reemplazado con un fragmento de la secuencia codificante del gene <i>gfp</i> . En este plásmido es en el que se hicieron todas las deleciones y mutaciones para el análisis del promotor ribosomal de <i>T. vaginalis</i> .
p(-991/+277)	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 5' generando el fragmento -991/+277 relativo al TSP
p(-748/+277)	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 5' generando el fragmento -748/+277 relativo al TSP
p(-448/+277)	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 5' generando el fragmento -448/+277 relativo al TSP
p(-231/+277)	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 5' generando el fragmento -231/+277 relativo al TSP
p(-128/+277)	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 5' generando el fragmento -128/+277 relativo al TSP
p(+1/+277)	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 5' generando el fragmento 1/+277 relativo al TSP
p(-1247/+129)	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 3' generando el fragmento -1247/+129 relativo al TSP
p(-1247/+1)	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 3' generando el fragmento -1247/+1 relativo al TSP
p(-128/+129)	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+129 relativo al TSP
p(-128/+50)	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP
p(-50/+50)	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -50/+50 relativo al TSP
p(-128/+50) TSP mut	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP y 3 cambios en la región del TSP, TGG→GTT, la base subrayada se refiere a la posición +1.
pBox1(distal) mut	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP y 3 cambios en la región del UCE putativo en la caja Box1-a, TTTGCTC cambiado por TGTACGC.
pBox2(distal) mut	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP y 3 cambios en la región del UCE putativo en la caja Box2-a, CGAAAAA cambiado por CTACACA.
pBox1-2(distal) mut	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP y 3 cambios en la región del UCE putativo, doble mutante en Box1-a y Box2-a.
pVar(-INT)	Derivado del plásmido pVar pero con deleción completa de la región intergénica mediante digestión con <i>HindIII</i> y <i>NruI</i> y relleno con DNA polymerase I (fragmento Klenow).
pConst $\Delta$ <i>EcoRI</i>	Derivado del pConst excepto que carece de la secuencia terminadora en el extremo 3' del gene 18S y el sitio de restricción <i>EcoRI</i> del plásmido para así clonar en el fragmento del gene <i>cat</i> la secuencia terminadora.
pTer53	Derivado del pConst $\Delta$ <i>EcoRI</i> pero con la secuencia terminadora clonada en el gene <i>cat</i> (Secuencia reportera Constante) en el sitio <i>EcoRI</i> en la orientación 5' a 3'. La secuencia terminadora se obtuvo del plásmido en el que el producto de PCR se clonó previamente pCR Blunt II TOPO.
pTer35	Derivado del pConst $\Delta$ <i>EcoRI</i> pero con la secuencia terminadora clonada en el gene <i>cat</i> (Secuencia reportera Constante) en el sitio <i>EcoRI</i> en la orientación 3' a 5'. La secuencia terminadora se obtuvo del plásmido en el que el producto de PCR se clonó previamente pCR Blunt II TOPO.
pTer53-7U's mut	Derivado del pConst $\Delta$ <i>EcoRI</i> pero con la secuencia terminadora mutada en la corrida de 7T's así TTTTTTTT→TGTGTGT.

pTer53-4U's mut	Derivado del pI16Const $\Delta EcoRI$ pero con la secuencia terminadora mutada en la corrida de 4T's así CACTTTT→CAATGTG.
pTer53 $\Delta E\Delta B\Delta X$	Derivado del pTer53 sin los sitios de restricción <i>XbaI</i> y <i>BamHI</i> del plásmido para así clonar en el fragmento del gene <i>cat</i> la secuencia terminadora usando esos mismos sitios.
p(Parental min)	Derivado del pTer53 $\Delta E\Delta B\Delta X$ pero con la secuencia mínima terminadora silvestre, clonada como <i>XbaI</i> y <i>BamHI</i> dentro del gene <i>cat</i> .
pStem-Swap	Derivado del pTer53 $\Delta E\Delta B\Delta X$ pero con la secuencia mínima terminadora en la que se intercambio la secuencia del tallo de la estructura tallo-asa, clonada como <i>XbaI</i> y <i>BamHI</i> dentro del gene <i>cat</i> .
pStem-Swap 7A's	Derivado del pTer53 $\Delta E\Delta B\Delta X$ pero con la secuencia mínima terminadora en la que se intercambio la secuencia del tallo de la estructura tallo-asa y remplazando la corrida de 7T's por 7 A's, clonada como <i>XbaI</i> y <i>BamHI</i> dentro del gene <i>cat</i> .

---

## VII. Resultados:

El estudio de las secuencias que dirigen la transcripción y terminación de la transcripción de los genes ribosomales en el presente trabajo se abordó con dos estrategias diferentes. En primer lugar, en el análisis para delimitar la región promotora y que permitiera identificar posibles elementos regulatorios se utilizó un sistema transcripcional *in vivo* con un control interno dependiente de Pol I. En segundo lugar, el análisis de la secuencia que dirige la terminación de la transcripción fue posible mediante un sistema transcripcional que permitiera determinar *in vivo* si la secuencia propuesta como terminadora de la transcripción era funcional o no. En las siguientes secciones se presentan las estrategias abordadas y los resultados obtenidos para el análisis tanto de la región promotora como terminadora de la transcripción.

Para realizar el estudio de las secuencias que dirigen la transcripción y la terminación de la transcripción, lo primero que se hizo fue un análisis de similitud de las copias del cistrón ribosomal en el genoma de *T. vaginalis*. Se utilizaron datos del genoma secuenciado y la secuencia de la clona obtenida en el laboratorio de la Dra. Imelda López Villaseñor (Lopez-Villaseñor *et al*, 2004), para la comparación y alineamiento de secuencias. Se encontró que las copias ribosomales y la región intergénica son 99.8% idénticas entre ellas y los cambios están fuera de la región caracterizada en el presente trabajo (datos no mostrados), por lo que es posible estudiar la región intergénica de una de las copias los genes ribosomales y extrapolar los resultados a la actividad transcripcional que se observaría con cualquiera de las regiones intergénicas de otras copias de los genes ribosomales.

*VI.1 Desarrollo de un sistema reportero transcripcional para el estudio de la región promotora de la transcripción.* Para realizar un análisis de la expresión de los genes ribosomales y poder delimitar y caracterizar la región promotora de la transcripción, se desarrolló un sistema de plásmidos reporteros transcripcionales, así como un sistema de detección, basados en estrategias similares a las descritas previamente (Figueroa-Angulo *et al*, 2003 y Panigrahi *et al*, 2009). Debido a que la RNA polimerasa I carece de las interacciones necesarias con los factores proteicos necesarios para generar un mRNA

maduro (*i.e* con 5' Cap y 3' cola de poliA) y ser exportado del núcleo para su traducción, no se puede emplear un reportero proteico sino que se usó un sistema reportero transcripcional que se resume en la Figura 26. En este sistema se emplearon dos plásmidos reporteros, con secuencias diferentes: una a la que se le llamó Constante (pConst) y otro con una secuencia a la que se le llamó Variable (pVar). La ventaja de usar secuencias reporteras surge de que el RNA ribosomal celular es muy abundante. Sin embargo, cualquier cambio o variación en la expresión es prácticamente imperceptible aún con el sistema más sensible. Por ello se diseñaron dos plásmidos, uno sobre el cual se harían todas las modificaciones o mutaciones sobre la región para delimitar la secuencia promotora y un segundo plásmido que se co-transfectaría y funcionaría como control interno de transcripción. De este modo no es necesario un control interno de la integridad del RNA transcrito por la Pol II, como se empleó en otro sistema reportado previamente (Panigrahi *et al*, 2009).

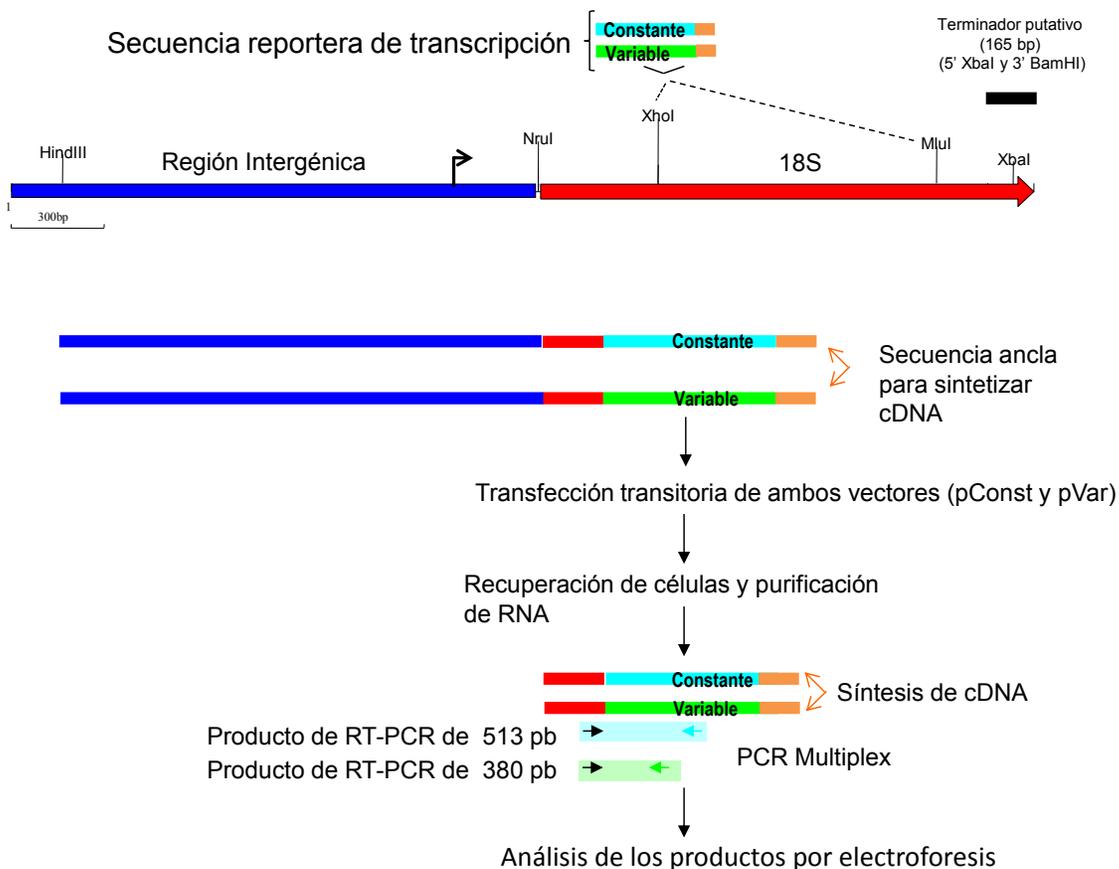


Figura 26. Estrategia para generar reporteros transcripcionales para el análisis de la secuencia promotora de la transcripción del cistrón ribosomal de *T. vaginalis*. Los plásmidos incluyen secuencias comunes para sintetizar cDNA de manera simultánea. El análisis de los productos se lleva a cabo en una reacción multiplex para las dos secuencias reporteras.

En el sistema reportero propuesto no se mide la presencia o actividad de una proteína, sino la transcripción de una secuencia reportera que mas tarde se pueda identificar mediante RT-PCR. La estrategia general se muestra en la Figura 27.

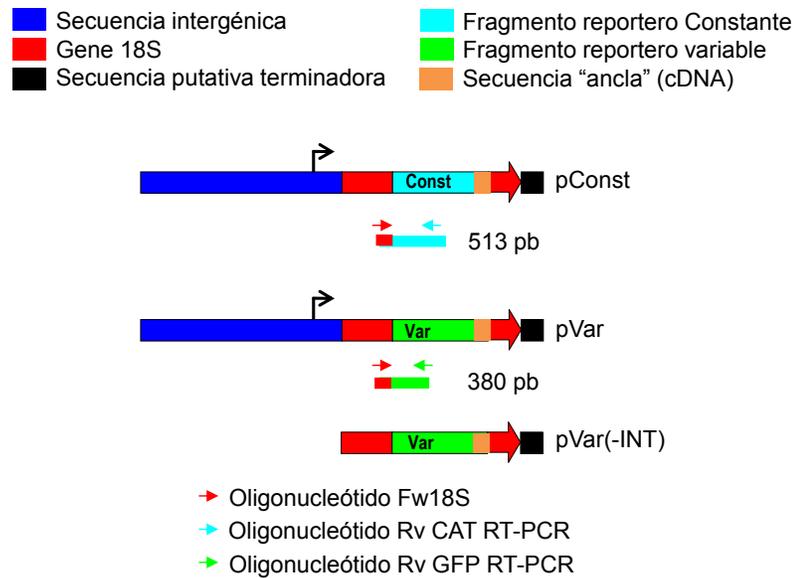


Figura 27 Estrategia para el análisis de transcritos reporteros mediante RT-PCR. Se esperan transcritos de los plásmidos pConst y pVar ya que tienen la región intergénica completa, mientras que con el plásmido pVar(-INT) no se espera transcrito alguno.

*VI.2 El sistema reportero es funcional in vivo.* Para validar el sistema experimental se siguió el esquema que se muestra en el esquema de la Figura 27. Se muestran los plásmidos empleados y el tamaño de los productos de RT-PCR esperados.

Se evaluaron dos parámetros iniciales: primero que el sistema reportero fuera funcional *in vivo* y segundo que el análisis por RT-PCR que se diseñó no diera problemas por amplificación inespecífica. Para ello se hicieron las siguientes transfecciones transitorias en células de *T. vaginalis*: transfección con el vehículo (agua), para verificar que ningún RNA endógeno diera reacción de amplificación inespecífica. En segundo lugar



Variable. +RT= reacciones hechas con cDNA. -RT= reacciones en las que no se incluyó la Transcriptasa Reversa.

El resultado anterior muestra que la transcripción de las secuencias reporteras es dirigida por la secuencia de la región intergénica, lo que sugiere que contiene una secuencia promotora de la transcripción. Dado que el sistema es funcional *in vivo* se decidió buscar la secuencia más acotada posible que retuviera actividad transcripcional. Para ello se diseñaron una serie de deleciones en el extremo 5', en el 3' o en ambos extremos y todas fueron probadas *in vivo*.

*VI.3 Efecto de deleciones sobre la región intergénica.* Para acotar el elemento promotor se generaron deleciones en la secuencia intergénica comprendida por el fragmento de -1247 pb río arriba del TSP y 277 pb del ETS. Esto se logró sustituyendo la región intergénica por fragmentos más pequeños, creados por amplificación mediante PCR usando oligonucleótidos específicos (Tabla S1) y luego clonado cada uno como un fragmento *HindIII-NruI*. El sitio de restricción *NruI* resultó de gran utilidad ya que son las últimas 6 bases antes de la secuencia codificante del gene 18S. En las deleciones en el extremo 5' se eliminaron aproximadamente 200 pb de manera consecutiva. En el extremo 3' (ETS) se hicieron deleciones más pequeñas, debido a que el ETS está constituido por 277 pb. Finalmente se hicieron deleciones en ambos extremos. En la Figura 29 se muestra un mapa con las coordenadas de cada una de las deleciones generadas, todas en relación con el sitio de inicio de la transcripción (TSP). De esta manera, los nucleótidos río arriba del TSP; se marcaron como -, y río abajo del TSP como +.

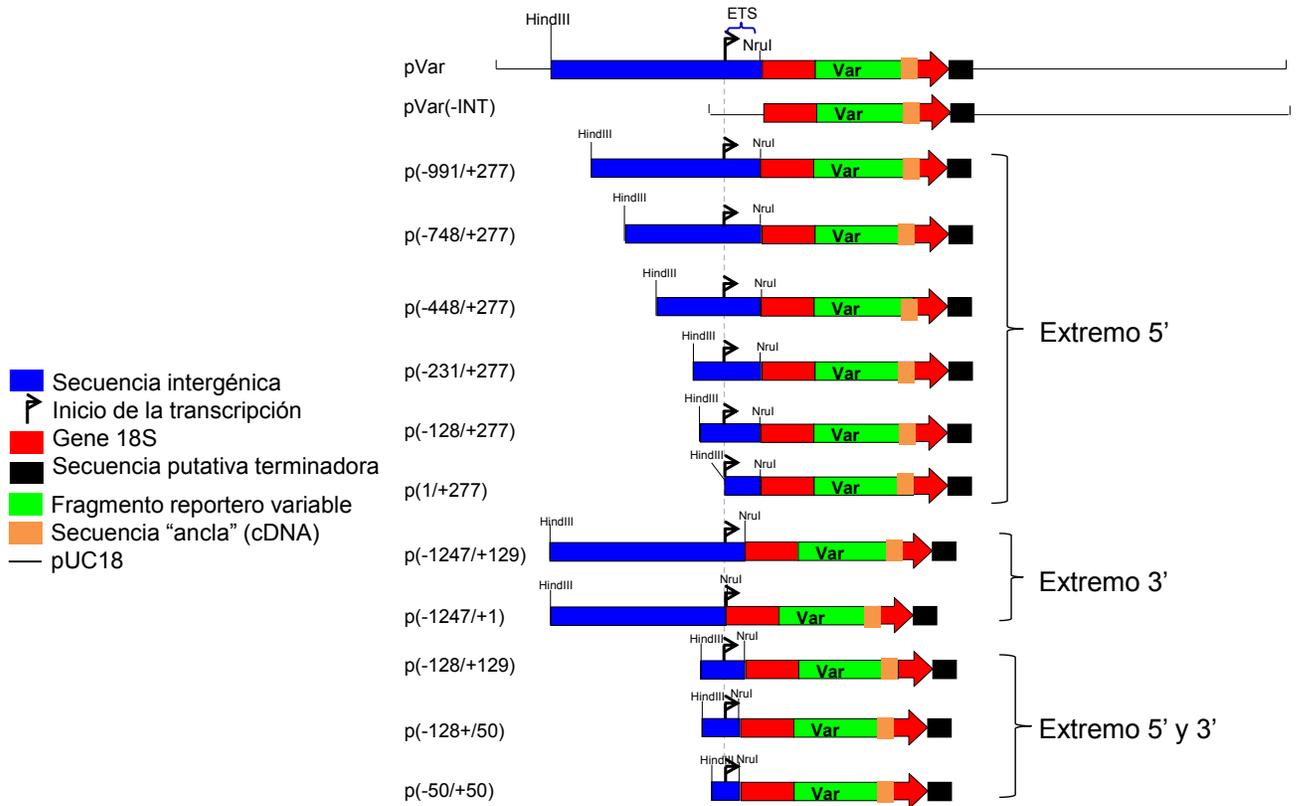


Figura 29. Generación de delecciones en la región intergénica. Se muestran las diferentes delecciones hechas con las coordenadas respecto al Sitio de Inicio de la transcripción (TSP). Se agruparon por delecciones hechas en el extremo 5', en el 3' y en ambos extremos. El tamaño total de la región intergénica es de 1524 pb (1247 pb río arriba del TSP; y 277 pb del ETS). Todas se generaron mediante amplificación de los fragmentos por PCR con oligonucleótidos específicos con los sitios *HindIII* y *NruI* en el extremo 5' y 3', respectivamente. Se incluyeron los plásmidos pVar y pVar(-INT) para comparación. Todas las construcciones se alinearon respecto al TSP

El efecto de las delecciones sobre la actividad transcripcional fue determinado de la misma manera en que se validaron los controles. De manera individual, cada plásmido conteniendo una delección específica fue co-transfectado con el plásmido reportero Constante (pConst). En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos para cada co-transfección. Las delecciones sencillas hechas en los extremos 5' y 3' sugerían que la región promotora se podía acotar al fragmento -128/+129 pb, el cual debería retener la misma actividad transcripcional que el fragmento silvestre. Se generó entonces la construcción de la doble delección (-128/+129) y se confirmó la actividad transcripcional de este fragmento al obtener una banda de amplificación para el reportero Variable (Figura 30 carril -

128/+129). Para delimitar aún más la región promotora, se construyeron las deleciones -128/+50 y -50/+50. La deleción -128/+50 retiene los niveles silvestres de actividad transcripcional, esto es, se pueden eliminar hasta tener solamente 50 pb después del ETS y mantener actividad transcripcional equivalente al fragmento completo. La deleción -50/+50 no tiene actividad transcripcional, ya que no se puede amplificar la banda del reportero Variable lo que sugiere que se eliminó del extremo 5' algún elemento necesario para la transcripción, lo cual se discutirá más adelante. Por lo tanto, el sistema reportero permitió delimitar la región promotora a un fragmento de 178 pb, que comprende -128 pb río arriba del TSP y +50 pb río abajo del TSP.

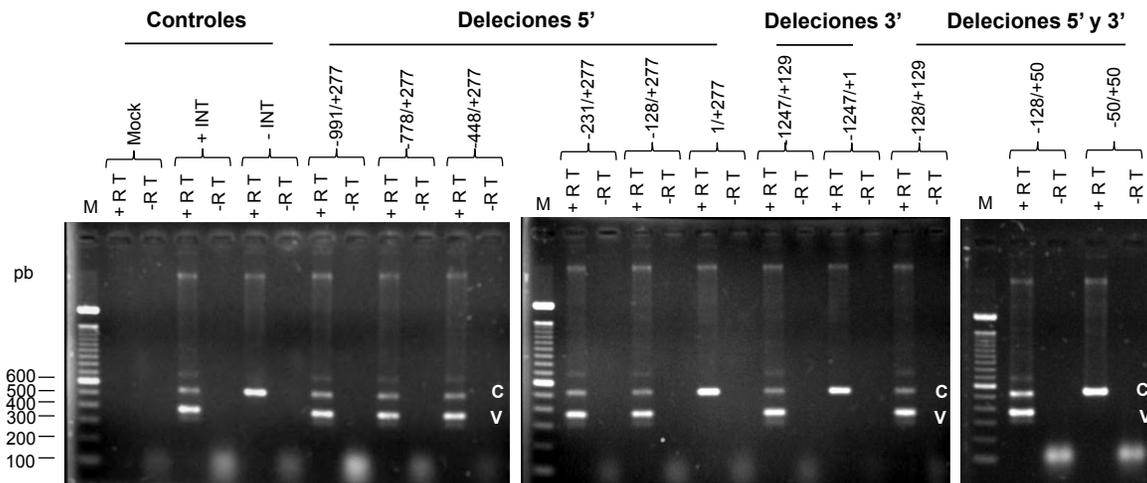


Figura 30. Análisis de las transfecciones hechas con los plásmidos derivados del pVar con deleciones secuenciales de la región intergénica y ETS. Se muestran los controles en los carriles con leyenda “Mock”, “+INT” y “-INT” (ver Figura 28). El resto de las leyendas indican las posiciones eliminadas de la región intergénica como se muestra en la Figura 29. M= marcador de peso molecular. C= producto de RT-PCR de la secuencia Constante (513 pb). V= producto de RT-PCR de la secuencia Variable (380 pb). +RT= reacciones hechas con cDNA. -RT= reacciones hechas sin Transcriptasa Reversa.

#### VI.4 Análisis por mutagénesis de la región del sitio de inicio de la transcripción.

Para caracterizar la secuencia -128/+50 que rodea el TSP, se generaron mutantes en la secuencia de esa región. Se ha visto que la transcripción por la Pol I es especie específica en varios casos, lo cual significa que el reclutamiento de la polimerasa en el promotor es sensible a variaciones en la secuencia, especialmente en la vecindad y la secuencia misma del TSP (Heix *et al*, 1995, Figueroa-Angulo *et al*, 2006 y Firek *et al*, 1990). Generamos una

mutante en tres bases del TSP, usando como plantilla el plásmido p(-128/+50), que es el plásmido con el fragmento más pequeño con actividad transcripcional. En la Figura 31 Panel **A** se muestra el Weblogo del alineamiento de varios TSP de protozoarios caracterizados, donde las flechas rojas indican las bases que se cambiaron (TGG por GTT, donde la base subrayada corresponde a la base del TSP). En el Panel **B** se muestra los perfiles del electroferograma de la secuencia silvestre (WT) y de la mutante en el TSP (TSP mut), las flechas indican las posiciones donde se realizaron los cambios. Los cambios hechos fueron purina por pirimidina y viceversa.

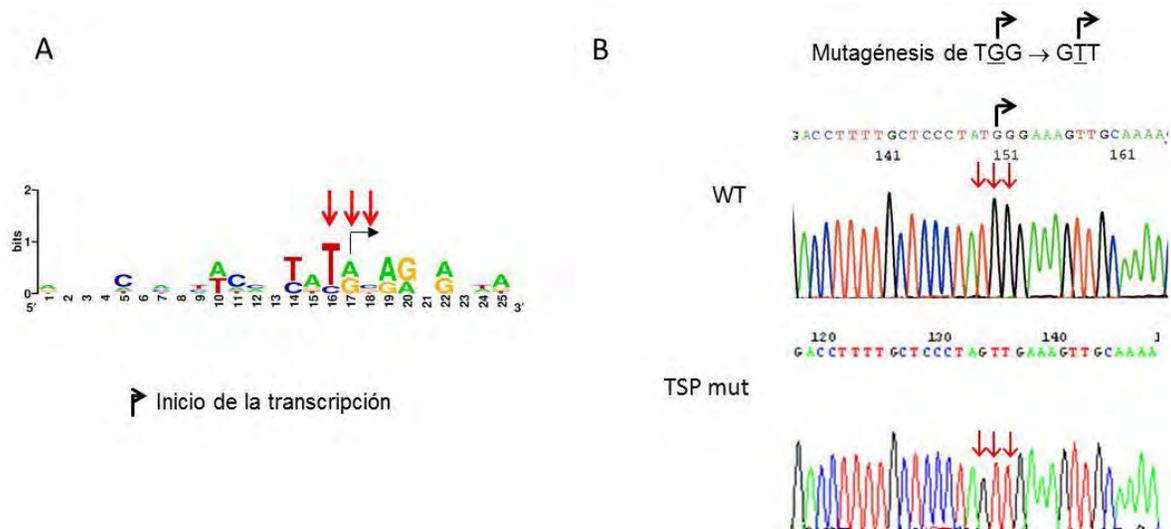


Figura 31. Mutagénesis de la región del Sitio de Inicio de la Transcripción (TSP) del promotor ribosomal. En el Panel **A** se muestra el WebLogo de varios TSP's, caracterizados experimentalmente, de protozoarios (*T. vaginalis*, *T. cruzi*, *T. brucei*, *P. berghei*, *E. histolytica*, *D. discoideum*). Las flechas rojas indican la posición de las bases cambiadas. En el Panel **B** se muestran los electroferograma de una reacción de secuencia de la región silvestre del promotor y el electroferograma de la mutante en la región del TSP. Las flechas negras indican la posición de las bases cambiadas. El WebLogo fue creado usando el programa disponible en línea en el sitio: <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>.

Los resultados de la transfección del plásmido con los tres cambios de la secuencia del TSP [p(-128/+50)TSP mut] se muestran en la Figura 32, donde se puede observar que la mutagénesis del TSP abatió la transcripción ya que no se pudo amplificar el producto de 380 pb correspondiente al reportero Variable. En comparación con el plásmido parental p(-128/+50) tiene clara actividad transcripcional.

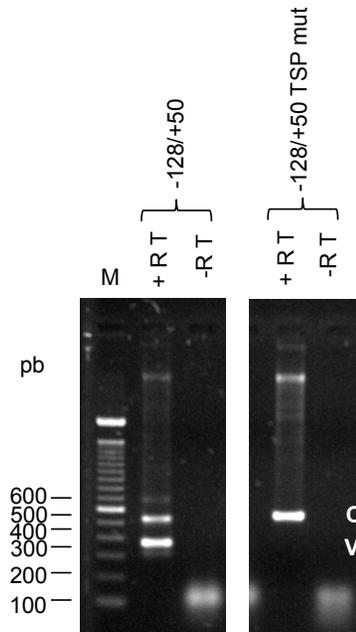


Figura 32. Efecto transcripcional de la mutación en la secuencia del TSP. Se muestra la actividad del plásmido parental (-128/+50) sobre el cual se cambió la secuencia del TSP. M= marcador de peso molecular. C= producto de RT-PCR de la secuencia Constante (513 pb). V= producto de RT-PCR de la secuencia Variable (380 pb). +RT= reacciones hechas con cDNA. -RT= reacciones hechas sin Transcriptasa Reversa.

Estos datos indican que con solamente tres cambios en el sitio de inicio de la transcripción se pierde la actividad transcripcional. Esto significa que la transcripción de los genes ribosomales por Pol I es específica y sensible a cambios en la secuencia del TSP.

