

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

PROGRAMA DE CIENCIAS GENÓMICAS

**“Caracterización estructural y funcional de la proteína
Tv-PSP1 de *Trichomonas vaginalis*”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

BIÓL. VICTOR HUGO MORALES BERNARDINO

DIRECTORA

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

CODIRECTOR

Dr. Enrique Rudiño Piñera

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, julio de 2020

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dra. Minerva Camacho Nuez
Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM.

Secretario: Dra. Maria Elizbeth Álvarez Sánchez
Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM.

Vocal: Dr. Enrique Rudiño Piñera
Instituto de Biotecnología, UNAM

1^{er} Suplente Dra. Claudia Selene Zárate Guerra
Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM.

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez
Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM

CODIRECTOR

Dr. Enrique Rudiño Piñera
Instituto de Biotecnología, UNAM

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, por aceptarme en el posgrado de ciencias genómicas, donde he logrado desarrollar habilidades importantes para mi vida profesional, también por brindarme apoyo económico a través de la Coordinación de Servicios Estudiantiles para el proyecto estudiantil sembrando propuestas: “CARACTERIZACIÓN DEL PLEGAMIENTO DE LA PROTEÍNA Tv-PSP1 EN *TRICHOMONAS VAGINALIS*”.

Agradezco el apoyo económico brindado como becario (**893801**) al CONACYT, sin su ayuda no habría logrado concluir esta maestría.

A la Sociedad Mexicana de Proteómica, por el apoyo económico recibido para la presentación de este proyecto en el “Octavo simposio de la Sociedad Mexicana de Proteómica”.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por el tiempo de súper cómputo brindado en MIZTLI.

A la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez por haberme brindado tan maravillosa oportunidad de realizar esta tesis bajo su tutoría y en su laboratorio, muchas gracias.

Al Dr. Enrique Rudiño por tan cálida ayuda y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr., Rodrigo Arreola por ayudarme y apoyarme con su conocimiento en la tarea de comprender tan fascinante mundo de las proteínas.

A la Dra., Minerva Camacho por su ayuda y colaboración durante mi estancia en el posgrado en Ciencias Genómicas.

Al Dr., Gilberto Valdés por su importante ayuda durante el desarrollo de las dinámicas moleculares y análisis de resultados.

A la maestra en ciencias Laura Vázquez por ayudarme y apoyarme con la parte técnica y su conocimiento.

A Victor Peña, por brindarme ayuda y conocimiento para el desarrollo de una gran parte de esta tesis.

A los lectores, por tomarse el tiempo de revisar este trabajo y brindar sus mejores consejos para el mejoramiento de este.

A mis compañeros y amigos del posgrado, por hacer mas amenos los días mas tolerable la estancia en el posgrado.

Dedicatoria

A mis padres Rosendo y Marfa, por guiarme y apoyarme aun en los momentos difíciles, por alentarme a completar esta nueva meta. Sin su amor y comprensión esta etapa no sería posible.

A mis hermanos Rosendo y José, por ser un pilar importante durante mi formación profesional, gracias por demostrarme que se pueden alcanzar grandes metas con esfuerzo y dedicación.

A mis sobrinas Pilar, Joana y Frida, aun siendo pequeñas me han demostrado que pueden ser más fuertes que los adultos, capaces de superar cualquier adversidad. Gracias por estar conmigo y alegrar los días.

A Yecenia, gracias por caminar a mi lado este largo y a veces tortuoso camino, juntos superamos las adversidades personales y las propias de este posgrado, gracias por tu comprensión, ayuda y apoyo para concluir esta meta personal.

A mí, por tener el valor, paciencia, tolerancia y respeto para poder terminar esta maestría, algo que debería imperar dentro del posgrado en ciencias genómicas.

Índice:

Agradecimientos	3
Dedicatoria	5
Índice:	6
Índice de tablas:	9
Índice de Figuras	10
Abreviaturas	12
Resumen	14
Abstract	16
1. Introducción:	18
1.1 Proteínas	18
1.2 Proteínas Solubles en Ácido Perclórico	22
1.3 <i>Trichomonas vaginalis</i>	25
1.4 Dinámica Molecular:	28
2. Antecedentes particulares:	37
3. Hipótesis:	48
4. Justificación:	49
5. Objetivos	50
5.1 General:	50
5.2 Particulares:	50
6. Estrategia experimental general	51
7. Metodología:	52
7.1.1 Alineamiento:	52
7.1.2 Obtención <i>in silico</i> de mutantes de Tv-PSP1 (sustitución):	52

7.1.3 Preparación del sistema:	54
7.1.4 Dinámica Molecular:	54
7.2. Obtener experimentalmente rTvPSP-1-His WT (con enlace S-S y sin enlace S/S)	55
7.2.1 Obtención experimental del plásmido que codifica para la proteína <i>WT</i> con un Tag de histidinas	55
7.2.1.1 Cultivo de Parásitos:	55
7.2.1.2 Purificación de DNA genómico:	55
7.2.1.3 PCR	55
7.2.1.4 Electroforesis en gel de agarosa	56
7.2.1.5 Ensayo de restricción	56
7.2.1.6 Ligación	57
7.2.1.7 Preparación de células competentes	57
7.2.1.8 Transformación de bacterias y purificación de plásmidos	58
7.2.1.9 Caracterización de las colonias candidatas	58
7.2.1.10 Secuenciación:	59
7.2.1.11 Análisis de la secuencia	59
7.2.2 Obtención experimental de la proteína <i>WT</i> con un <i>Tag</i> de histidinas	59
7.2.2.1 Expresión de la proteína recombinante	59
7.2.2.2 SDS-PAGE	60
7.2.2.3 Western blot	60
7.2.2.4 Inducción de la expresión de la proteína recombinante	61
7.2.2.5 Purificación de proteínas mediante FPLC	62
7.3. Análisis de la actividad funcional de rTv-PSP1-His WT con enlace S-S, en presencia y ausencia de cloración	62
7.3.1 Diseño de oligonucleótidos	62

7.3.2 Cuantificación de proteínas.....	63
7.3.3 Cloración de proteínas.....	63
7.3.4 Extracción de RNA	64
7.3.5 Ensayo funcional:.....	65
8. Resultados.....	66
8.1 Obtención <i>in silico</i> de dos mutantes por sustitución en CYS 76 y de rTv-PSP1-His WT.	66
8.2 Obtención de rTv-PSP1-His WT (con enlace S-S y sin enlace S/S).....	80
8.3. Análisis funcional de rTv-PSP1-His WT con enlace S-S, en presencia y ausencia de cloración).....	85
9. Discusión:.....	88
10. Conclusiones.....	93
CONCLUSION GENERAL:	93
Referencias.....	94
11. Apéndice:.....	101

Índice de tablas:

Tabla I. Proteínas PSP en diferentes organismos.	25
Tabla II. Interacciones atómicas y su energía potencial.	31
Tabla III. Comparación de softwares usados en dinámica molecular.	35
Tabla IV. Proteínas de la familia PSP reportadas en la base de datos PDB..	38
Tabla V. Proteínas predichas in silico que interactuacionan con TvPSP-1.....	45
Tabla VI. Proteínas obtenidas por espectrometría de masas que coimmunoprecipitan con Tv-PSP1.....	46

Índice de Figuras

Figura 1. Interacciones involucradas en el plegamiento y estabilización estructural de las proteínas.....	19
Figura 2. Estructura de diversas proteínas L-PSP.	23
Figura 3. Morfología de <i>Trichomonas vaginalis</i>	27
Figura 4. Localización de los genes <i>tv-psp</i> en el genoma de <i>Trichomonas vaginalis</i>	28
Figura 5. Número de publicaciones relacionadas con simulación de dinámica molecular en biología estructural.....	29
Figura 6. Supercomputadoras utilizadas para simulación de docking molecular y dinámica molecular..	33
Figura 7. Estructura cuaternaria de Tv-PSP1.....	40
Figura 8. Representación de un monómero de Tv-PSP1.....	41
Figura 9. Ubicación celular de Tv-PSP1 dentro de <i>T. vaginalis</i>	43
Figura 10. Dinámica molecular, representación estructural de Tv-PSP1 en el tiempo 0 (inicial) y 100 ns (final)	44
Figura 11. Obtención <i>in silico</i> de mutantes.....	53
Figura 12. Matriz de combinación de aminoácidos.	67
Figura 13. Alineamiento de las proteínas PSP de <i>Trichomonas vaginalis</i> y de diversos organismos	69
Figura 14. Alineamiento de 3 proteínas Tv-PSP presentes en <i>Trichomonas vaginalis</i>	70
Figura 15. Alineamiento de proteínas, porcentaje de identidad: Tv-PSP1, Tv-PSP2 y Tv-PSP-3.....	71
Figura 16. Radio de giro por monómero de la proteína Tv-PSP1 <i>WT</i>	72
Figura 17. RMSD por monómero de la proteína Tv-PSP1 C76F.....	73
Figura 18. Radio de giro por monómero de la proteína mutante Tv-PSP1 C76F.....	74
Figura 19. RMSD por monómero de la proteína mutante Tv-PSP1 C76V.	75
Figura 20. Radio de giro por monómero de la proteína mutante Tv-PSP1 C76V.....	76

Figura 21. Radio de giro de las proteínas (homotrímero) Tv-PSP1 <i>WT</i> , Tv-PSP1 C76F y Tv-PSP1 C76V.	77
Figura 22. RMSD de las proteínas (homotrímero) Tv-PSP1 <i>WT</i> , Tv-PSP1 C76F y Tv-PSP1 C76V.....	78
Figura 23. Estructura tridimensional de Tv-PSP1, Tv-PSP2 y Tv-PSP3 en diferentes tiempos..	79
Figura 24. DNA plasmídico (pET28 a +) y DNA genómico de <i>T. vaginalis</i> analizado en gel de agarosa al 1% teñido con <i>GelRed</i>	80
Figura 25. Inserto correspondiente a <i>tv-psp1</i> obtenido por PCR visualizado por Gel de agarosa al 1% teñido con <i>GelRed</i>	81
Figura 26. Plásmido recombinante de Tv-PSP1 visualizado en gel de agarosa al 1% teñido con <i>GelRed</i>	82
Figura 27. Electroferograma correspondiente al DNA plasmídico (pET 28 a +, con el inserto del gen <i>tv-psp1</i>).....	83
Figura 28. BLASTn, secuencia nucleotídica del gen <i>tv-psp1</i> obtenido comparada con la secuencia nucleotídica de <i>tv-psp1</i> reportada	84
Figura 29. Western blot de Tv-PSP1 purificada a partir de dos cepas de <i>E. coli</i> .(BL21 y roseta gammi.....	85
Figura 30. RNA total de <i>T. vaginalis</i> analizado en gel de agarosa al 1% teñido con <i>GelRed</i>	86
Figura 31. Ensayo funcional de Tv-PSP1.....	87

Abreviaturas

Å	Ángstrom
Atm	Atmósfera
CHARMM	Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics
DTT	Dithiotreitol
DNAp	Ácido desoxirribonucleico plasmídico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERE	Elementos de respuesta a eIF5A
FLOP/s	Operación de coma flotante por segundo
IRE	Elementos de respuesta a Hierro
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
LB	Medio luria Bertani
M	Moles
MD	Dinámica molecular
μl	Microlitros
mg	Miligramos
min	Minutos
mM	Milimoles
ms	Milisegundos
nm	Nanómetros
ns	Nanosegundos
OD	Densidad óptica
ON	Toda la noche
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial de Hidrógeno
PSP	Proteína soluble en ácido perclórico
RE	Retículo endoplasmático
RMSD	Desviación estándar cuadrática media
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
rTv-PSP1	Proteína recombinante Tv-PSP1
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TA	Temperatura ambiente
TAE	Amortiguador Tris-Acetato-EDTA
TYM	Medio de cultivo tripticasa-extracto de levadura-maltosa
UTR	Región no traducida
WB	Western Blot

Resumen

Los miembros de la familia de proteínas YER057c / YjgF / UK114 (Proteína soluble en ácido perclórico PSP) son macromoléculas con estructura homotrimérica que tienen 6 - 9 aminoácidos conservados en el sitio catalítico, poseen diversas funciones: 1) participan en la desaminación hidrolítica de intermedios de enamina / imina formados en el metabolismo de los aminoácidos, y 2) pueden funcionar como endoribonucleasas. Estas proteínas se encuentran presentes en los diversos dominios de la vida, desde las bacterias hasta los vertebrados. Dentro del genoma de *Trichomonas vaginalis*, un parásito protozoario causante de la tricomoniasis, se localizan 3 genes (*tv-psp1*, *tv-psp-2* y *tv-psp3*) que codifican para las proteínas Tv-PSP1, Tv-PSP2 y Tv-PSP3.

El objetivo de este trabajo fue determinar la importancia de los puentes disulfuro en la estabilidad estructural de la proteína Tv-PSP1 y probar su función catalítica en presencia y ausencia de cloro con el enlace disulfuro formado. Se obtuvieron *in silico* dos proteínas Tv-PSP1 mutantes para la posición 76, los aminoácidos fueron seleccionados a partir de un alineamiento de proteínas L-PSP de diversos organismos.

A través de dinámica molecular se logró obtener el radio de giro y el RMSD de Tv-PSP, tanto de la proteína WT como de ambas mutantes, mostrando un movimiento diferencial de uno de los monómeros de Tv-PSP1 WT con respecto a los otros dos monómeros a lo largo de 1000 ns. El radio de giro y RMSD de las mutantes de Tv-PSP1 no mostraron cambios significativos en la estructura tridimensional sugiriendo que los enlaces disulfuro no participan en el mantenimiento de su estructura tridimensional.

Para validar experimentalmente los hallazgos encontrados *in silico*, se obtuvo la proteína Tv-PSP-1 WT recombinante con etiqueta de histidinas a partir de la clonación de *tv-psp1* en el vector de expresión pET28 a⁺. Las proteínas recombinantes se expresaron en cepas BL21 y Rosetta gami de *E. coli*, posteriormente fueron purificadas

por FPLC y se identificaron por Western Blot usando los anticuerpos α -Tv-PSP1 y α -His-TAG.

Se realizaron ensayos funcionales con rTv-PSP1 clorada y no clorada con presencia de enlaces disulfuro. Los resultados mostraron que rTv-PSP1 *WT* degrada parcialmente el RNA total de *T. vaginalis*, no así cuando se eliminó la presencia de cloro mediante purificación en columna. La proteína r Tv-PSP1 *WT* sin cloración y con presencia de los enlaces disulfuro no fue capaz de degradar al RNA.

Abstract

The members of the protein family YER057c / YjgF / UK114 (Protein soluble in perchloric acid PSP) are macromolecules with homotrimeric structure that have 6 - 9 amino acids conserved in the catalytic site, with various functions: 1) involved in the hydrolytic deamination of intermediates of enamine / imine formed in amino acid metabolism, and 2) they can function as endoribonucleases. These proteins are present in the various domains of life, from bacteria to vertebrates. Within the genome of *Trichomonas vaginalis*, a protozoan parasite that causes trichomoniasis, 3 genes are located (tv-psp1, tv-psp-2 and tv-psp3) that code for the proteins Tv-PSP1, Tv-PSP2 and Tv-PSP3.

The aim of this work was to determine the relevance of the disulfide bridges in the structural stability of the Tv-PSP1 and to analyze its catalytic function in the chlorine presence or absence with the disulfide bond formed. By *in silico* analysis, were obtained two Tv-PSP1 mutants in the position 76. The screening of the amino acids mutants was doing by an alignment of L-PSP of several organisms.

By Molecular Dynamics, we obtained the radius of gyration and the RMSD of the Tv-PSP1, WT and the two mutants, this analysis shown a differential movement of one of the Tv-PSP1 WT monomers in comparison with the other two monomers to the 1000 ns. The Tv-PSP1 mutants did not show significant changes in the three-dimensional structure. These results suggested that the disulfide bonds do not participate in the maintenance of their three-dimensional structure.

To validate the results obtained *in silico*, we obtained the Tv-PSP1 recombinant with histidine-tagged, for this, we cloned de *tv-psp1* insert in the expression vector pET28 a + and the rTv-PSP1 was expressed in *E. coli* BL21 and Rosetta gami strains, then, they were purified by FPLC and identified the Tv-PSP1 by Western Blot using the α -Tv-PSP1 and α -His-TAG antibodies.

Functional analysis was performed with chlorinated and non-chlorinated rTv-PSP1 with the presence of disulfide bonds. The results shown that only the Tv-PSP1 WT degraded the total RNA of *T. vaginalis*. The chlorine presence was eliminated by the column purification and the Tv-PSP1 was not able to degrade RNA.

1. Introducción:

1.1 Proteínas

Las proteínas están compuestas por aminoácidos, los cuales tienen diferentes cadenas laterales o también llamados grupos R que les dan diferentes propiedades tales como hidrofobicidad, solubilidad, amortiguación de pH, especificidad (proteínas diferentes entre especies diferentes), y estabilidad. En una proteína correctamente plegada, los residuos de aminoácidos hidrofóbicos están juntos, mientras que los residuos hidrofílicos se exponen en la superficie de la proteína, este tipo de plegamiento minimiza la energía libre total de la proteína (Reynaud, 2010).

Por otra parte, la estabilidad estructural de las proteínas depende del balance entre distintas fuerzas (Fig. 1) como son las interacciones de Van Der Waals y los puentes de hidrógeno entre los residuos polares (Bosshard, Marti, & Jelesarov, 2004). Uno de los elementos importantes en el plegamiento de algunas proteínas son los puentes disulfuro. Los puentes disulfuro (S-S) están formados por la unión covalente de dos cisteínas debido a las propiedades *redox* del par tiol-disulfuro. La cisteína es fundamental para el plegamiento y la estabilidad de las proteínas debido a que puede estabilizar proteínas monoméricas y también multiméricas (Liu, *et al.*, 2016), además contribuye a la regulación de su actividad biológica y participa en la catálisis enzimática y en la interacción entre proteínas y metales (Garduño-Jiménez, 2017).