*VI.5 Otros elementos potencialmente reguladores.* Los promotores ribosomales son generalmente bipartitos, en los que está un elemento central o Core y un elemento río arriba conocido como UCE (por sus siglas en inglés Upstream Control Element). Haciendo una revisión de la literatura, los elementos UCE generalmente tienen secuencias repetidas tanto en la vecindad del TSP como río arriba de este. Los resultados de las deleciones en la región intergénica y el ETS sugieren que existe en el extremo 5' relativo al TSP la presencia de una secuencia regulatoria entre las bases -128 y -50. El análisis de esta región reveló dos secuencias cortas (7 pb) a las que se les llamó Box 1(distal) y Box 2(distal) que se repiten en la vecindad del sitio de inicio de la transcripción [Box1 (prox) y Box 2 (prox)] (Figura 33). Esto sugiere la presencia de un posible elemento regulador de tipo UCE (Heix *et al*, 1995).



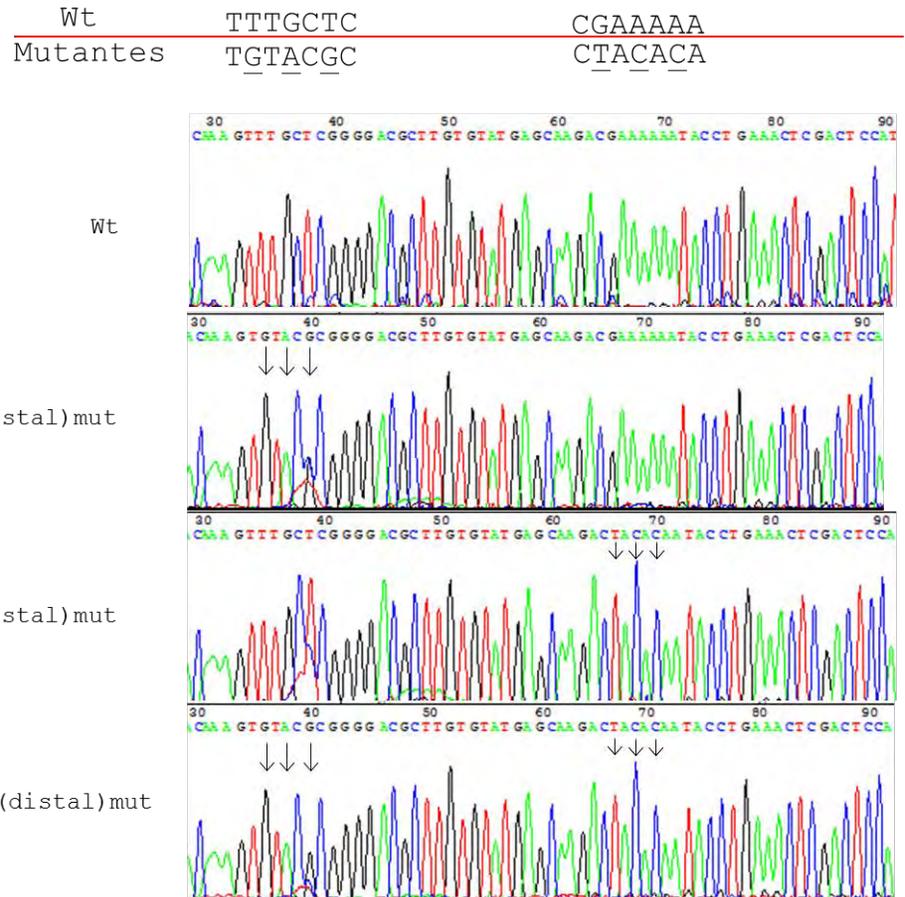


Figura 34. Mutantes del posible UCE del promotor ribosomal. Se indican los electroferogramas del plásmido p(-128/+50), que es el plásmido con el fragmento más pequeño que tiene actividad transcripcional y que fue usado para generar estas mutaciones. Se muestran las dos posiciones para las mutantes sencillas y la doble mutante. Subrayados se muestran los nucleótidos cambiados de la secuencia silvestre y sobre los electroferogramas se indican con flechas verticales los cambios hechos.

Los plásmidos mutantes fueron co-transfectados con el plásmido pConst y se analizó el efecto de las mutaciones sobre la actividad transcripcional de la manera ya descrita. En la Figura 35 se muestra el análisis comparativo con el fragmento silvestre (-128/+50). El plásmido con las mutaciones en la Box 2(distal) así como la doble mutante no tuvieron actividad transcripcional, mientras que los cambios en la secuencia de la Box 1(distal), no modifican la actividad transcripcional del plásmido reportero. Esto sugiere que solo la Box 2(distal) tiene un papel importante en la actividad transcripcional del promotor ribosomal. Estos datos confirman que entre las bases -50 y -128 existe un elemento

involucrado en la actividad del promotor que posiblemente sea reconocido por la maquinaria de la Pol I como un elemento de tipo UCE.

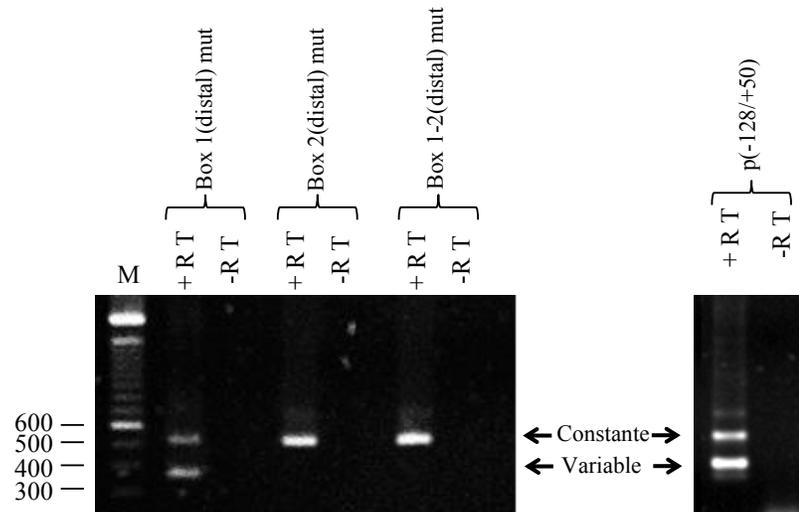


Figura 35. Análisis transcripcional de las transfecciones hechas con los plásmidos mutantes en las cajas que posiblemente constituyan un UCE del promotor ribosomal. M= marcador de peso molecular. +RT= reacciones hechas con cDNA. -RT= reacciones hechas sin Transcriptasa Reversa.

*VI.6 Búsqueda de posibles elementos moduladores en la región intergénica.* Se realizó un ensayo para determinar si el sistema reportero transcripcional permite distinguir elementos moduladores en la región intergénica. Para ello, se hicieron PCR's a diferente número de ciclos para tratar de encontrar diferentes niveles de transcripción en las regiones eliminadas. En la Figura 36 se muestran los resultados de algunas de las deleciones analizadas por RT-PCR usando como plantilla cDNA (+RT). Como se puede observar, a un número menor de ciclos al empleado en el resto de los experimentos (25 ciclos), no hay diferencias significativas en las construcciones probadas. Esto indica que el sistema reportero transcripcional no tiene la sensibilidad para distinguir elementos de regulación fina o bien, en el promotor del cistrón ribosomal de *T. vaginalis* no existen elementos que modulen la expresión de los genes ribosomales como en otros organismos.

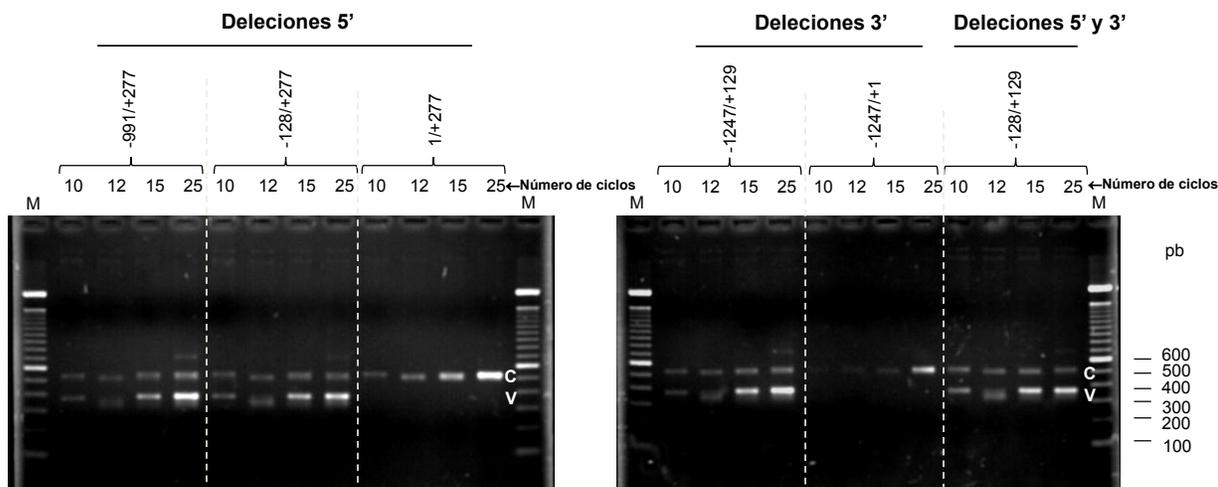


Figura 36. Análisis por PCR a diferentes ciclos de amplificación. Se hizo una mezcla maestra que fue repartida en 4 tubos de reacción, los cuales fueron sacados del termociclador al número de ciclo indicado en la parte superior de cada gel. C= producto de RT-PCR de la secuencia Constante. V= producto de RT-PCR de la secuencia Variable. M= marcador de peso molecular.

#### VI.7 Demostración de la especificidad de los productos amplificados por RT-PCR.

Debido a que en las reacciones de PCR se presentan unas bandas tenues adicionales a las esperadas, se analizaron algunas de las reacciones de RT-PCR para comprobar que los productos obtenidos fueran de las secuencias reporteras esperadas y no un producto inespecífico. Para ello, se realizó un ensayo de Southern blot utilizando como sonda fragmentos de las secuencias reporteras (Figura 37). En el Panel de la izquierda se muestra el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en el que se corrieron las reacciones de PCR multiplex hechas con cDNA como plantilla. En el Panel del centro se muestra el autoradiograma de la hibridación con la sonda para la secuencia reportera Constante, y en el Panel de la derecha el autoradiograma de la hibridación hecha con la sonda para la secuencia reportera Variable. Los resultados muestran que los productos obtenidos en las reacciones de PCR hibridan con la sonda correspondiente (secuencia Variable o Constante). Por lo tanto, los productos de PCR son los esperados y el resto de las bandas aparentemente son productos inespecíficos de amplificación que no influyen en los resultados.

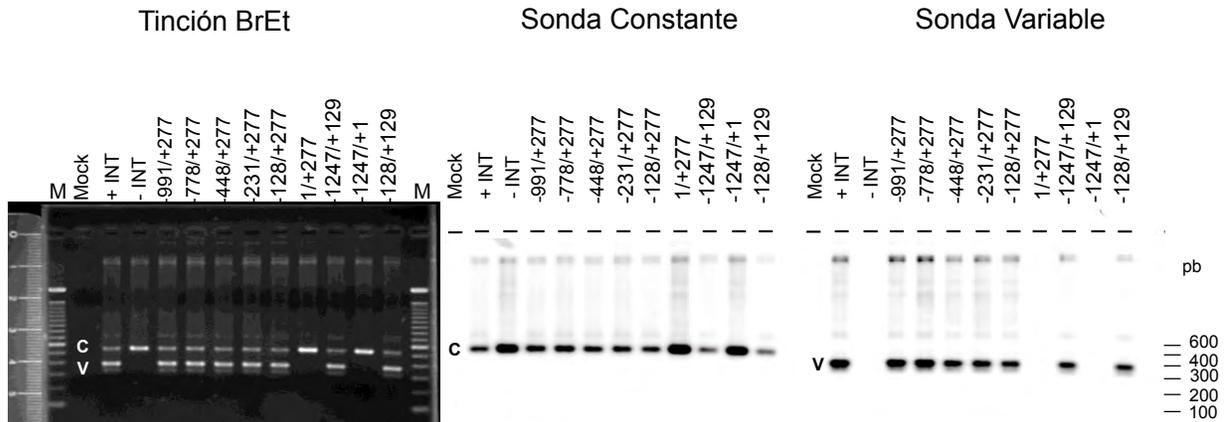


Figura 37. Confirmación de la identidad de las bandas amplificadas por RT-PCR. Se analizaron los productos de PCR obtenidos a partir de cDNA de las construcciones mostradas en la parte superior del gel (+RT). Las sondas usadas fueron el fragmento de 655 pb del reportero Constante y el fragmento de 734 pb del reportero Variable. Las líneas pequeñas horizontales en los autoradiogramas esquematizan los pozos del gel. C= producto de RT-PCR de la secuencia Constante. V= producto de RT-PCR de la secuencia Variable. M= marcador de peso.

*VI.8 Análisis de la secuencia terminadora.* Para identificar y caracterizar la secuencia que dirige la terminación de la transcripción, se analizó la secuencia de 165 pb inmediatamente río abajo del gene 28S y que se usó en las construcciones como terminador putativo (ver Figura 38). Se ha propuesto que corridas de U en los transcritos de los genes ribosomales son señal para el término de la transcripción (Reeder *et al*, 1997). También se ha propuesto la presencia de estructuras secundarias en el transcrito como señal de reconocimiento de endonucleasas que liberan el transcrito (Richard *et al*, 2009). La secuencia de 165 pb río abajo del gene 28S tiene dos corridas de T (uno de 7 bases y otro de 4) y es la única región en la secuencia intergénica que tiene esta propiedad, por lo que se analizó la secuencia completa de 165 pb y variantes de ésta (Tabla 5).

**Tabla 5.** Secuencias terminadoras analizadas.

Nombre	Secuencia (5' → 3)'
Ter53	GGATTTTTTTTCAAGTGTAAGTGTCAC <del>TTTTATATCCACGGGCCGCTATATG</del> AGCATCAAATATACTAACTAAAAATACAATAATCATATAGGAATGAAAAAA GATATTTAAAGCGAAAAC <del>TCAAAAAACAAATACTTAAGTATATAGGCTAACT</del> AATACACATACT
Ter35	AGTATGTGTATTAGTTAGCCTATATACTTAAGTATTTGTTTTTTGAGTTTT CGCTTTAATATCTTTTTTCATTCCATATGATTATTGTATTTTAGTTAGT ATATTTGATGCTCATATAGCGGCCCGTGGATATAAAAAGTGACACTTACACT TGAAAAAAATCC
Ter 7U's mut	GGATGTGTGTCAAGTGTAAGTGTCAC <del>TTTTATATCCACGGGCCGCTATATG</del> AGCATCAAATATACTAACTAAAAATACAATAATCATATAGGAATGAAAAAA GATATTTAAAGCGAAAAC <del>TCAAAAAACAAATACTTAAGTATATAGGCTAACT</del> AATACACATACT
Ter 4U's mut	GGATTTTTTTTCAAGTGTAAGTGTC <b>AA</b> TGTGATATCCACGGGCCGCTATATG AGCATCAAATATACTAACTAAAAATACAATAATCATATAGGAATGAAAAAA GATATTTAAAGCGAAAAC <del>TCAAAAAACAAATACTTAAGTATATAGGCTAACT</del> AATACACATACT
Parental min	GGATTTTTTTTCAAGTGTAAGTGTCAC <del>TTTTATAT</del>
Stem-Swap	GGATTTTTTTTCTTCAGTAAGTGCT <b>GA</b> ATTATAT
Stem-Swap 7A's	GG <b>AAAAAA</b> ACTTTCAGTAAGTGCT <b>GA</b> ATTATAT

Underlined sequences indicate mutated or swapped positions. Bold (las tablas que he

La secuencia Ter53 se refiere al fragmento en orientación 5' a 3' de 165 pb propuesto como terminador putativo. Los terminadores suelen ser sensibles a la orientación, por ello la secuencia ter35 se refiere a la secuencia de 165 pb pero en orientación 3' a 5'. De la secuencia Ter53 se hicieron dos construcciones con las corridas de T's mutados (Ter 7U's mut y Ter 4U's mut). Finalmente se muestran tres construcciones de 34 pb con las secuencias terminadoras mínimas (Parental min, Stem-Swap y Stem-Swap 7A's). Las secuencias mutadas se muestran subrayadas.

La estrategia que se siguió para probar la funcionalidad del terminador fue utilizar el plásmido reportero pConst con la secuencia de 165 pb incorporada dentro de la secuencia reportera Constante. El análisis transcripcional se hizo por RT-PCR de manera similar a la caracterización del promotor. La estrategia que se siguió fue la detección de transcritos derivados de secuencias tanto río arriba como río debajo de la región terminadora probada. Si el terminador es funcional, no se detectará transcripción río abajo a esta secuencia. Una

diferencia importante en este análisis es que se incluyó un control interno de transcripción (transcritos río arriba a la secuencia terminadora). De modo gráfico, en la Figura 38 se muestra la estrategia a seguir. La síntesis de cDNA se hizo con dos oligonucleótidos: uno previo a la secuencia terminadora (RvCATRT-PCR2) y uno río abajo de ésta (cDNAanclact, Tabla S1). El cDNA se usó como plantilla para los PCR's y las amplificaciones se hicieron mediante el juegos de oligonucleótidos que permiten analizar si la transcripción prosiguió después de la secuencia terminadora o no. El producto de 233 pb siempre se puede amplificar independientemente de la funcionalidad del terminador, mientras que los productos de 280 y 678 pb solamente se pueden amplificar si la secuencia terminadora no es funcional.

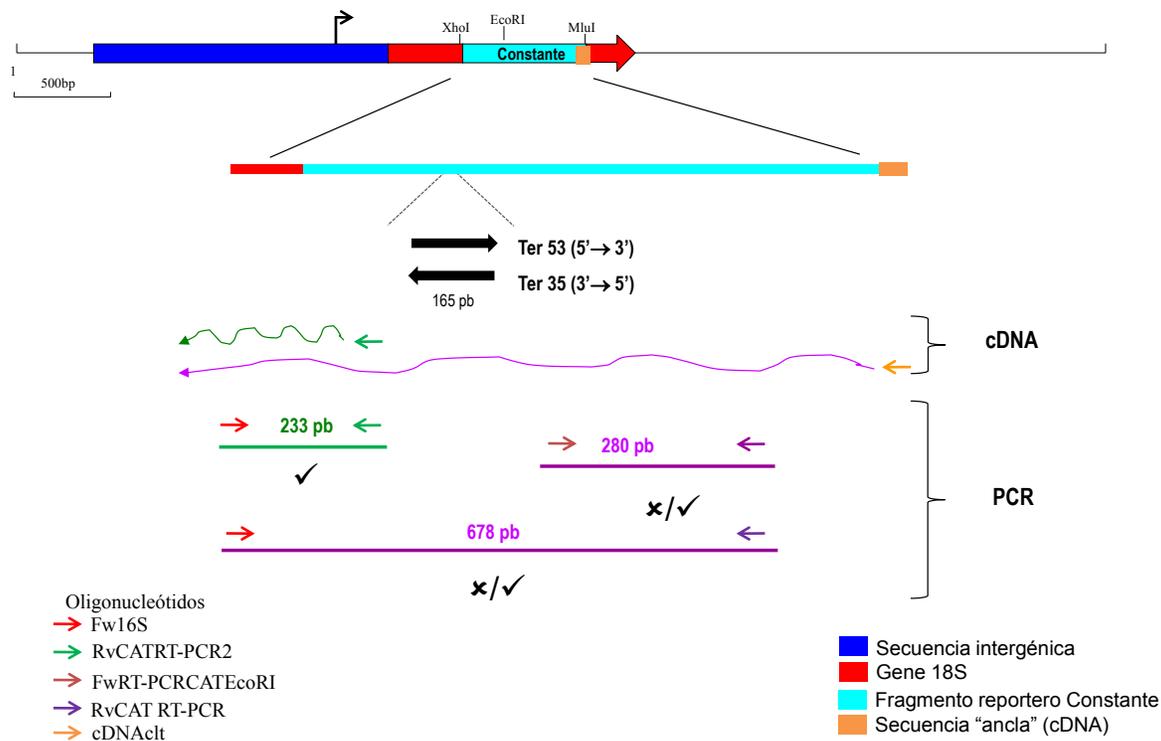


Figura 38. Estrategia de análisis transcripcional para la secuencia terminadora. El símbolo ✓ indica que es posible amplificar el producto debido a que la secuencia terminadora no es funcional o bien que es el amplicon previo a la secuencia terminadora (producto de 233 pb, que es a su vez un control positivo tanto de transfección como de transcripción). El símbolo ✗ indica que no es posible amplificar ese producto debido a que la secuencia terminadora es funcional.

Inicialmente se evaluó la capacidad de la secuencia de 165 pb para terminar la transcripción. Una propiedad que los terminadores de Pol I tienen en general es que son sensibles a su orientación (Grummt *et al*, 1985, Lang *et al*, 1993 y Richard *et al*, 2009), por lo que se probó la orientación 5' a 3' como en la orientación 3' a 5'. A estas construcciones se les llamó pTer 53 y pTer 35, respectivamente (Figura 38, Tabla 5).

Para verificar que los plásmidos tuvieran el terminador en la orientación deseada, se analizaron por secuenciación automática (Figura 39), en la que se muestra que la secuencia teórica coincide con los electroferogramas obtenidos. Se señalan los sitios de restricción contenidos en la secuencia.

Ter53

5'

GGATTTTTTCAAGTGTAAAGTGTCACTTTTATATCCACGGCCGCTATATGAGCATCAAATATACTAACTAAAAATACAATAATCATATAGGAATGA  
AAAAAGATATTTAAAGCGAAAACCTCAAAAAACAAATACTTAAGTATATAGGCTAACTAATACACATACT

3'

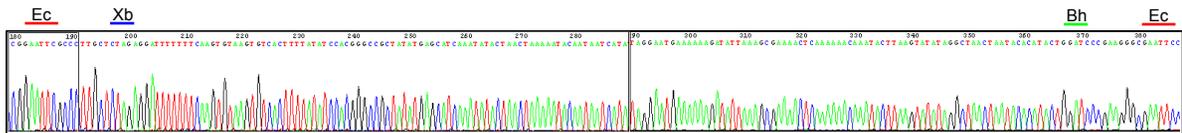
Ter35

5'

AGTATGTGTATTAGTTAGCCTATATACTTAAGTATTTGTTTTTGAGTTTTTCGCTTTAATATCTTTTTTCATTCCCTATATGATTATGTATTTTTAG  
TTAGTATATTTGATGCTCATATAGCGGCCCGTGGATATAAAAGTGACACTTACACTTGAAAAAATCC

3'

Ter53



Ter35

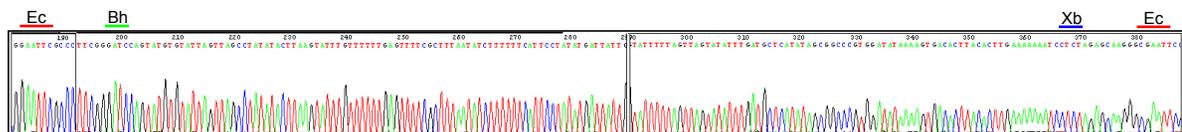


Figura 39. Verificación por secuenciación automática de las construcciones Ter53 y Ter35. Se muestran las secuencias teóricas y los electroferogramas de las reacciones de secuencia de la región que contiene la secuencia terminadora completa dentro del plásmido modificado pConstΔEcoRI. Las bases extra entre el fragmento terminador y los sitios de restricción provienen del plásmido intermediario para la clonación. Ec= *EcoRI* Bh= *BamHI*. Xb= *XbaI*.

Con los plásmidos Ter53 y Ter35, se transfectaron células de *T. vaginalis* y el RNA obtenido se analizó por RT-PCR (Figura 40). Con la secuencia Ter 53 se amplificó el transcrito de 233 pb previo al terminador pero los dos amplicones de 180 y 678 pb no se detectaron. Esto sugiere que la secuencia Ter 53 contiene un elemento capaz de detener la

transcripción. Respecto a la secuencia Ter 35, los tres amplicones se detectaron, lo que indica que el elemento terminador contenido en las 165 pb depende de polaridad para llevar a cabo su función.

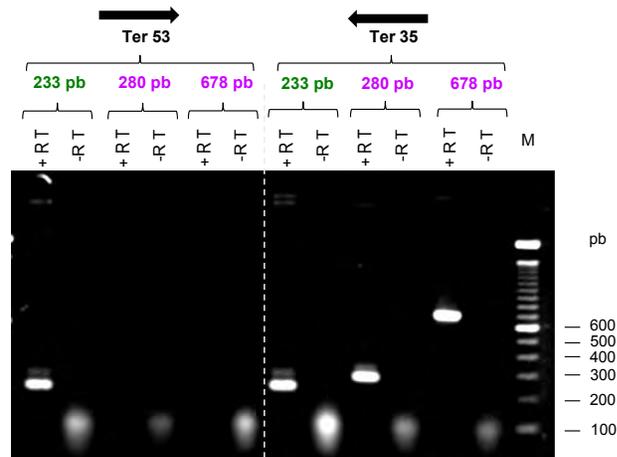


Figura 40. Análisis transcripcional de la secuencia terminadora de 165 pb en las dos orientaciones:  $5' \rightarrow 3'$  (Ter 53) y  $3' \rightarrow 5'$  (Ter35). M= marcador de peso molecular. +RT= Productos de PCR usando cDNA como plantilla. -RT= Controles hechos sin transcriptasa reversa. 233 pb: producto de RT-PCR previo a la secuencia terminadora (ver Figura 38). 280 pb: producto de RT-PCR río abajo a la secuencia terminadora. 678 pb: producto de RT-PCR amplificado que abarca tanto la región río arriba y río abajo a la secuencia terminadora.

Los resultados anteriores muestran que la secuencia Ter53 posee un elemento capaz de detener la transcripción, que como se menciona al inicio de esta sección, es probable que se trate de las corridas de T's. Ahora bien, como se puede ver en la Tabla 5, la secuencia Ter 35 también tiene corridas de T's, pero es incapaz de actuar como terminador transcripcional. Esto sugiere que una corrida de T's no es suficiente para llevar a cabo la terminación y que probablemente se requieran de otros elementos para detener la transcripción.

Como primera aproximación para elucidar el papel de las dos corridas de T's en la secuencia Ter 53, se hizo la mutagénesis de cada una de ellas y se probó su actividad. Se interrumpió cada corrida intercambiando de manera alternada una T por una G. Para la primera corrida de 7T's se cambio la secuencia TTTTTTT por TGTGTGT (7U's mut). En el caso de la segunda corrida de 4T's se cambio la secuencia CACTTTT por CAATGTG (4U's mut). Este cambio adicional fue debido a que la secuencia CACTTTT de *T. vaginalis*

guarda cierta similitud con el terminador propuesto para *Leishmania amazonensis*: CCCTTTT (Abreu-Blanco *et al*, 2010). En la Figura 41 se muestran los electroferogramas de los plásmidos mutantes 7U's mut y 4U's mut. Es importante señalar que en cada caso, la mutante en las primeras 7 T's mantiene intacta la secuencia de las 4 T's y viceversa.

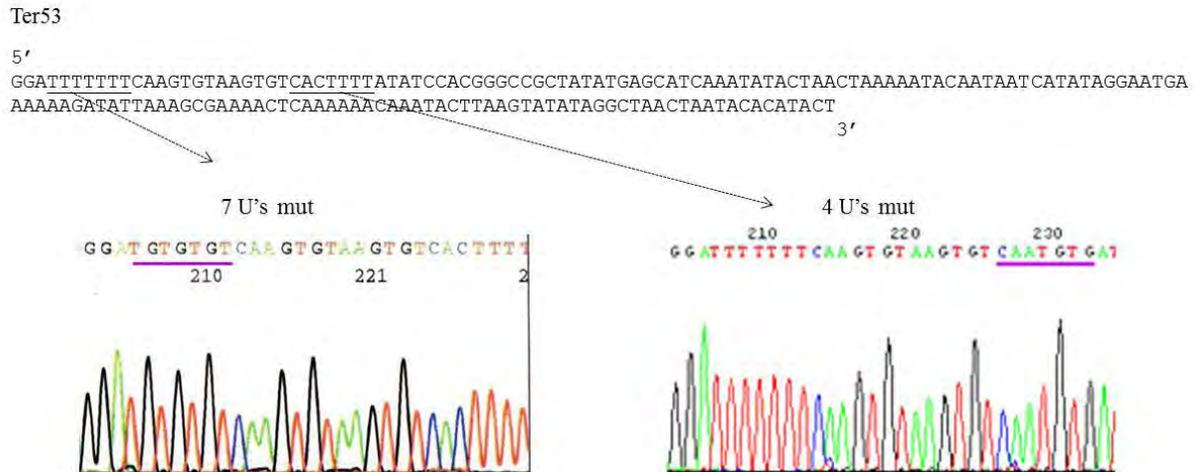


Figura 41. Secuencia de los plásmidos mutantes 7U's mut y 4 U's mut.

*VI.9 Efecto de las mutaciones de las corridas de U's sobre la terminación de la transcripción.* El efecto de los cambios en las dos corridas de U's del terminador Ter53 se evaluó siguiendo la misma estrategia que se mostró en la Figura 38. En la Figura 42 se observa que ninguna de las mutantes es capaz de terminar la transcripción, ya que en ambos casos se obtienen los tres amplicones. Esto indica que, aunque es necesario una corrida de U's, no es capaz de terminar la transcripción *per se*, y que deben existir elementos adicionales en el fragmento de 165 pb que están implicados en la terminación de la transcripción.

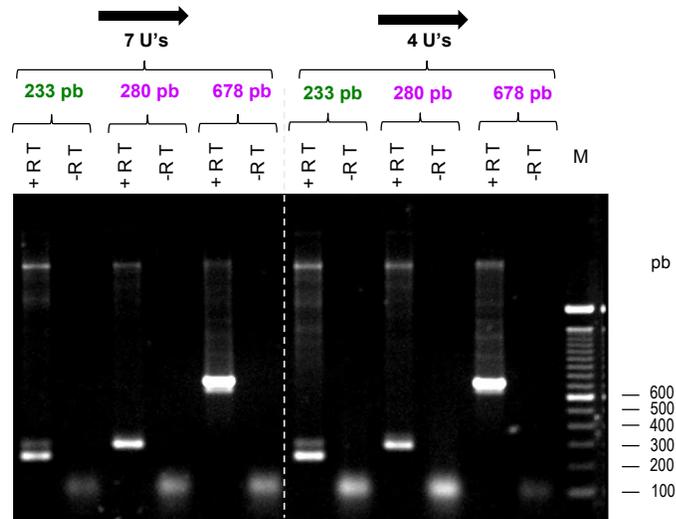


Figura 42. Análisis transcripcional de las mutantes 7U's y 4 U's. M= marcador de peso molecular. +RT= Productos de PCR usando cDNA como plantilla. -RT= Controles hechos sin transcriptasa reversa. 233 pb: producto de RT-PCR previo a la secuencia terminadora (ver Figura 38). 280 pb: producto de RT-PCR río abajo a la secuencia terminadora. 678 pb: producto de RT-PCR amplificado que abarca tanto la región río arriba y río abajo a la secuencia terminadora.

*VI.10 Identificación de elementos adicionales en la secuencia terminadora de la transcripción.* Por los resultados anteriores, las corridas de U's son necesarios pero no son capaces de detener la transcripción por si mismos. Por ello, se buscó en el transcrito otros elementos que pudieran estar implicados en esta función. Se analizó la estructura secundaria de los transcritos Ter53 y Ter35 así de las mutantes 7U's y 4 U's. En la Figura 43 se muestran las estructuras secundarias más probables de la región que comprenden los nucleótidos 1 a 51. En el caso de la secuencia Ter 53, la estructura de tipo tallo-asa se modela igual si se usan las bases 1-51 o si se modela con el fragmento de 165 pb. En los demás casos, la estructura secundaria se modifica dependiendo de la secuencia modelada (datos no mostrados). En el caso de la secuencia Ter35 aunque tiene corridas de T's, estos no están contiguos a una estructura tallo-asa como en la secuencia Ter53. Por lo tanto, la estructura tallo-asa identificada en la región 1-51 es un buen candidato a formar parte del terminador.

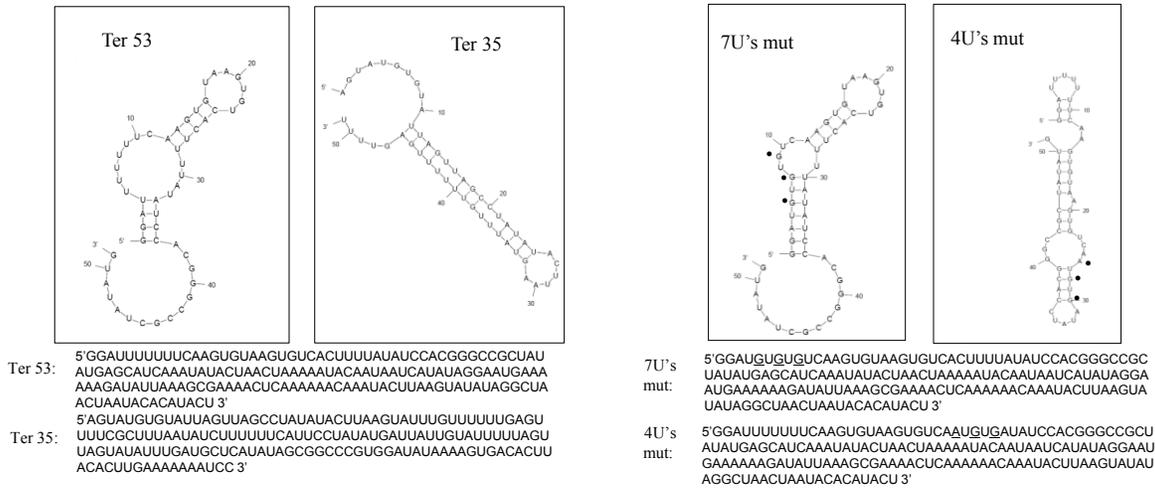


Figura 43. Predicción de estructura secundaria de las secuencias Ter53, Ter35, 7U's mut y 4U's mut. Se muestra en el modelo las bases 1-51. Los símbolos • indican las bases mutadas. Modelajes hechos con mFold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) (Zuker, 2003).

Con el fin de acotar el terminador y definir sus elementos funcionales, se diseñó un “terminador mínimo” que comprende las 34 pb que corresponden a la corrida de 7 U's, la corrida de 4 U's y la estructura tallo-asa. Se diseñaron un par de oligonucleótidos que, al alinearlos entre si, generen un fragmento de DNA de doble cadena para remplazar los 165 pb de pTer53 con las 34 pb del terminador mínimo, generado así el plásmido pParental min (ver **Materiales y Métodos**). En la Figura 44 se muestra la estructura del terminador mínimo transcripcional con la secuencia silvestre, a la que se le llamó Parental min. También se decidió evaluar por separado el papel de las dos corridas de U's así como de la estructura secundaria que se forma en el transcrito. Para ello se diseñaron dos construcciones adicionales del terminador mínimo: en la primera se intercambiaron las secuencias del tallo de la estructura tallo-asa, pero se mantuvo la misma estructura. A esta construcción se le llamó Stem-Swap. Es importante mencionar que en esta construcción se altera la secuencia de la corrida de 4 U's, ya que las dos primeras U's se cambian por dos A's. En la segunda construcción se mantiene el cambio en el tallo (Stem-Swap), pero además se cambia la corrida de 7 U's por una de 7A's. A esta construcción se le llamó Stem-Swap 7A's, y nuevamente, la estructura se mantiene pero ahora hay dos cambios en la secuencia del terminador. En la Figura 44 se presentan las estructuras secundarias de las secuencias de 34 bases y se indican las bases que se intercambiaron de la secuencia del tallo. El código de colores indica las bases que fueron intercambiadas en la secuencia del

tallo, y subrayado se muestra la corrida de A's incorporado en lugar de la de U's en la secuencia silvestre.

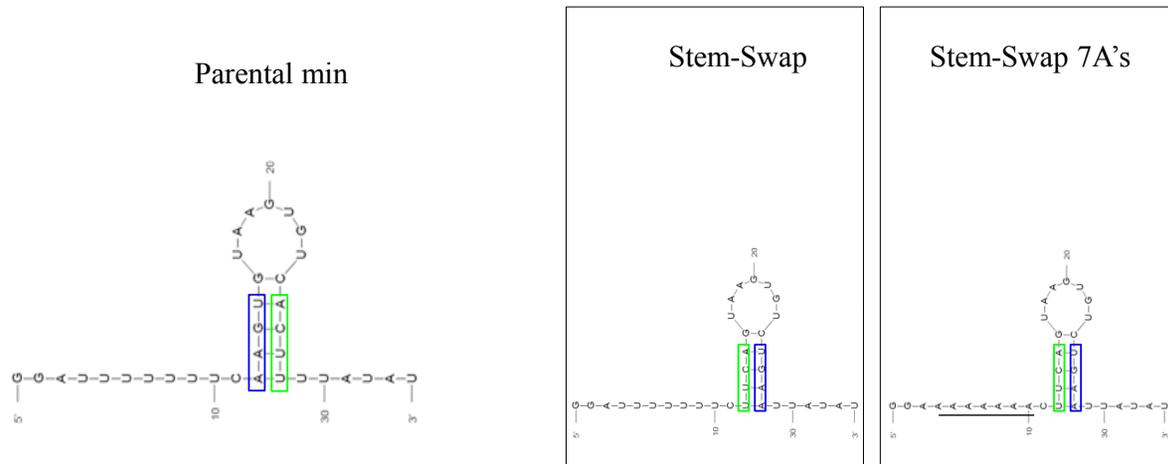


Figura 44. Estructuras secundarias de la secuencia del terminador de 34 pb silvestre y sus derivados. Los recuadros indican las bases del tallo que fueron intercambiadas, el orden azul-verde es para la secuencia parental, mientras que el orden verde-azul indica el intercambio en las secuencias Stem-Swap y Stem-Swap 7A's. Modelajes hechos con mFold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>). Referencia: Zuker, 2003.

Los tres plásmidos con los terminadores de 34 pb se confirmaron por secuenciación automática (Figura 45). Se indican los sitios de restricción usados para hacer la clonación.

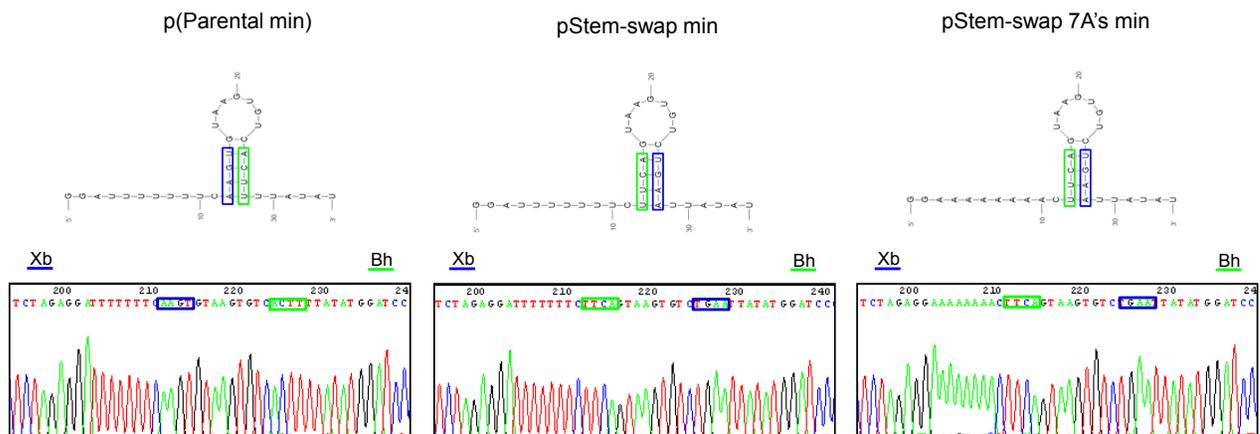


Figura 45. Verificación por secuenciación automática de las construcciones p(Parental min), pStem-swap min y pStem-swap 7A's min. Se muestran las estructuras secundarias y los electroferogramas de las reacciones de secuencia, así como los sitios de restricción utilizados en el proceso de clonación y la secuencia del terminador correspondiente. Los recuadros verde y azul indican las dos secuencias intercambiadas de la base del tallo de la estructura tallo-asa. Bh= *Bam*HI, Xb= *Xba*I.

Las células de *T. vaginalis* fueron transfedctadas con los plásmidos y se empleó la misma estrategia de análisis mostrada en la Figura 38 para probar su capacidad de detener la transcripción *in vivo*. El resultado se muestra en la Figura 46. En el panel Parental min se muestra que la secuencia de terminador mínimo de 34 pb es funcional, ya que sí se puede amplificar el producto control de 233 pb, pero no se amplifican los dos productos que indican transcritos posteriores a la secuencia terminadora. En este caso, por el tamaño de la secuencia incorporada, el producto de amplificación esperado que abarca río arriba y río abajo de la secuencia terminadora de la transcripción sería de 547 pb. Por lo tanto, el fragmento de 34 pb con la secuencia parental es capaz de detener la transcripción, sin necesidad de otros elementos río debajo de la corrida de 7 U's y de la estructura tallo-asa.

En el caso de la construcción con la secuencia del tallo intercambiada (Stem-Swap min), ésta también es capaz de detener la transcripción de igual manera que la secuencia parental (Figura 46, panel Stem-Swap min). Esto sugiere que la corrida de 4U's no es necesaria, ya que parte de esta secuencia se modificó. Por otra parte, el cambio de la secuencia del tallo sugiere que la función del terminador depende de la estructura tallo-asa pero es independiente de la secuencia. Finalmente se probó la construcción en la que se mantiene la secuencia de la estructura tallo-asa intercambiada pero en la que se cambió la corrida de 7 U's por una de 7 A's. Como se muestra en la Figura 46 panel Stem-Swap 7 A's los tres productos de RT-PCR se amplificaron, lo que indica que esta secuencia es incapaz de terminar la transcripción y por lo tanto la corrida de 7 U's es necesaria para llevar a cabo la función de terminador. Estos resultados, aunados a los obtenidos con la mutante 4U's mut (que tiene la corrida de 7U's pero carece de la estructura tallo-asa y no tiene función de terminador), demuestran que tanto la corrida de 7U's como la estructura tallo-asa son elementos esenciales del terminador.

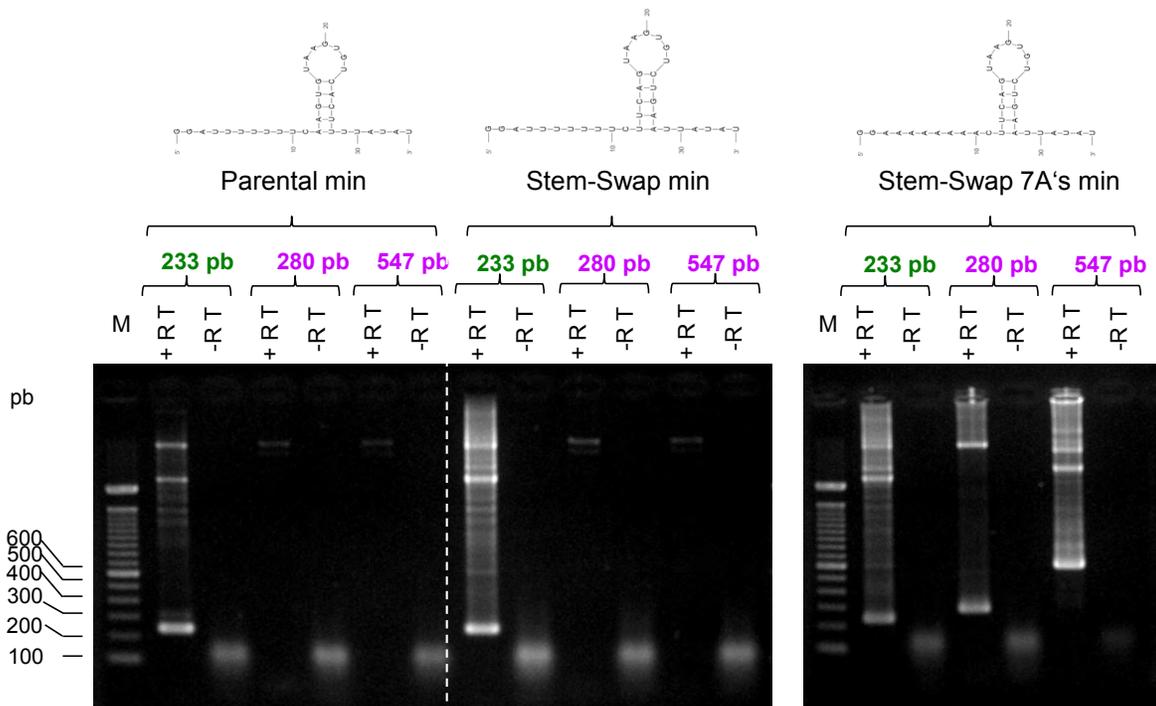


Figura 46. Análisis transcripcional de la secuencia terminadora mínima (34 pb) tanto de la secuencia silvestre (Parental min), como del cambio de las bases que conforman el tallo de la estructura tallo-asa (Swap min) y el cambio de la corrida de T's por A's manteniendo el cambio de la secuencia del tallo de la estructura tallo-asa (Stem-swap min 7A's). M= marcador de 100 pb de Invitrogen. +RT= Productos de PCR usando cDNA como plantilla. -RT= Controles hechos sin transcriptasa reversa.

Si el proceso de terminación en *T. vaginalis* fuera similar al de levadura, estos datos podrían sugerir que la estructura tallo-asa es sustrato de una proteína requerida para la terminación y que la corrida de U's es necesaria para producir una pausa en la transcripción (ver **Terminación en Introducción** (sección I.11) y Lang *et al*, 1995).

Para demostrar la especificidad de los productos amplificados, los productos de RT-PCR se analizaron por Southern blot. Se utilizó como sonda el fragmento de 655 pb del reportero Constante que comprende desde la región río arriba, la secuencia terminadora de la transcripción y la región río abajo (Figura 38). En la Figura 47 se muestran los resultados obtenidos. Las bandas de amplificación hibridan con la sonda del reportero Constante, lo que indica que se trata de los productos esperados.

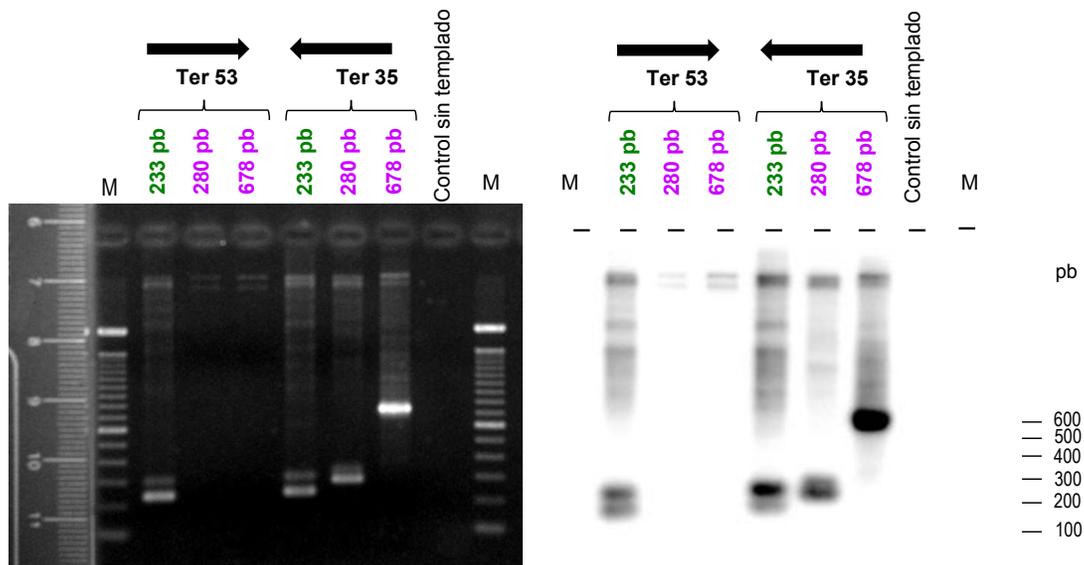


Figura 47. Confirmación de la identidad de las bandas observadas en el análisis por RT-PCR. Se analizaron las muestras obtenidas a partir de cDNA de las construcciones mostradas (+RT). En el Panel de la izquierda se muestra el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que fue transferido y los productos de amplificación hechos usando cDNA como plantilla. En el Panel de la derecha se muestra el autoradiograma de la hibridación tipo Southern blot. M= marcador de peso molecular. 233 pb: producto de amplificación previo a la secuencia terminadora probada. 280 pb: producto de PCR río abajo a la secuencia terminadora probada. 678 pb: producto de PCR que abarca tanto la región río arriba como río abajo a la secuencia terminadora de la transcripción. Las líneas en los autoradiogramas esquematizan los pozos del gel. Sonda: fragmento de 655 pb del reportero Constante

#### VI.11 Análisis *in silico* de las subunidades de la Pol I de *T. vaginalis*.

El presente trabajo constituye la primera caracterización de los elementos promotor y terminador de la transcripción en *T. vaginalis*. Por ello, se buscaron algunos de los elementos que constituyen la Pol I de *T. vaginalis*, ya que no hay reportes acerca de sus componentes.

La Pol I es una enzima de 14 subunidades que pesa 589 kDa. Existe una gran similitud estructural y funcional entre las tres polimerasas celulares lo cual permite hacer estudios comparativos a nivel de secuencia y de estructura (Vannini *et al*, 2012). En la Tabla 2 se muestran los números de acceso para algunas subunidades de la Pol I de *T. vaginalis* identificadas mediante BLAST, usando la secuencia de las subunidades reportadas para la Pol I de *S. cerevisiae*. Para reforzar su posible identidad con las subunidades de la Pol I, y tomando en cuenta que especialmente las relacionadas al core

catalítico son estructuralmente semejantes en las tres polimerasas, se hicieron modelos estructurales usando el servidor Phyre y Phyre2 (Kelley *et al*, 2009). Los modelos están basados esencialmente en las estructuras reportadas para la Pol II y algunas subunidades de Pol I de levadura. En la Figura 48 se muestran las subunidades (la nomenclatura usada en levadura y humano) de las cuales se logró modelar su estructura, así como los números de acceso en *T. vaginalis*. Solamente el UBF no se pudo modelar ya que aún no se ha obtenido su estructura cristalográfica.

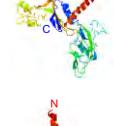
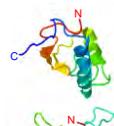
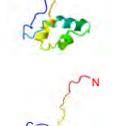
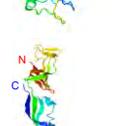
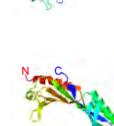
Core	A190	→ TVAG_172240 y TVAG_247430		✓
	A135	→ TVAG_353520		✓
	AC40	→ TVAG_016650		✓
	AC19	→ TVAG_190340		✓
	A12.2 N ribbon	} TVAG_482170		✓
	A12.2 C ribbon			
	Rpb5	→ TVAG_113600		✓
	RPB6	→ TVAG_221960		✓
	Rpb8	→ TVAG_186530		✓
	Rpb10	→ TVAG_434510		✓
	Rpb12	→ TVAG_283180		
	Tallo	A43	→ TVAG_415700	
Factores de transcripción	TBP	→ TVAG_291560 y TVAG_285070		✓
	Rrn3	→ TVAG_416970		✓

Figura 48. Identificación y estructura de las posibles subunidades de Pol I de *T. vaginalis*. Se muestran los nombres más usados para las subunidades de Pol I, los números de acceso en *T. vaginalis* y las estructuras predichas por los programas Phyre y Phyre2. El símbolo ✓ indica aquellos genes que están anotados como subunidades putativas de Pol I.

En la Figura 48 se muestra el número de acceso y las posibles estructuras de dos TBPs (TATA-binding protein) que tienen una similitud de 36.4% y una identidad del 39.75% pero que se estructuran de manera muy similar. (ver alineamiento en la Figura 49). Por otro lado, se ha reportado que los promotores de Pol II carecen de cajas TATA (Liston *et al*, 1999), por lo que llama la atención la presencia de proteínas tipo TBP en *T. vaginalis*.

```

TVAG_285070      MDAASFFDADGGVKEMNLDDSESM-KWYKEL--ENDADITVSTTEDITSL
TVAG_291560      MNPKEFI----GLEEANINNAKEFEQLVKEAQEESSEEITPESIQRNISL
*: . *:      *:* *::::: : ** *.: : ** .: : **

TVAG_285070      K----PKVNVIALAQYSCNKLNLSIASTIRNAEYKPKRIKAVVIRIRD
TVAG_291560      NQPPIPKVNVIVACVDYGC-KLDLLKITSSTRNSEYNPIRFPAAATLRNKE
:  *****:* .:.* *:::.*: *:::* * : *..* ::

TVAG_285070      PKATGLVFSNGKINIVGCRSVEDAKRAAHKFRKMLQQIGY-DVKLVNITI
TVAG_291560      PKATALAFKNGKVNIVGCKSADIALKAARCFGRLFKNIGIKDVKIKSFSI
****.*.*.***:*****:*. : * : ** : * : : : : ** ***: .: : *

TVAG_285070      SSIVATIHTPFNIAIAQIASADGHKLFQYRPEKFAGLIYRLTDPQCTML
TVAG_291560      ANMVATMDCKFPIHLESIASSPGHIKFATYNPEIYAGLIYRLASPKTTLM
.:****:. * * : .***: ** *. *.* ** :*****:.*: *::

TVAG_285070      IFQSGSIVLT-AKSEDDLTAGSNWIYPVLQKFEKKSMSSELLI
TVAG_291560      IYVSGKIIITGAKSEEELKAASAFIYPILRLFAS--TEPPAA
*: **.*:.* *****:*. * . :***:* : * . .

```

Figura 49. Alineamiento pareado entre las dos secuencias que posiblemente codifican para una proteína TBP (TATA-box Binding protein) en *T. vaginalis*. El alineamiento se hizo con Tcoffe (Notredame *et al*, 2000).

Sin embargo se sabe que en mamíferos y en levaduras las RNA polimerasas necesitan de la interacción con TBP para el reclutamiento de la Pol I en el promotor ribosomal. En levadura se sabe que TBP es reclutada en el promotor del cistrón ribosomal (van Werven *et al*, 2009).

Por lo tanto se decidió generar una TBP recombinante de *T. vaginalis* (TVGA\_291560) con un epítipo de 6 histidinas para generar una herramienta que permitiera iniciar los estudios del posible papel de TBP en las maquinarias

transcripcionales de *T. vaginalis*. Los dos marcos de lectura para TBP guardan entre ellos una identidad del 39.75%. Con respecto a la TBP de levadura (*YER148W*), la TBP TVAG\_285070 tiene una identidad del 31.2%, mientras que la TBP TVAG\_291560 tiene una identidad del 36.9%. Por lo tanto, se inició el trabajo con la TBP TVAG\_291560.

En la Figura 50, en el Panel A, se muestra el alineamiento de varias secuencias de aminoácidos de TBP's, tanto de *T. vaginalis* como de otros organismos. Se destaca que existe gran diversidad en la secuencia del extremo amino terminal, pero la secuencia de unión a DNA (TA(T/A)A(T/A)AA) es muy conservada desde Arqueobacterias hasta mamíferos (ratón) (Tan *et al*, 1998 y Langer *et al*, 1995). En el Panel B se muestra un cladograma con la TBP de *T. vaginalis* TVAG\_291560 el cual muestra a esta secuencia filogenéticamente alejada del resto de las TBPs.