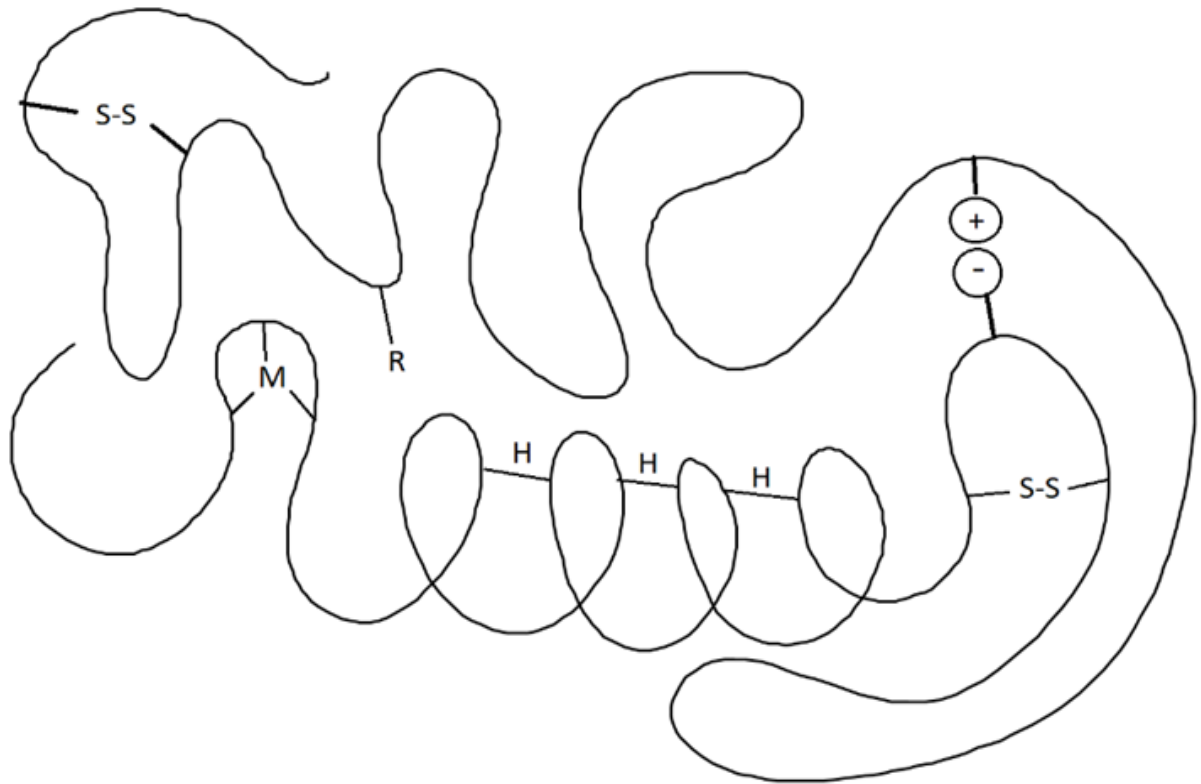


Figura 1. Interacciones involucradas en el plegamiento y estabilización estructural de las proteínas. Puentes disulfuro (S-S); puentes salinos (+ -); puentes de Hidrógeno (H-H) Algunas regiones de la proteína pueden interactuar con metales (M).

Los puentes salinos también brindan estabilidad, son enlaces que se forman entre residuos con carga opuesta como es el caso del Ácido glutámico y el Ácido aspártico (cargados negativamente) con los aminoácidos Arginina, Histidina y Lisina (cargados positivamente), cuando estos aminoácidos se encuentran lo suficientemente cerca entre sí, ocurre la interacción electrostática (Bosshard *et al.*, 2004), su formación depende del estado de protonación de las moléculas que interactúan y, por lo tanto, del pH. El aumento de la estabilidad térmica de las proteínas mediante la optimización de las interacciones de carga es un buen ejemplo de una solución evolutiva que utiliza factores físicos (Jelesarov & Karshikoff, 2009).

Las proteínas son macromoléculas que se encuentran presentes en muchos organismos (Alberts, *et al.*, 2002), en los eucariotas las proteínas que deben reutilizarse o que no son funcionalmente viables se marcan para su degradación mediante una proteína llamada ubiquitina, esta marca es reconocida por algunas subunidades del proteosoma (Tanaka, 2009). Este complejo proteico se encuentra presente en todas las células eucariotas y archaeas así como en algunas bacterias (Sun, *et al.*, 2004).

Cuando una proteína se pliega de forma inadecuada puede ser destruida en el proteosoma. *Trichomonas vaginalis*, como todas las células eucariotas posee subunidades de proteosoma, aunque no ha sido descrito completamente, se conoce que la incubación a corto plazo con un inhibidor del proteosoma conduce a la autofagia en condiciones de crecimiento ricas en glucosa (O'Donoghue, *et al.*, 2019).

Las modificaciones postraduccionales, están involucradas en la actividad funcional de muchas proteínas, son modificaciones rápidas, específicas y altamente controladas, que son importantes en los procesos celulares, como la actividad enzimática, el recambio y localización de proteínas, son modificaciones covalentes que se sitúan en 1 o más aminoácidos y se han descrito más de 300 tipos diferentes (Kumar & Prabhakar, 2008), ejemplo de ellas son: fosforilación, ubiquitinación, acetilación, entre otras.

Recientemente, se ha descrito una modificación que podría estar involucrada en el cambio de función de algunas proteínas: la cloración. La cloración de proteínas causa alteraciones en la estructura de éstas a través de la cadena lateral o la modificación del grupo amino del enlace peptídico. Esta modificación, se realiza *in vitro* se realiza mediante la utilización de ácido hipocloroso (HClO). El ácido hipocloroso es un potente antimicrobiano no antibiótico utilizado en medicina clínica para el control de infecciones

y como agente desinfectante (Ulfig, *et al.*, 2019), *in vivo* el HClO es sintetizado por células del sistema inmune para el control de agentes patógenos durante la fagocitosis.

En laboratorio, el HClO se puede obtener a través de tres diferentes métodos:

1. Hidrólisis de gas de cloro ($\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{HClO} + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$)

2. Electrolisis de solución de sal ($2\text{Cl}^- + 2\text{e}^- \text{Cl}_2$) y ($\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{HClO} + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$)

3. Acidificación de hipoclorito ($\text{OCl}^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{HClO}$): Debido a que el hipoclorito está disponible comercialmente, este método es el más utilizado, conveniente y controlable.

El HClO es producido dentro de las vacuolas fagocíticas a partir de H_2O_2 y Cl^- por acción de la enzima mieloperoxidasa (Green, *et al.*, 2014) cuando se entra en contacto con algún agente patógeno como los son: virus, bacterias o parásitos, siendo un agente oxidante y altamente tóxico. Algunas proteínas de *S. aureus* sufren modificaciones, específicamente en residuos de tirosina, convirtiéndose en tirosina clorada, lo anterior sucede en dosis bactericidas (30 nmol) de ácido hipocloroso e incluso por debajo de ellas (Chapman, *et al.*, 2002).

La cloración puede cambiar la actividad funcional de algunas proteínas; en diversos estudios se ha probado la acción de este reactivo en contacto con diversas proteínas; por ejemplo, la proteína Hsp33 de *E. coli* sufre un cambio conformacional en su estructura mediante el despliegue del dominio C-terminal, convirtiéndose en una

chaperona altamente activa que evita la agregación de otras proteínas dentro de la bacteria (Winter, *et al.*, 2008).

1.2 Proteínas Solubles en Ácido Perclórico

La familia de proteínas YER057c/YjgF/UK114 incluye a proteínas con funciones diversas: algunas participan en la desaminación hidrolítica de intermediarios de enamina/imina formados en el metabolismo normal de aminoácidos, otras pueden funcionar como endoribonucleasa escindiendo los enlaces fosfodiéster del RNAm e inhibiendo la traducción de proteínas (Villalobos-Osnaya, *et al.*, 2018).

Las proteínas solubles en ácido perclórico estructuralmente forman homotrímeros (Fig. 2); algunos ejemplos son: UK 114 de *Capra hircus* (PDB: 1NQ3), proteína de 136 aa con función de endoribonucleasa, L-PSP de *Rattus norvegicus* (PDB: 1QAH). Poseen de 6-9 aminoácidos conservados (P-X5-Y-X13-G-X25-N-X27-F-X3-N-X13-R-X8-P-X5-E) y se ha propuesto que podrían ser parte del sitio activo de la proteína.

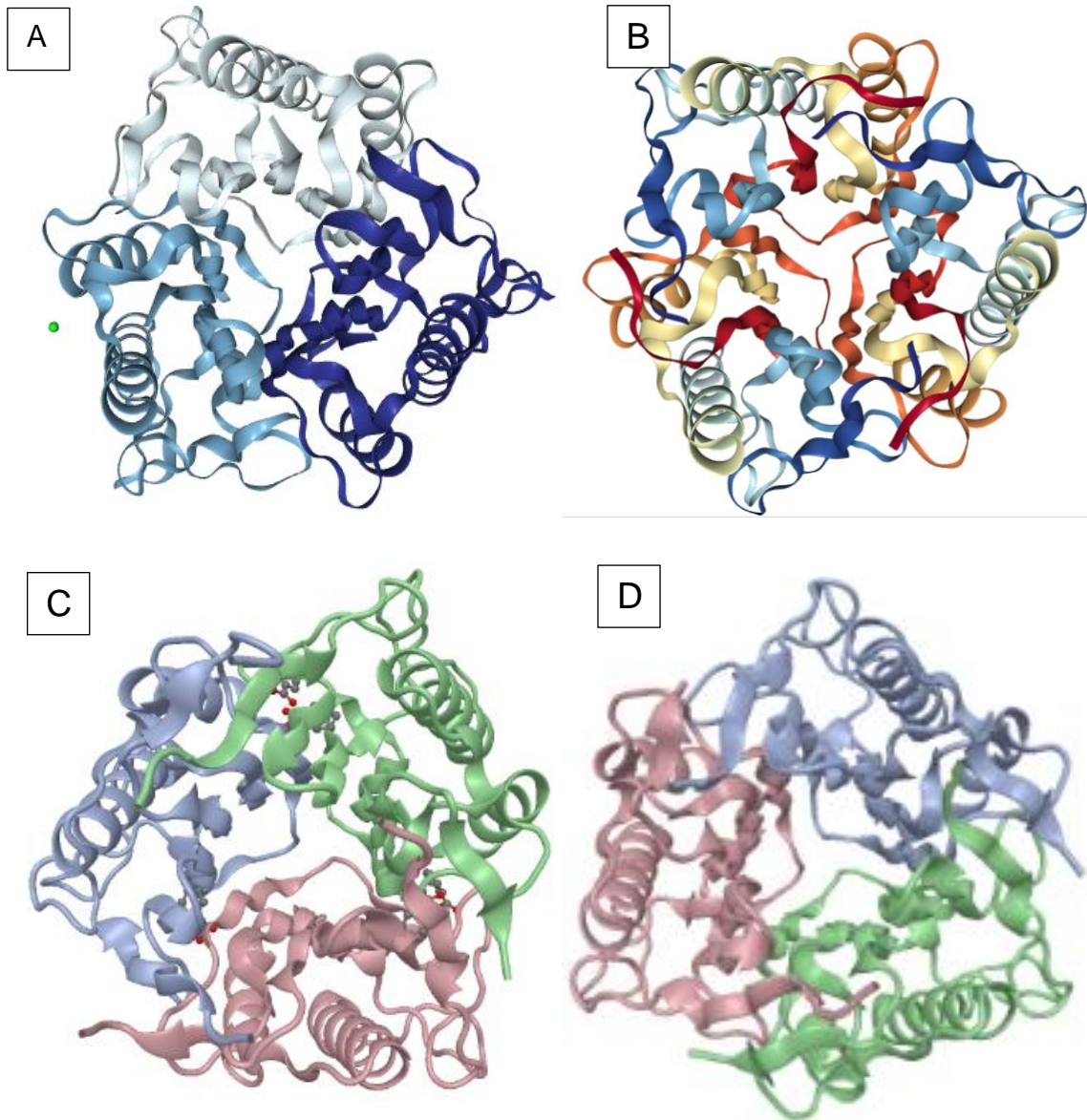


Figura 2. Estructura de diversas proteínas L-PSP. A) L-PSP de *Entamoeba histolytica* PDB: 3M4S, B) L-PSP *Rattus norvegicus*, PDB: 1QAH, C) UK114 *Homo sapiens*, PDB:1ONI, D) UK 114 de *Capra hircus*, PDB: 1NQ3.

Las proteínas de esta familia se encuentran altamente conservadas en los diferentes dominios de la vida, desde bacterias y levaduras hasta mamíferos incluyendo al humano. En cuanto a su ubicación celular, estas proteínas se encuentran presentes no solo en el citoplasma o el núcleo sino también en diversas estructuras celulares como el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Kanouchi, *et al.*, 2005).

La familia de proteínas PSP o también llamada familia Rid (*Reactive intermediate/imine deaminase*), cuenta a su vez con 8 subfamilias: Rid A y Rid 1-RID 7 (Hodge-Hanson & Downs, 2017), la familia Rid A se encuentra presente en todos los dominios, mientras que la familia Rid 1-7 esta limitada solo a procariontas, algunas proteínas homólogas de la familia Rid-2 y Rid-3 pueden unirse a ceto-ácidos de forma *in vitro* (Tabla I). Se conoce que algunas cepas mutantes de *Salmonella entérica* para el gen *YjgF* no pueden crecer en presencia de piruvato como única fuente de carbono a menos que se proporcione Isoleucina, por lo que se ha propuesto que *YjgF* participa en la biosíntesis de Isoleucina (Christopherson, *et al.*, 2008), en *Saccharomyces cerevisiae* las proteínas YIL051c y YER057c juegan un papel importante en la regulación de vías metabólicas y diferenciación celular (Kim, *et al.*, 2001).

En hígado de rata la proteína L-PSP (*rat liver perchloric acid-soluble protein*) es un inhibidor potente de la síntesis de proteínas ya que afecta directamente la traducción del RNA mensajero (Morishita, *et al.*, 1999). Previamente se ha logrado obtener proteínas PSP de mitocondria en células de hígado y riñón de rata y se ha observado que son capaces de inhibir la síntesis *in vitro* de proteínas (Oka, *et al.*, 1995). La proteína UK114 de *Homo sapiens* (UniProtKB-P52758, RIDA_HUMAN) además de participar en el metabolismo (desaminación hidrolítica de intermediarios de enamina/imina que se forman durante el curso del metabolismo normal: 2-aminobutanoato + H₂O = 2-oxobutanoato + NH₄⁺), también puede realizar actividad de endoribonucleasa (Tabla I).

Tabla I. Proteínas PSP en diferentes organismos.

NOMBRE	ORGANISMO	UBICACIÓN CELULAR	GEN	FUNCIÓN
YER057	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Núcleo y mitocondrias	<i>hmf1</i>	Regulación de vías metabólicas y diferenciación celular.
YjgF	<i>Salmonella entérica</i>	Citoplasma	<i>ridA</i>	Requerido para la biosíntesis de isoleucina.
Rhp-PSP	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>		<i>rpx1_3039</i>	Propiedades antivirales (frente al virus del mosaico del tabaco).
L-PSP	<i>Rattus norvegicus</i>	Mitocondria, núcleo y peroxisomas	<i>rida</i>	Inhibidor potente de la síntesis de proteínas, facilita la liberación de amoníaco de metabolitos reactivos tóxicos.
UK114	<i>Homo sapiens</i>	Mitocondria, núcleo y peroxisoma	<i>hrsp12</i>	Facilita la liberación de amoníaco de metabolitos reactivos tóxicos.

1.3 *Trichomonas vaginalis*

La tricomoniasis es una enfermedad con cientos de millones de casos anuales en múltiples regiones alrededor del mundo y de gran importancia médica a nivel mundial (Meites, 2013), actualmente las opciones de tratamiento se limitan a dos compuestos aprobados por la FDA (metronidazol y tinidazol), sin embargo, ha sido reportado el desarrollo de resistencia por parte del parásito hacia estos compuestos (Dunne, *et al.*, 2003), por lo que se buscan nuevos blancos farmacéuticos para el tratamiento de esta infección (O'Donoghue, *et al.*, 2019).

El examen microscópico a partir de una preparación de secreciones vaginales mezcladas con solución salina normal es el examen diagnóstico más común para la detección del parásito y la infección por *T. vaginalis* en mujeres (Hobbs & Seña, 2013).

La infección por *T. vaginalis* produce una amplia variedad de manifestaciones clínicas y patológicas, en la mayoría de los casos las pacientes pueden ser asintomáticas, pero algunas veces pueden desarrollar signos típicamente asociados con la enfermedad (Menezes, *et al.*, 2016). Además de la enfermedad causada propiamente por este parásito, la tricomoniasis puede aumentar el riesgo de aborto durante el embarazo e incluso puede aumentar el riesgo de contraer VIH (McClelland, *et al.* 2007) y el riesgo de desarrollo de neoplasias en cuello uterino y cáncer de próstata en pacientes masculinos (Marous, *et al.*, 2017). La tricomoniasis no suele ocasionar síntomas para los hombres, pero cuando aparecen estos son: irritación dentro del pene, sensación de ardor al orinar o después de eyacular y secreciones purulentas provenientes del pene (Krieger, *et al.*, 1993).

Trichomonas vaginalis es un protozoo flagelado y pleomórfico con una morfología ovalada o piriforme (en forma de pera). Este parásito posee 4 flagelos anteriores libres que se derivan del complejo cinetosomal y un quinto flagelo que corre de la parte anterior hacia la posterior, para formar una membrana ondulante, este flagelo está asociado a una estructura denominada costa (Fig. 3).