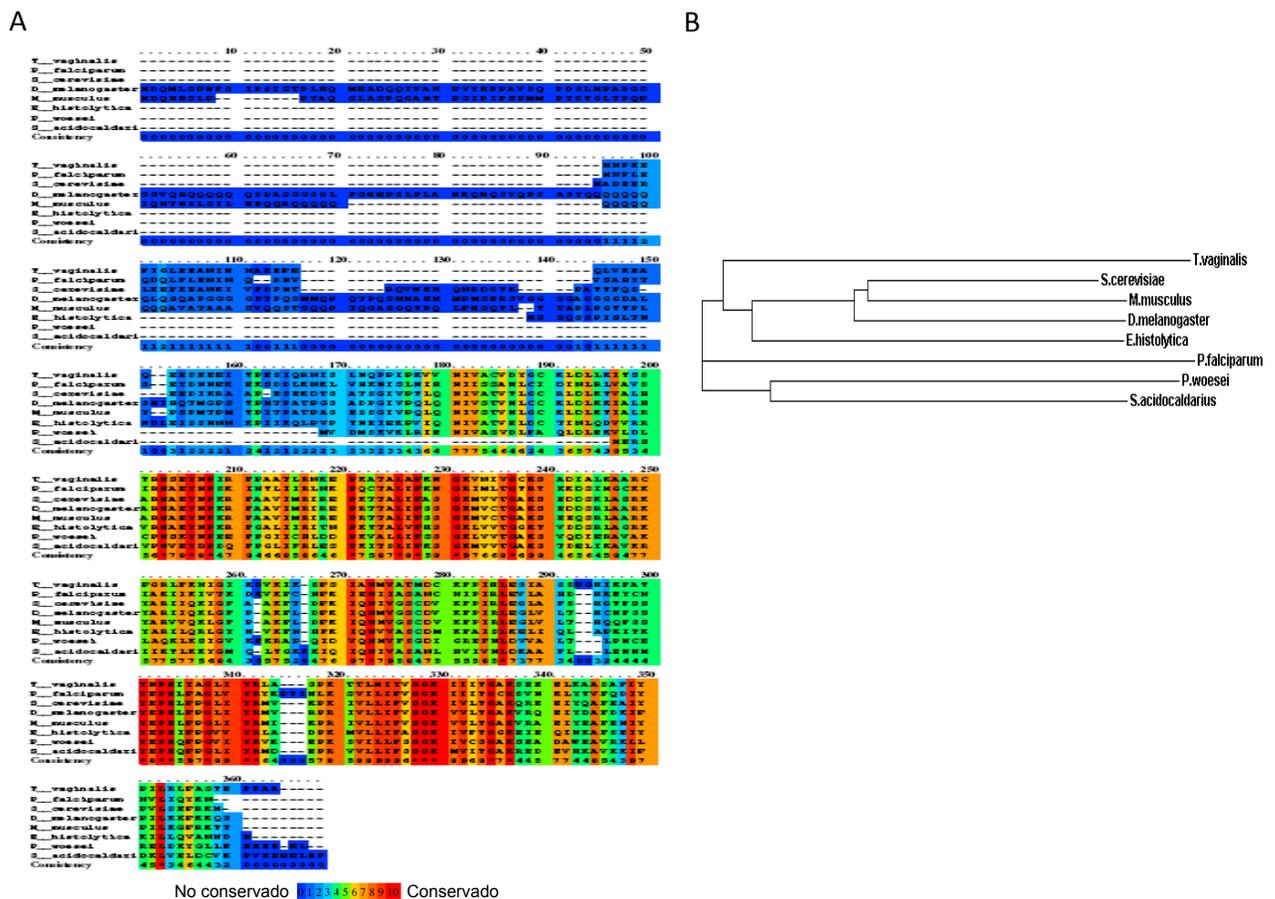


Figura 50. Alineamiento múltiple de varias secuencias para la proteína TBP. Se muestra en el Panel A el alineamiento múltiple, con el código de colores a la izquierda para el grado de conservación. Se muestran en el siguiente orden: *T. vaginalis*, *P. falciparum*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *M. Musculus*, *E. histolytica*,

*P. wosei* y *S. acidocaldarius*. Se muestra en Panel **B** el cladograma de las secuencias comparadas en el alineamiento múltiple. Se usó PRALINE para el alineamiento y clustalW para el cladograma: <http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/> y [http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web\\_clustalw2/toolform.ebi](http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustalw2/toolform.ebi).

Con base en los datos anteriores, se decidió construir un plásmido de expresión en bacterias que permitiera sobre expresar el producto del gene TVAG\_291560 (TBP) con una etiqueta de 6 histidinas añadidas al extremo amino terminal (**Materiales y Métodos**). En la Figura 51 se muestra un gel de SDS PAGE al 10% que muestra la inducción de la proteína TBP de *T. vaginalis* expresada en *E. coli*. Se muestra la inducción en dos cepas diferentes de *E. coli*, la M15/pREP4 y la BL21 Rosseta. Al inducir con 1 mM de IPTG en la cepa M15/pREP4 se puede ver el aumento de una banda un poco arriba del marcador de 25 kDa, lo cual coincide con el peso molecular teórico de 26.7 kDa (TBP con el epítipo de 6XHis). Se observa también una inducción en la cepa BL21 Rosseta, pero no es tan eficiente como en M15/pREP4.

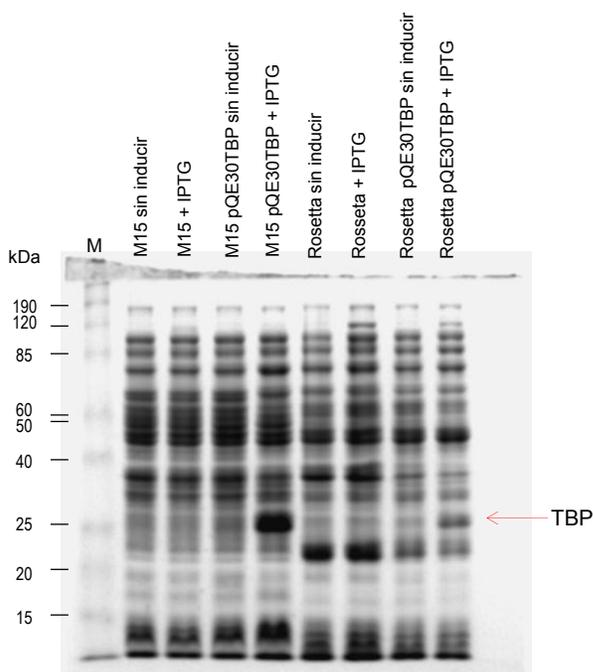


Figura 51. Inducción de la proteína TBP recombinante. El plásmido pQE30 TBP fue transformado en las cepas M15/pREP4 y en la cepa BL21(Rosetta). Se crecieron a una  $OD_{600} \sim 0.8$  y se añadió 1 mM de IPTG. Se incubó por cinco horas. Se analizó en un gel SDS-PAGE al 10% gel separador. En ambas cepas se observa

inducción, pero es más abundante en M15/pREP4. M= marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen).

Para confirmar que se trata de la proteína recombinante, la M. C. Lluvia Rosas Hernández realizó un ensayo de western blot para determinar que la proteína TBP contiene la etiqueta de 6XHis y está en el peso molecular esperado. En la Figura 52 se muestra como en la cepa M15/pREP4 se induce una proteína del peso molecular esperado y que reacciona con el  $\alpha$ His. En el Panel **A** se muestra el perfil de los extractos totales de *E. coli* obtenidos induciendo y sin inducir la proteína recombinante TBP. En el Panel **B** se muestra el western blot revelado con  $\alpha$ His para reconocer las proteínas etiquetadas con epítopes de 6X His. Como se puede apreciar, la proteína recombinante obtenida se expresa y tiene un epítipo de 6X His.

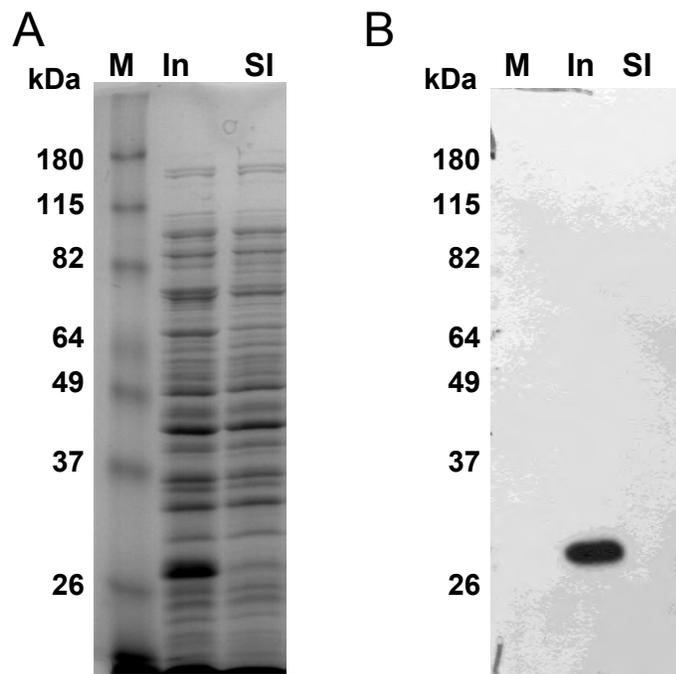


Figura 52. Western blot  $\alpha$ His de extractos totales de la cepa M15/pREP4 transformada con el plásmido pQE30 TBP. Imagen cortesía de la M. C. Lluvia Rosas Hernández. M= marcador de peso molecular. In= extractos totales de células M15/pREP4 pQE30 TBP inducidas con 1 mM de IPTG. SI= extracto total de células M15/pREP4 pQE30 TBP sin inducir. kDa= marcador de peso molecular.

Finalmente, se analizó si el gen para TBP (TVAG\_291560) se expresa en células de *T. vaginalis* y no se trata de un pseudogene. Para ello se abordaron dos estrategias: realizar

un análisis *in silico* de los elementos que dirigen la transcripción y el procesamiento de los mRNAs de *T. vaginalis*, y estudiar la expresión de este gene por RT-PCR. Primero, se analizó la secuencia río arriba del ATG de inicio de la traducción de este gene (localizado en el contig DS113233:60511,91218) y se encontró que tiene dos posibles secuencias Inr (Smith *et al*, 2011). En la Figura 53 se muestran los posibles elementos requeridos para la expresión de TBP en *T. vaginalis*. La línea azul divide los posibles elementos promotores (parte superior de la imagen) y las señales para el procesamiento y poliadenilación de transcritos en el extremo 3' (parte inferior de la imagen). Subrayados y en la parte superior de la imagen, se muestran dos Inr putativos posibles, siendo el número 2 el más probable, ya que se encuentra a 14 bases del sitio de inicio de la traducción, mientras que el Inr 1 está a 39 bases. La secuencia más común para un Inr es la tipo 1: TCA(T/C)(T/A)(T/A)(T/C)(T/A)(T/C)(C/A)(T/A)(C/A)T(T/A); le sigue en frecuencia la tipo 2: (T/C)(T/C)AN(T/A)(T/C)(T/C). Hay dos tipos más de Inr menos frecuentes, que son CCTTT y (A/G/T)(A/G)C(G/C)G(T/C)T(T/A/G), pero ninguna de estas dos últimas secuencias se pudo identificar en la región río arriba (Smith *et al*, 2011). Se señala también que en el extremo 3' están presentes las señales de procesamiento y poliadenilación de mRNAs de *T. vaginalis*. En el extremo 3' se encuentran dos señales de poliadenilación (TAAA) seguida de posibles sitios de procesamiento (Y(A)<sub>2-5</sub>TT) y regiones ricas en T's (Espinosa *et al*, 2002 y Fuentes *et al*, 2012).

**Secuencia 5'**

TAAGGGGATATCCCCTAAATAAAATACATATTTGATATCGAGAACTTGCTTCCACTCATT 14940

Inr putativo tipo 1

Inr putativo tipo 2

ATTTAACTTTCATTGAAAATATGAGGGGGAATAACCCCGCCACTTCCCAAAAATTTTAA 15000

ATG inicio de TBP

ATGAATCCAAAAGAATTTATTGGCTTAGAAGAAGCTAATATAAATAATGCAAAAAGAATTC TBP

**Secuencia 3'**

TAA codón de TBP

TAATTTAATCCAATTTTGTTTATTAAATTTCTATTGTTTCCTTTATAAATACTATTTTCC  
 ACTATAGAGTATATCAAGAGCCAATTTTCATTCATTTTTAGTATGATTTTTTGCTATTTAA  
 AATGATATCTTTTTA

Figura 53. Análisis de los elementos implicados en la expresión del gene TBP TVAG\_291560.

Por los elementos presentes en los extremos 5' y 3', es probable que el gene de TBP sea expresado, especialmente porque el Inr tipo 2 se encuentra a una distancia adecuada para iniciar la transcripción del gene de TBP. Para determinar experimentalmente la expresión, se sintetizó cDNA a partir de RNA poliA+ (donado por Vanesa Fuentes Morales), se hicieron dos PCRs: uno con oligonucleótidos específicos para TBP (TBPFw y TBPRv., Tabla S1) y otro PCR usando el oligo Fw de TBP (Tabla S1) y como reverso el oligonucleótido (AUAPB) específico para la cola de poliA. En la Figura 54 Panel A se muestran los resultados del RT-PCR del mRNA de TBP. Se obtuvieron las bandas esperadas de 714 y 750 pb, aunque también se amplificaron productos adicionales al usar el oligonucleótido AUAPB. Para confirmar que el amplificado obtenido fuera el correcto se digirió el producto de PCR con *HhaI* que corta al producto amplificado de TBP en dos fragmentos uno de 346 y otro de 368 pb (carriles Hh PCR TBP y HhPCR TBP + AUAPB). Lo segundo que se hizo, usando el fragmento clonado y secuenciado en el plásmido pQE30 que sobre expresa la proteína TBP recombinante, se usó como sonda en un ensayo tipo Southern blot (Figura 54).

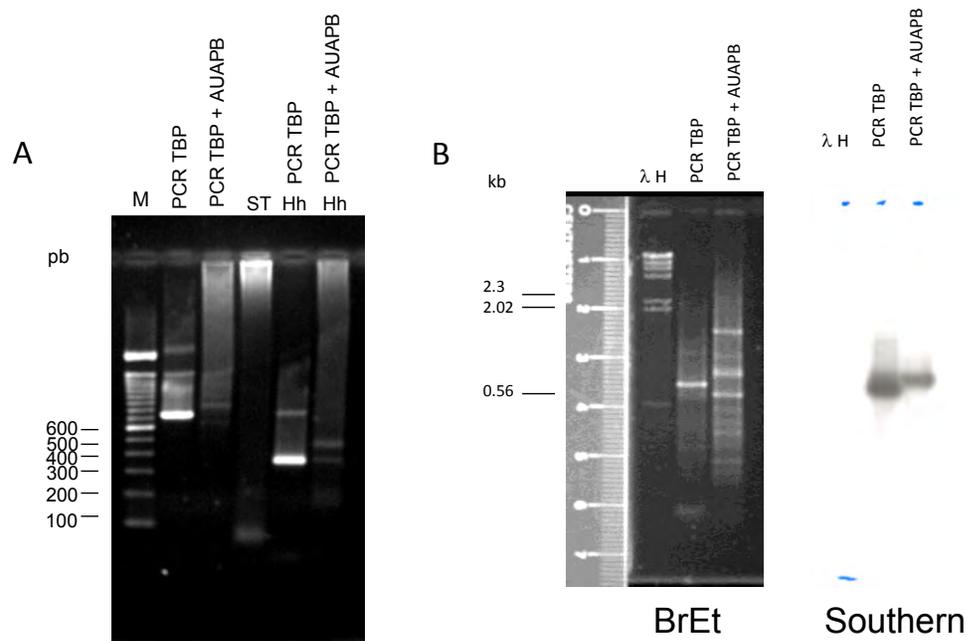


Figura 54. Análisis de la expresión de TBP en *T. vaginalis*. M= marcador de peso molecular. Hh= digestión con *HhaI*. ST= control sin templado. En el Panel A se muestran los productos de amplificación por PCR a partir de cDNA usando dos juegos de oligonucleótidos específicos para TBP (TBP30Fw y TBP30Rv, Tabla S1). El PCR TBP + AUAPB se hizo con los oligonucleótidos TBP30Fw y el reverso fue el oligonucleótido AUAPB, específico para la cola de poliA (ver **Materiales y Métodos**). Panel B, autorradiograma del análisis por Southern blot de los productos de RT-PCR.

Los resultados anteriores demuestran que el gene de TBP TVAG\_291560 se expresa y tiene un 3' UTR de aproximadamente 50 bases, lo que concuerda con el largo de los UTRs y las colas de poli A en *T. vaginalis*.

## VIII. Discusión:

Los genes ribosomales son esenciales en la vida y proliferación celular ya que están íntimamente relacionados con las condiciones de disponibilidad de nutrientes, así como el ciclo celular. La desregulación de estos procesos puede llevar a la muerte celular o bien a la mala ubicación de las células durante el desarrollo o a una proliferación excesiva como en el caso del cáncer.

La regulación de la expresión de los genes ribosomales ocurre tanto a nivel genético, es decir, a nivel de secuencias regulatorias en el promotor ribosomal o bien, por el número de copias presentes en el genoma, lo que aumenta el número de unidades activas transcripcionalmente (Moss, 2004). El número de copias varía de un organismo a otro y van desde una decena hasta miles de copias, que es el caso de los mamíferos. También hay un efecto ambiental sobre la expresión de los genes ribosomales, como son el caso de la disponibilidad de nutrientes o la presencia de factores que inducen la proliferación celular, lo cuales afectan directamente la actividad transcripcional de la Pol I. En condiciones proliferantes, el 50% de la actividad de síntesis celular se concentra en la producción de ribosomas. Si se suma con la actividad de la Pol III se acerca al 80% (Moss, 2004 y Paule *et al*, 2000).

La regulación de los niveles de rRNA ocurre en cuatro puntos generales: el inicio de la transcripción, la elongación del transcrito, la terminación de la transcripción y el procesamiento de los transcritos. Un factor regulatorio adicional, es la degradación del rRNA, que depende de muchos factores celulares y no únicamente de un exceso de transcritos ribosomales (Moss *et al*, 2006).

La transcripción de los genes ribosomales depende de varios factores, entre ellos el número de copias presentes en el genoma, cuántas de ellas son activas, las secuencias regulatorias y los factores internos y externos que modulan la actividad de la Pol I.

En la Figura 4 de la **Introducción**, se muestra una preparación por Miller spreads de unidades ribosomales aisladas, técnica que permite visualizar el proceso transcripcional de los genes ribosomales de manera directa, a través de microscopía electrónica, al evidenciar estructuras llamadas “Árboles de Navidad”. En la Figura 4 destaca que aparentemente no hay diferencias en la actividad transcripcional de cada una de las unidades transcripcionales ribosomales. Pero como se muestra en la Figura 55, se ha documentado también que no

todas las copias son igualmente activas ni lo son en todo momento, y eso se debe tanto a la regulación intrínseca de cada copia, como a su posición en el nucléolo y al silenciamiento por la estructura de la cromatina de manera local o bien por la región que ocupan en el genoma en su conjunto. Destaca cómo cada una de ellas están delimitadas, se puede ver la actividad de cada una de las copias, ya que tanto el inicio como el término son claramente visibles (Raska *et al*, 2004).

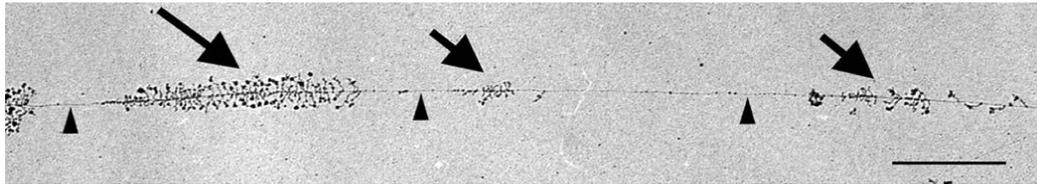


Figura 55. Imagen de una preparación por Miller spreads a partir de DNA de levadura. Los triángulos negros indican la posición de carga de la Pol I. Las flechas negras indican las copias del cistron ribosomal presentes en la imagen. La barra de escala corresponde a 1  $\mu$ m. Tomada de la referencia Raska *et al*, 2004.

El segundo paso de regulación transcripcional es a nivel de los elementos en *cis* que presenta el promotor ribosomal. Existen reportes de varios tipos de secuencias de regulación descritos en mamíferos (ratón) y en protozoarios (ver **Introducción** y Längst *et al*, 1997, Paule *et al*, 2000 y Figueroa-Angulo *et al*, 2006).

Por todo ello, estudiar la región intergénica, especialmente en la búsqueda de los elementos que regulan el inicio y termino de la transcripción del cistron ribosomal de *T. vaginalis* permite conocer las bases moleculares del reconocimiento del promotor por Pol I y por ende, comenzar a entender una parte fundamental del metabolismo de éste organismo de importancia biomédica.

En este trabajo se realizó un estudio a nivel molecular de las regiones involucradas en el proceso de inicio y término de la transcripción del cistron ribosomal de *T. vaginalis*. Los análisis comprenden deleciones y mutaciones para delimitar la región promotora, así como ensayos para determinar la región que dirige la terminación de la transcripción en el extremo 3' del gene 28S. Lo cual pudo ser realizado gracias al desarrollo de un sistema reportero transcripcional.

Para establecer el sistema reportero se consideraron dos objetivos: por un lado, se buscó acotar lo más posible la secuencia que permite la transcripción de los genes reporteros y por otro lado, se buscó determinar la secuencia capaz de dirigir la terminación de la transcripción. El reportero transcripcional se basó en el uso de secuencias reporteras cuya transcripción se determinó mediante RT-PCR. El criterio que se usó para identificar una secuencia que posiblemente fuera un terminador, fue que río abajo del gene 28S era la única secuencia con una corrida de T's y como se mencionó en las secciones anteriores, es un criterio si bien no universal, si propio de las secuencias terminadoras (Richard *et al*, 2009).

Con base en los hallazgos presentados para delimitar la secuencia promotora de la transcripción, se determinó la presencia de un solo elemento promotor. Este hallazgo es reforzado por evidencia experimental, reportada previamente, en la que mediante ensayos de tipo northern blot se encuentra que no hay transcritos río arriba de la secuencia del TSP. Esto muestra que no hay promotores espaciadores como en mamíferos (López-Villaseñor *et al*, 2004).

Al realizar una delección de -50 a +50 pb se eliminó por completo la funcionalidad del promotor, lo que sugería que entre las bases -128 y -50 relativas al TSP, se encontraba una secuencia regulatoria. Al analizar la secuencia se encontró que existían dos secuencias repetidas tanto en la vecindad del TSP como en la región -128 a -50, una de ellas con una corrida de A's y con la secuencia CGAAAAA, que es la más cercana al TSP (Heix *et al*, 1995). Al hacer la mutagénesis en ambas cajas se encontró que la denominada Box 2 distal participa de manera esencial en la actividad del promotor, lo cual sugiere que tiene un papel de tipo UCE probablemente necesaria para el reclutamiento y correcto posicionamiento de la Pol I. Para poder decir, sin ambigüedad, qué tipo de elemento es así como el papel que desempeña en la activación del promotor ribosomal de *T. vaginalis*, se requiere identificar los elementos proteicos que reconocen esta secuencia.

También se analizó la secuencia en la región del TSP. Se hicieron 3 cambios por mutagénesis dirigida, teniendo como resultado una pérdida total de actividad, lo que sugiere que el reconocimiento del promotor por Pol I es secuencia específica. Aunado a lo observado con el posible UCE, parece que en *T. vaginalis*, al tener pocas copias del cistrón ribosomal (solamente 14 copias en un solo locus) la Pol I debe ser reclutada al promotor



detener la transcripción, así como determinar cuáles son las secuencias necesarias para llevar a cabo la terminación de la transcripción.

El análisis de la secuencia de 165 pb río abajo del gene 28S reveló que es la única secuencia presente en la región intergénica, en proximidad el final del gene 28S que tiene una corrida larga de T's (7 bases) y uno pequeño de tan solo 4 T's, ambas corridas son U's en el transcrito. La evidencia experimental mostró que es una secuencia capaz de detener la transcripción y que es dependiente de la polaridad en la que se encuentra. La polaridad es una propiedad que se encuentra en varias secuencias terminadoras de la transcripción. La sensibilidad a la orientación en las secuencias terminadoras de la transcripción depende tanto de la secuencia misma (al invertirla se pierden las corridas de U's) como de la estructura secundaria que adopta al ser transcrita (permite la pausa de la Pol I así como ser sustrato de las endonucleasas necesarias para liberar el transcrito) (Reeder *et al*, 1997).

Los resultados del análisis de la secuencia terminadora de la transcripción mostraron que es necesaria tanto la estructura de tallo-asa (independiente de la secuencia) como una corrida de T's, sugiriendo que es sustrato de una endonucleasa indispensable para la liberación del transcrito. También se sugiere que la corrida de U's genera una pausa necesaria para la liberación del transcrito (Peculis, 2002 y Reeder *et al*, 1997).

En resumen, lo que se ha encontrado en el presente trabajo es que la señales tanto de inicio como de término de la transcripción por Pol I, son muy compactas a diferencia de lo que se ha visto en otros organismos (ver **Introducción**). La región intergénica en *T. vaginalis* es de tan solo 1.6 kpb, mientras que las más pequeñas documentadas son de aproximadamente 2 kpb. Además, éstas tienen elementos regulatorios típicos, como los mostrados en la Figura 4, especialmente las secuencias repetidas características, mientras que en el caso de *T. vaginalis*, están ausentes (Sollner-Webb *et al*, 1991 y Long *et al*, 1980). La secuencia terminadora funcional es de 34 pb, mientras que en otros organismos varía entre 100 y 500 pb (dependiendo del número de secuencias repetidas, como en mamíferos, o del número de estructuras tallo-asa, como en el caso de levadura). Además, las secuencias terminadoras funcionales de otros organismos se encuentran típicamente entre 100 y 500 pb río abajo del gene 28S, mientras que en *T. vaginalis* es una secuencia que se encuentra tan sólo a 3 bases del último nucleótido codificador del rRNA 28S. En otros protozoarios parásitos, como es el caso de *L. amazonensis*, la secuencia terminadora

tiene río arriba del motivo central (con secuencia CCCTTTT), una estructura tallo-asa. También es importante señalar que aparentemente la secuencia de *L. amazonensis* la orientación no parece afectar su funcionamiento como secuencia terminadora de la transcripción (Abreu-Blanco *et al*, 2010), una diferencia importante con la secuencia terminadora de la transcripción de *T. vaginalis*.

La secuencia terminadora de la transcripción identificada no presenta homología con la secuencia que une en otros organismos el factor de término (en levaduras Reb1p y en mamíferos TTF1). El único elemento que se encuentra presente en *T. vaginalis* es la corrida de U's. En otros organismos se ha propuesto que la corrida de U's es necesaria para la liberación del transcrito y para generar una pausa en la transcripción. En general, la corrida de U's se localiza río arriba del sitio de unión del factor de liberación (Lang *et al*, 1995), donde quizá sea la estructura de tallo-asa la que es reconocida por dicho factor en *T. vaginalis*. En algunos casos (como en ratón y en *Xenopus*) se encuentran secuencias terminadoras río arriba del promotor o del TSP cuya función es detener la transcripción de los promotores espaciadores y a la vez estimular la transcripción (Richard *et al*, 2009). En el caso de *T. vaginalis* éste no es el caso, ya que una búsqueda del elemento de 34 pb mostró que dicho elemento únicamente se encuentra en el extremo 3' del gene 28S y no en otra parte de la secuencia intergénica.

Muchos terminadores dependen de las corridas de U's (Lang *et al*, 1995), aunque existen excepciones, como es el caso del terminador de *Xenopus borealis*. Éste depende de una corrida de C's, lo cual sugiere que el mecanismo también varía de una especie a otra. Sin embargo, quizás se conserve el mecanismo funcional, ya que una corrida de C's puede inducir también una pausa o un deslizamiento en la transcripción que permite el desapareamiento del transcrito de la hebra plantilla. De cualquier modo, es necesario desestabilizar la interacción ácido nucleico-proteína (Jeong *et al*, 1996 y Lang *et al*, 1995). También, podría funcionar como señal de liberación del transcrito (Labhart *et al*, 1990).

Comparativamente, lo que se observa en la transcripción mediada por Pol II, es que los elementos regulatorios indispensables son solamente un elemento central ubicado aproximadamente entre 6 y 20 pb río arriba del inicio de la traducción y tienen una secuencia conservada (T/C/A)(C/T)A(+1)(T/C/A)(T/A), donde el +1 corresponde al inicio de la transcripción. Tanto la secuencia como la posición relativa al inicio de la traducción

son algo muy conservado y aparentemente no requieren de otros elementos (como la secuencia de la TATA Box) para ser funcionales (Liston *et al*, 1999, Smith *et al*, 2011(A), Lau *et al*, 2006 y Schumacher *et al*, 2003).

En el caso de la señal de poliadenilación en *T. vaginalis* ésta se encuentra en el extremo 3' de los RNA mensajeros, frecuentemente está acoplada al codón UAA de paro de la traducción y tiene extremos 3' no traducidos (3' UTR) que generalmente no superan las 100 pb. Asimismo, la señal de poliadenilación es más compacta con respecto a la que se conoce en otros organismos (en *T. vaginalis* es UAAA en lugar del hexanucleótido consenso AAUAAA), señalando una diferencia más entre éste organismo y el resto de los eucariontes (Espinosa *et al*, 2002 y Fuentes *et al*, 2012).

En resumen, los elementos de control transcripcional en *T. vaginalis* son más compactos que en otros organismos. Quizá ésta simplificación se deba a los elementos regulatorios y al nicho ecológico que ocupa *T. vaginalis*, como parásito estricto con un ciclo de vida y propagación relativamente simple. Todo esto basándose en que es un organismo de divergencia evolutiva temprana, por lo que es posible sugerir que la regulación genética es un reflejo del estilo de vida de un parásito estricto (Embley *et al*, 2006).

## **IX. Conclusiones:**

Esta es la primera caracterización funcional de un promotor de tipo Pol I en tricomonadidos. El promotor está comprendido en una región compacta de aproximadamente 180 pb, en la que se encuentra un TSP único y un posible elemento tipo UCE. Respecto a la terminación transcripcional, se identificó un elemento funcional de 34 pb localizado río abajo del gen 28S. Se demostró su dependencia de polaridad y se logró establecer el papel de una corrida de U's así como una estructura de tallo-asa en su funcionalidad. El presente trabajo presenta las bases para el estudio de Pol I en protozoarios de divergencia evolutiva temprana.

## X. Perspectivas

Con la presente caracterización de los elementos regulatorios del cistrón ribosomal de *T. vaginalis*, se propone hacer una caracterización de los componentes de la Pol I, ya que no se han caracterizado las subunidades que la componen salvo por las subunidades identificadas en el presente trabajo. También, se desconocen los elementos de la Pol I que interaccionan con las secuencias identificadas en el presente trabajo, tanto con el promotor como con la secuencia terminadora de la transcripción del cistrón ribosomal.

En resumen, surgen las siguientes preguntas: ¿cuáles son los elementos que conforman a la Pol I de *T. vaginalis*? ¿Existe, como en otros organismos, una interrelación de la TBP con las tres RNA polimerasas celulares? Se requieren más estudios para elucidar estas cuestiones. Se propone usar la TBP recombinante para realizar los siguientes ensayos: localización nuclear e interacciones con otras proteínas para determinar con cuales subunidades de las tres RNA polimerasas celulares es capaz de interaccionar, y finalmente, evaluar que secuencias de DNA es capaz de reconocer.

Por ello se proponen las siguientes perspectivas:

- Caracterizar bioquímicamente las subunidades que componen la Pol I de *T. vaginalis*.
- Identificar en qué condiciones las subunidades RPA31 (aparentemente específicas de protozoarios) y TBP son necesarias para la transcripción y si alguna de éstas interacciona con la Pol I de *T. vaginalis*.
- Identificar bajo qué condiciones TBP es esencial para la transcripción (en todos los tipos de promotores).
- Caracterizar los factores proteicos necesarios para llevar a cabo la terminación de la transcripción.

## XI. Anexos:

Tabla S1. Oligonucleótidos usados en el presente trabajo

Nombre	Secuencia 5'→3'	Función
CATFw	CCGCTCGAGTCACTGGATATACCACCG	Oligonucleótido delantero para amplificar el gene <i>cat</i> y generar el reportero Constante. El sitio de restricción <i>XhoI</i> está subrayado.
CATcRv	CCGACGCGT <i>CGGGCAGGAGTGCGGCGAGGCTGCCAC</i> TCATCGCAGTA	Oligonucleótido reverso para amplificar el reportero Constante, un fragmento del gene <i>cat</i> . Las cursivas indican la secuencia ancla empleada para la síntesis de cDNA*. El sitio de restricción <i>MluI</i> está subrayado.
GFPFw	CCGCTCGAGATGGTGTAGCAAGGGCGAG	Oligonucleótido delantero para amplificar la secuencia reportera Variable, originalmente un fragmento del gene <i>gfp</i> . El sitio de restricción <i>XhoI</i> está subrayado.
GFPcRv	CCGACGCGT <i>CGGGCAGGAGTGCGGCGAGGAGTGTAGC</i> TCGTCCATGC	Oligonucleótido reverso para amplificar el reportero Variable, originalmente un fragmento del gene <i>gfp</i> gene. Las cursivas indican la secuencia ancla para la síntesis de cDNA*. El sitio de restricción <i>MluI</i> está subrayado.
TerFw	GCTCTAGAGGATTTTTTCAAGTGTAAAG	Oligonucleótido delantero para amplificar la secuencia terminadora de 165 bp, localizada río abajo del gene 28S. El sitio de restricción <i>XbaI</i> está subrayado.
TerRv	CGGGATCCAGTATGTGTATTAGTTAGC	Oligonucleótido reverso para amplificar la secuencia terminadora de 165 bp, localizada río abajo del gene 28S. El sitio de restricción <i>BamHI</i> está subrayado.
Fw-991/+277	CCCAAGCTTCGTAAGATATATACTATTCCC	Oligonucleótido delantero para genera la deleción 5' -991/+277 relativa al TSP. El sitio de restricción <i>HindIII</i> está subrayado.
Fw-748/+277	CCCAAGCTTCGATTTATGCGTGTGGAAC	Oligonucleótido delantero para genera la deleción 5' -748/+277 relativa al TSP. El sitio de restricción <i>HindIII</i> está subrayado.
Fw-448/+277	CCCAAGCTTTATCTTGAAGAAAGTTCG	Oligonucleótido delantero para genera la deleción 5' -448/+277 relativa al TSP. El sitio de restricción <i>HindIII</i> está subrayado.
Fw-231/+277	CCCAAGCTTAGCACACTTTACCATATAC	Oligonucleótido delantero para genera la deleción 5' -231/+277 relativa al TSP. El sitio de restricción <i>HindIII</i> está subrayado.
Fw-128/+277	CCCAAGCTTCTCCACAACATTGCCCATAC	Oligonucleótido delantero para genera la deleción 5' -128/+277, -128/+129 y -128/+50 relativa al TSP. El sitio de restricción <i>HindIII</i> está subrayado.
Fw+1/+277	CCCAAGCTTGGGAAAGTTGCAAACGATTC	Oligonucleótido delantero para genera la deleción 5' +1/+277 relativa al TSP. El sitio de restricción <i>HindIII</i> está subrayado.
RvFullETS <i>NruI</i>	CCCGGTCGCGATTAATAAAGATGTATTAAG	Oligonucleótido reverso para amplificar todo el ETS, Todas las construcciones que contienen el ETS complete se empleo este oligonucleótido para generarlas. El sitio de restricción <i>NruI</i> está subrayado.
ETS-1247/+129	CCCGGTCGCGAGACAGAATCAATATGTAAC	Oligonucleótido reverso para generar las construcciones -1247/+129 y -128/+129. El sitio de restricción <i>NruI</i> está subrayado.
ΔETS-1247/+1	CCCGGTCGCGACATAGGAGCAAAGGTCATG	Oligonucleótido reverso para generar las construcciones -1247/+1. El sitio de restricción <i>NruI</i> está subrayado.
Fw +50	AAGCTTTCATCGATTGAATTTTTG	Oligonucleótido delantero para genera la deleción 5' y 3' -50/+50 relativa a la secuencia del TSP. El sitio de restricción <i>HindIII</i> está subrayado.
Fw -50	TGCGAGATTTAGTAAGAAATGCTTACTC	Oligonucleótido reverso para genera la deleción -50/+50 y -128/+50. El sitio de restricción <i>NruI</i> está subrayado.
TSPMutantSense	GACCTTTTGCTCCCTAGTTGAAAGTTGCAAACG	Oligonucleótido sentido para la mutagénesis de la región del TSP
TSPMutantComp	CGTTTTGCAACTTTCAACTAGGAGCAAAGGTC	Oligonucleótido complementario para la mutagénesis de la región del TSP
Box1(distal)Mut Sent	CAACATTGCCATACAAAGTGTACGCGGGGACGCTT GTGTATG	Oligonucleótido sentido para mutagenizar la posible secuencia UCE caja 1 (Box1) del promotor ribosomal.
Box1(distal) Mut Comp	CATACACAAGCGTCCCCGCGTACACTTTGTATGGGC	Oligonucleótido complementario para mutagenizar la posible secuencia UCE

	AATGTTG	caja 1 (Box1) del promotor ribosomal.
Box 2(distal) Mut Sent	CTTGTGTATGAGCAAGACTACACAATACCTGAAACT CGACTC	Oligonucleótido sentido para mutagenizar la posible secuencia UCE caja 2 (Box2) del promotor ribosomal.
Box 2(distal) Mut Comp	GAGTCGAGTTTCAGGTATTGTGTAGTCTTGCTCATA CACAAG	Oligonucleótido complementario para mutagenizar la posible secuencia UCE caja 2 (Box2) del promotor ribosomal.
TerFw 7U's mut	CTTGCTCTAGAGGATGTGTGTCAAGTGTAAGTGTC	Oligonucleótido sentido para hacer la mutagénesis de la secuencia terminadora, reemplazo de la corrida de 7T's.
TerRV 7U's mut	GACACTTACACTTGACACACATCCTCTAGAGCAAG	Oligonucleótido complementario para hacer la mutagénesis de la secuencia terminadora, reemplazo de la corrida de 7T's.
TerFw 4U's mut	CAAGTGAAGTGTC AATGTGATATCCACGGGCCGC	Oligonucleótido sentido para hacer la mutagénesis de la secuencia terminadora, reemplazo de la corrida de 4T's.
TerRv 4U's mut	GCGGCCCGTGGATATCACATTGACACTTACACTTG	Oligonucleótido complementario para hacer la mutagénesis de la secuencia terminadora, reemplazo de la corrida de 4T's.
Parental Min sense	CTAGAGGATTTTTTCAAGTGTAAGTGTCACCTTTTA TATG	Oligonucleótido sentido para el ensamblaje <i>in vitro</i> del terminador silvestre (wild type). Los oligonucleótidos al alinearse generan un extremo 5' del sitio de restricción <i>XbaI</i> saliente como si ya fuera digerido y lo mismo en el extremo 3' pero para el sitio re restricción <i>BamHI</i> para poderlos clonar en el plásmido pTer53ΔEΔXΔB con esos dos sitios de restricción.
Parental Min comp	GATCCATATAAAAAGTGACACTTACACTTGAAAAAAA TCCT	Oligonucleótido complementario para el ensamblaje <i>in vitro</i> del terminador silvestre (wild type). Los oligonucleótidos al alinearse generan un extremo 5' del sitio de restricción <i>XbaI</i> saliente como si ya fuera digerido y lo mismo en el extremo 3' pero para el sitio re restricción <i>BamHI</i> para poderlos clonar en el plásmido pTer53ΔEΔXΔB con esos dos sitios de restricción.
Stem swap sense	CTAGAGGATTTTTTCTTCAGTAAGTGCTGAATTA TATG	Oligonucleótido sentido para el ensamblaje <i>in vitro</i> del terminador Swap (modificación de la secuencia del tallo de la estructura tallo-asa). Los oligonucleótidos al alinearse generan un extremo 5' del sitio de restricción <i>XbaI</i> saliente como si ya fuera digerido y lo mismo en el extremo 3' pero para el sitio re restricción <i>BamHI</i> para poderlos clonar en el plásmido pTer53ΔEΔXΔB con esos dos sitios de restricción.
Stem swap comp	GATCCATATAAATTCAGACACTTACTGAAGAAAAAAA TCCT	Oligonucleótido complementario para el ensamblaje <i>in vitro</i> del terminador Swap (modificación de la secuencia del tallo de la estructura tallo-asa). Los oligonucleótidos al alinearse generan un extremo 5' del sitio de restricción <i>XbaI</i> saliente como si ya fuera digerido y lo mismo en el extremo 3' pero para el sitio re restricción <i>BamHI</i> para poderlos clonar en el plásmido pTer53ΔEΔXΔB con esos dos sitios de restricción.
Stem swap sense 7A's	CTAGAGGAAAAAAAACCTTCAGTAAGTGCTGAATTA TATG	Oligonucleótido sentido para el ensamblaje <i>in vitro</i> del terminador Swap A's (modificación de la secuencia del tallo de la estructura tallo-asa y cambio de corrida de T's por A's). Los oligonucleótidos al alinearse generan un extremo 5' del sitio de restricción <i>XbaI</i> saliente como si ya fuera digerido y lo mismo en el extremo 3' pero para el sitio re restricción <i>BamHI</i> para poderlos clonar en el plásmido pTer53ΔEΔXΔB con esos dos sitios de restricción.
Stem swap comp 7A's	GATCCATATAAATTCAGACACTTACTGAAGTTTTTTT TCCT	Oligonucleótido complementario para el ensamblaje <i>in vitro</i> del terminador Swap A's (modificación de la secuencia del tallo de la estructura tallo-asa y cambio de corrida de T's por A's). Los oligonucleótidos al alinearse generan un extremo 5' del sitio de restricción <i>XbaI</i> saliente como si ya fuera digerido y lo mismo en el extremo 3' pero para el sitio re restricción <i>BamHI</i> para poderlos

cDNA <sub>act</sub>	CGGGCAGGAGTGC GGCGAGG	clonar en el plásmido pTer53ΔEΔXΔB con esos dos sitios de restricción. Oligonucleótido complementario con la secuencia ancla, usado para la síntesis de cDNA a partir de esa secuencia (*)
Fw18S	GGGTAGCAGCAGGCGCG	Oligonucleótido delantero empelado para ambas secuencias reporteras en las reacciones de RT-PCR, se ancla al gene 18S justo antes del inicio de la secuencia reportera.
RvCAT RT-PCR	GTTGTCCATATTGGCCACG	Oligonucleótido reverse para análisis por RT-PCR del reportero Constante.
RvCATRT-PCR2	GCCCCCTGATGAATGCTCATCCG	Oligonucleótido reverse para análisis por RT-PCR del reportero Constante para el análisis de las construcciones con terminador. Es el PCR-A en las figuras de resultados del terminador. Se empleó en combinación con el oligonucleótido Fw18S.
FwRT-PCRCATEcoRI	CGTATGGCAATGAAAGAC	Oligonucleótido delantero para análisis por RT-PCR del reportero Constante para el análisis de las construcciones con terminador. Es el PCR-B en las figuras de resultados del terminador. Se empleó en combinación con el oligonucleótido RVCAT RT-PCR
RvGFP RT-PCR	CAAGACCCGCGCCGAGGTG	Oligonucleótido reverse para el análisis del reportero Variable.
Secuencia <i>clt</i>	CTGGTGCCCGTCCTCGCCGCGGCGTGACCGCCCCGC ACACCCGCACACCCCGCACAGCCGCACAGCGCGAA TTCCACGTC AAGCGGCGTGTGAATCGGCCCGCACA CCGGCCCGCACACGCGCCCGCACACCCCGGCACAC CCACCCCGCACAGCAAGCGGCGGACCCCGAGGCAA CCGGATCGGCCAGACGACCAGGAGGAAACCCGTG AACGCCGAGCCCCAGTATCCCGCCCTCGGGCGCCAG ATCACCGACGCGGAGCTCCTCGCCGCACTCCTGCC G	Secuencia del <i>clt</i> (cis-acting locus of transfer) del plásmido pJV1 de <i>Streptomyces phaeochromogenes</i> . Posiciones: 11075 – 220. <b>Database ID: U23762.1</b> Subrayado se muestra la secuencia complementaria a la que se usó en los oligonucleótidos que contienen esta secuencia.
TBP <sub>fw</sub>	CCCGGATCCATGAATCCAA AAGAATTTAT TGGC	Oligonucleótido delantero para amplificar el marco de lectura abierta de TBP TVAG_291560. Subrayado se muestra el sitio de restricción <i>Bam</i> HI.
TBP <sub>rv</sub>	CCCAAGCTT TTAAGCAGCT GGCGTTCTG TGC	Oligonucleótido reverse para amplificar el marco de lectura abierta de TBP TVAG_291560. Subrayado se muestra el sitio de restricción <i>Hind</i> III.
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTT	Oligonucleótido complementario a la cola de poliA de mRNAs. Incluye secuencia complementaria al oligonucleótido AUAPB.
AUAPB	GGATCCGGCCACGCGTCGACTAGTAC	Oligonucleótido complementario al oligo AP.

Tabla S2. Plásmidos y cepas empelados en el presente trabajo, con su posición en las cajas de resguardo a -80| C.

Nombre en artículo	Nombre de trabajo cotidiano/Cepa	Caja de resguardo	Posición en caja	Características*
-----	JM109 (vial1)	1	1	Cepa usada en clonaciones, sin resistencia a antibióticos.
-----	JM109 (vial2)	1	2	Cepa usada en clonaciones, sin resistencia a antibióticos.
p921	p921 (vial 1)	1	3	Plásmido que contiene el fragmento <i>EcoRI</i> del cistrón ribosomal de <i>T. vaginalis</i> (López-Villaseñor <i>et al.</i> , 2004). Resistencia a ampicilina.
p921	p921 (vial 2)	1	4	Plásmido que contiene el fragmento <i>EcoRI</i> del cistrón ribosomal de <i>T. vaginalis</i> (López-Villaseñor <i>et al.</i> , 2004). Resistencia a ampicilina.
pUC18	pUC18 (vial 1)	1	5	Plásmido de clonación comercial. Resistencia a ampicilina.
pUC18	pUC18 (vial 2)	1	6	Plásmido de clonación comercial. Resistencia a ampicilina.
-----	pCAT (vial 1)	1	7	Plásmido que contiene el gene <i>cat</i> flanqueado por las regiones 5' y 3' del gene de actina de <i>T. vaginalis</i> . Donado por Vanesa Fuentes. Resistencia a ampicilina.
-----	pCAT (vial 2)	1	8	Plásmido que contiene el gene <i>cat</i> flanqueado por las regiones 5' y 3' del gene de actina de <i>T. vaginalis</i> . Donado por Vanesa Fuentes. Resistencia a ampicilina.
-----	pGFP (vial 1)	1	9	Plásmido que contiene el gene <i>gfp</i> flanqueado por las regiones 5' y 3' del gene de actina de <i>T. vaginalis</i> . Resistencia a ampicilina.
-----	pGFP (vial 2)	1	10	Plásmido que contiene el gene <i>gfp</i> flanqueado por las regiones 5' y 3' del gene de actina de <i>T. vaginalis</i> . Resistencia a ampicilina.
-----	PCR# 12 TOPO (vial 1)	1	11	pCR Blunt II TOPO conteniendo el fragmento PCR#12 que comprende 1674 bases de la región intergénica del cistrón ribosomal, provisto por la Dra. Ana Lilia Torres Machorro. Resistencia a kanamicina.
-----	PCR# 12 TOPO (vial 2)	1	12	pCR Blunt II TOPO conteniendo el fragmento PCR#12 que comprende 1674 bases de la región intergénica del cistrón ribosomal, provisto por la Dra. Ana Lilia Torres Machorro. Resistencia a kanamicina.
-----	pI18S (clona 9 vial 1)	1	13	Subclonación en pUC18 del fragmento <i>HindIII XbaI</i> proveniente del p921, contiene casi toda la región intergénica y secuencia codificante del 18S. Ampicilina resistente
-----	pI18S (clona 9 vial 2)	1	14	Subclonación en pUC18 del fragmento <i>HindIII XbaI</i> proveniente del p921, contiene casi toda la región intergénica y secuencia codificante del 18S. Ampicilina resistente
-----	pI18S (clona 11 vial 1)	1	15	Subclonación en pUC18 del fragmento <i>HindIII XbaI</i> proveniente del p921, contiene casi toda la región intergénica y secuencia codificante del 18S. Ampicilina resistente

-----	pI18S (clona 11 vial 2)	1	16	Subclonación en pUC18 del fragmento <i>HindIII XbaI</i> proveniente del p921, contiene casi toda la región intergénica y secuencia codificante del 18S. Ampicilina resistente
-----	Sonda EMSA TOPO (clona 2, vial 1)	1	17	Fragmento de 361 pb amplificado con los oligonucleótidos ETS-1248/-129 junto con el primer Fw -231/+277 y clonado en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	Sonda EMSA TOPO (clona 2, vial 2)	1	18	Fragmento de 361 pb amplificado con los oligonucleótidos ETS-1248/-129 junto con el primer Fw -231/+277 y clonado en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	Sonda EMSA TOPO (clona 3, vial 1)	1	19	Fragmento de 361 pb amplificado con los oligonucleótidos ETS-1248/-129 junto con el primer Fw -231/+277 y clonado en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	Sonda EMSA TOPO (clona 3, vial 2)	1	20	Fragmento de 361 pb amplificado con los oligonucleótidos ETS-1248/-129 junto con el primer Fw -231/+277 y clonado en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	Terminador TOPO (clona 1, vial 1)	1	21	Fragmento de 164 pb amplificado con los oligonucleótidos TerFw y TerRv y clonado en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	Terminador TOPO (clona 1, vial 2)	1	22	Fragmento de 164 pb amplificado con los oligonucleótidos TerFw y TerRv y clonado en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	pI18S/Ter (clona 3 vial 1)	1	23	pI18S con el fragmento terminador clonado como <i>XbaI-BamHI</i> en el extremo 3' del gene 18S. Resistencia a ampicilina.
-----	pI18S/Ter (clona 3 vial 2)	1	24	pI18S con el fragmento terminador clonado como <i>XbaI-BamHI</i> en el extremo 3' del gene 18S. Resistencia a ampicilina.
-----	pI18S/Ter (clona 4 vial 1)	1	25	pI18S con el fragmento terminador clonado como <i>XbaI-BamHI</i> en el extremo 3' del gene 18S. Resistencia a ampicilina.
-----	pI18S/Ter (clona 4 vial 2)	1	26	pI18S con el fragmento terminador clonado como <i>XbaI-BamHI</i> en el extremo 3' del gene 18S. Resistencia a ampicilina.
pVar	pI18S/Ter-GFP (clona 1 vial 1)	1	27	Similar al plásmido pConst, pero el fragmento <i>XhoI</i> y <i>MluI</i> del gene 18S-like fue remplazado con un fragmento de la secuencia codificante del gene <i>gfp</i> . En este plásmido es en el que se hicieron todas las deleciones y mutaciones para el análisis del promotor ribosomal de <i>T. vaginalis</i> . Resistencia a ampicilina. Secuenciada y correcta.
pVar	pI18S/Ter-GFP (clona 1 vial 2)	1	28	Similar al plásmido pConst, pero el fragmento <i>XhoI</i> y <i>MluI</i> del gene 18S-like fue remplazado con un fragmento de la secuencia codificante del gene <i>gfp</i> . En este plásmido es en el que se hicieron todas las deleciones y mutaciones para el análisis del promotor ribosomal de <i>T. vaginalis</i> . Resistencia a ampicilina.
pVar	pI18S/Ter-GFP (clona 2 vial	1	29	Similar al plásmido pConst, pero el fragmento <i>XhoI</i> y <i>MluI</i>

	1)				del gene 18S-like fue reemplazado con un fragmento de la secuencia codificante del gene <i>gfp</i> . En este plásmido es en el que se hicieron todas las deleciones y mutaciones para el análisis del promotor ribosomal de <i>T. vaginalis</i> . Resistencia a ampicilina. Secuenciada y correcta.
pConst	pI18S/Ter-CAT (clona 1 vial 1)	1	30		pUC18 que contiene el fragmento <i>HindIII</i> y <i>XbaI</i> obtenido del p921 y que comprende la región intergénica (excepto las 165 pb que corresponden a la secuencia terminadora) y un fragmento casi completo del gene 18S-like. Incluye un reportero transcripcional que comprende un fragmento de la secuencia codificante del gene <i>cat</i> y una secuencia ancla para la síntesis de cDNA y estos elementos reemplazan un fragmento <i>XhoI</i> y <i>MluI</i> del gene 18S-like. Incluye también en el extremo 3' del gene 18S-like la secuencia de 165 pb terminadora, clonada como <i>XbaI</i> and <i>BamHI</i> . Secuenciada y correcta. Resistencia a ampicilina.
pConst	pI18S/Ter-CAT (clona 1 vial 2)	1	31		pUC18 que contiene el fragmento <i>HindIII</i> y <i>XbaI</i> obtenido del p921 y que comprende la región intergénica (excepto las 165 pb que corresponden a la secuencia terminadora) y un fragmento casi completo del gene 18S-like. Incluye un reportero transcripcional que comprende un fragmento de la secuencia codificante del gene <i>cat</i> y una secuencia ancla para la síntesis de cDNA y estos elementos reemplazan un fragmento <i>XhoI</i> y <i>MluI</i> del gene 18S-like. Incluye también en el extremo 3' del gene 18S-like la secuencia de 165 pb terminadora, clonada como <i>XbaI</i> and <i>BamHI</i> . Secuenciada y correcta. Resistencia a ampicilina.
pConst	pI18S/Ter-CAT (clona 2 vial 1)	1	32		pUC18 que contiene el fragmento <i>HindIII</i> y <i>XbaI</i> obtenido del p921 y que comprende la región intergénica (excepto las 165 pb que corresponden a la secuencia terminadora) y un fragmento casi completo del gene 18S-like. Incluye un reportero transcripcional que comprende un fragmento de la secuencia codificante del gene <i>cat</i> y una secuencia ancla para la síntesis de cDNA y estos elementos reemplazan un fragmento <i>XhoI</i> y <i>MluI</i> del gene 18S-like. Incluye también en el extremo 3' del gene 18S-like la secuencia de 165 pb terminadora, clonada como <i>XbaI</i> and <i>BamHI</i> . Secuenciada y correcta. Resistencia a ampicilina.
pVar(-INT)	pI18S/Ter-GFP ΔInt (clona 1 vial 1)	1	33		Derivado del plásmido pVar pero con deleción completa de la región intergénica mediante digestión con <i>HindIII</i> y <i>NruI</i> y relleno con DNA polimerasa I (fragmento Klenow). Resistencia a ampicilina.
pVar(-INT)	pI18S/Ter-GFP ΔInt (clona 1 vial 2)	1	34		Derivado del plásmido pVar pero con deleción completa de la región intergénica mediante digestión con <i>HindIII</i> y <i>NruI</i> y relleno con DNA polimerasa I (fragmento Klenow). Resistencia a ampicilina.
-----	pUC18ΔEcoRI (clona 1 vial	1	35		Derivado del plásmido pUC18 pero se eliminó el sitio

	1)				<i>EcoRI</i> mediante digestión con la misma enzima y relleno con DNA polimerasa I (fragmento Klenow). Resistencia a ampicilina.
-----	pUC18Δ <i>EcoRI</i> (clona 1 vial 2)	1	36		Derivado del plásmido pUC18 pero se eliminó el sitio <i>EcoRI</i> mediante digestión con la misma enzima y relleno con DNA polimerasa I (fragmento Klenow). Resistencia a ampicilina.
-----	TBP pQE30 TOPO (clona 1 vial 1)	1	37		Producto de PCR que amplifica la TBP (TVAG_291560) con los oligonucleótidos TBP30Fw y TBP30Rv clonado en el plásmido pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TBP pQE30 TOPO (clona 1 vial 2)	1	38		Producto de PCR que amplifica la TBP (TVAG_291560) con los oligonucleótidos TBP30Fw y TBP30Rv clonado en el plásmido pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TBP pQE30 TOPO (clona 3 vial 1)	1	39		Producto de PCR que amplifica la TBP (TVAG_291560) con los oligonucleótidos TBP30Fw y TBP30Rv clonado en el plásmido pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TBP pQE30 TOPO (clona 3 vial 2)	1	40		Producto de PCR que amplifica la TBP (TVAG_291560) con los oligonucleótidos TBP30Fw y TBP30Rv clonado en el plásmido pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TBP pQE60 TOPO (clona 1 vial 1)	1	41		Producto de PCR que amplifica la TBP (TVAG_291560) con los oligonucleótidos TBP60Fw y TBP60Rv clonado en el plásmido pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TBP pQE60 TOPO (clona 1 vial 2)	1	42		Producto de PCR que amplifica la TBP (TVAG_291560) con los oligonucleótidos TBP60Fw y TBP60Rv clonado en el plásmido pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	Fragmento de GFP en TOPO (clona 2 vial 1)	1	43		Producto de PCR de GFP con los oligonucleótidos Fw18S y GFPcItRv PCR clonado en el plásmido pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	Fragmento de GFP en TOPO (clona 2 vial 2)	1	44		Producto de PCR de GFP con los oligonucleótidos Fw18S y GFPcItRv-PCR clonado en el plásmido pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	M15/pREP4 Vial 1	1	45		Cepa M15/pREP4 para sobreexpresión de proteínas. Kanamicina resistente.
-----	M15/pREP4 Vial 2	1	46		Cepa M15/pREP4 para sobreexpresión de proteínas. Kanamicina resistente.
-----	pQE30-TBP (clona 9 vial 1)	1	47		Producto de PCR de TBP clonado como <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III. Secuenciada y correcta. Ampicilina resistente.
-----	pQE30-TBP (clona 9 vial 2)	1	48		Producto de PCR de TBP clonado como <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III. Secuenciada y correcta. Ampicilina resistente.
-----	pQE30-TBP en M15/pREP4 (clona 1 vial 1)	1	49		M15/pREP4 transformada con el plásmido pQE30-TBP. Resistente a kanamicina y ampicilina.
-----	pQE30-TBP en M15/pREP4 (clona 1 vial 2)	1	50		M15/pREP4 transformada con el plásmido pQE30-TBP. Resistente a kanamicina y ampicilina.
-----	pQE30-TBP en M15/pREP4 (clona 2 vial 1)	1	51		M15/pREP4 transformada con el plásmido pQE30-TBP. Resistente a kanamicina y ampicilina.
-----	pQE30-TBP en M15/pREP4 (clona 2 vial 2)	1	52		M15/pREP4 transformada con el plásmido pQE30-TBP. Resistente a kanamicina y ampicilina.