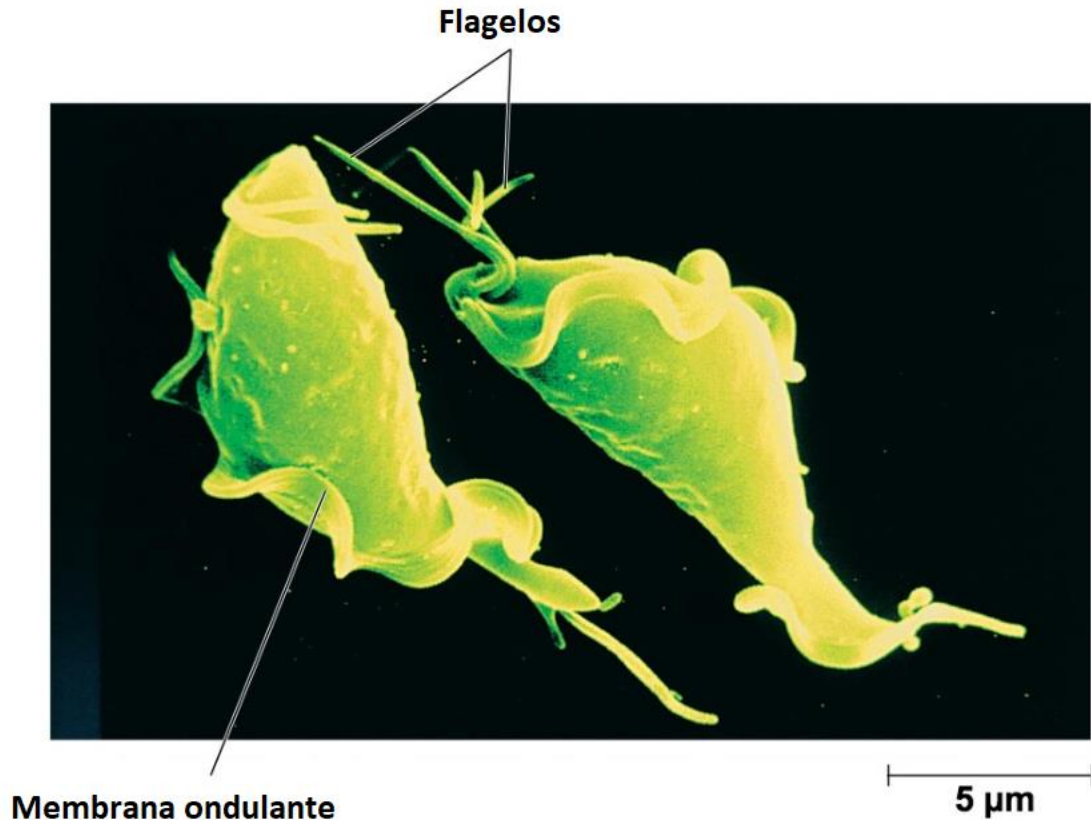


Figura 3. Morfología de *Trichomonas vaginalis*. Vista por Microscopía Electrónica de Barrido. Se observa la presencia de 4 flagelos en la parte anterior y un quinto flagelo que corre hasta la parte posterior, encargado de dar movilidad al parásito.

Este parásito posee uno de los genomas de mayor tamaño y complejidad con 170.246 Mb, y alrededor de 60,000 genes que codifican para aproximadamente 59,700 proteínas; en su genoma se encuentran 3 genes que codifican para proteínas que pertenecen a la familia YER057c/YjgF/UK114. En *T. vaginalis* es poco el conocimiento que se tiene acerca de la función biológica de las proteínas solubles en ácido perclórico, sin embargo, en trabajos previos de laboratorio se ha demostrado que el genoma de *T. vaginalis* posee los siguientes genes: *tv-psp1* (Gene Bank: JQ406681), *tv-psp2* (Gene ID: 4761132) y *tv-psp3* (Gene ID: 4765055), que codifican para 3 proteínas solubles en ácido perclórico Tv-PSP1, Tv-PSP2 y Tv-PSP3 (Fig. 4).

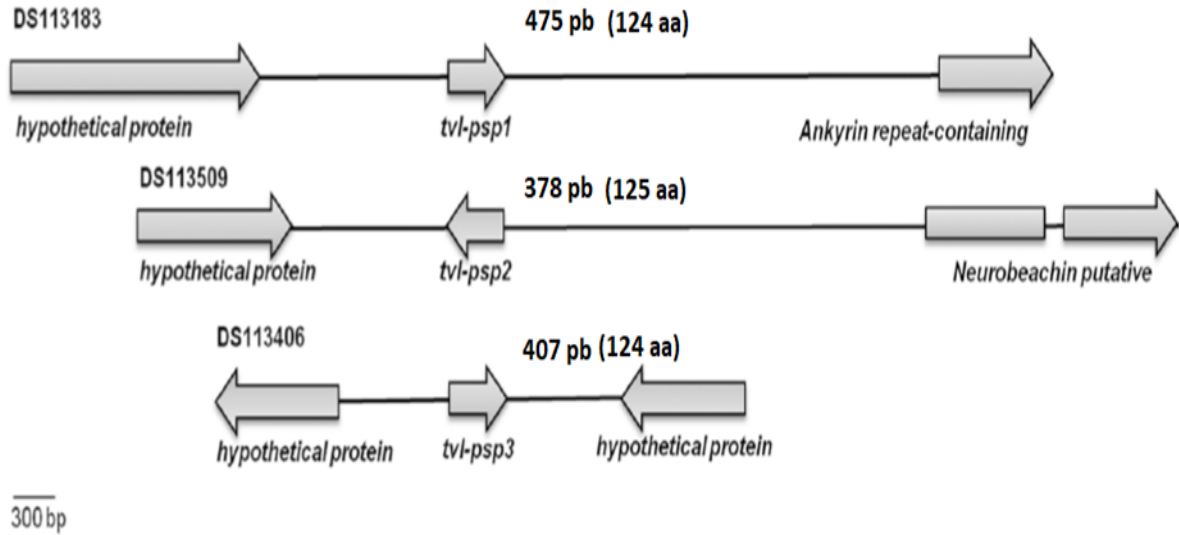


Figura 4. Localización de los genes *tvl-psp* en el genoma de *Trichomonas vaginalis*. Tomado y modificado de Villalobos-Osnaya, 2018.

1.4 Dinámica Molecular:

La determinación estructural de las moléculas es imprescindible para comprender su funcionamiento biológico, para ello, existen diversas herramientas, una de ellas es la base de datos PDB del acrónimo de *Protein Data Bank* (Berman, Henrick y Nakamura, 2003), en esta base de datos se deposita información relacionada con la estructura tridimensional de proteínas y ácidos nucleicos (Parasuraman, 2012). Los archivos en formato *.pdb* describen la organización de los átomos que conforman una macromolécula y la distancia que hay entre ellos (Dutta, *et al.*, 2009), estos datos se obtienen en su mayoría a través de una técnica llamada “difracción de rayos X”, estos archivos pueden describir una macromolécula en solitario o en interacción con algún ligando. Las coordenadas de los átomos de una proteína incluidas en el archivo *.pdb* pueden ser utilizadas con diversos propósitos tales como: modelado tridimensional y dinámica molecular.

La simulación por dinámica molecular se realiza desde finales de los años 50's con gases simples (Alder y Wainwright, 1957), mientras que la primera simulación de una proteína se realizó a finales de los años 70's (McCammon, Gelin, & Karplus, 1977), sin embargo, en años recientes ha aumentado el número de publicaciones que utilizan dinámica molecular (Fig. 5) en parte por el avance tecnológico, el desarrollo de software libre, aparición de unidades gráficas de procesamiento (GPU) y la introducción de nuevos algoritmos que ayudan a la optimización de las simulaciones (Salomon-Ferrer, 2013).

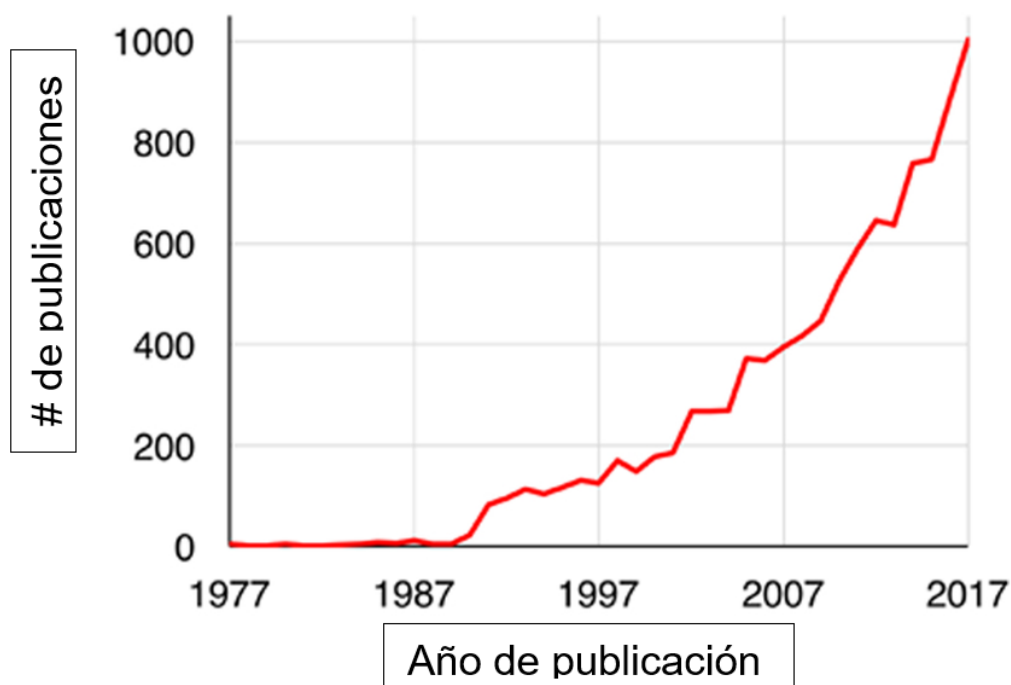


Figura 5. Número de publicaciones relacionadas con simulaciones de dinámica molecular en biología estructural, obtenido y modificado de Hollingsworth y Dror, 2018.

Una dinámica molecular es una simulación por computadora de un sistema biológico, utilizada para observar el movimiento de los átomos a lo largo de un tiempo determinado (Hospital, *et al.*, 2015), con la finalidad de comprender mecanismos biológicos tales como: regulación de proteínas, actividad enzimática, transporte a

través de membranas celulares, construcción o agregación de organelos celulares como los ribosomas entre otros (Hollingsworth y Dror, 2018), e incluso para el diseño de nuevos fármacos en materia neurológica (Coleman , Green, y Gouaux, 2016; Minor, 2007).

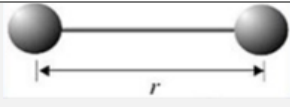
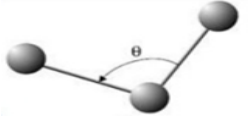
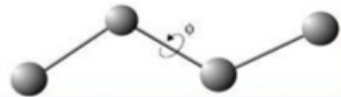
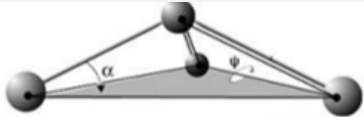
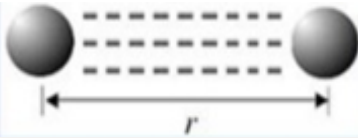
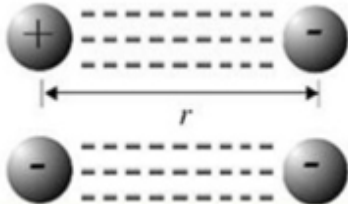
Las simulaciones se han vuelto más precisas con mejores campos de fuerza debido en parte a que pueden muestrear fácilmente movimientos moleculares en la escala desde nanosegundos (ns) hasta microsegundos (ms) (Kumari, *et al.*, 2017). Los pasos típicos de una Dinámica Molecular (DM) consisten en elegir una configuración molecular inicial, describir las interacciones atómicas y la física del modelo, ejecutar la simulación y hacer observaciones desde la trayectoria, esto último incluye diversos cálculos como la desviación cuadrática media (RMSD), radio de giro, número de interacciones, formación de puentes de hidrógeno H-H, entre otras.

El campo de fuerza que se utiliza dentro de una dinámica molecular es el que determina las reglas del movimiento. El campo de fuerza es un archivo que contiene fórmulas y datos relevantes respecto a interacciones atómicas y su energía potencial: enlace, ángulo, ángulo dihedro, ángulo dihedro impropio, interacciones sin enlace tanto de Van der Waals como electrostáticas (tabla II), es importante mencionar que la información de un campo de fuerza son aproximaciones empíricas refinadas mediante mecánica cuántica, sin embargo, las interacciones están basadas en resortes y potenciales clásicos (Leyes de Hooke y de Coulomb) y también toman en cuenta reportes experimentales de diversos grupos de investigación.

Pueden elegirse diversos campos de fuerza que pueden ser utilizados en dinámica molecular, tales como: CHARMM (*Chemistry at HARvard Molecular Mechanics*) 36, CHARMM 27, AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*), Parm 94, GROMOS (*GRoningen MOlecular Simulation*) 11, GROMOS 87, OPLS (*Optimized*

Potentials for Liquid Simulations), cada uno posee distintas variaciones y en la mayoría de los casos pueden ser modificados de acuerdo a las necesidades del usuario.

Tabla II. Interacciones atómicas y su energía potencial, (campo de fuerza) utilizables en dinámica molecular.

TIPO DE INTERACCIÓN	# DE ÁTOMOS REQUERIDO	IMAGEN
ENLACE	2	
ÁNGULO	3	
ÁNGULO DIEDRO	4	
ÁNGULO DIEDRO IMPROPIO	4	
INTERACCIONES DE VAN DER WAALS	2	
INTERACCIONES ELECTROSTÁTICAS	2	

Las simulaciones de dinámica molecular han permitido un avance gigantesco para la comprensión de diversos fenómenos biológicos como el plegamiento de proteínas (Lindahl, 2008) o la interacción proteína-ligando en un periodo relativamente corto de tiempo, el ejemplo más claro es lo que sucedió con la reciente crisis de salud mundial causada por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2, a partir de las estructuras cristalizadas de diversas proteínas del virus se realizaron dinámicas y acoplamiento molecular (Dockin Molecular) mediante el uso de la supercomputadora *SUMMIT* del fabricante IBM (Fig. 6A) que posee un poder de cómputo de 200 petaFLOP/s. A partir de 39 estructuras de diversas drogas se lograron identificar cinco fármacos neutros: Carfilzomib, Eravaciclina, Valrubicina, Lopinavir y Elbasvir, que tienen potencial actividad inhibitoria contra la proteasa (PDB: 6LU7) del virus causante de COVID-19 (Wang, 2020).

Actualmente estas simulaciones requieren de mucho poder de cómputo, por lo que regularmente suelen ser corridas en supercomputadoras, sin embargo, con las nuevas tecnologías de procesadores y de unidades de procesamiento gráfico es posible realizar dinámica molecular utilizando una computadora personal. Para el desarrollo de este trabajo se optó por utilizar supercómputo, en México la Universidad Nacional Autónoma de México posee la supercomputadora MIZTLI (Fig. 6B), con una capacidad de cálculo de 118 Teraflop/s (LANCAD, 2020).

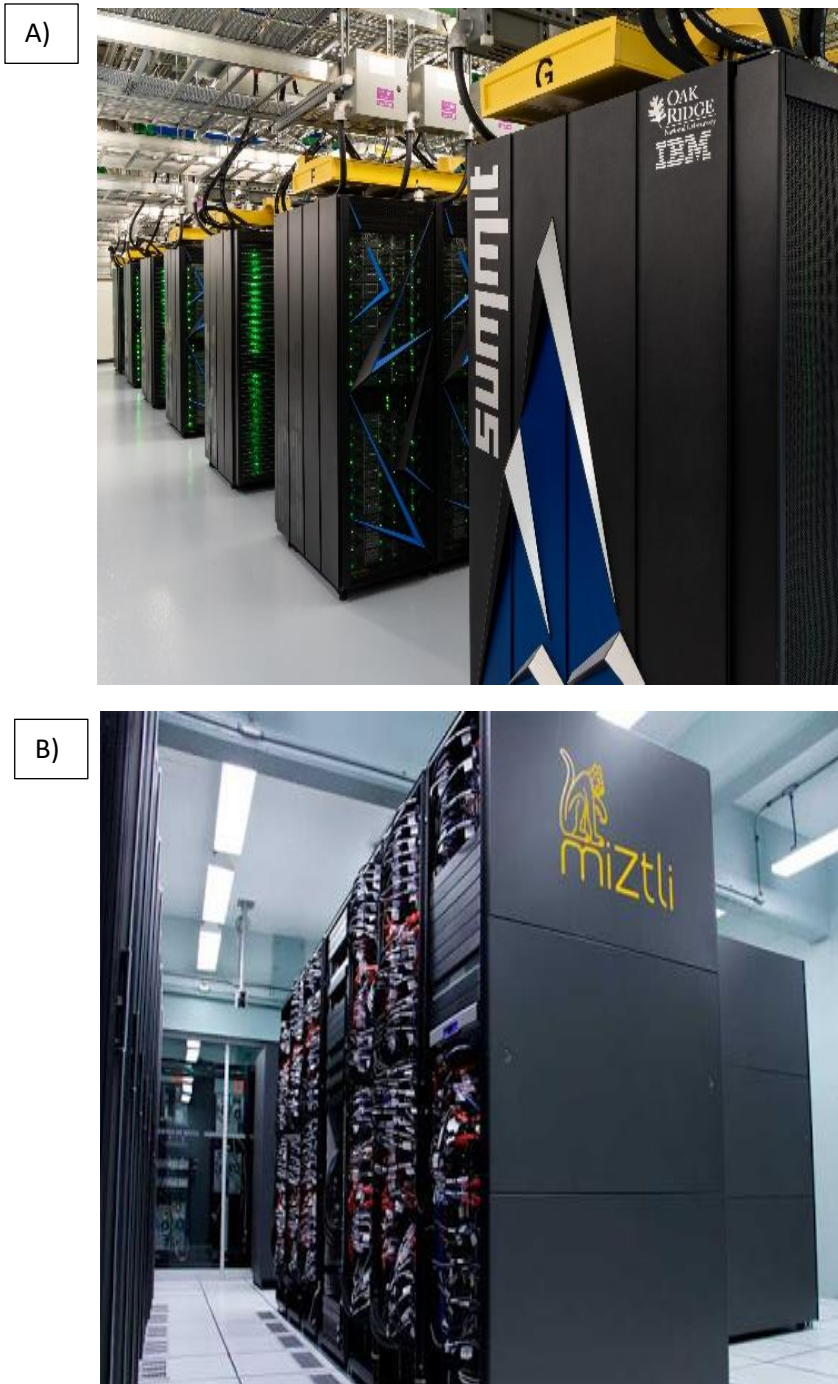


Figura 6. Supercomputadoras utilizadas para simulacion de docking molecular y dinámica molecular. A) Supercomputadora SUMMIT del fabricante IBM, perteneciente al departamento de energia de los Estados Unidos de América, B) Supercomputadora MIZTLI del fabricante HP, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dentro del cómputo distribuido (los cálculos computacionales se dividen en mas de 1 equipo de cómputo) existe una propuesta que realiza dinámica molecular y plegamiento de proteínas llamada *Folding@Home* (Marianayagam, Fawzi, & Head-Gordon, 2004) la que ha sido diseñada para usar los recursos de computadoras personales para realizar simulaciones de plegamiento proteico y dinámica molecular relevantes a diversas enfermedades como el Cáncer, Alzheimer y recientemente COVID-19 (enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2). El 20 de marzo de 2020, *Folding@Home* anunció que posee una potencia de cálculo de más de 470 petaFLOP/s, superando a la supercomputadora más rápida hasta la fecha: la IBM SUMMIT. El software descarga un paquete de información del servidor y utiliza los núcleos físicos de cualquier computadora personal y el procesador gráfico para realizar los cálculos de ese paquete de datos, al terminar los devuelve al servidor y se ensabla toda la información para tener un resultado final como la estructura tridimensional de una proteína o la trayectoria de una dinámica molecular. Es interesante conocer que sucederá en el futuro con este tipo de simulaciones, teniendo en cuenta la reciente aparición de computadoras cuánticas.