pConst $\Delta$ EcoRI	pI18S-CAT $\Delta$ EcoRI (vial 1)	1	53	Derivado del pConst excepto que carece de la secuencia terminadora en el extremo 3' del gene 18S-like y el sitio de restricción <i>EcoRI</i> del plásmido para así clonar en el fragmento del gene <i>cat</i> la secuencia terminadora.
pConst $\Delta$ EcoRI	pI18S-CAT $\Delta$ EcoRI (vial 2)	1	54	Derivado del pConst excepto que carece de la secuencia terminadora en el extremo 3' del gene 18S-like y el sitio de restricción <i>EcoRI</i> del plásmido para así clonar en el fragmento del gene <i>cat</i> la secuencia terminadora.
-----	pQE60-TBP (clona 10 vial 1)	1	55	Producto de PCR de TBP clonado como <i>NcoI</i> y <i>BglIII</i> . Secuenciada y correcta. Ampicilina resistente.
-----	pQE60-TBP (clona 10 vial 2)	1	56	Producto de PCR de TBP clonado como <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i> . Secuenciada y correcta. Ampicilina resistente.
-----	pQE60-TBP (clona 3 vial 1)	1	57	Producto de PCR de TBP clonado como <i>NcoI</i> y <i>BglIII</i> . Secuenciada y correcta. Ampicilina resistente.
-----	pQE60-TBP (clona 3 vial 2)	1	58	Producto de PCR de TBP clonado como <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i> . Secuenciada y correcta. Ampicilina resistente.
-----	pQE60-TBP en M15/pREP4 (clona 10 colonia 1 vial 1)	1	59	M15/pREP4 transformada con el plásmido pQE60-TBP. Resistente a kanamicina y ampicilina.
-----	pQE30-TBP en M15/pREP4 (clona 10 colonia 1 vial 2)	1	60	M15/pREP4 transformada con el plásmido pQE60-TBP. Resistente a kanamicina y ampicilina.
-----	pQE60-TBP en M15/pREP4 (clona 10 colonia 2 vial 1)	1	61	M15/pREP4 transformada con el plásmido pQE60-TBP. Resistente a kanamicina y ampicilina.
-----	pQE30-TBP en M15/pREP4 (clona 10 colonia 2 vial 2)	1	62	M15/pREP4 transformada con el plásmido pQE60-TBP. Resistente a kanamicina y ampicilina
-----	Fragmento de GFP en TOPO (clona 1 vial 1)	1	63	Producto de PCR de GFP con los oligonucleótidos Fw18S y Rv GFP RT-PCR PCR clonado en el plásmido pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	Fragmento de GFP en TOPO (clona 1 vial 2)	1	64	Producto de PCR de GFP con los oligonucleótidos Fw18S y Rv GFP RT-PCR PCR clonado en el plásmido pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	pQE60-TBP en M15/pREP4 (clona 3 colonia 1 vial 1)	1	65	M15/pREP4 transformada con el plásmido pQE60-TBP. Resistente a kanamicina y ampicilina. Clona con codón de paro, no tiene colas de histidina en el C-terminal, se diseñó mal el oligonucleótido.
-----	pQE30-TBP en M15/pREP4 (clona 3 colonia 1 vial 2)	1	66	M15/pREP4 transformada con el plásmido pQE60-TBP. Resistente a kanamicina y ampicilina. Clona con codón de paro, no tiene colas de histidina en el C-terminal, se diseñó mal el oligonucleótido.
-----	pQE60-TBP en M15/pREP4 (clona 3 colonia 2 vial 1)	1	67	M15/pREP4 transformada con el plásmido pQE60-TBP. Resistente a kanamicina y ampicilina. Clona con codón de paro, no tiene colas de histidina en el C-terminal, se diseñó mal el oligonucleótido.
-----	pQE30-TBP en M15/pREP4 (clona 3 colonia 2 vial 2)	1	68	M15/pREP4 transformada con el plásmido pQE60-TBP. Resistente a kanamicina y ampicilina. Clona con codón de paro, no tiene colas de histidina en el C-terminal, se diseñó mal el oligonucleótido.
-----	XL-1 Blue MRF vial 1	1	69	Cepa XL-1 MRF (Stratagene). Resistencia por fago a

-----	XL-1 Blue MRF vial 2	1	70	tetraciclina. Cepa XL-1 MRF (Stratagene). Resistencia por fago a tetraciclina.
-----	XL-1 Blue MRF pQE30-TBP vial 1	1	71	Cepa XL-1 MRF (Stratagene). Resistencia por fago a tetraciclina. Transformada con plásmido pQE30-TBP Resistente a ampicilina
-----	XL-1 Blue MRF pQE30-TBP vial 2	1	72	Cepa XL-1 MRF (Stratagene). Resistencia por fago a tetraciclina. Transformada con plásmido pQE30-TBP Resistente a ampicilina
-----	Clona del PCR de actina (por Norma) vial 1	1	73	Clona de actina para sonda control. Resistencia a ampicilina.
-----	Clona del PCR de actina (por Norma) vial 2	1	74	Clona de actina para sonda control. Resistencia a ampicilina.
-----	TOPO Del 1 vial 1	2	1	Producto de PCR para generar la delección -991/+227 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO Del 1 vial 2	2	2	Producto de PCR para generar la delección -991/+227 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO Del 2 vial 1	2	3	Producto de PCR para generar la delección -748/+227 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO Del 2 vial 2	2	4	Producto de PCR para generar la delección -748/+227 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO Del 3 vial 1	2	5	Producto de PCR para generar la delección -448/+227 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO Del 3 vial 2	2	6	Producto de PCR para generar la delección -448/+227 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO Del 4 vial 1	2	7	Producto de PCR para generar la delección -231/+227 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO Del 4 vial 2	2	8	Producto de PCR para generar la delección -231/+227 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO Del 5 vial 1	2	9	Producto de PCR para generar la delección -128/+227 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO Del 5 vial 2	2	10	Producto de PCR para generar la delección -128/+227 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO Del 6 vial 1	2	11	Producto de PCR para generar la delección 1/+227 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO Del 6 vial 2	2	12	Producto de PCR para generar la delección 1/+227 de la

-----	TOPO ETS del 3 vial 1	2	13	región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina. Producto de PCR para generar la delección -1247/+129 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO ETS del 3 vial 2	2	14	Producto de PCR para generar la delección -1247/+129 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO ΔETS vial 1	2	15	Producto de PCR para generar la delección -1247/+1 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO ΔETS vial 2	2	16	Producto de PCR para generar la delección -1247/+1 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
p(-748/+277)	pl6STerGFP Del 2 clona 3 vial 1	2	17	Derivado del plásmido pVar pero con delección 5' generando el fragmento -748/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(-748/+277)	pl6STerGFP Del 2 clona 3 vial 2	2	18	Derivado del plásmido pVar pero con delección 5' generando el fragmento -748/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(-448/+277)	pl6STerGFP Del 3 clona 2 vial 1	2	19	Derivado del plásmido pVar pero con delección 5' generando el fragmento -448/+277 relativo al TSP
p(-448/+277)	pl6STerGFP Del 3 clona 2 vial 2	2	20	Derivado del plásmido pVar pero con delección 5' generando el fragmento -448/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(-231/+277)	pl6STerGFP Del 4 clona 1 vial 1	2	21	Derivado del plásmido pVar pero con delección 5' generando el fragmento -231/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(-231/+277)	pl6STerGFP Del 4 clona 1 vial 2	2	22	Derivado del plásmido pVar pero con delección 5' generando el fragmento -231/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(-128/+277)	pl6STerGFP Del 5 clona 2 vial 1	2	23	Derivado del plásmido pVar pero con delección 5' generando el fragmento -128/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(-128/+277)	pl6STerGFP Del 5 clona 2 vial 2	2	24	Derivado del plásmido pVar pero con delección 5' generando el fragmento -128/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(+1/+277)	pl6STerGFP Del 6 clona 2 vial 1	2	25	Derivado del plásmido pVar pero con delección 5' generando el fragmento 1/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(+1/+277)	pl6STerGFP Del 6 clona 2 vial 2	2	26	Derivado del plásmido pVar pero con delección 5' generando el fragmento 1/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(-448/+277)	pl6STerGFP Del 3 vial 1 clona 2	2	27	Derivado del plásmido pVar pero con delección 5' generando el fragmento -448/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(-231/+277)	pl6STerGFP Del 4 clona 2	2	28	Derivado del plásmido pVar pero con delección 5'

	vial 1			generando el fragmento -231/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(-128/+277)	pl6STerGFP Del 5 clona 3 vial 1	2	29	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 5' generando el fragmento -128/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(-128/+277)	pl6STerGFP Del 5 clona 4 vial 1	2	30	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 5' generando el fragmento -128/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(+1/+277)	pl6STerGFP Del 6 clona 2 vial 1	2	31	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 5' generando el fragmento 1/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(+1/+277)	pl6STerGFP Del 6 clona 8 vial 1	2	32	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 5' generando el fragmento 1/+277 relativo al TSP. Secuenciada y correcta.
p(-991/+277)	pl6STerGFP Del 1 clona 1 vial 1	2	33	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 5' generando el fragmento -991/+277 relativo al TSP
p(-991/+277)	pl6STerGFP Del 1 clona 1 vial 2	2	34	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 5' generando el fragmento -991/+277 relativo al TSP
p(-1247/+129)	pl6STerGFP ETSdel3 clona 2 vial 1	2	35	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 3' generando el fragmento -1247/+129 relativo al TSP
p(-1247/+129)	pl6STerGFP ETSdel3 clona 2 vial 2	2	36	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 3' generando el fragmento -1247/+129 relativo al TSP
p(-991/+277)	pl6STerGFP Del 1 clona 2 vial 1	2	37	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 5' generando el fragmento -991/+277 relativo al TSP
p(-1247/+129)	pl6STerGFP ETSdel3 clona 5 vial 2	2	38	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 3' generando el fragmento -1247/+129 relativo al TSP
-----	TOPO del -128/129 clona 1 vial 1	2	39	Producto de PCR para generar la deleción -128/+129 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO del -128/129 clona 1 vial 2	2	40	Producto de PCR para generar la deleción -128/+129 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO del -128/129 clona 2 vial 1	2	41	Producto de PCR para generar la deleción -128/+129 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO del -128/129 clona 2 vial 2	2	42	Producto de PCR para generar la deleción -128/+129 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
p(-128/+129)	pl6STerGFP (-128/129) clona 3 vial 1	2	43	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+129 relativo al TSP
p(-128/+129)	pl6STerGFP (-128/129) clona 3 vial 2	2	44	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+129 relativo al TSP
-----	TOPO PCR Del2-ΔETS Clona 11 Vial 1	2	45	PCR con los oligonucleótidos que generan una deleción -448 y +1 de la región intergénica. Resistencia a kanamicina.

-----	TOPO PCR Del2-ΔETS Clona 11 Vial 2	2	46	PCR con los oligonucleótidos que generan una deleción -448 y +1 de la región intergénica. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO PCR Del4-ΔETS Clona 1 Vial 1	2	47	PCR con los oligonucleótidos que generan una deleción -231 y +1 de la región intergénica. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO PCR Del4-ΔETS Clona 2 Vial 1	2	48	PCR con los oligonucleótidos que generan una deleción -231 y +1 de la región intergénica. Resistencia a kanamicina.
p(-1247/+1)	pI6STerGFP full -ΔETS clona 1 vial 1	2	49	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 3' generando el fragmento -1247/+1 relativo al TSP
p(-1247/+1)	pI6STerGFP full -ΔETS clona 1 vial 2	2	50	Derivado del plásmido pVar pero con deleción 3' generando el fragmento -1247/+1 relativo al TSP
-----	pI6STerGFP Del4-ΔETS Clona 1 Vial 1	2	51	Deleción hecha con los oligonucleótidos que generan una deleción -231 y +1 de la región intergénica. Resistencia a kanamicina.
-----	pI6STerGFP Del4-ΔETS Clona 1 Vial 1	2	52	Deleción hecha con los oligonucleótidos que generan una deleción -231 y +1 de la región intergénica. Resistencia a kanamicina.
pTer53	pI18SCATΔEcoRI (Ter53) Clona 2, vial 1	2	53	Derivado del pConst ΔEcoRI pero con la secuencia terminadora clonada en el gene <i>cat</i> (Secuencia reportera Constante) en el sitio <i>EcoRI</i> en la orientación 5' a 3'. La secuencia terminadora se obtuvo del plásmido en el que el producto de PCR se clonó previamente pCR Blunt II TOPO.
pTer53	pI18SCATΔEcoRI (Ter53) Clona 2, vial 2	2	54	Derivado del pConst ΔEcoRI pero con la secuencia terminadora clonada en el gene <i>cat</i> (Secuencia reportera Constante) en el sitio <i>EcoRI</i> en la orientación 5' a 3'. La secuencia terminadora se obtuvo del plásmido en el que el producto de PCR se clonó previamente pCR Blunt II TOPO.
pTer35	pI18SCATΔEcoRI (Ter35) Clona 3, vial 1	2	55	Derivado del pConst ΔEcoRI pero con la secuencia terminadora clonada en el gene <i>cat</i> (Secuencia reportera Constante) en el sitio <i>EcoRI</i> en la orientación 3' a 5'. La secuencia terminadora se obtuvo del plásmido en el que el producto de PCR se clonó previamente pCR Blunt II TOPO.
pTer35	pI18SCATΔEcoRI (Ter35) Clona 3, vial 2	2	56	Derivado del pConst ΔEcoRI pero con la secuencia terminadora clonada en el gene <i>cat</i> (Secuencia reportera Constante) en el sitio <i>EcoRI</i> en la orientación 3' a 5'. La secuencia terminadora se obtuvo del plásmido en el que el producto de PCR se clonó previamente pCR Blunt II TOPO.
-----	BL21 Rossetta 2, vial único.	2	57	Cepa BL21 Rossetta, plásmido con codones raros para <i>E.coli</i> . Resistente a cloranfenicol.
-----	BL21 Rossetta 2 pQE30-	2	58	Cepa BL21 Rossetta, plásmido con codones raros para

	TBP, clona 1 vial 1.				<i>E. coli</i> y transformada con el pQE30-TBP. Resistente a cloranfenicol y ampicilina.
-----	BL21 Rossetta 2 pQE30-TBP, clona 2 vial 1.	2	59		Cepa BL21 Rossetta, plásmido con codones raros para <i>E. coli</i> y transformada con el pQE30-TBP. Resistente a cloranfenicol y ampicilina.
-----	BL21 Rossetta 2 pQE30-TBP, clona 3 vial 1.	2	60		Cepa BL21 Rossetta, plásmido con codones raros para <i>E. coli</i> y transformada con el pQE30-TBP. Resistente a cloranfenicol y ampicilina.
-----	TOPO -128/+50 vial 1	2	61		Producto de PCR para generar la delección -128/+50 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO -128/+50 vial 2	2	62		Producto de PCR para generar la delección -128/+50 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO -50/+50 vial 1	2	63		Producto de PCR para generar la delección -50/+50 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
-----	TOPO -50/+50 vial 2	2	64		Producto de PCR para generar la delección -50/+50 de la región intergénica, clonada en pCR Blunt II TOPO. Resistencia a kanamicina.
p(-128/+50)	pI18SGFP -128/+50 clona 3 vial 1	2	65		Derivado del plásmido pVar pero con delección en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP. Resistencia a ampicilina.
p(-128/+50)	pI18SGFP -128/+50 clona 3 vial 2	2	66		Derivado del plásmido pVar pero con delección en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP. Resistencia a ampicilina.
p(-50/+50)	pI18SGFP -50/+50 clona 2 vial 1	2	67		Derivado del plásmido pVar pero con delección en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -50/+50 relativo al TSP. Resistencia a ampicilina.
p(-50/+50)	pI18SGFP -50/+50 clona 2 vial 2	2	67*	(numeración repetida)	Derivado del plásmido pVar pero con delección en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -50/+50 relativo al TSP. Resistencia a ampicilina.
-----	pI18SGFP -128/129 TSP mut confirmada por secuencia. Vial 1	2	68		Derivado del plásmido pVar pero con delección en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+129 relativo al TSP y 3 cambios en la región del TSP, TGG→GTT, la base subrayada se refiere a la posición +1. Resistente a ampicilina.
-----	pI18SGFP -128/129 TSP mut confirmada por secuencia. Vial 2	2	69		Derivado del plásmido pVar pero con delección en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+129 relativo al TSP y 3 cambios en la región del TSP, TGG→GTT, la base subrayada se refiere a la posición +1. Resistente a ampicilina.
pTer53-7U's mut	pI18SCATTer53 mutante corrida 7 T's. Vial 1	2	70		Derivado del pConst Δ <i>EcoRI</i> pero con la secuencia terminadora mutada en la corrida de 7T's así TTTTTTT→TGTGTGT. Resistencia a ampicilina.
pTer53-7U's mut	pI18SCATTer53 mutante	2	71		Derivado del pConst Δ <i>EcoRI</i> pero con la secuencia

	corrida 7 T's. Vial 2			terminadora mutada en la corrida de 7T's así TTTTTTT→TGTGTGT. Resistencia a ampicilina.
pTer53-4U's mut	pI18SCATTer53 mutante corrida 4 T's Motivo <i>Leishmania</i> . Vial 1	2	72	Derivado del pI16Const Δ <i>Eco</i> RI pero con la secuencia terminadora mutada en la corrida de 4T's así CACTTTT→CAATGTG. Resistencia a ampicilina.
pTer53-4U's mut	pI18SCATTer53 mutante corrida 4 T's Motivo <i>Leishmania</i> . Vial 2	2	73	Derivado del pI16Const Δ <i>Eco</i> RI pero con la secuencia terminadora mutada en la corrida de 4T's así CACTTTT→CAATGTG. Resistencia a ampicilina.
P(-128/+50) TSP mut	pI18SGFP -128/+50 TSP mut confirmada por secuencia. Vial 1	2	74	Derivado del plásmido pVar pero con delección en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+129 relativo al TSP y 3 cambios en la región del TSP, TGG→GTT, la base subrayada se refiere a la posición +1. Resistente a ampicilina.
P(-128/+50) TSP mut	pI18SGFP -128/+50 TSP mut confirmada por secuencia. Vial 1	2	75	Derivado del plásmido pVar pero con delección en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+129 relativo al TSP y 3 cambios en la región del TSP, TGG→GTT, la base subrayada se refiere a la posición +1. Resistente a ampicilina.
-----	pI18S-CAT Δ <i>Eco</i> RIΔ <i>Xba</i> IΔ <i>Bam</i> HI (vial 1)	2	76	Derivado del pConst excepto que carece de la secuencia terminadora en el extremo 3' del gene 18S-like y el sitio de restricción <i>Eco</i> RI del plásmido así como se eliminó la secuencia terminadora removiendo los sitios <i>Xba</i> I y <i>Bam</i> HI. Resistencia a ampicilina.
-----	pI18S-CAT Δ <i>Eco</i> RIΔ <i>Xba</i> IΔ <i>Bam</i> HI (vial 2)	2	77	Derivado del pConst excepto que carece de la secuencia terminadora en el extremo 3' del gene 18S-like y el sitio de restricción <i>Eco</i> RI del plásmido así como se eliminó la secuencia terminadora removiendo los sitios <i>Xba</i> I y <i>Bam</i> HI. Resistencia a ampicilina.
pTer53Δ <i>E</i> Δ <i>B</i> Δ <i>X</i>	pI18S-CAT Δ <i>Eco</i> RIΔ <i>Xba</i> IΔ <i>Bam</i> HI + fragmento Ter53/CAT vial 1	2	78	Derivado del pTer53 sin los sitios de restricción <i>Xba</i> I y <i>Bam</i> HI del plásmido para así clonar en el fragmento del gene <i>cat</i> la secuencia terminadora usando esos mismos sitios. Resistencia a ampicilina
pTer53Δ <i>E</i> Δ <i>B</i> Δ <i>X</i>	pI18S-CAT Δ <i>Eco</i> RIΔ <i>Xba</i> IΔ <i>Bam</i> HI + fragmento Ter53/CAT vial 2	2	79	Derivado del pTer53 sin los sitios de restricción <i>Xba</i> I y <i>Bam</i> HI del plásmido para así clonar en el fragmento del gene <i>cat</i> la secuencia terminadora usando esos mismos sitios. Resistencia a ampicilina
p(Parental min)	pI18S-CAT Δ <i>Eco</i> RIΔ <i>Xba</i> IΔ <i>Bam</i> HI + fragmento Wt mínimo en <i>Xba</i> I y <i>Bam</i> HI. Vial 1.	3	1	Derivado del pTer53 Δ <i>E</i> Δ <i>B</i> Δ <i>X</i> pero con la secuencia mínima terminadora silvestre, clonada como <i>Xba</i> I y <i>Bam</i> HI dentro del gene <i>cat</i> . Resistencia a ampicilina.
p(Parental min)	pI18S-CAT Δ <i>Eco</i> RIΔ <i>Xba</i> IΔ <i>Bam</i> HI + fragmento Wt mínimo en <i>Xba</i> I y <i>Bam</i> HI Vial 2.	3	2	Derivado del pTer53 Δ <i>E</i> Δ <i>B</i> Δ <i>X</i> pero con la secuencia mínima terminadora silvestre, clonada como <i>Xba</i> I y <i>Bam</i> HI dentro del gene <i>cat</i> . Resistencia a ampicilina.
p(Stem-swap min)	pI18S-CAT Δ <i>Eco</i> RIΔ <i>Xba</i> IΔ <i>Bam</i> HI +	2	3	Derivado del pTer53 Δ <i>E</i> Δ <i>B</i> Δ <i>X</i> pero con la secuencia mínima terminadora en la que se intercambio la secuencia

	fragmento Swap hair pin mínimo en <i>XbaI</i> y <i>BamHI</i> Vial 1.			del tallo de la estructura tallo-asa, clonada como <i>XbaI</i> y <i>BamHI</i> dentro del gene <i>cat</i> .
p(Stem-swap min)	pI18S-CAT $\Delta EcoRI \Delta XbaI \Delta BamHI$ + fragmento Swap hair pin mínimo en <i>XbaI</i> y <i>BamHI</i> Vial 2.	2	4	Derivado del pTer53 $\Delta E \Delta B \Delta X$ pero con la secuencia mínima terminadora en la que se intercambia la secuencia del tallo de la estructura tallo-asa, clonada como <i>XbaI</i> y <i>BamHI</i> dentro del gene <i>cat</i> .
p(Stem-swap A's min)	pI18S-CAT $\Delta EcoRI \Delta XbaI \Delta BamHI$ + fragmento Swap + corrida de A's hair pin mínimo en <i>XbaI</i> y <i>BamHI</i> Vial 1.	2	5	Derivado del pTer53 $\Delta E \Delta B \Delta X$ pero con la secuencia mínima terminadora en la que se intercambia la secuencia del tallo de la estructura tallo-asa y remplazando la corrida de 7T's por 7 A's, clonada como <i>XbaI</i> y <i>BamHI</i> dentro del gene <i>cat</i> .
p(Stem-swap A's min)	pI18S-CAT $\Delta EcoRI \Delta XbaI \Delta BamHI$ + fragmento Swap + corrida de A's hair pin mínimo en <i>XbaI</i> y <i>BamHI</i> Vial 2.	2	6	Derivado del pTer53 $\Delta E \Delta B \Delta X$ pero con la secuencia mínima terminadora en la que se intercambia la secuencia del tallo de la estructura tallo-asa y remplazando la corrida de 7T's por 7 A's, clonada como <i>XbaI</i> y <i>BamHI</i> dentro del gene <i>cat</i> .
-----	pGEM-TBP vial 1	3	7	PCR amplificado usando cDNA (a partir de poliA+, donado por Vanesa Fuentes). Ya por secuencia vimos que no es, se trata del gene TVAG_145660. Se emplearon los oligonucleótidos TBPfw AUAPB. Resistencia a ampicilina.
-----	pGEM-TBP vial 2	3	8	PCR amplificado usando cDNA (a partir de poliA+, donado por Vanesa Fuentes). Ya por secuencia vimos que no es, se trata del gene TVAG_145660. Se emplearon los oligonucleótidos TBPfw AUAPB. Resistencia a ampicilina.
-----	pGEM-TBP vial 1	3	9	PCR amplificado usando cDNA (a partir de poliA+, donado por Vanesa Fuentes). Ya por secuencia vimos que no es, se trata del gene de la proteína L8 ribosomal. Se emplearon los oligonucleótidos TBPfw AUAPB. Resistencia a ampicilina.
-----	pGEM-TBP vial 2	3	10	PCR amplificado usando cDNA (a partir de poliA+, donado por Vanesa Fuentes). Ya por secuencia vimos que no es, se trata del gene de la proteína L8 ribosomal. Se emplearon los oligonucleótidos TBPfw AUAPB. Resistencia a ampicilina.
pBox1(distal) mut	pI18SGFP -128/+50 Mutante Box 1 UCE Vial 1	3	11	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP y 3 cambios en la región del UCE putativo en la caja Box1-a, TTTGCTC cambiado por TGTACGC. Resistente a ampicilina.
pBox1(distal) mut	pI18SGFP -128/+50 Mutante Box 1 UCE Vial 1	3	12	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP y 3 cambios en la región del UCE putativo en la caja

				Box1-a, TTTGCTC cambiado por TGTACGC. Resistente a ampicilina.
pBox2(distal) mut	pI18SGFP -128/+50 Mutante Box 2 UCE Vial 1	3	13	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP y 3 cambios en la región del UCE putativo en la caja Box2-a, CGAAAAA cambiado por CTACACA. Resistente a ampicilina.
pBox2(distal) mut	pI18SGFP -128/+50 Mutante Box 2 UCE Vial 2	3	14	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP y 3 cambios en la región del UCE putativo en la caja Box2-a, CGAAAAA cambiado por CTACACA. Resistente a ampicilina.
pBox1-2(distal) mut	pI18SGFP -128/+50 Mutante Box 1-2 UCE Vial 1	3	15	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP y 3 cambios en la región del UCE putativo, doble mutante en Box1-a y Box2-a, se usó de plantilla la mutante en Box1. Resistente a ampicilina.
pBox1-2(distal) mut	pI18SGFP -128/+50 Mutante Box1- 2 UCE Vial 2	3	16	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP y 3 cambios en la región del UCE putativo, doble mutante en Box1-a y Box2-a, se usó de plantilla la mutante en Box 1. Resistente a ampicilina.
-----	pI18SGFP -128/+50 Mutante Box 2-1 UCE Vial 1	3	17	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP y 3 cambios en la región del UCE putativo, doble mutante en Box1-a y Box2-a, se usó de plantilla la mutante en la Box 2. Resistente a ampicilina.
-----	pI18SGFP -128/+50 Mutante Box 2-1 UCE Vial 2	3	18	Derivado del plásmido pVar pero con deleción en el extremo 5' y 3' generando el fragmento -128/+50 relativo al TSP y 3 cambios en la región del UCE putativo, doble mutante en Box1-a y Box2-a, se usó de plantilla la mutante en la Box 2. Resistente a ampicilina.

---

## **XII. Bibliografía:**

1. Abreu-Blanco MT, Ramírez JL, Pinto-Santini DM, Papadopoulou B, Guevara P. 2010 Analysis of ribosomal RNA transcription termination and 3' end processing in *Leishmania amazonensis*. *Gene*. 451 (1-2):15-22.
2. Afzan MY, Sivanandam S, Kumar GS. 2010 Modified Field's staining--a rapid stain for *Trichomonas vaginalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 68 (2):159-62.
3. Alderete JF, Garza GE. 1988 Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. *Infect Immun*. 56:28–33.
4. Alderete JF, Newton E, Dennis C, Neale KA. 1991 The vagina of women infected with *Trichomonas vaginalis* has numerous proteinases and antibody to trichomonad proteinases. *Genitourin Med*. 67:469–74.
5. Ardalan S, Lee BC, Garber GE. 2009 *Trichomonas vaginalis*: the adhesins AP51 and AP65 bind heme and hemoglobin. *Exp Parasitol*. 121(4):300-6.
6. Arroyo R, Gonzalez-Robles A, Martínez-Palomo A, Alderete JF. 1993 Signaling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Mol. Microbiol*. 7:299–309.
7. Bartolomei MS, Corden JL. 1995 Clustered alpha-amanitin resistance mutations in mouse. *Mol Gen Genet*. 246(6):778-82.
8. Bell TF. 1930 *Trichomonas vaginalis* Vaginitis. *Cal West Med*. 33(6):901.
9. Benchimol M. 2009 Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue Cell*. 41(3):151-68

10. Benchimol M, Ribeiro KC, Mariante RM, Alderete JF. 2001 Structure and division of the Golgi complex in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Eur J Cell Biol.* 80(9):593-607.
11. Benchimol M. 2004 Trichomonads under Microscopy. *Microsc Microanal.* 10(5):528-50.
12. Bradley PJ, Lahti CJ, Plümper E, Johnson PJ. 1997 Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist *Trichomonas*: similarities with mitochondrial protein import. *EMBO J.* 16(12):3484-93.
13. Bravo AB, Miranda LS, Lima OF, Cambas AV, Hernández ML, Alvarez JM. 2009 Validation of an immunologic diagnostic kit for infectious vaginitis by *Trichomonas vaginalis*, *Candida spp.*, and *Gardnerella vaginalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 63(3):257-60.
14. Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UC, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Müller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CY, Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Perteua M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu CL, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Logsdon JM Jr, Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu CH, Lee YS, Embley TM, Coombs GH, Mottram JC, Tachezy J, Fraser-Liggett CM, Johnson PJ. 2007 Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science.* 315(5809):207-12.
15. Clark CG, Diamond LS. 2002 Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev.* 15(3):329-41.