Para realizar las simulaciones existen diferentes versiones de software: GROMACS, NAMD (Acun, *et al.*, 2018), GROMOS, CHARMM (Tabla III) entre otros. Algunos software requieren de conocimiento previo por parte del usuario, tal es el caso de los que no utilizan una interfaz gráfica, pues se limitan al uso de comandos y uso de terminales, caso contrario a lo que sucede con una interfaz gráfica, pues en muchos casos no se requiere de conocimiento previo de programación o comandos.

Tabla III. Comparación de softwares diferentes para realizar dinámica molecular.

	INTERFAZ GRÁFICA	ACELERADOR GRÁFICO	COMPATIBILIDAD/ DISTRIBUCIÓN	DESCARGA
GROMACS	No	Si	Linux/Mac OS	Gratuita
NAMD	Si	Si	Linux/Mac OS/ Windows	Gratuita mediante registro
GROMOS	No	Si	Linux/UNIX	Gratuita mediante registro
CHARMM	Si	Si	Linux/Mac OS	Versión basica gratuita/ versión completa con suscripción

Es de particular interés para este trabajo el software Gromacs y el campo de fuerza CHARMM. Gromacs es un software que simula las ecuaciones newtonianas de movimiento (van der Spoel, van Maaren & Caleman, 2012) para sistemas que poseen desde cientos hasta millones de partículas, proporciona un amplio conjunto de tipos de cálculo, herramientas de preparación y análisis. Este software es ampliamente utilizado para dinámica molecular.

El proceso de realización de una *DM* consta de diversos pasos; **1. Archivo de entrada:** contiene las coordenadas de la molécula a simular en formato *.pdb* (obtenido por cristalización o a través de modelado por homología), el archivo es convertido a formato *gmx*, **2. Elegir el campo de fuerza:** puede elegirse o modificarse con base en las necesidades de la simulación, **3. Solvatación:** en este paso se crea una celda donde se colocará la proteína, se define su tamaño y se agregan moléculas de agua (con la finalidad de simular un ambiente acuoso), **4. Neutralización:** se agregan iones, la cantidad dependerá de la carga de la proteína, **5. Minimización** de energía: el objetivo de este paso es asegurarnos de que el sistema no tenga choques estéricos o

geometría inapropiada, la estructura se relaja y adquiere una conformación más laxa mediante este proceso, **6. Equilibrio:** aquí se equilibra el solvente y los iones alrededor de la proteína; se elige la temperatura adecuada a la que se desea realizar la simulación con la finalidad de que pueda interactuar de forma adecuada el solvente y el soluto, la razón es que el solvente se optimiza principalmente dentro de sí mismo y no necesariamente con el soluto, también se agrega presión al sistema (si el sistema mantiene siempre la misma temperatura y presión se considera isotérmico-isobárico), **7. Simulación de la Dinámica Molecular:** se define el tiempo de ejecución (número de pasos de ejecución *-runs-*) y se corre la dinámica molecular. Este es el proceso que requiere el mayor tiempo, pues puede ir de pocos picosegundos a nanosegundos (horas, días o hasta semanas), **8. Análisis de resultados:** Se analiza la trayectoria obtenida y se le realizan diferentes cálculos y mediciones.

2. Antecedentes particulares:

Las proteínas solubles en ácido perclórico se encuentran altamente conservadas en los distintos dominios de la vida, una de ellas se purificó por primera vez del sobrenadante obtenido del pulmón de rata en ácido perclórico al 5% y fue llamado RL-PSP (Oka, *et al.*, 1995), posteriormente se purificó otra proteína PSP de rata que fue capaz de inhibir la síntesis de proteínas en un sistema de lisado de reticulocitos de conejo, esta fue nombrada RLu-PSP1 y se expresó en mayor cantidad en citoplasma de bronquiolos y células epiteliales alveolares del pulmón de ratas de 60 días de edad (Matsumoto, *et al.*, 2003).

En la base de datos PDB se han reportado diversas estructuras cristalizadas correspondientes a proteínas de la familia PSP, algunas de ellas se muestran en la **tabla IV**. Como se ha mencionado anteriormente, este grupo de proteínas llevan a cabo funciones diferentes y están ubicadas en compartimentos celulares distintos, sin embargo, todas ellas poseen una estructura homotrimérica.

Tabla IV. Proteínas de la familia PSP reportadas en la base de datos PDB. Tomado de Villalobos-Osnaya, 2019, Tesis de Doctorado.

Estructura PDB	Organismo
3K0T	<i>Pseudomonas syringae</i>
2B33	<i>Thermotoga marítima</i>
1QD9	<i>Bacillus subtilis</i> YABJ
3IEF	<i>Giardia lamblia</i>
2DYY	<i>Pyrococcus horikoshi</i>
3GTZ	<i>Salmonella typhimurium</i>
2CSL	<i>Thermus thermophilus</i>
2EWC	<i>Streptococcus pyogenes</i>
3D01	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
1ONI	<i>Homo sapiens</i>
3MIX	<i>Bacillus subtilis</i>
3K12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3I7T	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
2IG8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3LYB	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1PF5, 2UYN, 3V4D, 1QU9, 2UYJ, 2UYP	<i>Escherichia coli</i>
1JD1, 3QUW	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3MQW, 3M1X, 3M4S	<i>Entamoeba histolytica</i>
3KJK	<i>Neisseria meningitidis</i>
1QAH	<i>Rattus norvegicus</i>
3L7Q	<i>Streptococcus mutans</i>
1J7H	<i>Haemophilus influenzae</i>
2CW4	<i>Thermus Thermophilus</i>
1XRG	<i>Clostridium thermocellum</i>
3KJJ	<i>Neisseria meningitidis</i>
2CWJ	<i>Aeropyrum pernix</i>
3LME	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
3VCZ	<i>Vibrio vulnificus</i>
2CVL	<i>Thermus thermophilus</i>
1NQ3	<i>Capra hircus</i>
3R0P	Organismo sin cultivar

Previamente se reportó que la proteína L-PSP (UK114) de humano está presente en el retículo endoplasmático (RE) y se ha propuesto que su acción pudiera estar asociada a un estrés del RE (Kanouchi, *et al.*, 2005). UK114 se expresa de forma tejido-específica y se localiza tanto en hígado como en riñón; a esta proteína se le ha atribuido la acción funcional de supresor de tumor e incluso ha llegado a proponerse como un biomarcador de estadio de las muestras de carcinoma hepatocelular (Chong, *et al.*, 2008).

En *T. vaginalis* existen 3 proteínas PSP; Tv-PSP1, Tv-PSP2 y Tv-PSP3. En la base de datos: *Trich Data Base* no se han encontrado EST (etiquetas de secuencias expresadas) de Tv-PSP2, debido probablemente a que aún no se han determinado las condiciones de expresión de esa proteína. La proteína Tv-PSP1 se expresa en condiciones normales de cultivo (37°C, medio TYM suplementado con 10% de suero de caballo, pH 6.2) y posee una estructura homotrimérica (Fig. 7) con un peso de 40.5 kDa, cada monómero de 13.5 kDa (Villalobos-Osnaya, *et al.*, 2018).

Tv-PSP1 es regulada de manera negativa por poliaminas, y es soluble en ácido perclórico (PSP), debido a sus características se ha considerado probable que esta proteína pudiera jugar un papel importante en la degradación de RNAm. En experimentos previos se ha propuesto que la proteína soluble en ácido perclórico 1 de *T. vaginalis* es de suma importancia para diversos procesos, tales como la citotoxicidad.

Se ha descrito que podría interaccionar con el RNA de tvcp39, debido a la presencia de estructuras tallo y burbuja tipo ERE en su extremo 3 UTR, se ha propuesto que pudieran estar involucradas en el reconocimiento con la proteína Tv-PSP1. (Villalobos, 2011).

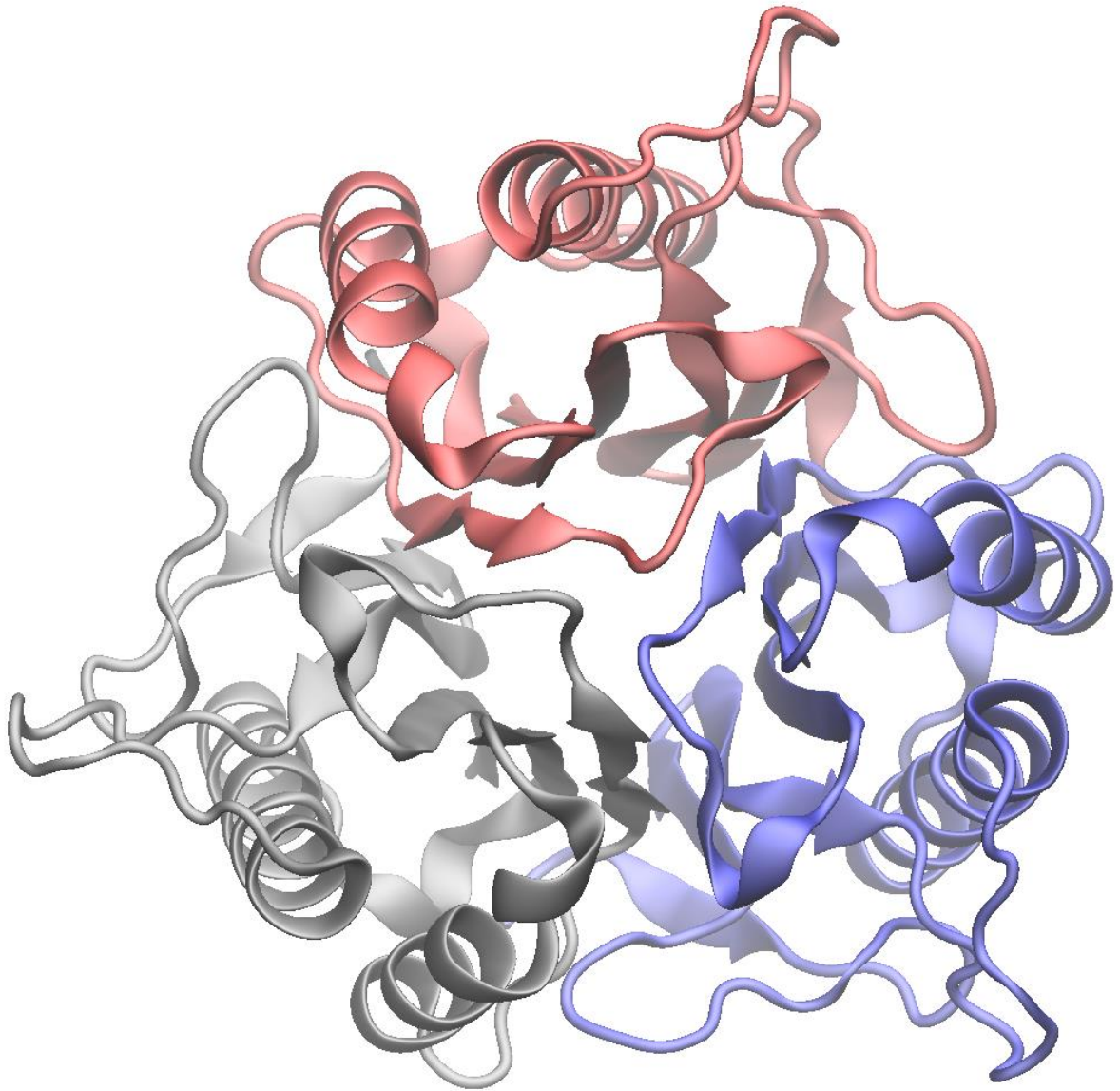


Figura 7. Estructura cuaternaria de Tv-PSP1. Proteína trimérica compuesta por 3 monómeros iguales, cada uno se muestra de diferente color. Visualizado mediante el software VMD.

El modelo monomérico de Tv-PSP1 obtenido previamente, ha mostrado que se compone de seis hojas β y dos α -hélices colocadas en una orientación paralela hacia un lado de la hoja (Fig. 8).

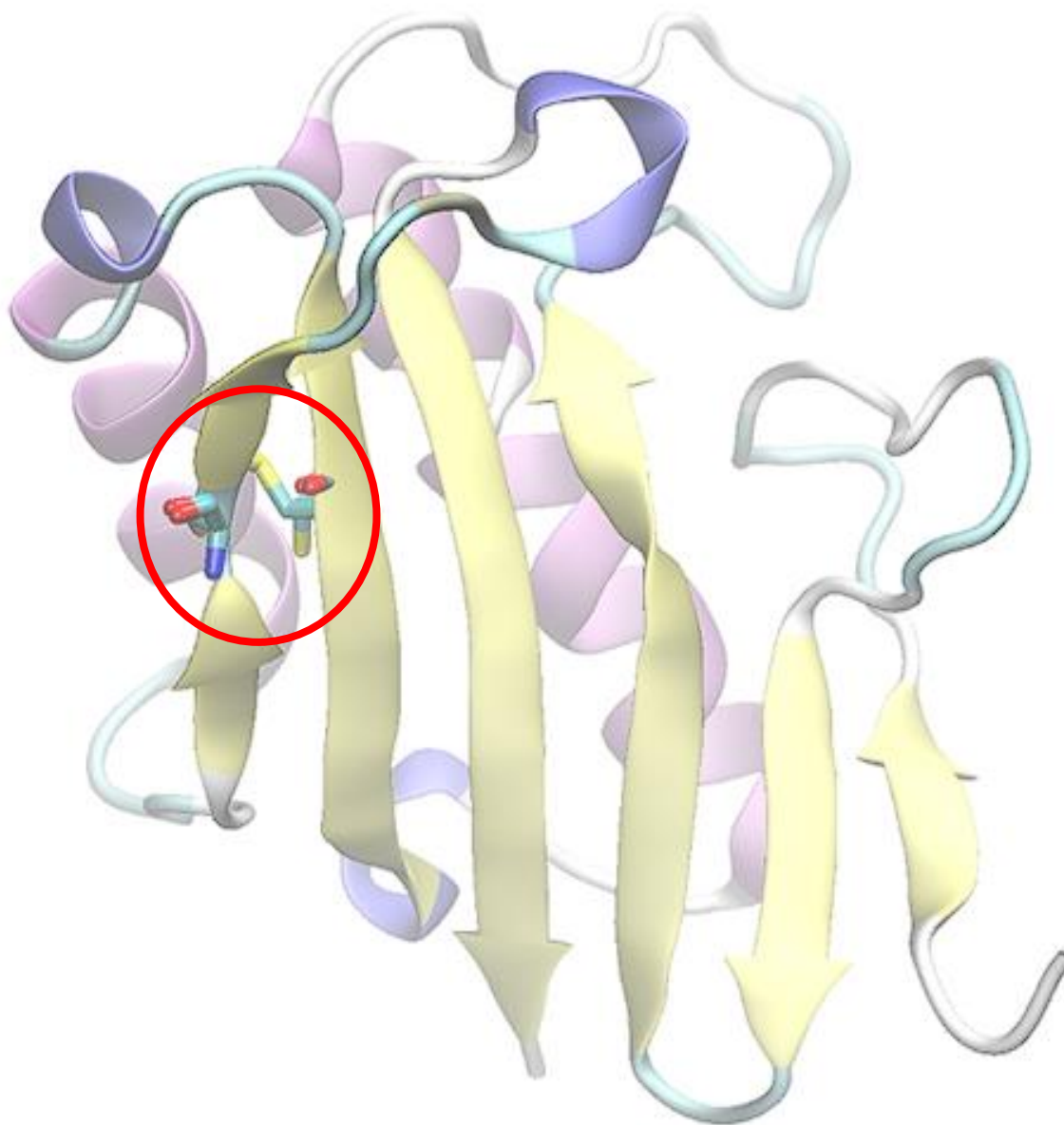


Figura 8. Representación de un monómero de Tv-PSP1. Se destaca dentro del círculo rojo la presencia del enlace disulfuro (Cis76 – Cis104). Visualizado mediante el software VMD.

Previamente en experimentos de degradación del RNA de *T. vaginalis*, donde se utiliza el RNA total del parásito en presencia de Tv-PSP1, se encontró que esta proteína es capaz de degradar parcialmente al RNA, por lo que se le ha atribuido la posible función de ribonucleasa (Villalobos-Osnaya, *et al*; 2018). La ubicación celular de esta proteína dentro del parásito es en citoplasma, núcleo e hidrogenosoma (Fig. 9).