16. Clemens DL, Johnson PJ. 2000 Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. *Mol Biochem Parasitol* 106, 307–313.
17. Cramer P, Armache KJ, Baumli S, Benkert S, Brueckner F, Buchen C, Damsma GE, Dengl S, Geiger SR, Jasiak AJ, Jawhari A, Jennebach S, Kamenski T, Kettenberger H, Kuhn CD, Lehmann E, Leike K, Sydow JF, Vannini A. 2008 Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu Rev Biophys.* 37:337-52.
18. Crerar MM, Leather R, David E, Pearson ML. 1983 Myogenic differentiation of L6 rat myoblasts: evidence for pleiotropic effects on myogenesis by RNA polymerase II mutations to alpha-amanitin resistance. *Mol Cell Biol.* 3(5):946-55.
19. Culotta VC, Wilkinson JK, Sollner-Webb B. 1987 Mouse and frog violate the paradigm of species-specific transcription of ribosomal RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84,7498-502.
20. Das S, Huengsborg M, Shahmanesh M. 2005 Treatment failure of vaginal trichomoniasis in clinical practice. *Int J STD AIDS.* 16(4):284-6.
21. Delgadillo MG, Liston DR, Niazi K, Johnson PJ. 1997 Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(9):4716-20.
22. Delgado-Viscogliosi P, Viscogliosi E, Gerbod D, Kulda J, Sogin ML, Edgcomb VP. 2000 Molecular phylogeny of parabasalids based on small subunit rRNA sequences, with emphasis on the Trichomonadinae subfamily. *J Eukaryot Microbiol.* 47(1):70-5.
23. Diamond LS. 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 43(4):488-90.

24. Doelling JH, Pikaard CS. 1995 The minimal ribosomal RNA gene promoter of *Arabidopsis thaliana* includes a critical element at the transcription initiation site. *Plant J.* 8(5):683-92.
25. Doelling JH, Pikaard CS. 1996 Species-specificity of rRNA gene transcription in plants manifested as a switch in RNA polymerase specificity. *Nucleic Acids Res.* 24(23):4725-32.
26. Donné A. 1836 Animalcules observés dans les matières purulentes et le produit des sécrétions des organes génitaux de l'homme et de la femme", *Comptes Rendues de l'Académie des Sciences, Paris*; 3:385-6.
27. Drygin D, Rice WG, Grummt I. 2010 The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 50:131-56.
28. Eberhard D, Grummt I. 1996 Species specificity of ribosomal gene transcription: a factor associated with human RNA polymerase I prevents transcription of mouse rDNA. *DNA Cell Biol.* 15(2):167-73.
29. Embley TM, Martin W. 2006 Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature.* 440(7084):623-30.
30. Espinosa N, Hernández R, López-Griego L, López-Villaseñor I. 2002 Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene.* 289(1-2):81-6.
31. Fichorova RN, Trifonova RT, Gilbert RO, Costello CE, Hayes GR, Lucas JJ, Singh BN. 2006 *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infect. Immun.* 74:5773-9.

32. Figueroa-Angulo E, Martínez-Calvillo S, López-Villaseñor I, Hernández R. 2003 Evidence supporting a major promoter in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene. FEMS Microbiol Lett. 225(2):221-5.
33. Figueroa-Angulo E, María Cevallos A, Zentella A, López-Villaseñor I, Hernández R. 2006 Potential regulatory elements in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene promoter. Biochim Biophys Acta. 1759(10):497-501.
34. Firek S, Read C, Smith DR, Moss T. 1990 Point mutation analysis of the *Xenopus laevis* RNA polymerase I core promoter. Nucleic Acids Res. 18(1):105-9.
35. Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F. 2003 Ribosome assembly in eukaryotes. Gene. 313:17-42.
36. Fouts AC, Kraus SJ. 1980 *Trichomonas vaginalis*: reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. J Infect Dis. 141(2):137-143.
37. Fuentes V, Barrera G, Sánchez J, Hernández R, López-Villaseñor I. 2012 Functional Analysis of Sequence Motifs Involved in the Polyadenylation of *Trichomonas vaginalis* mRNAs. Eukaryot Cell. 11(6):725-34.
38. Goldman LM, Upcroft JA, Workowski K, Rapkin A. 2009 Treatment of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. Sex Health. 6(4):345-7.
39. Grummt, I. 1999. Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. 62: 109–54.
40. Grummt I. 2003 Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. Genes Dev. 17(14):1691-702.

41. Grummt I, Rosenbauer H, Niedermeyer I, Maier U, Ohrlein A. 1986 A repeated 18 bp sequence motif in the mouse rDNA spacer mediates binding of a nuclear factor and transcription termination. *Cell*. 45(6):837-46.
42. Hajdu SI. 2008 Scarcely Remembered Inventors of New Terms in Clinical and Laboratory Science *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 38(2):174-6.
43. Hajdu SI. 1998 The discovery of *Trichomonas vaginalis*. *Acta Cytol*. 42:1075.
44. Heix J, Grummt I. 1995 Species specificity of transcription by RNA polymerase I. *Curr Opin Genet Dev*. 5(5):652-6.
45. Hernández HM, Figueredo M, Garrido N, Sánchez L, Sarracent J. 2005 Intranasal immunisation with a 62 kDa proteinase combined with cholera toxin or CpG adjuvant protects against *Trichomonas vaginalis* genital tract infections in mice. *Int J Parasitol*. 35(13):1333-7.
46. Hernández-Romano P, Hernández R, Arroyo R, Alderete JF, López-Villaseñor I. 2010 Identification and characterization of a surface-associated, subtilisin-like serine protease in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*. 137(11):1621-35.
47. Hussein EM, Atwa MM. 2008 Infectivity of *Trichomonas vaginalis* pseudocysts inoculated intra-vaginally in mice. *J Egypt Soc Parasitol*. 38(3):749-62.
48. Ingersoll J, Bythwood T, Abdul-Ali D, Wingood GM, Diclemente RJ, Caliendo AM. 2008 Stability of *Trichomonas vaginalis* DNA in urine specimens. *J Clin Microbiol*. 46(5):1628-30.
49. Inoue H., Nojima H. and Okayama H. 1990 High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96:23-28.

50. Ishikawa Y, Safrany G, Hisatake K, Tanaka N, Maeda Y, Kato H, Kominami R, Muramatsu M. 1991 Structure of the core promoter of human and mouse ribosomal RNA gene. Asymmetry of species-specific transcription. *J Mol Biol.* 218(1):55-67.
51. Jeong SW, Lang WH, Reeder RH. 1996 The yeast transcription terminator for RNA polymerase I is designed to prevent polymerase slippage *J Biol Chem.* 271(27):16104-10.
52. Johnston VJ, Mabey DC. 2008 Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Curr Opin Infect Dis.* 21(1):56-64.
53. Kawauchi J, Mischo H, Braglia P, Rondon A, Proudfoot NJ. 2008 Budding yeast RNA polymerases I and II employ parallel mechanisms of transcriptional termination. *Genes Dev.* 22(8):1082-92.
54. Kelley LA, Sternberg MJ. 2009 Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc.* 4(3):363-71.
55. Kummer S, Hayes GR, Gilbert RO, Beach DH, Lucas JJ, Singh BN. 2008 Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microb Pathog.* 44(3):197-203.
56. Labhart P, Reeder RH. 1990 Functional difference between the sites of ribosomal 40S precursor 3' end formation in *Xenopus laevis* and *Xenopus borealis*. *Nucleic Acids Res.* 18(17):5271-7.
57. Lang WH, Reeder RH. 1993 The REB1 site is an essential component of a terminator for RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 13: 649–58.
58. Lang WH, Reeder RH. 1995 Transcription termination of RNA polymerase I due to a T-rich element interacting with Reb1p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(21):9781-5.

59. Langer D, Hain J, Thuriaux P, Zillig W. 1995 Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(13):5768-72.
60. Längst G, Schätz T, Langowski J, Grummt I. 1997 Structural analysis of mouse rDNA: coincidence between nuclease hypersensitive sites, DNA curvature and regulatory elements in the intergenic spacer. *Nucleic Acids Res.* 25(3):511-7.
61. Lau AO, Smith AJ, Brown MT, Johnson PJ. 2006 *Trichomonas vaginalis* initiator binding protein (IBP39) and RNA polymerase II large subunit carboxy terminal domain interaction. *Mol Biochem Parasitol.* 150(1):56-62.
62. Lehker MW, Arroyo R, Alderete JF. 1991 The regulation of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J Exp Med* 174: 311–18.
63. Lehker MW, Sweeney D. 1999 Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sex Transm Infect.* 75(4):231-8.
64. Liston DR, Johnson P J. 1999 Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element. *Mol. Cell. Biol.* 19:2380–8.
65. Long EO, Dawid IB. 1980 Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem.* 49:727-64.
66. López-Villaseñor I, Contreras AP, López-Griego L, Alvarez-Sánchez E, Hernández R. 2004. *Trichomonas vaginalis* ribosomal DNA: analysis of the intergenic region and mapping of the transcription start point. *Mol Biochem Parasitol.* 137(1):175-9.
67. Malik SB, Brochu CD, Bilic I, Yuan J, Hess M, Logsdon JM Jr, Carlton JM. 2011 Phylogeny of Parasitic Parabasalia and Free-Living Relatives Inferred from Conventional Markers vs. *Rpb1*, a Single-Copy Gene. *PLoS ONE* 6(6): e20774.

68. Malik SB, Pightling AW, Stefaniak LM, Schurko AM, Logsdon JM Jr. 2007 An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in *Trichomonas vaginalis*. PLoS One. 2007 Aug 6;3(8):e2879.
69. Mason SW, Wallisch M, Grummt I. 1997 RNA polymerase I transcription termination: similar mechanisms are employed by yeast and mammals. J Mol Biol. 268(2):229-34.
70. Mentel M, Martin W. 2008 Energy metabolism among eukaryotic anaerobes in light of Proterozoic ocean chemistry. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 363(1504):2717-29.
71. Midlej V, Benchimol M. 2010 *Trichomonas vaginalis* kills and eats--evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. Parasitology. 137(1):65-76.
72. Moss T. 2004 At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. Curr Opin Genet Dev. 14(2):210-7.
73. Moss T, Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T. 2006 A new paradigm for the regulation of the mammalian ribosomal RNA genes. Biochem Soc Trans. 34(Pt 6):1079-81.
74. Müller F, Tora L. 2009 TBP2 is a general transcription factor specialized for female germ cells. J Biol. 8(11):97.
75. Muresu R, Rubino S, Rizzu P, Baldini A, Colombo M, Cappuccinelli P. 1994 A new method for identification of *Trichomonas vaginalis* by fluorescent DNA in situ hybridization. J Clin Microbiol. 32(4):1018-22.
76. Nazar RN. 2004 Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes. IUBMB Life. 56(8):457-65

77. Nguyen TN, Schimanski B, Günzl A. 2007 Active RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei* harbors a novel subunit essential for transcription. *Mol Cell Biol.* 27(17):6254-63.
78. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. 2000 T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol.* 302(1):205-17.
79. Panigrahi SK, Jhingan GD, Som I, Bhattacharya A, Petri WA Jr, Bhattacharya S. 2009 Promoter analysis of palindromic transcription units in the ribosomal DNA circle of *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell.* 8(1):69-76.
80. Paule MR, White RJ. 2000 Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* 28(6):1283-98.
81. Peculis BA. 2002 Ribosome biogenesis: ribosomal RNA synthesis as a package deal. *Curr Biol.* 12(18):R623-4.
82. Pereira-Neves A, Benchimol M. 2008 *Trichomonas vaginalis*: in vitro survival in swimming pool water samples. *Exp Parasitol.* 118(3):438-41.
83. Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. 1998 Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev.* 11(2):300-17.
84. Prescott EM, Osheim YN, Jones HS, Alen CM, Roan JG, Reeder RH, Beyer AL, Proudfoot NJ. 2004 Transcriptional termination by RNA polymerase I requires the small subunit Rpa12p. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 101: 6068–73.
85. Provenzano D, Alderete JF. 1995 Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun.* 35:903–9.

86. Quon DV, d'Oliveira CE, Johnson PJ. 1992 Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 89(10):4402-6.
87. Ramón-Luing LD, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, Avila-González L, Arroyo R. 2011 Identification and characterization of the immunogenic cytotoxic TvCP39 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*. Int J Biochem Cell Biol. 43(10):1500-11.
88. Raska I, Koberna K, Malínský J, Fidlerová H, Masata M. 2004 The nucleolus and transcription of ribosomal genes. Biol Cell. 96(8):579-94.
89. Reeder RH, Lang W. 1994 The mechanism of transcription termination by RNA polymerase I. Mol Microbiol. 12(1):11-5.
90. Reeder RH, Lang WH. 1997 Terminating transcription in eukaryotes: lessons learned from RNA polymerase I. Trends Biochem Sci. 22(12):473-7.
91. Reeder RH, Guevara P, Roan JG. 1999 *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase I terminates transcription at the Reb1 terminator in vivo. Mol. Cell Biol. 19: 7369–7376.
92. Ribeiro KC, Pereira-Neves A, Benchimol M. 2002 The mitotic spindle and associated membranes in the closed mitosis of trichomonads. Biol Cell. 94(3):157-72.
93. Richard P, Manley JL. 2009 Transcription termination by nuclear RNA polymerases. Genes Dev. 23(11):1247-69.
94. Rosa Ide A, Rocha DA, de Souza W, Urbina JA, Benchimol M. 2011 Ultrastructural alterations induced by  $\Delta(24(25))$ -sterol methyltransferase inhibitors on *Trichomonas vaginalis*. FEMS Microbiol Lett. 315(1):72-8.

95. Rudloff U, Eberhard D, Tora L, Stunnenberg H, Grummt I. 1994 TBP-associated factors interact with DNA and govern species specificity of RNA polymerase I transcription. *EMBO J.* 13(11):2611-6.
96. Rughooputh S; Greenwell P. 2005 *Trichomonas vaginalis*: paradigm of a successful sexually transmitted organism. *Br J Biomed Sci.* 62(4): 193-200.
97. Ryu JS, Choi HK, Min DY, Ha SE, Ahn MH. 2001 Effect of iron on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol.* 87(2):457-60.
98. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989, *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
99. Schumacher MA, Lau AO, Johnson PJ. 2003 Structural basis of core promoter recognition in a primitive eukaryote. *Cell.* 115(4):413-24.
100. Schwebke JR. 2002 Update of trichomoniasis. *Sex Transm Infect.* 78(5):378-9.
101. Shaw P, Doonan J. 2005 The nucleolus. Playing by different rules? *Cell Cycle.* 4(1):102-5.
102. Simpson P, Higgins G, Qiao M, Waddell R, Kok T. 2007 Real-time PCRs for detection of *Trichomonas vaginalis* beta-tubulin and 18S rRNA genes in female genital specimens. *J Med Microbiol.* 56(Pt 6):772- 7.
103. Smith AJ, Chudnovsky L, Simoes-Barbosa A, Delgadillo-Correa MG, Jonsson ZO, Wohlschlegel JA, Johnson PJ. 2011(A) Novel core promoter elements and a cognate transcription factor in the divergent unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Mol Cell Biol.* 31(7):1444-58.

104. Smith A, Johnson P. 2011 (B) Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. Res Microbiol. 162(6):646-54.
105. Singh BN, Hayes GR, Lucas JJ, Sommer U, Viseux N, Mirgorodskaya E, Trifonova RT, Sassi RR, Costello CE, Fichorova RN. 2009 Structural details and composition of *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan in relevance to the epithelial immune function. Glycoconj J. 26(1):3-17.
106. Sogin ML. 1991 Early evolution and the origin of eukaryotes. Curr Opin Genet Dev. 1(4):457-63.
107. Sollner-Webb B, Mougey EB. 1991 News from the nucleolus: rRNA gene expression. Trends Biochem Sci. 16(2):58-62.
108. Tan S, Richmond TJ. 1998 Eukaryotic transcription factors. Curr Opin Struct Biol. 8(1):41-8.
109. Thurman AR, Doncel GF. 2011 Innate immunity and inflammatory response to *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis: relationship to HIV acquisition. Am J Reprod Immunol. 65(2):89-98.
110. Torok MR, Miller WC, Hobbs MM, Macdonald PD, Leone PA, Schwebke JR, Sena AC. 2007 The association between *Trichomonas vaginalis* infection and level of vaginal lactobacilli, in nonpregnant women. J Infect Dis. 196(7):1102-7.
111. Torres-Machorro AL, Hernández R, Alderete JF, López-Villaseñor I. 2009 Comparative analyses among the *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax*, and *Tritrichomonas foetus* 5S ribosomal RNA genes. Curr Genet. 55(2):199-210.
112. Torres-Machorro AL, Hernández R, Cevallos AM, López-Villaseñor I. 2010 Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? FEMS Microbiol Rev. 34(1):59-86.

113. TrichDB versión 1.3 11 de Enero del 2012.  
<http://trichdb.org/trichdb/showXmlDataContent.do?name=XmlQuestions.GenomeDataType>  
e
114. Upcroft P, Upcroft JA. 2001 Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev.* 14(1):150-64
115. Vanáčová S, Tachezy J, Ullu E, Tschudi C. 2001 Unusual diversity in alpha-amanitin sensitivity of RNA polymerases in trichomonads. *Mol Biochem Parasitol.* 115(2):239-47.
116. Vannini A, Cramer P. 2012 Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries. *Mol Cell.* 45(4):439-46
117. van Werven FJ, van Teeffelen HA, Holstege FC, Timmers HT. 2009 Distinct promoter dynamics of the basal transcription factor TBP across the yeast genome. *Nat Struct Mol Biol.* 16(10):1043-8.
118. Wang AL, Wang CC. 1985 Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol.* 14(3):323-35.
119. Weisenberger D, Scheer U. 1995 A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J Cell Biol.* 129(3):561-75.
120. WHO Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. World Health Organization; Geneva: 2001.  
[www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/006.htm](http://www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/006.htm).
121. Zubáčová Z, Cimbůrek Z, Tachezy J. 2008 Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Mol Biochem Parasitol* 161(1):49-54.
122. Zuker M. 2003 Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31(13): 3406-15.

### XIII. Artículo

C Model  
MOLBIO-10677; No. of Pages 9

ARTICLE IN PRESS

Molecular & Biochemical Parasitology xxx (2012) xxx–xxx

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect



Molecular & Biochemical Parasitology



## *Trichomonas vaginalis* ribosomal RNA: Identification and characterisation of the transcription promoter and terminator sequences

Bernardo Franco, Roberto Hernández, Imelda López-Villaseñor\*

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

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 22 February 2012  
Received in revised form 26 April 2012  
Accepted 24 May 2012  
Available online xxx

**Keywords:**  
Ribosomal genes  
RNA polymerase I  
Promoter  
Transcription terminating sequence  
*Trichomonas vaginalis*

### ABSTRACT

*Trichomonas vaginalis* is a parasitic protozoan of both medical and biological relevance. Transcriptional studies in this organism have focused mainly on type II pol promoters, whereas the elements necessary for transcription by polI or polIII have not been investigated. Here, with the aid of a transient transcription system, we characterised the rDNA intergenic region, defining both the promoter and the terminator sequences required for transcription. We defined the promoter as a compact region of approximately 180 bp. We also identified a potential upstream control element (UCE) that was located 80 bp upstream of the transcription start point (TSP). A transcription termination element was identified within a 34 bp region that was located immediately downstream of the 28S coding sequence. The function of this element depends upon polarity and the presence of both a stretch of uridine residues (U's) and a hairpin structure in the transcript. Our observations provide a strong basis for the study of DNA recognition by the polI transcriptional machinery in this early divergent organism.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The 18S, 5.8S and 28S eukaryotic rRNA coding regions are typically linked and constitute the so-called rRNA main transcription unit. Among protozoan organisms, there is enormous diversity in sequence and gene arrangement. Each transcriptional unit is separated by intergenic sequences that vary in length among organisms, ranging from 2 to 30 kbp [1]. Both the promoter and terminator sequences are located within this intergenic region. The ribosomal cistron is transcribed by RNA polymerase I (polI), and it has been shown that the elements that control the initiation of transcription are generally species-specific [2] although exceptions have been reported [3]. The transcription of the ribosomal genes may account for more than 80% of the total cellular RNA. Such high levels of transcription are achieved by the high copy number of ribosomal genes and by an efficient transcriptional machinery. The transcription of the ribosomal genes is tightly regulated. Indeed, cell fate may depend upon the number of active rRNA copies and the transcriptional status of these copies, which collectively regulate cell growth and proliferation [4].

*Trichomonas vaginalis* is a micro-aerotolerant, multi-flagellated parasitic protist. This eukaryotic microbe is the etiologic agent of trichomoniasis, the most common, non-viral sexually transmitted disease in humans [5]. Many studies have focused on transcription by RNA polymerase II (polII) in *T. vaginalis*; however, the transcription of the rRNA genes has not been thoroughly studied. Our group has previously determined the transcription start point (TSP) of the rRNA transcription unit [6], but the promoter and the transcription termination elements have not been characterised. Analysis of the intergenic sequence of the *T. vaginalis* ribosomal genes has revealed a lack of the repetitive or palindromic sequences (8–20 bp in length) that are known to regulate levels of transcription in other species [7–10]. Similarly, Sal boxes, which are known transcription terminating sequences in higher eukaryotes, are also not present [11]. However, two tracts of thymidine residues (T's) have been found at the 3' end of the 28S gene, and as these elements have been described to mediate polI termination in eukaryotes, they may function as the terminating sequence elements in *T. vaginalis* ribosomal genes [12].

The goal of the present study was to delineate the promoter and transcription termination elements in the *T. vaginalis* rDNA. To this end, we developed a transcription-based reporter assay that utilised the co-transfection of control and variable reporters, thereby allowing for comparisons in expression. We found that the promoter region was contained within the –128/+50 base region relative to the TSP. Additionally a putative upstream control element (UCE) was identified within this sequence. Termination of

Abbreviations: TSP, transcription start point; polI, RNA polymerase I; UCE, upstream control element; CE, core element; ETS, external transcribed spacer; PCR, polymerase chain reaction.

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56228952.

E-mail address: imelda@biomedicas.unam.mx (I. López-Villaseñor).

0166-6851/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.05.004>

Please cite this article in press as: Franco B, et al. *Trichomonas vaginalis* ribosomal RNA: Identification and characterisation of the transcription promoter and terminator sequences. Mol Biochem Parasitol (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.05.004>

**Table 1**  
Plasmids used in the present study.

Plasmid name	Characteristics
pUC18	General cloning vector (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Canada)
p921	Plasmid derived from pBluescript; contains the complete <i>T. vaginalis</i> rDNA, EcoRI fragment [6]
pConst	Plasmid derived from pUC18, containing the HindIII-XbaI fragment from p921; comprises 1525 bp of the intergenic region and a fragment of the 18S gene. A cat sequence replaced the XbaI-MluI fragment of the 18S and was used as a transcriptional reporter, and is followed by the anchor sequence for cDNA synthesis. The 3' end of the cloned fragment contains a 165 bp sequence containing the poly putative terminating sequence, cloned as XbaI-BamHI
pVar	Similar to pConst, but a <i>gfp</i> sequence replaced the XbaI-MluI fragment of the 18S and was used as a transcriptional reporter, in which mutations were performed
p(-901)+277	Derived from pVar, comprising fragment -901/+277 relative to the TSP
p(-748)+277	Derived from pVar, comprising fragment -748/+277 relative to the TSP
p(-448)+277	Derived from pVar, comprising fragment -448/+277 relative to the TSP
p(-231)+277	Derived from pVar, comprising fragment -231/+277 relative to the TSP
p(-128)+277	Derived from pVar, comprising fragment -128/+277 relative to the TSP
p(+1)+277	Derived from pVar, comprising fragment 1/+277 relative to the TSP
p(-1247)+129	Derived from pVar, comprising fragment -1247/+129 relative to the TSP
p(-1247)+1	Derived from pVar, comprising fragment -1247/+1 relative to the TSP
p(-128)+129	Derived from pVar, comprising fragment -128/+129 relative to the TSP
p(-128)+50	Derived from pVar, comprising fragment -128/+50 relative to the TSP
p(-50)+50	Derived from pVar, comprising fragment -50/+50 relative to the TSP
p(-128)+50 TSP mut)	Derived from p(-128)+50, with 3 base changes in the TSP, TCG → GTT. Underlined is the +1 position in the putative UCE Box 1 distal (TTTGCTC for TGTACGC)
pBox1(distal)mut	Derived from p(-128)+50, with 3 base changes in the putative UCE Box 2 distal (CGAAAAA for CTACACA)
pBox2(distal)mut	Derived from p(-128)+50, with 3 base changes in the putative UCE Box 2 distal (CGAAAAA for CTACACA)
pBox1-2(distal)mut	Derived from p(-128)+50 but with the double mutation in as in the above Box 1 distal and Box 2 distal
pVar(-INT)	Derived from pVar, lacking the full intergenic fragment. This was removed by HindIII and NruI digestion, filled in with DNA polymerase I Klenow fragment, and re-ligated
pConstΔEAT	Derived from pConst but without the 165bp putative terminating sequence. The EcoRI restriction site was removed from the multiple cloning site in the pUC18 vector
pTer53	Derived from pConstΔEAT; contains the 165bp terminating sequence cloned as an EcoRI fragment inside the coding sequence of the constant reporter sequence (cat) in the 5'-3' orientation
pTer35	Derived from pConstΔEAT; contains the 165bp terminating sequence cloned as an EcoRI fragment inside the coding sequence of the constant reporter sequence (cat) in the 3'-5' orientation
pTer-7 U's mut	Derived from pTer53. The 7 U's sequence was changed to UGUGUGU in the transcript
pTer-4 U's mut	Derived from pTer53. The CACUUUU sequence was changed to CAUUGUC in the transcript
pTer53ΔBAX	Derived from pTer53; the BamHI and XbaI restriction sites were removed from the multiple cloning site in the vector

**Table 1 (Continued)**

Plasmid name	Characteristics
pParental min	Derived from pTer53ΔBAX; the Ter53 sequence was replaced with 34 bp minimal terminating sequences using XbaI and BamHI restriction sites
pStem-Swap	Constructed as pParental min; the sequence in the stem was swapped
pStem-Swap 7A's	Constructed as pParental min; the sequence in the stem was swapped and the T stretch was replaced with an A stretch

transcription by *polI* was found to depend upon the presence of a tract of U's, followed by a stem-loop structure in the transcript.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and enzymes

All chemicals and enzymes were molecular biology grade or higher. Chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., Research Organics, Gibco BRL and J.T. Baker. Enzymes were purchased from Invitrogen.