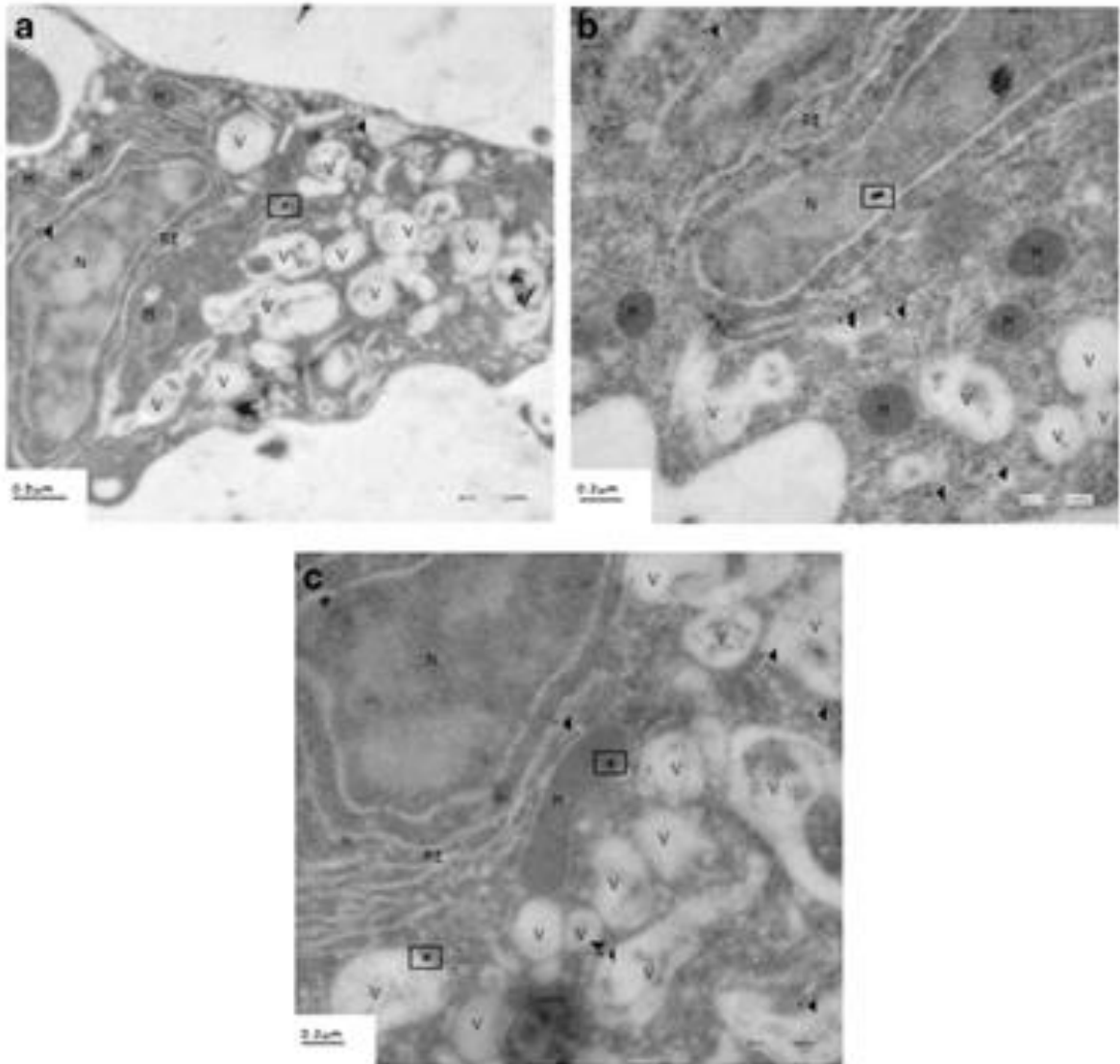


Figura 9. Ubicación celular de Tv-PSP1 dentro de *T. vaginalis*. a) citoplasma, b) núcleo, c) hidrogenosoma, los cuadros indican la presencia de la proteína Tv-PSP1, vista a través de Microscopía electrónica de transmisión. Tomado y modificado de Villalobos-Osnaya, et al; 2018.

La dinámica molecular previamente realizada a partir de un modelo basado en homología de TvPSP-1 utilizando el software NAMD, 100 ns, 30°C y 1 atm de presión, mostró un movimiento inusual en uno de los monómeros que componen al homotrímero (Fig. 10).



Figura 10. Dinámica molecular, representación estructural de Tv-PSP1 en el tiempo 0 (inicial) y 100 ns (final), se observa movimiento en un loop perteneciente a uno de los trímeros. Modelo basado en homología, tomado y modificado de Villalobos-Osnaya, et al; 2018.

Por otra parte, mediante herramientas de predicción *in silico*, concretamente utilizando el servidor STRING, se han descrito algunas proteínas con las que podría interaccionar Tv-PSP1 (Tabla V) algunas de ellas participan en la degradación del RNA debido a su actividad funcional como ribonucleasas (Villalobos-Osnaya, 2019).

Tabla IV. Proteínas predichas *in silico* que interaccionan con Tv-PSP1, tomado de Villalobos-Osnaya, 2019, Tesis de Doctorado.

T. vaginalis

ID Proteína	Nombre de la proteína	ID TrichDB
<i>XP_001277024.1</i>	Proteína hipotética	TVAG_121140
<i>XP_001322588.1</i>	Factor de Elongación TU (unión a GTP)	TVAG_109490
<i>XP_001321791.1</i>	Proteína hipotética	TVAG_276410
<i>XP_001317139.1</i>	Proteína hipotética	TVAG_016880
<i>XP_001582930.1</i>	Familia 3' exoribonucleasa dominio 1	TVAG_250040
<i>XP_001317083.1</i>	Familia 3' exoribonucleasa dominio 1	TVAG_287740
<i>XP_001307267.1</i>	Familia 3' exoribonucleasa dominio 1	TVAG_441569
<i>XP_001316265.1</i>	Proteína hipotética	TVAG_055280
<i>XP_001580923.1</i>	Proteína hipotética	TVAG_113950
<i>XP_001579037.1</i>	Proteína hipotética	TVAG_113950

Posteriormente mediante ensayos de coimmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti rTv-PSP1 y extractos totales de *T. vaginalis*, se lograron identificar 8 proteínas a través de espectrometría de masas algunas de las cuáles son exoribonucleasas y otras son proteínas hipotéticas (Tabla VI) (Villalobos-Osnaya, 2019).

Tabla VI. Proteínas obtenidas por espectrometría de masas que coimmunoprecipitan con Tv-PSP1. Tomado de Villalobos-Osnaya, 2019, Tesis de Doctorado.

ID	Proteína
<i>TVAG_364900</i>	Posible proteína contiene bromodominio
<i>TVAG_426270</i>	Proteína hipotética conservada
<i>TVAG_296310</i>	Proteína hipotética conservada
<i>TVAG_080140</i>	Proteína hipotética conservada
<i>TVAG_128900</i>	Proteína hipotética conservada
<i>TVAG_350200</i>	Proteína hipotética conservada
<i>TVAG_412960</i>	Proteína atípica de la familia PIKK
<i>TVAG_267870</i>	Posible enzima málica

Mediante experimentos de difracción de rayos X, se obtuvo la configuración cristalina de Tv-PSP1 con una resolución de 2 Å (datos en proceso de publicación), esta molécula mostró una estructura cuaternaria, la cuál es similar a otras L-PSP. Esta estructura tiene un puente disulfuro interno en cada una de las subunidades. Sin embargo, dentro de la organización de simetría del cristal se observan 4 trímeros con diferente estabilidad térmica valorada mediante los parámetros de factores B.

Valores bajos de factor B indican que la molécula se encuentra en forma estable, mientras que valores grandes o elevados de factor B indican que la molécula se vuelve más dinámica y podría cambiar su estructura, además también se observa una asociación entre la elevación de factores B y la pérdida de puentes disulfuro en los trímeros.

Uno de los residuos de Cisteína del puente disulfuro se encuentra sobre la misma hebra de uno de los residuos que forman un puente salino entre subunidades y que está muy conservado. Se ha observado también que este puente salino se pierde en la subunidad con altos factores B y sin puentes disulfuro formados. Este dato es contrastante con el hecho de que se trata de una estructura altamente estable a la disociación de la estructura cuaternaria.

Esta evidencia experimental señala que cuando están presentes tanto los puentes disulfuro y el puente salino, la proteína se encontraría en su punto de máxima estabilidad estructural y por lo tanto con factores B bajos. Lo anterior nos permite especular que al perderse los puentes disulfuro y el puente salino, en la estructura del homotrímero se incrementarían los valores del factor B y se incrementará el estado de la vibración térmica asociada a la molécula. Sin embargo, la alta estabilidad cuaternaria reportada (Villalobos-Osnaya *et al.*, 2018) no explicaría este dato de forma simple. Por lo que podemos preguntarnos ¿Cuál es el papel de los puentes disulfuro en la estabilidad general de la proteína? y ¿Qué implicación tienen en la función biológica como ribonucleasa?

3. Hipótesis:

- Los puentes disulfuro participan en el mantenimiento de la estructura y en la función como endoribonucleasa de Tv-PSP1.

4. Justificación:

Debido a que la tricomoniasis es un problema de salud pública a nivel mundial, consideramos importante conocer la estructura de proteínas que tienen funciones importantes dentro de las vías de patogénesis de *T. vaginalis* tal como Tv-PSP1, con la finalidad de entender y obtener conocimiento acerca de su función y de su posible papel en la sobrevivencia del parásito en el microambiente del tracto urogenital humano.

5. Objetivos

5.1 General:

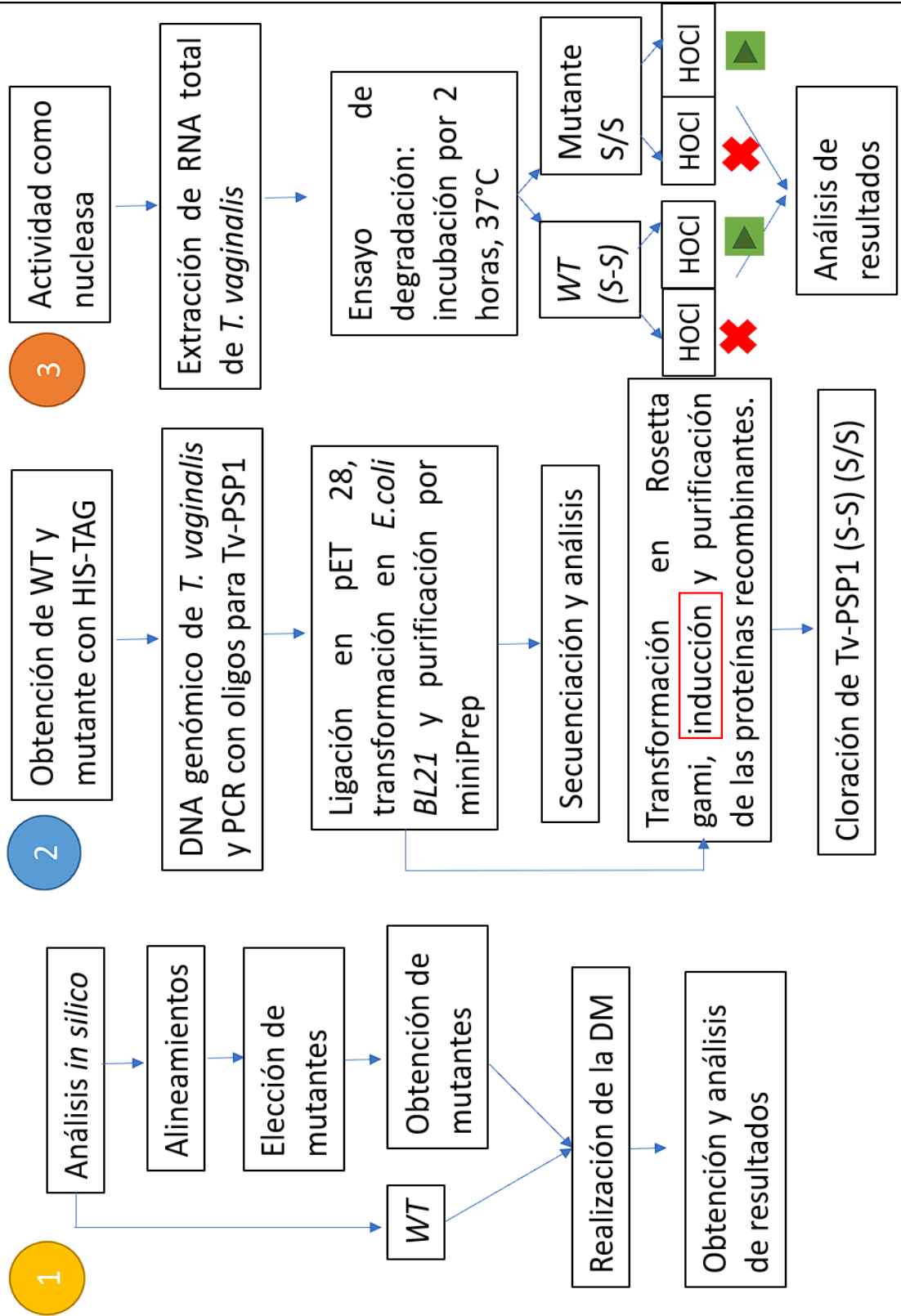
- Determinar el papel de los enlaces disulfuro en la estabilidad estructural y funcionalidad biológica (como endoribonucleasa) de Tv-PSP1.

5.2 Particulares:

- Determinar el papel de los puentes disulfuro en la estructura de Tv-PSP1 mediante la obtención *in silico* de al menos dos mutantes por sustitución en CYS 76 y de Tv-PSP1 *WT*.
- Obtener experimentalmente rTv-PSP1-His *WT* (con enlace S-S y sin enlace S/S).
- Analizar la actividad funcional de rTv-PSP1-His *WT* con enlace S-S, en presencia y ausencia de cloración

6. Estrategia experimental general

Estrategia Experimental



7. Metodología:

7.1. Determinar el papel de los puentes disulfuro en la estructura de Tv-PSP1 mediante la obtención *in silico* de al menos dos mutantes por sustitución en CYS 76 y de Tv-PSP1 *WT*.

7.1.1 Alineamiento:

En primer lugar, se realizó una matriz de combinación de aminoácidos, con la finalidad de observar el número de mutantes potenciales, posteriormente se obtuvo la secuencia de la proteína TvPSP-1 en el buscador de proteínas del sitio *NCBI* (*Protein*: AFH78190.1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), en el servidor UniProtKB y ExPASy se buscaron las proteínas homólogas de Tv-PSP1 en diferentes organismos, posteriormente se obtuvo la secuencia de las proteínas y se procedió a realizar un alineamiento múltiple de secuencias con ayuda de los programas: ClustalX, MEGA-X y BioEdit.

7.1.2 Obtención *in silico* de mutantes de Tv-PSP1 (sustitución):

Dos mutantes fueron obtenidas por sustitución de aa para la Cisteína de la posición 76 utilizando la herramienta *Solution Builder* del servidor CHARMM-GUI. Como *input* se utilizó el archivo *.pdb* de la proteína *WTTv-PSP1* (proporcionado por el laboratorio del Dr. Enrique Rudiño Piñera, IBT - UNAM), en la posición 76 se cambió el aminoácido Cisteína por Valina en cada uno de los tres monómeros, por separado lo anterior se repitió cambiando Cisteína por Fenilalanina, y al final se adicionaron iones, así como temperatura y se descargó el archivo *.pdb* con las proteínas mutantes (figura 11).

CHARMM-GUI

Effective Simulation Input Generator and More

[about us](#) :: [input generator](#) :: [Q&A](#) :: [archive](#) :: [contact](#)

Some [lectures](#), [job postings](#), and [FAQ](#) are now available. See [upload logs](#)

Input Generator

- Job Retriever
- PDB Reader
- Glycan Reader & Modeler
- Ligand Reader & Modeler
- Glycolipid Modeler
- LPS Modeler
- Nanomaterial Modeler
- Multicomponent Assembler
- Solution Builder
- Membrane Builder
- Martini Maker
- PACE CG Builder
- Drude Prepper
- Free Energy Calculator
- MAP Utilizer
- DEER Facilitator
- NMR Structure Calculator
- PBEQ Solver
- Implicit Solvent Modeler

Solution Builder

PDB Info	CHARMM PDB	Solvator	PBC Setup	Input Generator
Title				
PDB ID	PSP1-13_REFINE_33-COOT-TRIMA_(1)			
Type	Protein			
Experimental Method	Unknown			

PDB Manipulation Options:

- Terminal group patching: **2**
- Preserve hydrogen coordinates:
- Mutation:

SEGID	RESID	Amino acid	Mutant	
PROA	76	CYS	VAL	-
PROB	76	CYS	VAL	-
PROC	76	CYS	VAL	-
- Protonation:

System Size:

Box Type	Rectangle		
Crystal Type	CUBIC		
System Size	A	79	Dimension along the A (X) axis
	B	79	Dimension along the B (Y) axis
	C	79	Dimension along the C (Z) axis
Crystal Angle	Alpha	90.0	Angle between the axis B and C
	Beta	90.0	Angle between the axis A and C
	Gamma	90.0	Angle between the axis A and B
# of Ions	NA	41	
	CL	38	

Figura 11. Obtención *in silico* de mutantes. A partir del archivo *.pdb* de la proteína Tv-PSP1 se obtuvieron 2 mutantes, cambiando los aminoácidos seleccionados en la posición 76, en la figura inferior se muestran los parámetros utilizados para el centrado de la proteína y equilibrio del sistema.

7.1.3 Preparación del sistema:

El cristal de la proteína Tv-PSP1 a través de difracción de rayos X (obtenido previamente) fue resuelto y refinado para obtener un archivo *.pdb* con las coordenadas de los átomos de la misma, el archivo fue visualizado con el software VMD (versión 1.9.3); la información previa permitió conocer la existencia de un enlace disulfuro por cada uno de los monómeros. Se instaló Gromacs versión 2019.3 en una computadora personal, conectada hacia la supercomputadora MIZTLI ubicada en la Dirección de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC) en Ciudad Universitaria-UNAM.

7.1.4 Dinámica Molecular:

Los archivos de las proteínas mutantes y de la proteína *WT* obtenidos previamente, fueron utilizados para comenzar la dinámica molecular. El campo de fuerza elegido fue CHARMM36m, se procedió a neutralizar el sistema agregando iones de sodio (Na), se utilizó 1 atm de presión y 310°K y se realizó un proceso de minimización de energía, finalmente el archivo fue mandado a MIZTLI y se corrió la dinámica molecular para un periodo de tiempo de 1,000 nanosegundos, lo anterior se realizó para la técnica de “*all atoms*” y para “*coarse grained*”. Se realizó una prueba de velocidad para calcular el tiempo de proceso, dando como resultado 30 ns/día. Para el caso de *coarse grained* se realizaron 10 réplicas por cada proteína. Al finalizar se analizó la trayectoria mediante el cálculo de RMSD y Radio de giro, los datos fueron graficados mediante el uso del software XMGrace, la visualización de la estructura inicial y final, así como de la trayectoria se realizó en el software VMD.

Los cálculos de RMSD Y Radio de giro fueron obtenidos mediante la utilización de las herramientas *gmx rms* y *gmx gyrate* respectivamente, incluidas en el software Gromacs.

7.2. Obtener experimentalmente rTvPSP-1-His WT (con enlace S-S y sin enlace S/S)

7.2.1 Obtención experimental del plásmido que codifica para la proteína WT con un Tag de histidinas

7.2.1.1 Cultivo de Parásitos:

A partir de un cultivo sincrónico de dos semanas de parásitos *T. vaginalis* de la cepa CNCD 147 se colocó un subcultivo y se dejó crecer por 24 horas en medio TYM pH 6.2 a 37°C.