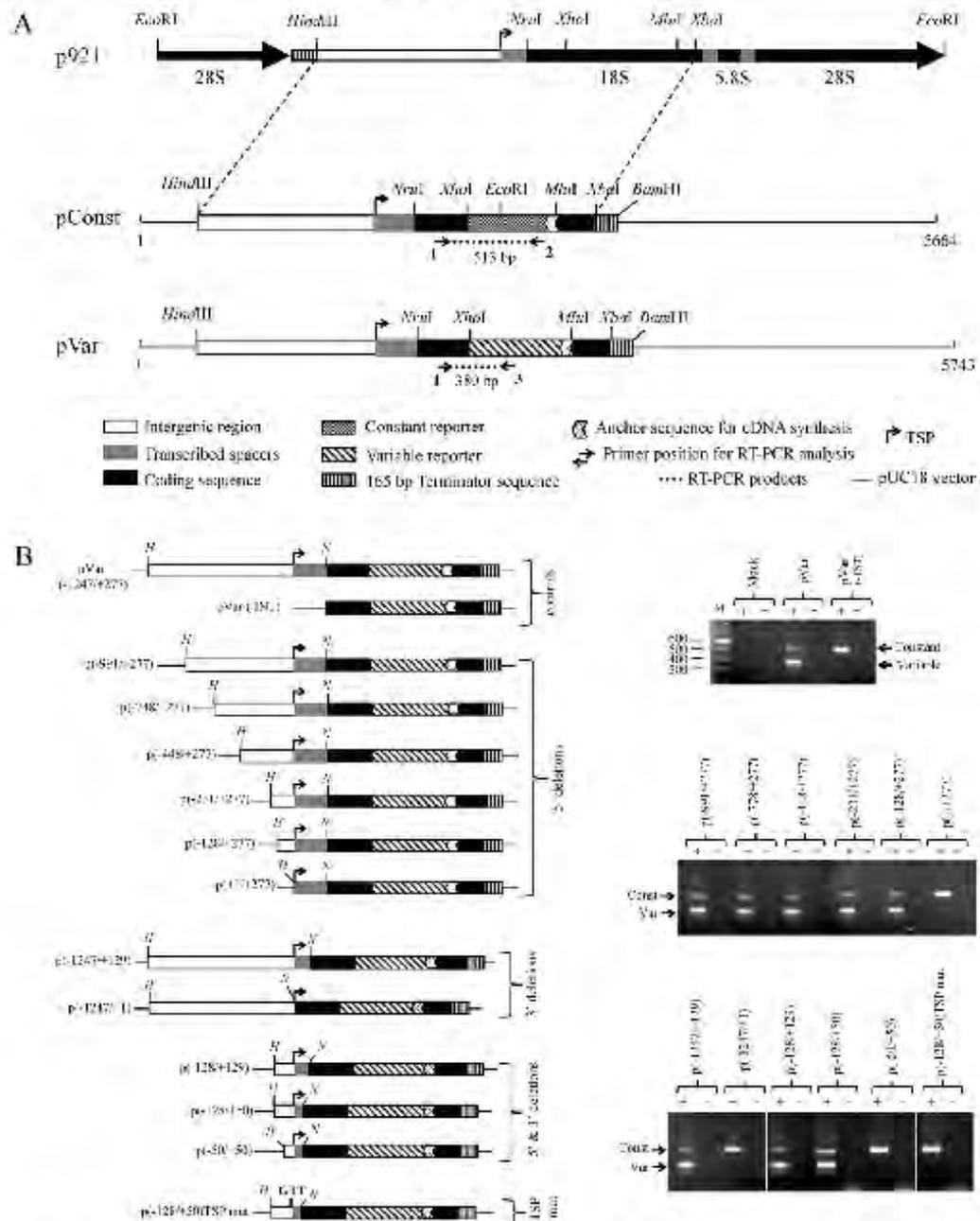
### 2.2. Cell culture

The *T. vaginalis* strain CNCD147 was cultured as previously described [13,14] using trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium supplemented with 10% heat-inactivated horse serum at 37 °C.

### 2.3. Plasmids

All molecular biology procedures were performed by standard methods [15]. A dual reporter co-transfection assay was used to analyse the effects of deletions or mutations in the intergenic region on transcription by *polI*. The analysed sequence is a *HindIII-NruI* fragment that includes 1247 bp of the rDNA intergenic region and the external transcribed spacer (ETS, 277 bp) (Fig. 1A). The *HindIII-XbaI* fragment from p921 [6] (Table 1) was cloned into pUC18 (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Canada). This fragment consists of the intergenic region, the ETS and 1524 bp of the 18S coding region (sometimes referred to as '16S-like' in trichomonads). The 165 bp fragment immediately downstream from the 28S coding region that contains a potential *polI* transcription termination sequence [12] was amplified with the TerFw and TerRv primers (Table S1) and inserted at the *XbaI-BamHI* sites downstream the 18S coding region (Fig. 1A). Two reporter plasmids were constructed: the constant reporter (pConst) contained 655 bp of the *cat* gene and was used as an internal transcription control throughout the transfection experiments. The variable reporter (pVar) contained 734 bp of the *gfp* gene and was used to evaluate the effects on transcription of deletions or mutations in the intergenic region. The 891 bp fragment between the *XbaI* and *MluI* sites within the 18S coding region was replaced with either the constant or the variable reporter sequences, amplified using the CATFw and CATcRv primers for the constant sequence or the GFPFw and GFPcRv primers for the variable sequence. Both reverse primers contained an added anchor *cit* (*cis*-locus of transfer) sequence to allow for the simultaneous synthesis of cDNA during the transcription analysis (Table S1). The *cit* sequence (Table S1) was obtained from the *cit* locus from plasmid pJV1 from *Streptomyces phacelomogenes* (Database ID: U23762.1) and is not present in the *T. vaginalis* genome.

Several plasmids were derived from the pVar vector by sequential deletions (approximately 200 bp each) from either the 5' end, the 3' end, or from both ends of the *HindIII-NruI* fragment (Fig. 1B).



**Fig. 1.** Reporter plasmids used to define the *T. vaginalis* polI promoter. Panel A: generation of the constant reporter (pConst) and the variable reporter (pVar). These plasmids were derived from p921, which contains a complete copy of the *T. vaginalis* ribosomal gene [6]. The HindIII-XbaI fragment from p921 was cloned into pUC18, and a 165 bp putative terminating sequence was inserted downstream from the 18S coding region. 801 bp from the 18S sequence were replaced by 655 bp of the *out* gene to generate the constant reporter plasmid (pConst) or by 734 bp of the *gp* gene to create the variable reporter plasmid (pVar). The pConst plasmid was always co-transfected with the pVar plasmid (or its mutated derivatives) as an internal transcriptional control. Both constructs contain an anchor sequence used for the simultaneous synthesis of cDNA from the

Please cite this article in press as: Franco B, et al. *Trichomonas vaginalis* ribosomal RNA: Identification and characterization of the transcription promoter and terminator sequences. Mol Biochem Parasitol (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.05.004>

These deletions were obtained by PCR amplification and cloning of the desired fragments using the *HindIII* and *NruI* sites. Plasmid pVar(-INT) lacking the full intergenic fragment and the ETS was constructed by digestion of pVar with *HindIII* and *NruI* followed by blunting with the DNA polymerase Klenow fragment (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and re-ligation (Fig. 1B and Table 1).

Other plasmids were designed to evaluate a fragment of 165 bp located immediately downstream of the 28S coding region, that could include a poly transcription terminator. These constructs were created by cloning the *HindIII*-*XbaI* fragment from the pConst plasmid (Fig. 1A) into a pUC18 plasmid lacking the *EcoRI* site in the multiple cloning site (pConst $\Delta$ E $\Delta$ T). The 165 bp fragment (with *EcoRI* ends) was then inserted in the *EcoRI* site inside the constant reporter of pConst $\Delta$ E $\Delta$ T (Table 1). Using this strategy, the 165 bp putative terminator sequence was cloned in both orientations: 5'  $\rightarrow$  3' (pTer53) and 3'  $\rightarrow$  5' (pTer35) (Fig. 3A). All plasmid constructs were confirmed by automated sequencing.

#### 2.4. Mutagenesis

The TSP, the putative UCE and the terminating sequences were mutated using the Quick Change Mutagenesis kit (Stratagene, USA) and the primers listed in Table S1. Sequences were confirmed by automated sequencing.

#### 2.5. Construction of a minimal terminating sequence by primer alignment

To determine the minimal sequence necessary to terminate transcription, complementary primers were designed with the appropriate sequences (Table S1). Nucleotides corresponding to the *XbaI* and *BamHI* overhangs were added to the ends of each primer and were left non-complementary, as if the DNA had been digested with these enzymes. The primers were then annealed by heating an equimolar mixture of the sense and complementary strands in TE buffer at 94 °C and then slowly cooling the solution to 45 °C at a rate of 1.5 °C per 30 s. The annealed primers (34 bp) replaced the 165 bp termination fragment from pTer53 using *XbaI* and *BamHI* sites through the intermediate plasmids described in Table 1. Following this strategy the pParental min, pStem-Swap and pStem-Swap 7A's plasmids were constructed. All plasmid sequences were confirmed by automated sequencing.

Plasmids used for transient transfections were purified using the QIAgen mini plasmid purification kit (Qiagen, Germany). The method for determining the *in vivo* capability of the mutated sequences to terminate transcription was identical to that described below for the full size fragment, with the exception that the anticipated size of one of the final PCR products was smaller (Fig. 3A).

#### 2.6. Transcriptional analysis

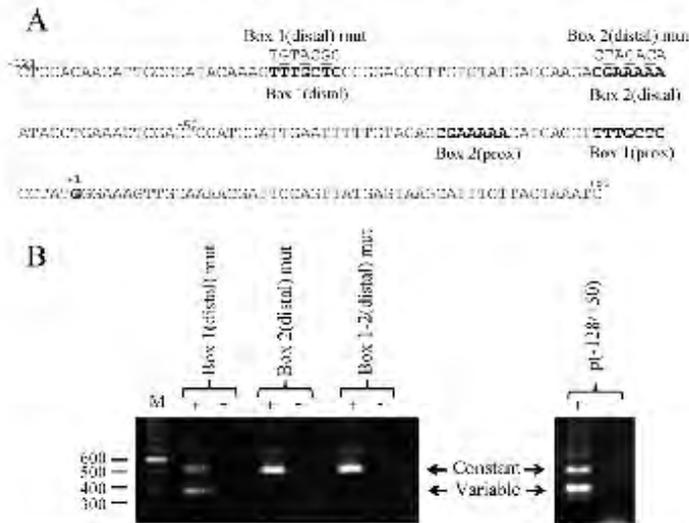
The transient transfection of *T. vaginalis* with plasmids was performed as previously described [16] with some modifications. Briefly, the cells were grown in TYM medium with 10%

heat-inactivated horse serum to a density of approximately  $1.5 \times 10^6$  cells per ml. For each transfection,  $2.4 \times 10^6$  cells were used. The cells were harvested by centrifugation and were washed twice in 20 ml of Zimmerman solution (1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 132 mM NaCl, 8 mM KCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 mM  $\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$  and 90  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ) at 4 °C. The cells were resuspended in Zimmerman solution to a concentration of  $2.4 \times 10^6$  cells per 400  $\mu\text{l}$  of solution at 4 °C. To each 400  $\mu\text{l}$  of cell suspension, 50  $\mu\text{g}$  of each plasmid was added (for both single and co-transfections) in a total volume of 50  $\mu\text{l}$ . The samples were then incubated for 5 min prior to electroporation. Electroporation was performed using BTX electroporation cells and the BTX apparatus at 360 V, 13  $\Omega$  and 1500  $\mu\text{F}$ . A mock electroporation control was performed in the absence of DNA (water only). The cells were recovered in 30 ml of TYM medium supplemented with 10% heat-inactivated horse serum at 37 °C. Twenty-two hours after electroporation, the cells were recovered by centrifugation at 3000 rpm for 10 min and washed once in PBS at 37 °C. Total RNA was then extracted using the Trizol reagent (Invitrogen). RNA integrity was verified by agarose gel electrophoresis under denaturing conditions. All transfections were performed at least twice in independent experiments with the exception of the mock plasmid, the pVar and the pVar(-INT) controls, which were performed five times. One microgram of total RNA was used to synthesise cDNA using the appropriate set of primers. The cDNA-*act* primer alone was used for the analysis of the promoter, and the cDNA-*act* primer was used in combination with the RvCATRT-PCR2 primer for the analysis of the terminating sequence. The latter primer was used in this case because we needed to obtain cDNA upstream from the terminating sequence for use as a positive transcriptional control. Each reaction was set up using 1  $\times$  first strand buffer for SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen), 1 mM of the dNTP mix and 100 ng of primers. The samples were incubated at 65 °C for 5 min followed by 1 min on ice. One hundred units of SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) was added to each reaction, and the reactions were incubated at 42 °C for 15 min followed by 50 °C for 30 min. The reactions were stopped with a 15 min incubation at 70 °C. The samples were briefly centrifuged, and 1 U of RNase H (Invitrogen) was added. The samples were subsequently incubated at 37 °C for 35 min. Each reaction was then digested with *HhaI* and *EcoRI* to eliminate any possible dsDNA plasmid contamination present in the RNA samples. For each cDNA synthesis reaction, a control parallel reaction was performed in the absence of reverse transcriptase, and further used as template for PCR. The two reactions were loaded in adjacent lanes: (+) or (-) refer to the presence or absence of reverse transcriptase in the cDNA synthesis reaction (Figs. 1B, 2, 3B and C). The lack of amplification products in the (-) lanes indicates that amplicons observed in the (+) lanes truly derive from RNA transcripts.

Multiplex PCR reactions were performed in 20  $\mu\text{l}$  final volumes with 1  $\times$  reaction buffer for *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen), 1  $\times$  enhancer solution for *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen), 1 mM dNTP mix, 1.5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 ng of each primer, 0.625 U of *Pfx* thermostable polymerase (Invitrogen) and 1  $\mu\text{l}$  of cDNA template. The thermocycler program used for all transcriptional analyses consisted of an initial step of 5 min at 94 °C followed by 25 cycles of

two transcripts. The primers used for the RT-PCR are shown as arrows. 1: oligo Pw 18S; 2: oligo RvCAT RT-PCR; 3: oligo RvGFP RT-PCR. TSP: transcription start point. Panel B: definition of the poly promoter region by sequential deletions and mutagenesis. Left: schematic representation of reporter plasmids. All constructs are derived from plasmid pVar. Numbers in parenthesis refer to the preserved bases relative to the TSP. pVar(-INT) lacks the complete intergenic and ETS regions and was used as a no-transcription control. 5' deletions refer to the deletions in the intergenic region. 3' deletions refer to deletions in the ETS. H, *HindIII*; N, *NruI*. Right: the ability of the different plasmids to direct transcription of the reporter gene in *T. vaginalis* was evaluated by RT-PCR. *T. vaginalis* cells were co-transfected with the pConst control and each pVar derivative, followed by RNA extraction, cDNA synthesis and multiplex amplification of both the constant and the variable reporter fragments, as described in Section 2. Amplicons were analysed by electrophoresis on a 2% agarose gel followed by ethidium bromide staining. Plasmids used in each experiment are indicated at the top of the gels. To avoid overloading the figure, the pConst control is not indicated although it was always included in the transfections. Const: RT-PCR product from the constant transcription reporter. Var: RT-PCR product from the variable transcription reporter. M: molecular weight markers. Mock: *T. vaginalis* cells were mock-transfected with water. (+) lanes: reverse transcriptase was added in the cDNA synthesis step. (-) lanes: reverse transcriptase was not included in the cDNA synthesis step. The poly promoter was mapped to the -128 to +50 bp region relative to the TSP, as this region was the smallest fragment tested that allowed for the amplification of the variable reporter.

Please cite this article in press as: Franco B, et al. *Trichomonas vaginalis* ribosomal RNA: Identification and characterisation of the transcription promoter and terminator sequences. Mol Biochem Parasitol (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.05.004>



**Fig. 2.** Identification of a putative UCE within the  $-128/+50$  fragment. Panel A: two repeated elements (bold) are located near the TSP. These are referred to as Box1(distal)Box1(prox) and Box2(distal)Box2(prox). These two putative UCE sequences were analysed by site directed mutagenesis in the pVar(-128/+50) plasmid. The mutated regions are shown above the parental sequence, and the mutated nucleotides are underlined. Independent mutants for Box1(distal) and Box2(distal) were constructed, as was a double mutant for Box1-2(distal). Panel B: RT-PCR analysis of *T. vaginalis* cells transfected with the Box1(distal)mut, Box2(distal)mut, the double Box1-2(distal)mut, and the p(-128/+50) plasmids. (+) and (-) lanes are as described in Fig. 1.

1 min at 94 °C, 30 s at 54 °C, 30 s at 68 °C and a final step of 10 min at 68 °C. PCR products were run on 2% TAE agarose gels, stained with ethidium bromide and visualised by UV light. Additional amplifications were performed using a lower number of cycles (10, 12, 15, and 25 cycles) with equivalent results (data not shown). The identities of the amplicons were confirmed by Southern blot hybridisation (data not shown). Control mock-transfection assays were carried out, and no amplification bands were obtained.

### 2.7. In silico models of the RNA structures

Modelling of the terminating sequence was performed with the Mfold web server (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) using the default settings [17].

## 3. Results and discussion

### 3.1. Strategy and design of a transcriptional reporter system for *polI*

The rDNA intergenic sequence in *T. vaginalis* is relatively small (1690bp) when compared with that of other organisms, where it ranges from 2 to 30 kbp. The rDNA regulatory elements are generally located within this region and include the TSP, the upstream control element (UCE), the promoter, enhancer regions, intergenic promoters and the transcription terminator. In most organisms, the ribosomal genes are grouped in tandem, and *T. vaginalis* has approximately 14 copies of this gene cluster [1]. Using genome sequencing data [18], we compared the larger rDNA contigs and found that the different copies of the rDNA sequence were almost identical. Although extensive comparisons among databases were made, we were not able to identify any repetitive elements, conserved transcription factor binding sequences, or strong homology to other intergenic sequences, even in organisms

that were evolutionarily related to *T. vaginalis*. Previously, our group determined the transcription start point for the *T. vaginalis* rRNA genes [6]. The aim of the present work was to define the promoter region and the termination sequences necessary for transcription by RNA polI in *T. vaginalis*.

Our first goal was to design a reporter system that allowed us to monitor transcription from a transiently transfected rRNA promoter construct. A protein reporter system could not be used because polI transcripts lack the 5' cap and the 3' polyA tail that are necessary for nuclear exportation and cytoplasmic translation. Therefore, our strategy was to analyse RNA expression using a two-plasmid co-transfection system. In this system, one plasmid contained the almost complete parental rRNA intergenic region and the ETS, which drove the constant expression of a reporter transcript (pConst). The second plasmid contained a different reporter transcript (pVar) in which mutations and deletions were introduced into the intergenic region. Variations in the transcription of these mutants could then be evaluated relative to the pConst plasmid (Fig. 1A and Table 1). The two reporters (constant and variable) contain a common anchor sequence at their 3' end that allows for the simultaneous synthesis of both reporter cDNAs by PCR amplification in a multiplex reaction. The resulting RT-PCR products (513 bp for the pConst plasmid and 380 bp for the pVar plasmid) can be distinguished on an agarose gel. The multiplex PCR was performed using the sets of primers shown in Fig. 1A.

Our analysis of the RT-PCR products after co-transfection of *T. vaginalis* cells with the two plasmids reveals that the presence of the reporter amplicons depends upon the intergenic region (Fig. 1B). The presence of the two amplicons (constant and variable) in the pVar lane confirms that both reporters are transcribed when the complete intergenic region is present. In contrast, no transcription of the variable reporter is detected when the pVar(-INT) plasmid is transfected. Therefore, our system permits an evaluation of the promoter activity of the full length or mutant intergenic regions.

Please cite this article in press as: Franco B, et al. *Trichomonas vaginalis* ribosomal RNA: Identification and characterisation of the transcription promoter and terminator sequences. Mol Biochem Parasitol (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.05.004>





We initially determined whether the complete 165 bp sequence was able to facilitate the termination of transcription of the reporter gene and, if so, whether this function was dependent upon the polarity of the sequence. Because the yeast and mouse terminators have been shown to have a reduced efficiency when the orientation of the sequence is changed [20–22], we tested both orientations of the 165 bp region. We used a similar strategy as that used for the analysis of the promoter elements (e.g., RT-PCR amplification of a transcribed reporter). Our tested constructs were derived from the constant reporter plasmid. The *EcoRI* site in the constant reporter sequence was used to insert the 165 bp putative terminator fragment in both orientations. These orientations were termed pTer53 (for the 5′–3′ orientation) and pTer35 (for the 3′–5′ orientation) (Fig. 3A). To evaluate transcription termination activity in the transfected cells, we synthesised cDNA with two primers, one that was upstream to and one that was downstream of the terminator sequence, followed by PCR amplification. In this system, amplicon A (233 bp) would always be detected because it is derived from the transcribed region upstream of the putative terminator sequence. This amplicon serves as an internal transcriptional control and additionally confirms that the plasmid was effectively transfected. In contrast, amplicons B (280 bp) and C (678 bp) would be amplified only when read-through transcripts are present (Fig. 3A).

When the cells were transfected with the pTer53 plasmid, only control amplicon A was detected, suggesting that the 165 bp sequence indeed contains a transcription termination element (Fig. 3B, lanes Ter53). In contrast, when pTer35 was transfected, all three amplicons (A–C) were detected. This indicates that transcription was not halted and that proper termination depended upon the polarity of the 165 bp sequence (Fig. 3B, lanes Ter35). As shown in Fig. 3B, several long stretches of uridine residues (U's) are contained within the Ter35 sequence. Nevertheless, this sequence is unable to halt transcription. This result suggests that, in *T. vaginalis*, a stretch of U's in the transcript is not sufficient to terminate transcription and that additional element(s) are required. Such elements are not present in the pTer35 construct.

To test for additional motifs or structures present in the terminator, we mutated various elements in the Ter53 sequence and tested the ability of the mutants to terminate transcription. First, the stretch of 7 U's was replaced by UGUGUGU to create the plasmid, pTer-7 U's mut (positions 4–10 of the Ter53 sequence; Fig. 3B). This construct was unable to stop transcription, as PCR products B and C were readily amplified (Fig. 3B, lanes Ter-7 U's mut). In a second construct, the stretch of 4 U's (CACUUUU sequence, positions 24–30 of the Ter53 sequence) was replaced by CAUGUG to create the plasmid, pTer-4 U's mut (Fig. 3B). This element was chosen because it has a strong sequence similarity to a previously proposed terminator sequence in *Leishmania amazonensis* (CCUUUUU). It is worth mentioning that in this kinetoplastid, the rRNA transcription terminator sequence seems to be orientation-independent [23]. This second mutant construct was unable to terminate transcription (Fig. 3B, lanes Ter-4 U's mut) in *T. vaginalis*, even though the first stretch of 7 U's was still present. Taken together, these results suggest that both the tract of U's and a second downstream element are important for the termination of transcription by *polI* in *T. vaginalis*.

At this point, we were not able to determine whether the inability of the mutants to terminate transcription resulted from changes in the sequence or from changes in the secondary structure of the RNA molecule. Therefore, computational models of the secondary structures of these RNAs were created using the Mfold program (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) [17]. As depicted in Fig. 3B, the Ter53 sequence is predicted to adopt a fold with an unpaired stretch of U's followed by a stem-loop. In contrast, in the Ter35 sequence, several stretches of U's are found, but these are predicted to be contained within

a long stem (Fig. 3B). Similarly, both the pTer-7 U's mut and the pTer-4 U's mut RNAs are predicted to adopt different stem-loop structures than the parental molecule. To distinguish between the effects caused by changes in the sequence and the effects caused by changes in the secondary structure of the RNA terminator element, we constructed and tested additional plasmids.

First, we created a shorter version of the terminator region that included the first 34 bp of the terminator region that included the 7 U's motif, and the stem-loop (which involves the 4 U's motif) (Fig. 3C, Parental min). Using the same assay described above, this 34 bp-long sequence efficiently directed the termination of transcription (Fig. 3C, lanes Parental min). This finding indicates that all of the necessary elements for the termination of transcription by *polI* are contained within the 34 bases downstream of the 28S coding region.

Two additional 34 bp mutant constructs were created: in the first, pStem-Swap, the 7 U's motif and the stem-loop structure were maintained, but the sequence of the stem was interchanged. In the second (pStem-Swap 7A's), the 7 U's motif was replaced with 7 adenine residues (A's) in the pStem-Swap. It is important to note that the predicted secondary structure of both mutants is the same as that of the pParental min (Fig. 3C and Table 1). The Stem-Swap mutant was capable of efficiently directing the termination of transcription (Fig. 3C, lanes Stem-Swap). This supports the proposal that the stem-loop structure is important, regardless of the nucleotide sequence of the stem. In contrast, all three PCR products are amplified when the Stem-Swap 7A's construct is used, implying that this construct is unable to terminate transcription (Fig. 3C, Stem-Swap 7A's). Therefore, the track of U's likely plays an essential role in the termination of transcription by *polI*. In conclusion, the *T. vaginalis* transcription terminator sequence for RNA *polI* behaves as an efficient and orientation-dependent terminator that requires two important features: a stretch of U's and a hairpin structure. The stretch of U's might be essential for transcript release and the hairpin structure might be the binding sequence for the DNA-binding protein that effects termination [24]. Nevertheless, additional studies will be required to identify factors involved in the termination process.

#### 4. Conclusions

This is the first functional characterisation for a *polI* type promoter in trichomonads. The defined promoter is comprised of a compact region of about 180 bp, where a single TSP and a potential UCE element were identified. Regarding transcription termination, a functional element of 34 bp was located downstream of the 28S gene. It was demonstrated that transcription termination depends on polarity, and the role of a stretch of U's followed by a hairpin structure was established. This work may provide a basis for the study of the *polI* machinery in early divergent protozoa.

#### Acknowledgments

This work was supported by grant P45037-Q from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, and grant IN220210 from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Preliminary work from Karla López is acknowledged. This work was done in partial fulfilment of the requirements for a Ph.D. degree from the Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, by Bernardo Franco who was recipient of the CONACYT scholarship #199648.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.05.004>.

#### References

- [1] Torres-Machorro AL, Hernández R, Cevallos AM, López-Villaseñor I. Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? *FEMS Microbiology Reviews* 2010;34:59–86.
- [2] Doelling JH, Pikaard CS. Species-specificity of rRNA gene transcription in plants manifested as a switch in RNA polymerase specificity. *Nucleic Acids Research* 1996;24:4725–32.
- [3] Culotta VC, Wilkinson JK, Soliner-Webb B. Mouse and frog violate the paradigm of species-specific transcription of ribosomal RNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84:7498–502.
- [4] Moss T, Stefanovsky VY. At the center of eukaryotic life. *Cell* 2002;109:545–8.
- [5] WHO: <http://www.who.int/hiv/pub/sti/pub7/en/index.html>.
- [6] López-Villaseñor I, Contreras AP, López-Criego I, Alvarez-Sánchez E, Hernández R. *Trichomonas vaginalis* ribosomal DNA: analysis of the intergenic region and mapping of the transcription start point (TSP). *Molecular and Biochemical Parasitology* 2004;137:175–9.
- [7] Lingst C, Schätz T, Langowski J, Grummt I. Structural analysis of mouse rDNA: coincidence between nuclease hypersensitive sites, DNA curvature and regulatory elements in the intergenic spacer. *Nucleic Acids Research* 1997;25:511–7.
- [8] Kuhn A, Grummt I. A novel promoter in the mouse rDNA spacer is active in vivo and in vitro. *EMBO Journal* 1987;6:3487–92.
- [9] Clos J, Normani A, Ohrlain A, Grummt I. The core promoter of mouse rDNA consists of two functionally distinct domains. *Nucleic Acids Research* 1986;14:7581–95.
- [10] Figueroa-Angulo E, Cevallos AM, Zenitella A, López-Villaseñor I, Hernández R. Potential regulatory elements in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene promoter. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006;1759:497–501.
- [11] Pfeleiderer C, Smid A, Bartsch I, Grummt I. An undecamer DNA sequence directs termination of human ribosomal gene transcription. *Nucleic Acids Research* 1990;18:4727–36.
- [12] Reeder RH, Lang WH. Terminating transcription in eukaryotes: lessons learned from RNA polymerase I. *Trends in Biochemical Sciences* 1997;22:473–7.
- [13] Diamond LS. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *Journal of Parasitology* 1957;43:488–90.
- [14] Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of laminal parasitic protozoa of clinical importance. *Clinical Microbiology Reviews* 2002;15:329–41.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
- [16] Delgadillo MC, Liston DR, Niazi K, Johnson PJ. Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:4716–20.
- [17] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 2003;31:3406–15.
- [18] Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, et al. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 2007;315:207–12.
- [19] Heix J, Grummt I. Species specificity of transcription by RNA polymerase I. *Current Opinion in Genetics and Development* 1995;5:652–6.
- [20] Grummt I, Maier U, Ohrlain A, Hassouna N, Bachelletier JP. Transcription of mouse rDNA terminates downstream of the 39 end of 28S RNA and involves interaction of factors with repeated sequences in the 39 spacer. *Cell* 1985;43:801–10.
- [21] Lang WH, Reeder RH. The REB1 site is an essential component of a terminator for RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 1993;13:649–58.
- [22] Richard P, Manley JL. Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes and Development* 2009;23:1247–60.
- [23] Abreu-Blanco MT, Ramírez JL, Pinto-Santini DM, Papadopoulos B, Guevara P. Analysis of ribosomal RNA transcription termination and 3' end processing in *Leishmania amazonensis*. *Gene* 2010;451:15–22.
- [24] Lang WH, Reeder RH. Transcription termination of RNA polymerase I due to a T-rich element interacting with Reb1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:9781–5.

Please cite this article in press as: Franco B, et al. *Trichomonas vaginalis* ribosomal RNA: Identification and characterisation of the transcription promoter and terminator sequences. *Mol Biochem Parasitol* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.05.004>