7.2.1.2 Purificación de DNA genómico:

Un cultivo de 2×10^6 parásitos fue colocado en un tubo cónico de centrifuga de 15ml; los parásitos fueron centrifugados a 7,500 rpm/4°C/10 minutos, el sobrenadante fue eliminado, se lavaron con PBS 1X frío dos veces y se procedió a realizar la purificación del DNA genómico mediante el Quick-DNA Miniprep Plus Kit de ZYMO Research, siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA purificado fue resuspendido en 50µl de H₂O libre de nucleasas y se cuantificó mediante Nanodrop, se tomaron 2µl para una electroforesis en gel de agarosa al 1% y el resto fue congelado a -20°C hasta su uso.

7.2.1.3 PCR

Para llevar a cabo la PCR punto final se utilizó el DNA genómico de *T. vaginalis*, brevemente, en un tubo de PCR se agregaron 500 ng del DNA, 5µl de Máster Mix de Promega (Núm. Cat: M7505), 100pMol de oligonucleótido sentido, 10pMol de oligonucleótido antisentido y H₂O libre de nucleasas para completar un volumen final de 24µl. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

Oligonucleótido sentido (*forward*)

5'CCCGGATCCATGTCTAAAGTCATCAGC3'
BamHI

Oligonucleótido antisentido (*reverse*)

5'CCCTCGAGTTACTTGTAAGCGATGGC3'
XhoI

La PCR se realizó en el termociclador 9700 de Applied biosystems y el programa de PCR fue el siguiente:

94°C	7 min	}	30 ciclos
94°C	1 min		
55°C	30 seg		
72°C	30 seg		
72°C	7 min		

Cabe destacar que los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados previamente con dos sitios de corte que son reconocidos por dos enzimas de restricción diferentes.

7.2.1.4 Electroforesis en gel de agarosa

En un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1x se cargaron 2µl del producto de PCR + amortiguador de carga (con *GelRed* como colorante), la electroforesis se corrió durante 45 minutos a 50 volts. Al finalizar, el gel fue visualizado en equipo Chemidoc de BioRad. El resto de muestra fue congelada a una temperatura de -20°C hasta su uso.

7.2.1.5 Ensayo de restricción

Después de visualizar los geles de agarosa se procedió a realizar un ensayo doble de restricción. En un tubo de polipropileno se colocaron 2µg de DNA, 1µl de las enzimas

BamHI y *XhoI*, 2µl de buffer y H₂O libre de nucleasas para ajustar un volumen final de 20µl. La mezcla se dejó en incubación a 37°C durante 2 horas, posteriormente se realizó tratamiento con *Shrimp Alkaline Phosphatase* durante 30 minutos a 37°C, finalmente se inactivó la enzima incubando la reacción a 65°C por 15 minutos, lo anterior con la finalidad de poder desfosforilar los extremos del plásmido.

7.2.1.6 Ligación

En un tubo de polipropileno se colocó una alícuota del plásmido restringido y desfosforilado en presencia del producto de PCR a razón molar de 1:3 respectivamente, se agregó también 1µl de ligasa T4 con 1 µl de su respectivo amortiguador y H₂O libre de nucleasas para ajustar un volumen final de 20µl, se procedió a realizar la ligación en las siguientes condiciones: incubación a 16°C por 12 horas. El producto de la ligación fue utilizado para transformar bacterias *E. coli* BL21 competentes, mediante el método que se describe a continuación, fueron sembradas e incubadas a 37°C por 12 horas en placas de agar LB con kanamicina 50µg/ml. Como control de bacterias y de antibiótico se realizó el mismo procedimiento de transformación sin utilizar DNA.

7.2.1.7 Preparación de células competentes

50 µl de bacterias *E. coli* de la cepa BL21 y Rosetta gammi fueron sembrados por separado en placas de agar LB sin antibiótico mediante estría cruzada, las placas fueron colocadas en una incubadora a 37°C y se dejaron crecer las bacterias durante 16 horas. Después del crecimiento bacteriano se tomó una colonia y se colocó en 5ml de medio LB, se dejaron crecer en agitación 200rpm /37°C/16 horas. Al día siguiente se tomaron 100 µl y se resembraron en 10ml de medio LB, se colocaron en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de entre 0.4 - 0.6, las bacterias fueron centrifugadas a 3,800 rpm/4°C/5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 2.4ml de buffer 1 (RbCl₂ 100mM, MnCl₂ 50mM, CaCl₂ 10mM, KC₂H₃O₂ 50Mm y Glicerol 15% pH=5.8) y se incubaron en hielo durante 5 minutos,

posteriormente se centrifugó 3,800 rpm/4°C/5 minutos eliminando el sobrenadante y resuspendiendo las células en 5ml de buffer 2 (RbCl₂ 10mM, MOPS 10mM, CaCl₂ 75mM y Glicerol 15%) y se incubaron en hielo durante 15 minutos, se prepararon alícuotas de 50µl en tubos de polipropileno de 1.5ml en baño de hielo seco y etanol 70%, las células competentes fueron conservadas a -80°C hasta su uso.

7.2.1.8 Transformación de bacterias y purificación de plásmidos

Las alícuotas de bacterias *E. coli* cepa BL21 se colocaron en hielo y se agregaron 30ng de DNA del plásmido pET28 a (+), se incubó en hielo durante 30 minutos y se procedió a dar choque térmico a 42°C durante 40 segundos, posteriormente se colocaron en hielo por 2 minutos y se agregaron 500µl de medio LB fresco. Las bacterias se dejaron en recuperación durante 1 hora en agitación 200rpm/37°C/16 horas, finalmente fueron colocadas en placas de agar LB con kanamicina 50µg/ml y se dejaron crecer 16 horas a 37°C. Al día siguiente se tomó una colonia y se colocó en 50 ml de medio líquido LB con kanamicina 50µg/ml y se dejaron en agitación 200rpm/37°C/16 horas. Las células fueron centrifugadas 7500 rpm/4°C/10 minutos, posteriormente se realizó la purificación del plásmido mediante el uso del kit Qiagen Plasmid Midi Prep siguiendo las instrucciones del fabricante, a continuación; el DNA purificado fue resuspendido en 100µl de H₂O libre de nucleasas, se cuantificó, se visualizó en gel de agarosa y fue congelado a -20°C hasta su uso.

7.2.1.9 Caracterización de las colonias candidatas

De las colonias que crecieron en las placas se tomaron 5 y se crecieron en medio LB líquido, la purificación del DNA se realizó mediante la utilización del kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para comprobar que el vector incorporó al inserto, se realizó nuevamente un ensayo de doble de restricción, con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I siguiendo la metodología

anteriormente descrita, una alícuota de esta restricción fue corrida en un gel de agarosa al 1% teñido con *GelRed*. Por separado, se utilizó el DNA purificado para realizar PCR punto final, con el objetivo de observar un amplicón de tamaño correspondiente al gen de la proteína Tv-psp1.

7.2.1.10 Secuenciación:

La secuenciación de DNA de los plásmidos pertenecientes a las colonias candidatas se realizó a partir de PCR punto final con *DYE terminators*, utilizando como *primer forward* el oligonucleótido del promotor T7 y como primer reverse el oligonucleótido antisentido del gen que codifica para Tv-PSP1, lo anterior se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de PCR fue purificado para eliminar los restos de terminadores mediante el uso del kit DyEX 2.0 Spin siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó en las instalaciones del Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM. Las colonias seleccionadas fueron sometidas a secuenciación para comprobar la presencia del inserto y que se encontrara en marco de lectura. Las bacterias con el inserto, correspondientes a las colonias obtenidas, se colocaron en glicerol 50% agua/glicerol y se congelaron a -80°C hasta su uso.

7.2.1.11 Análisis de la secuencia

Una vez obtenida la secuencia del plásmido, se procedió a visualizar el electroferograma con ayuda del software *SnapGene viewer*, también se realizó un alineamiento (BLASTn) en el servidor NCBI en el servidor ExPASy con la finalidad de verificar si el gen estaba en marco de lectura deseado.

7.2.2 Obtención experimental de la proteína *WT* con un *Tag* de histidinas

7.2.2.1 Expresión de la proteína recombinante

50µl del stock en glicerol de las bacterias con el vector que contenía al inserto fueron tomados y se dejaron crecer en 5 ml de medio LB con antibiótico, se colocaron en

condiciones de cultivo durante 16 horas, posteriormente se tomaron 500µl y se sembraron en 10 ml de medio fresco en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 - 0.6, se tomó 1 ml de bacterias, se centrifugaron y el pellet fue congelado a -20°C, al resto se agregó IPTG a una concentración final de 10µg/ml, las bacterias se incubaron en agitación a 200 rpm/30°C/16 horas.

Un pellet celular se obtuvo a partir de 1 ml de bacterias inducidas, se agregaron 200µl de TNTE frío (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, 1 mM EDTA) y se agregaron también 20µl de coctel de inhibidores de serín-proteasas, cisteín-proteasas y metaloproteasas 10X (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche), posteriormente se mezcló vigorosamente con ayuda de vórtex durante 1 minuto, posteriormente se sonicó durante 2 minutos con ciclos de 30 segundos de sonicación por 30 segundos de descanso a una amplitud de 80%, las muestras fueron centrifugadas 10 minutos/12000rpm/4°C. Las muestras fueron mantenidas en hielo hasta antes de su uso.

7.2.2.2 SDS-PAGE

Para analizar la inducción de las proteínas se hicieron dos geles desnaturalizantes (SDS-PAGE), el gel separador se preparó al 12%. Se adicionó amortiguador de carga a las muestras y fueron hervidas durante 45 minutos. La electroforesis se llevó a cabo a 80 volts durante 1 hora, hasta observar las muestras en la parte final del gel (aproximadamente 1 hora y media más). Al finalizar la electroforesis, uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie, mientras que un gel espejo fue utilizado para realizar western blot.

7.2.2.3 Western blot

El gel espejo fue transferido a una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.45 µm (BioRad), la membrana, el papel filtro y las esponjas fueron sumergidas en amortiguador de transferencia (ver anexo) durante 10 minutos antes de la transferencia

y se montó en cassette. La transferencia de proteínas se realizó en cámara húmeda; 20 minutos a 30 volts y 1 hora a 100 volts.

Al finalizar la transferencia se realizó una tinción con rojo de Ponceau a la membrana para observar la presencia de las proteínas transferidas, posteriormente se lavó la membrana con PBS 1X.

La membrana con las proteínas transferidas se bloqueó con leche al 5% en PBS 1x durante 16 horas a 4°C en agitación suave. Al día siguiente la membrana se lavó con 15 ml de PBS 1X/TWEEN 5% dejándola en agitación a temperatura ambiente, se desechó el PBS, lo anterior se repitió 4 veces más.

Después de los lavados se agregó el anticuerpo primario a la membrana, se utilizaron dos anticuerpos diferentes: α -HIS-TAG (1:2000, Rabbit) y α Tv-PSP1 (1:2000, Mouse) ambos policlonales. El anticuerpo fue preparado en 10 ml de PBS 1X, se añadió a la membrana y se dejó en incubación a 4°C y agitación suave durante 16 horas. Después de la incubación, los anticuerpos fueron recuperados y se utilizaron dos veces más como máximo, la membrana fue lavada como se mencionó anteriormente con PBS/TWEEN por 10 minutos, 5 veces. Posteriormente se agregaron los anticuerpos secundarios (1:3,000) conjugados a peroxidasa y preparados en 5 ml de PBS 1X, la membrana se dejó en incubación a 4°C 16 horas en agitación suave. Al día siguiente se lavó la membrana 5 veces con PBS 1X/TWEEN como se mencionó anteriormente. La membrana fue revelada por quimioluminiscencia en presencia de reactivo Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo), cada membrana fue analizada en el equipo ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad).

7.2.2.4 Inducción de la expresión de la proteína recombinante

50 μ l del stock en glicerol (previamente preparado) de bacterias *E. coli* de las cepas Rosetta gami y BL21 (por separado) que contenían el vector con el inserto, se dejaron crecer en 10 ml de medio LB con kanamicina 50 μ g/ml en agitación 200rpm/37°C/16 horas, posteriormente se tomó 1 ml y se sembró en 500 ml de medio LB con

antibiótico. El inóculo fue mantenido en agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 – 0.6, una vez alcanzada esta densidad óptica se procedió a agregar IPTG a una concentración final de 10µmol/ml, las bacterias se incubaron en agitación a 200 rpm/30°C/24 horas. Los 500 ml de medio con bacterias fueron centrifugados en tubos de 50 ml a 7800 rpm/4°C/15 minutos, se eliminó el sobrenadante y los pellets fueron lisados con buffer TNE siguiendo la metodología descrita anteriormente, el lisado celular fue centrifugado a 12,000 rpm/4°C/1 hora, posteriormente el sobrenadante fue filtrado con una membrana con un tamaño de poro de 0.22 µm.

7.2.2.5 Purificación de proteínas mediante FPLC

Para purificar las proteínas recombinantes se utilizó la columna HisTrap HP His tag protein purification columns (GE Healthcare Life Science) nueva de 1 ml (se utilizó una columna para purificar las proteínas provenientes de BL21 y otra para las proteínas provenientes de Rosetta gami) y el equipo Akta Prime Plus del mismo fabricante. En primer lugar, se procedió a lavar el equipo y la columna 2 veces con H₂O filtrada y desgasificada, posteriormente se equilibró la columna con buffer de unión HIS-TAG (Na₃PO₄ 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 20 mM, pH 7.4), la muestra de proteínas preparada previamente fue inyectada al equipo de forma suave con un flujo de 0.20 ml/min, se lavó 2 veces cada una con 20 ml de buffer de unión. Al final la proteína fue eluída en buffer de elusión (Na₃PO₄ 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 0.5 M, pH 7.4) y se recogieron fracciones de 1 ml cada una, las fracciones fueron observadas en geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y se realizó western blot con los anticuerpos α-HIS-TAG y α-Tv-PSP1 como se explica anteriormente.

7.3. Análisis de la actividad funcional de rTv-PSP1-His WT con enlace S-S, en presencia y ausencia de cloración

7.3.1 Diseño de oligonucleótidos

A partir de la secuencia obtenida del plásmido con el inserto correspondiente al gen que codifica para la proteína TvPSP-1, se diseñó 1 par de oligonucleótidos con la mutación en el sitio de interés (C76), la secuencia fue la siguiente:

Oligonucleótido sentido “TvPSP1_226_C76V_FW”:

5'GTTGTCAAGTGCAACGTATACCTTGCTGATATC3'

Oligonucleótido antisentido “TvPSP1_226_C76V_RV”:

5'GATATCAGCAAGGTATACGTTGCACTTGACAAC3'

Una vez recibidos los oligonucleótidos se procedió a realizar PCR de punto final para comprobar que amplificaran el fragmento. La obtención de esta mutante permaneció como un camino alternativo debido a la problemática mundial ocasionada en el año en curso. Debido a lo anterior se decidió explorar el camino de la modificación postraduccional y la actividad funcional de Tv-PSP1 en presencia y/o ausencia de los enlaces disulfuro, expresando la proteína recombinante en dos cepas diferentes de *E. coli*, para tener 1 proteína con la formación de enlaces disulfuro y otra sin la formación de ellos.

7.3.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford, las muestras de las proteínas se colocaron en placas 96 pozos y se leyeron mediante espectrometría a una longitud de onda de 595 nm, la curva patrón se obtuvo mediante la medición de BSA (1 µg/ml), NaCl 0.15 M y Bradford 1X.

7.3.3 Cloración de proteínas

El ácido hipocloroso (HOCl) utilizado se preparó a partir de una solución de hipoclorito de sodio al 6% y se diluyó a 200mM en 200 mM en Tris / HCl 50 mM, pH 7,5 y se mantuvo en reposo durante 2 horas. Se agregó 1mM de las proteínas purificadas y se colocaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en HOCl con una relación molar de proteína:HOCl de 1:10.

7.3.4 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó mediante el método de TRIzol (Invitrogen, Life Technologies), a partir de un cultivo de *T. vaginalis* se obtuvieron 20×10^6 parásitos y se colocaron en un tubo cónico de centrifuga, los parásitos fueron centrifugados a 7,800rpm/4°C/10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavaron dos veces con PBS 1x frío, se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de TRIzol frío, la muestra se colocó en un tubo de polipropileno de 1.5 ml y se procedió a realizar la purificación del RNA.

El tubo eppendorf de 1.5 ml se mantuvo en hielo y se agitó en Vórtex durante 15 segundos, posteriormente se incubó en hielo por 5 minutos, a continuación, se agregaron 200 µl de cloroformo y fue homogenizado por inversión suave. Después, el tubo fue centrifugado a 12,000 rpm/4°C/10 minutos, se recuperó la fase acuosa en tubos de polipropileno de 1.5ml y se añadieron 500 µl de isopropanol, el RNA se precipitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para continuar, la muestra fue centrifugada 12,000rpm/15min, se eliminó el sobrenadante y se procedió a realizar un lavado al pellet con etanol al 70%, se centrifugó nuevamente a 3,500rpm/4°C/10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet con el tubo invertido durante 1 hora a temperatura ambiente. Para finalizar, el RNA fue resuspendido en 100 µl de H₂O libre de nucleasas, se cuantificó y se congeló a -20°C hasta su uso.

7.3.5 Ensayo funcional:

Para realizar el ensayo funcional, se utilizó 1µg de RNA y se incubó en presencia de 1pM de proteína Tv-PSP1 clorada y sin clorar (proveniente de la cepa Rosetta gami: formación de los enlaces disulfuro S-S) durante 1 hora a temperatura ambiente, como control positivo se utilizó RNasa A, como control negativo se utilizó GST. Las muestras fueron observadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con *Ge/Red*.

8. Resultados

8.1 Obtención *in silico* de dos mutantes por sustitución en CYS 76 y de rTv-PSP1-His WT.

Para cumplir con el primer objetivo, se realizó una matriz de combinaciones con la finalidad de cambiar las cisteínas presentes en la posición 76 y 104 de la proteína TvPSP-1 y observar el número de mutantes potenciales (Fig. 12), el resultado fue de 400 posibles combinaciones.

	Glicina	Alanina	Valina	Leucina	Isoleucina	Metionina	Prolina	Fenilalanina	Tirosina	Triptófano
Glicina	GLI/GLI	GLI/ALA	GLI/VAL	GLI/LEU	GLI/ILE	GLI/MET	GLI/PRO	GLI/PHE	GLI/TRY	GLI/TRP
Alanina	ALA/GLI	ALA/ALA	ALA/VAL	ALA/LEU	ALA/ILE	ALA/MET	ALA/PRO	ALA/PHE	ALA/TRY	ALA/TRP
Valina	VAL/GLI	VAL/ALA	VAL/VAL	VAL/LEU	VAL/ILE	VAL/MET	VAL/PRO	VAL/PHE	VAL/TRY	VAL/TRP
Leucina	LEU/GLI	LEU/ALA	LEU/VAL	LEU/LEU	LEU/ILE	LEU/MET	LEU/PRO	LEU/PHE	LEU/TRY	LEU/TRP
Isoleucina	ILE/GLI	ILE/ALA	ILE/VAL	ILE/LEU	ILE/ILE	ILE/MET	ILE/PRO	ILE/PHE	ILE/TRY	ILE/TRP
Metionina	MET/GLI	MET/ALA	MET/VAL	MET/LEU	MET/ILE	MET/MET	MET/PRO	MET/PHE	MET/TRY	MET/TRP
Prolina	PRO/GLI	PRO/ALA	PRO/VAL	PRO/LEU	PRO/ILE	PRO/MET	PRO/PRO	PRO/PHE	PRO/TRY	PRO/TRP
Fenilalanina	PHE/GLI	PHE/ALA	PHE/VAL	PHE/LEU	PHE/ILE	PHE/MET	PHE/PRO	PHE/PHE	PHE/TRY	PHE/TRP
Tirosina	TRY/GLI	TRY/ALA	TRY/VAL	TRY/LEU	TRY/ILE	TRY/MET	TRY/PRO	TRY/PHE	TRY/TRY	TRY/TRP
Triptófano	TRP/GLI	TRP/ALA	TRP/VAL	TRP/LEU	TRP/ILE	TRP/MET	TRP/PRO	TRP/PHE	TRP/TRY	TRP/TRP
Serina	SER/GLI	SER/ALA	SER/VAL	SER/LEU	SER/ILE	SER/MET	SER/PRO	SER/PHE	SER/TRY	SER/TRP
Cisteína	CYS/GLI	CYS/ALA	CYS/VAL	CYS/LEU	CYS/ILE	CYS/MET	CYS/PRO	CYS/PHE	CYS/TRY	CYS/TRP
Treonina	TRE/GLI	TRE/ALA	TRE/VAL	TRE/LEU	TRE/ILE	TRE/MET	TRE/PRO	TRE/PHE	TRE/TRY	TRE/TRP
Asparagina	ASG/GLI	ASG/ALA	ASG/VAL	ASG/LEU	ASG/ILE	ASG/MET	ASG/PRO	ASG/PHE	ASG/TRY	ASG/TRP
Glutamina	GLN/GLI	GLN/ALA	GLN/VAL	GLN/LEU	GLN/ILE	GLN/MET	GLN/PRO	GLN/PHE	GLN/TRY	GLN/TRP
Ac Aspártico	ASP/GLI	ASP/ALA	ASP/VAL	ASP/LEU	ASP/ILE	ASP/MET	ASP/PRO	ASP/PHE	ASP/TRY	ASP/TRP
Ac Glutámico	GLU/GLI	GLU/ALA	GLU/VAL	GLU/LEU	GLU/ILE	GLU/MET	GLU/PRO	GLU/PHE	GLU/TRY	GLU/TRP
Lisina	LYS/GLI	LYS/ALA	LYS/VAL	LYS/LEU	LYS/ILE	LYS/MET	LYS/PRO	LYS/PHE	LYS/TRY	LYS/TRP
Arginina	ARG/GLI	ARG/ALA	ARG/VAL	ARG/LEU	ARG/ILE	ARG/MET	ARG/PRO	ARG/PHE	ARG/TRY	ARG/TRP
Histidina	HIS/GLI	HIS/ALA	HIS/VAL	HIS/LEU	HIS/ILE	HIS/MET	HIS/PRO	HIS/PHE	HIS/TRY	HIS/TRP

	Serina	Cisteína	Treonina	Asparagina	Glutamina	Ac Aspártico	Ac Glutámico	Lisina	Arginina	Histidina
Glicina	GLI/SER	GLI/CYS	GLI/TRE	GLI/ASG	GLI/GLN	GLI/ASP	GLI/GLU	GLI/LYS	GLI/ARG	GLI/HIS
Alanina	ALA/SER	ALA/CYS	ALA/TRE	ALA/ASG	ALA/GLN	ALA/ASP	ALA/GLU	ALA/LYS	ALA/ARG	ALA/HIS
Valina	VAL/SER	VAL/CYS	VAL/TRE	VAL/ASG	VAL/GLN	VAL/ASP	VAL/GLU	VAL/LYS	VAL/ARG	VAL/HIS
Leucina	LEU/SER	LEU/CYS	LEU/TRE	LEU/ASG	LEU/GLN	LEU/ASP	LEU/GLU	LEU/LYS	LEU/ARG	LEU/HIS
Isoleucina	ILE/SER	ILE/CYS	ILE/TRE	ILE/ASG	ILE/GLN	ILE/ASP	ILE/GLU	ILE/LYS	ILE/ARG	ILE/HIS
Metionina	MET/SER	MET/CYS	MET/TRE	MET/ASG	MET/GLN	MET/ASP	MET/GLU	MET/LYS	MET/ARG	MET/HIS
Prolina	PRO/SER	PRO/CYS	PRO/TRE	PRO/ASG	PRO/GLN	PRO/ASP	PRO/GLU	PRO/LYS	PRO/ARG	PRO/HIS
Fenilalanina	PHE/SER	PHE/CYS	PHE/TRE	PHE/ASG	PHE/GLN	PHE/ASP	PHE/GLU	PHE/LYS	PHE/ARG	PHE/HIS
Tirosina	TRY/SER	TRY/CYS	TRY/TRE	TRY/ASG	TRY/GLN	TRY/ASP	TRY/GLU	TRY/LYS	TRY/ARG	TRY/HIS
Triptófano	TRP/SER	TRP/CYS	TRP/TRE	TRP/ASG	TRP/GLN	TRP/ASP	TRP/GLU	TRP/LYS	TRP/ARG	TRP/HIS
Serina	SER/SER	SER/CYS	SER/TRE	SER/ASG	SER/GLN	SER/ASP	SER/GLU	SER/LYS	SER/ARG	SER/HIS
Cisteína	CYS/SER	CYS/CYS	CYS/TRE	CYS/ASG	CYS/GLN	CYS/ASP	CYS/GLU	CYS/LYS	CYS/ARG	CYS/HIS
Treonina	TRE/SER	TRE/CYS	TRE/TRE	TRE/ASG	TRE/GLN	TRE/ASP	TRE/GLU	TRE/LYS	TRE/ARG	TRE/HIS
Asparagina	ASG/SER	ASG/CYS	ASG/TRE	ASG/ASG	ASG/GLN	ASG/ASP	ASG/GLU	ASG/LYS	ASG/ARG	ASG/HIS
Glutamina	GLN/SER	GLN/CYS	GLN/TRE	GLN/ASG	GLN/GLN	GLN/ASP	GLN/GLU	GLN/LYS	GLN/ARG	GLN/HIS
Ac Aspártico	ASP/SER	ASP/CYS	ASP/TRE	ASP/ASG	ASP/GLN	ASP/ASP	ASP/GLU	ASP/LYS	ASP/ARG	ASP/HIS
Ac Glutámico	GLU/SER	GLU/CYS	GLU/TRE	GLU/ASG	GLU/GLN	GLU/ASP	GLU/GLU	GLU/LYS	GLU/ARG	GLU/HIS
Lisina	LYS/SER	LYS/CYS	LYS/TRE	LYS/ASG	LYS/GLN	LYS/ASP	LYS/GLU	LYS/LYS	LYS/ARG	LYS/HIS
Arginina	ARG/SER	ARG/CYS	ARG/TRE	ARG/ASG	ARG/GLN	ARG/ASP	ARG/GLU	ARG/LYS	ARG/ARG	ARG/HIS
Histidina	HIS/SER	HIS/CYS	HIS/TRE	HIS/ASG	HIS/GLN	HIS/ASP	HIS/GLU	HIS/LYS	HIS/ARG	HIS/HIS

Figura 12. Matriz de combinación de aminoácidos. La matriz permitió conocer las posibles combinaciones para los sitios 76 y 104 correspondientes a las cisteínas que conforman el enlace disulfuro, en color azul se muestran aa neutros no polares, en color verde los aa neutros aromáticos, en rosa los aa neutros polares, en naranja los aa ácidos y en verde claro los aa básicos.

Estas 400 combinaciones resultantes de las mutaciones en las cisteínas 76 y 104 son un número muy grande para poder realizar dinámica molecular, por lo que se descartó realizar mutaciones en ambas posiciones y se decidió solo cambiar una de las cisteínas (76) por dos aminoácidos diferentes. Para elegir los aminoácidos que podrían sustituirse se realizó un BLASTp con Tv-PSP1 en el servidor ExPASy para observar que aminoácidos se encuentran presentes en la posición 76 de proteínas homólogas a TvPSP-1.

En el alineamiento (Fig. 13) se observan los aminoácidos presentes en la posición 76 y 104 de proteínas homólogas de diferentes organismos, en la posición de interés se observa al aminoácido Valina mientras que en la posición 104 existe una Cisteína. El objetivo de tener 2 mutantes que no presenten enlaces disulfuro fue analizar la estructura de la proteína mediante dinámica molecular. Para ello, se seleccionó al aminoácido Valina y en la otra mutante se seleccionó al aminoácido Fenilalanina por

el tamaño del aminoácido, teniendo en cuenta lo reportado en la literatura asumiendo la probabilidad de que fuera capaz de generar un movimiento diferente en esa sección en comparación con un aminoácido pequeño.

la finalidad de conocer los aminoácidos diferenciales entre las mismas (Fig. 14), lo anterior como propuesta de utilizar a Tv-PSP3 como una potencial proteína mutante. Los resultados mostraron 56 aminoácidos diferenciales entre Tv-PSP1 y Tv-PSP3.

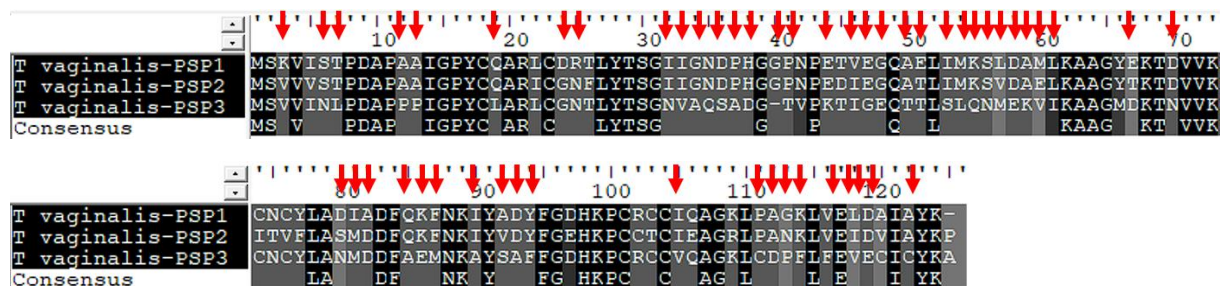


Figura 14. Alineamiento de 3 proteínas Tv-PSP presentes en *Trichomonas vaginalis*. Con flechas rojas se muestran los aminoácidos diferenciales entre Tv-PSP1, Tv-PSP2 y Tv-PSP3

También se obtuvo el porcentaje de identidad entre Tv-PSP1 – Tv-PSP2 y entre Tv-PSP1 - Tv-PS3, con la finalidad de conocer cuales aminoácido son diferenciales. El porcentaje de identidad entre Tv-PSP1 y Tv-PSP3 fue del 77%, para Tv-PSP1 y Tv-PSP3 fue de 55% (Fig. 15).

A

T vaginalis-PSP2

Sequence ID: Query_36538 Length: 125 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 124 [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
202 bits(515)	1e-73	Compositional matrix adjust.	96/124(77%)	106/124(85%)	0/124(0%)

B

T vaginalis-PSP3

Sequence ID: Query_36539 Length: 124 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 123 [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
140 bits(353)	5e-49	Compositional matrix adjust.	68/124(55%)	89/124(71%)	1/124(0%)

Figura 15. Alineamiento de proteínas, porcentaje de identidad: Tv-PSP1, Tv-PSP2 y Tv-PSP3. A) Se muestra el porcentaje de identidad entre las proteínas Tv-PS1 y Tv-PSP2 (77%), B) Se muestra el porcentaje de identidad entre las proteínas Tv-PSP1 y Tv-PSP3(55%).

A continuación se realizó la dinámica molecular de las dos mutantes C76V, C76F y de la proteína Tv-PSP1 *WT* siguiendo la metodología mencionada anteriormente, obteniendo los siguientes resultados:

En primer lugar, se muestra el radio de giro correspondiente de cada uno de los monómeros de la proteína Tv-PSP1 *WT* a través de la técnica de *all atoms* (Fig. 16), en donde se muestra que el monómero 1 Y 3 mantienen un fluctuación pequeña en comparación con el monómero 2 a lo largo de los 1,000 ns.

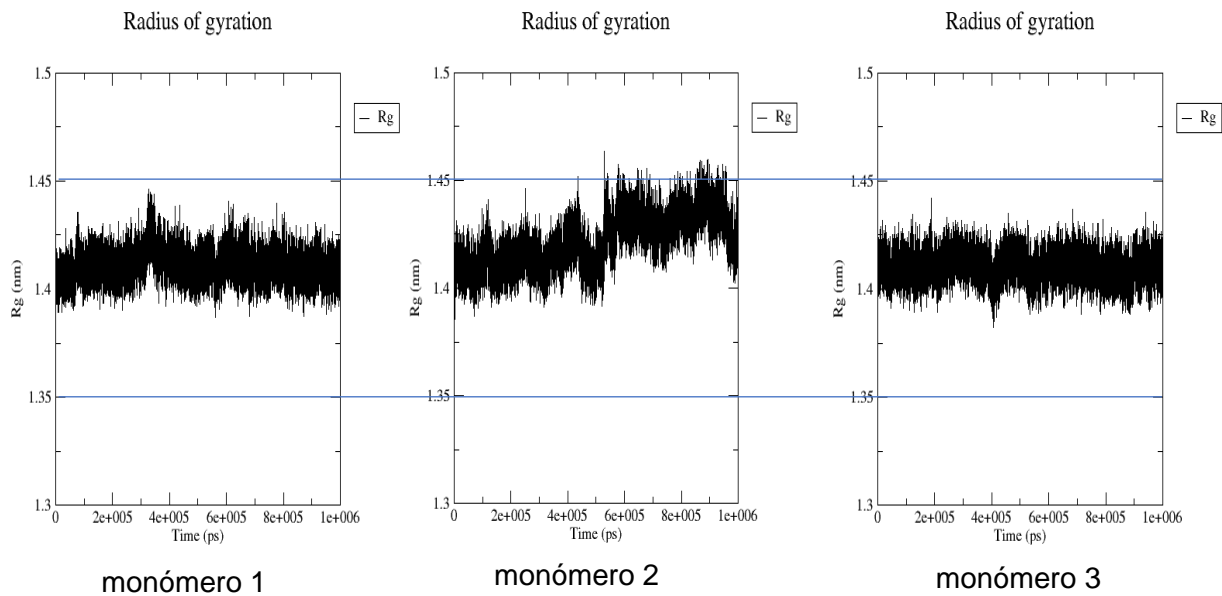


Figura 16. Radio de giro por monómero de la proteína *WT*. Se observan fluctuaciones en cada monómero a lo largo de 1000 ns.

Posteriormente se realizó el análisis de la trayectoria por RMSD de la mutante con Fenilalanina (C76F), en donde se observó una fluctuación en los tres monómeros (Fig. 17), en uno de ellos es menos marcada. Ninguno de ellos fluctúa mas allá de los 4Å.

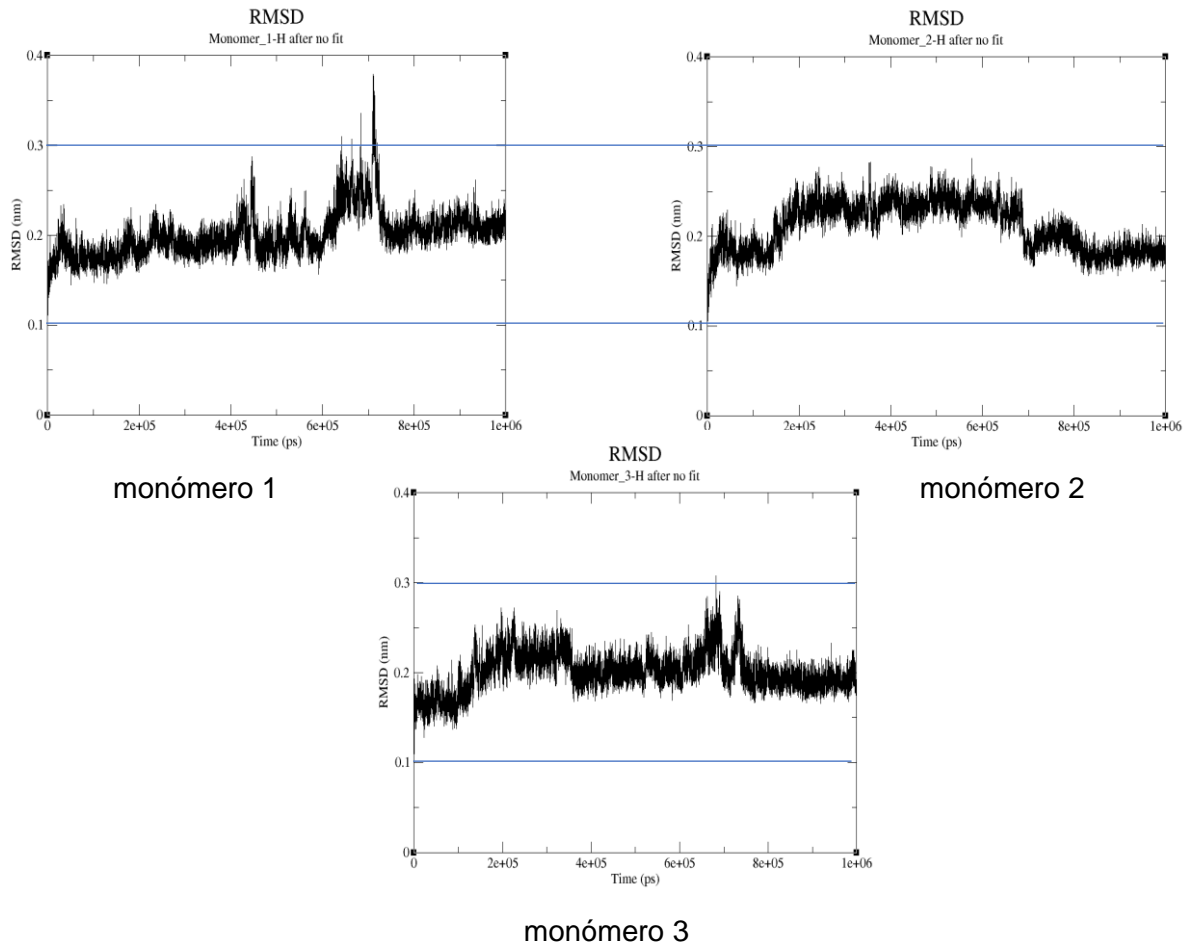


Figura 17. RMSD por monómero de la proteína Tv-PSP1 C76F. Existe un movimiento marcado en el monómero 1 después de los 600 ns que supera los 3Å.

Se analizó la misma trayectoria (C76F) mediante el radio de giro (Fig. 18), se observa que no hay un cambio grande entre los 3 monómeros. Las fluctuaciones se mantienen entre los 2-3Å.

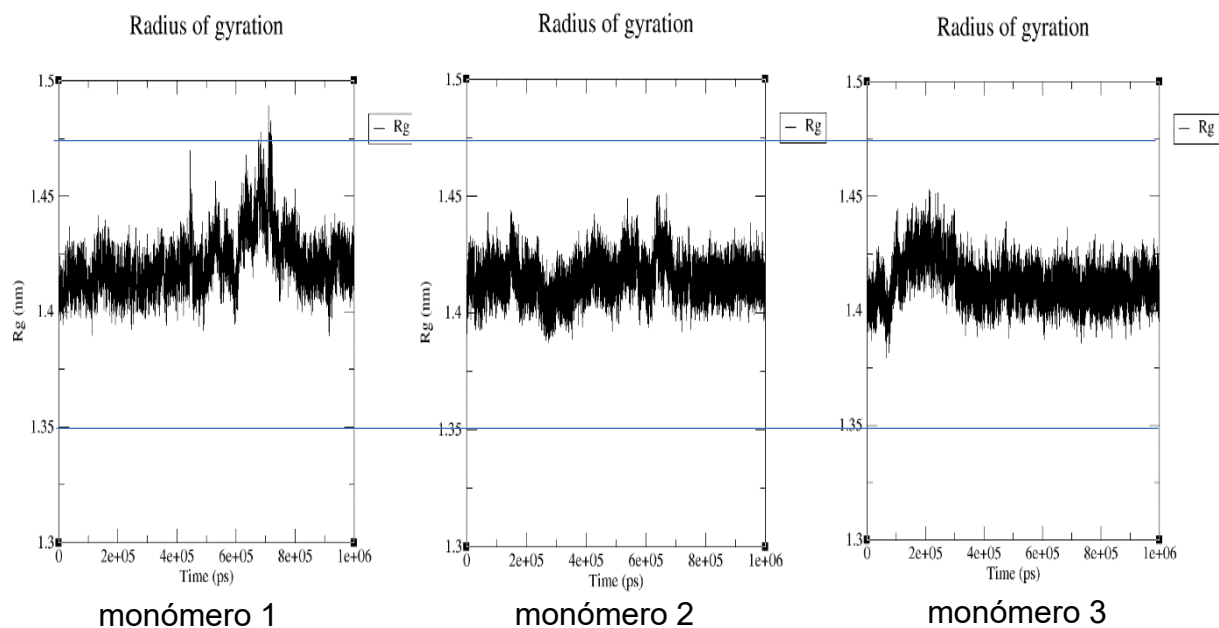


Figura 18. Radio de giro por monómero de la proteína mutante Tv-PSP1 C76F.

Posteriormente se analizó la trayectoria correspondiente a la mutante C76V (Fig. 19), para este caso se observa que dos monómeros poseen mayor fluctuación después de los 600 ns, sin embargo, el movimiento se mantiene en los monómeros 1 y 2 y no va más allá de los 4 Å, para el caso del monómero 3 se observa que en ocasiones sobrepasa los 4 y llega casi hasta los 5 Å.

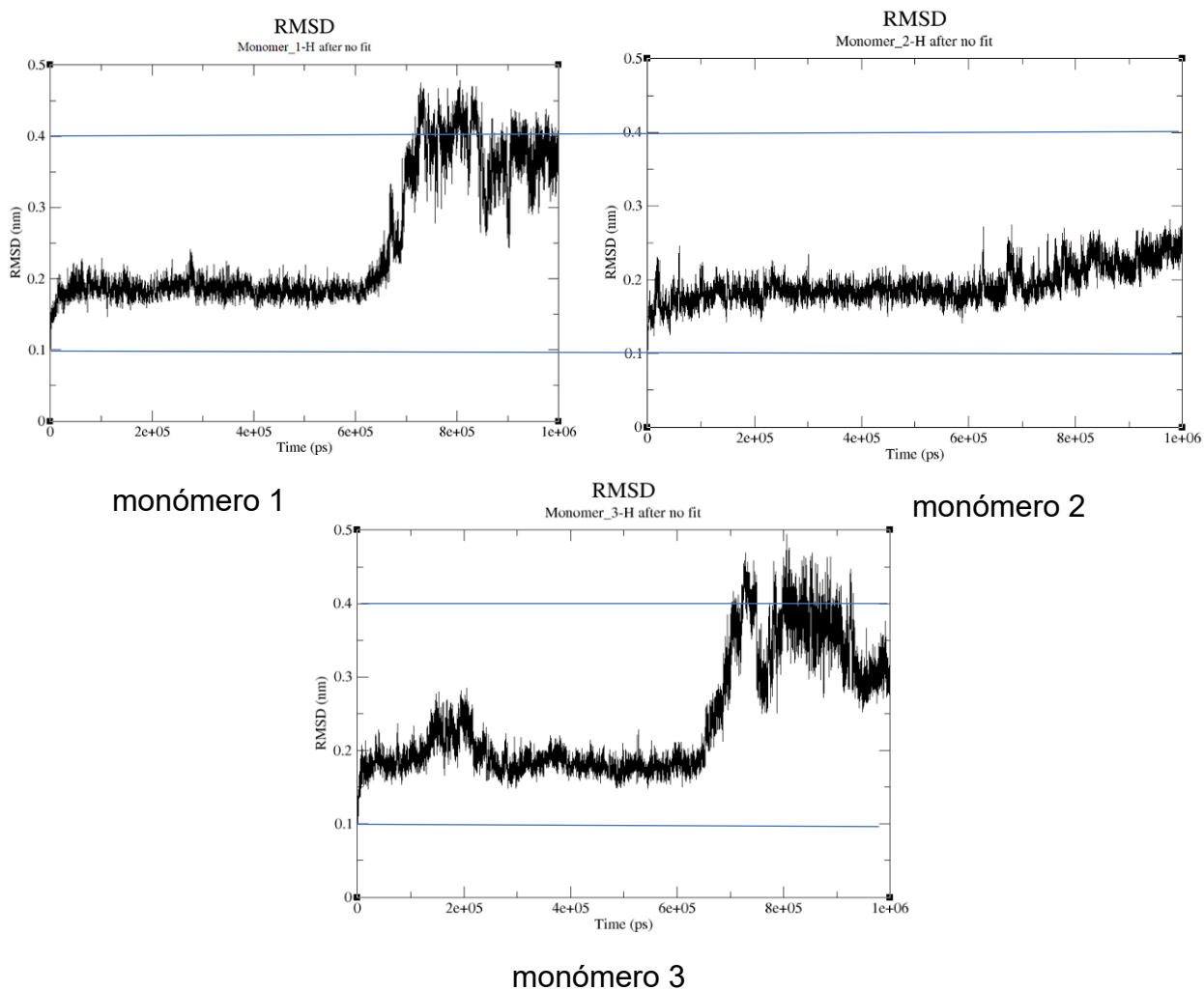


Figura 19. RMSD por monómero de la proteína mutante Tv-PSP1 C76V.

Se analizó también la trayectoria de Tv-PSP1 C76V mediante el Radio de giro (Fig. 20). Las gráficas muestran que los monómeros 1 y 3 tienen mayor movimiento en comparación con el monómero 2, ambos monómeros se mantienen estables hasta los 600 ns, posteriormente su movimiento aumenta.

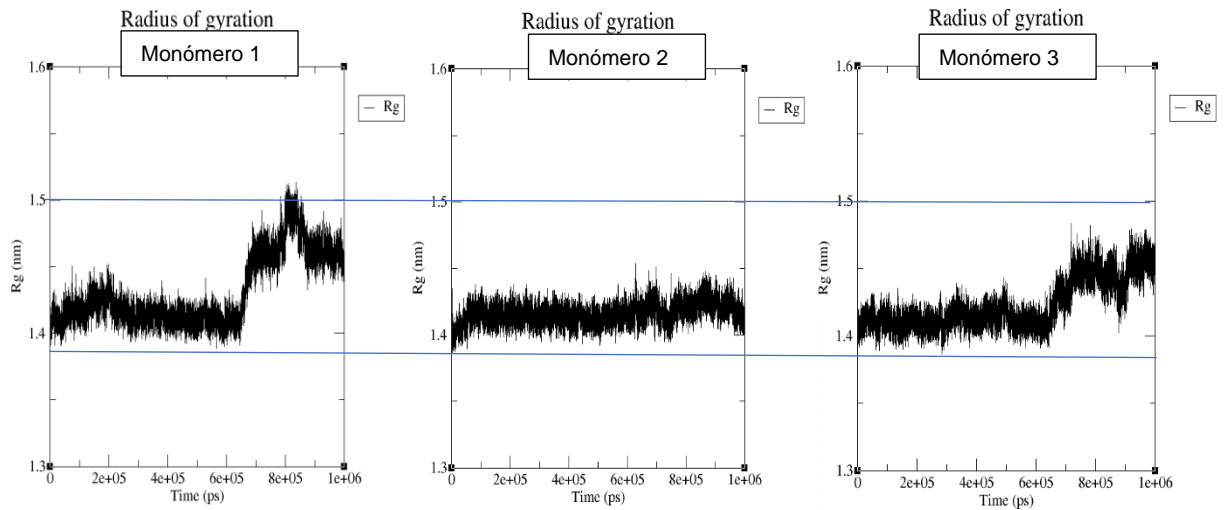


Figura 20. Radio de giro por monómero de la proteína mutante Tv-PSP1 C76V.

Posteriormente se procedió a observar la trayectoria de los 3 monómeros (proteína homotrimérica) mediante radio de giro (Fig. 21), se observa que la proteína *wild type* y la mutante Tv-PSP1 C76F mantienen un radio de giro entre 1.92 y 1.98 nm, sin embargo, para el caso de la mutante Tv-PSP1 C76V se observa que sobrepasa los 1.98 nm después de los 600 ns, lo anterior es importante debido a que la mutante con un aminoácido pequeño (Valina) tiene un movimiento mayor en comparación con la otra mutante (Fenilalanina), con base en esto, la mutante con Valina fue seleccionada como candidata para producirla de manera recombinante.

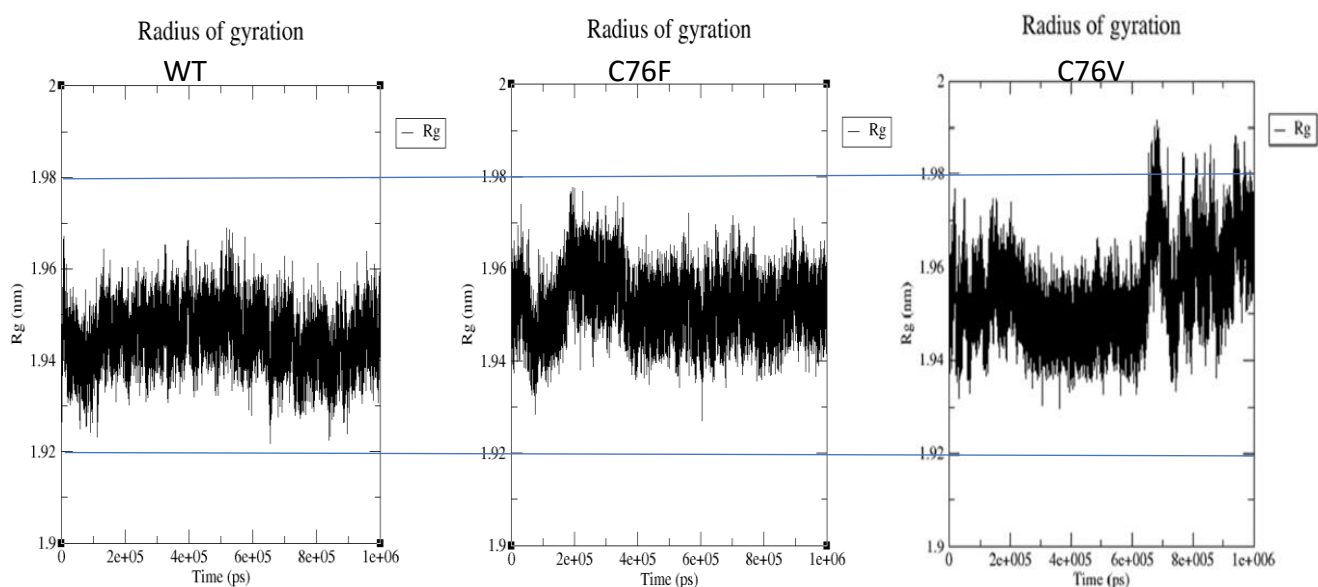


Figura 21. Radio de giro de las proteínas (homotrímtero) Tv-PSP1 WT, Tv-PSP1 C76F y Tv-PSP1 C76V.

También se analizaron las trayectorias de las 3 proteínas mediante RMSD (Fig. 22), en donde se observa que la proteína *wild type* y la mutante C76F se mueven entre 1Å y 2Å, mientras que en la mutante C76V se observa que en momentos (antes de los 600 ns) se mantiene estable y después de los 600ns comienza a subir el RMSD llegando en ocasiones a superar los 4Å, la información anteriormente mencionada tanto para los monómeros como para la proteína estructuralmente homotrmérica nos permitió proponer a la mutante Tv-PSP1 C76V para obtenerla experimentalmente.

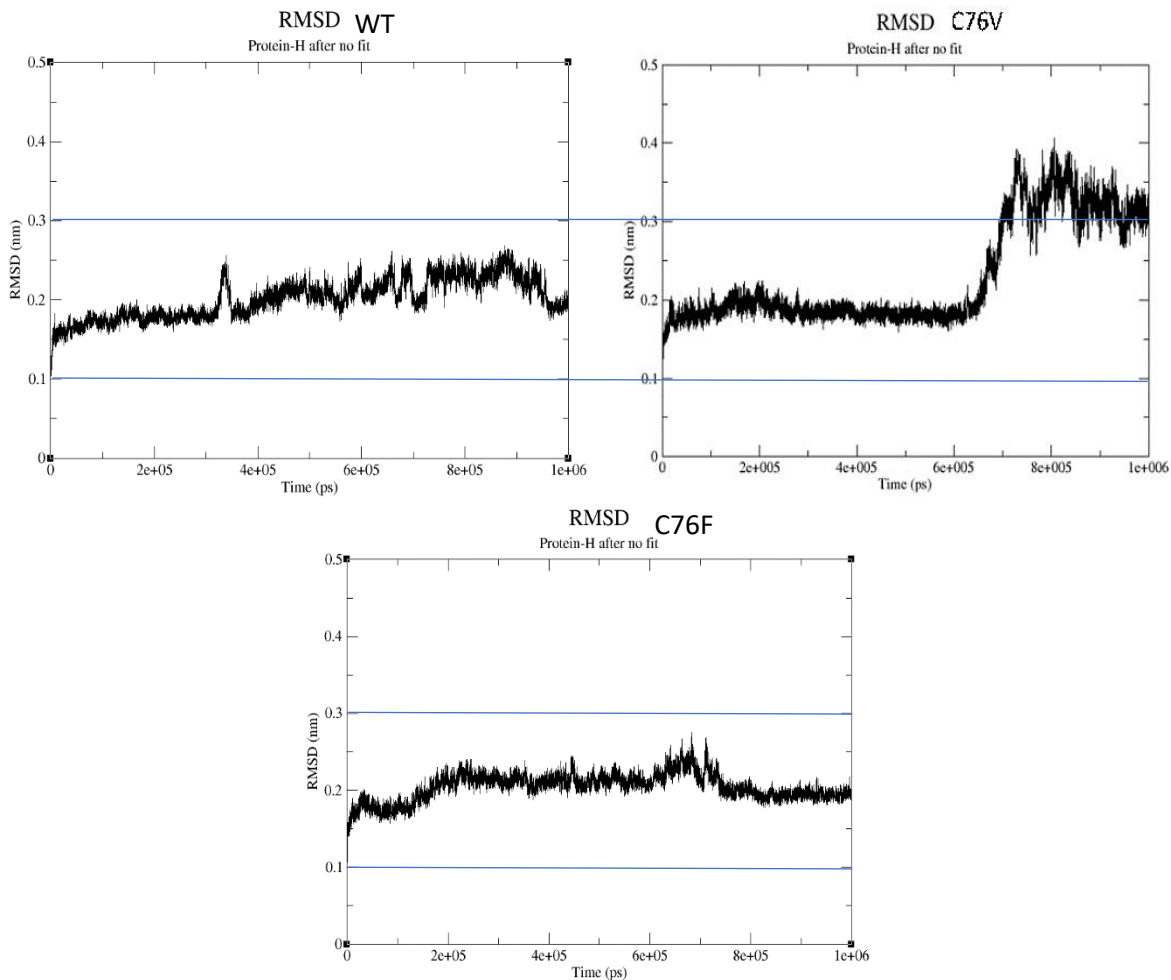


Figura 22. RMSD de las proteínas (homotrímero) Tv-PSP1 WT, Tv-PSP1 C76F y Tv-PSP1 C76V.

La trayectoria de las dinámicas moleculares correspondientes a Tv-PSP1, C76V y C76F vista con el software *VMD*, mostró un asa (*loop*) en la mutante C76V que presenta mayor movimiento en comparación con la estructura de las otras dos proteínas (Fig. 23).

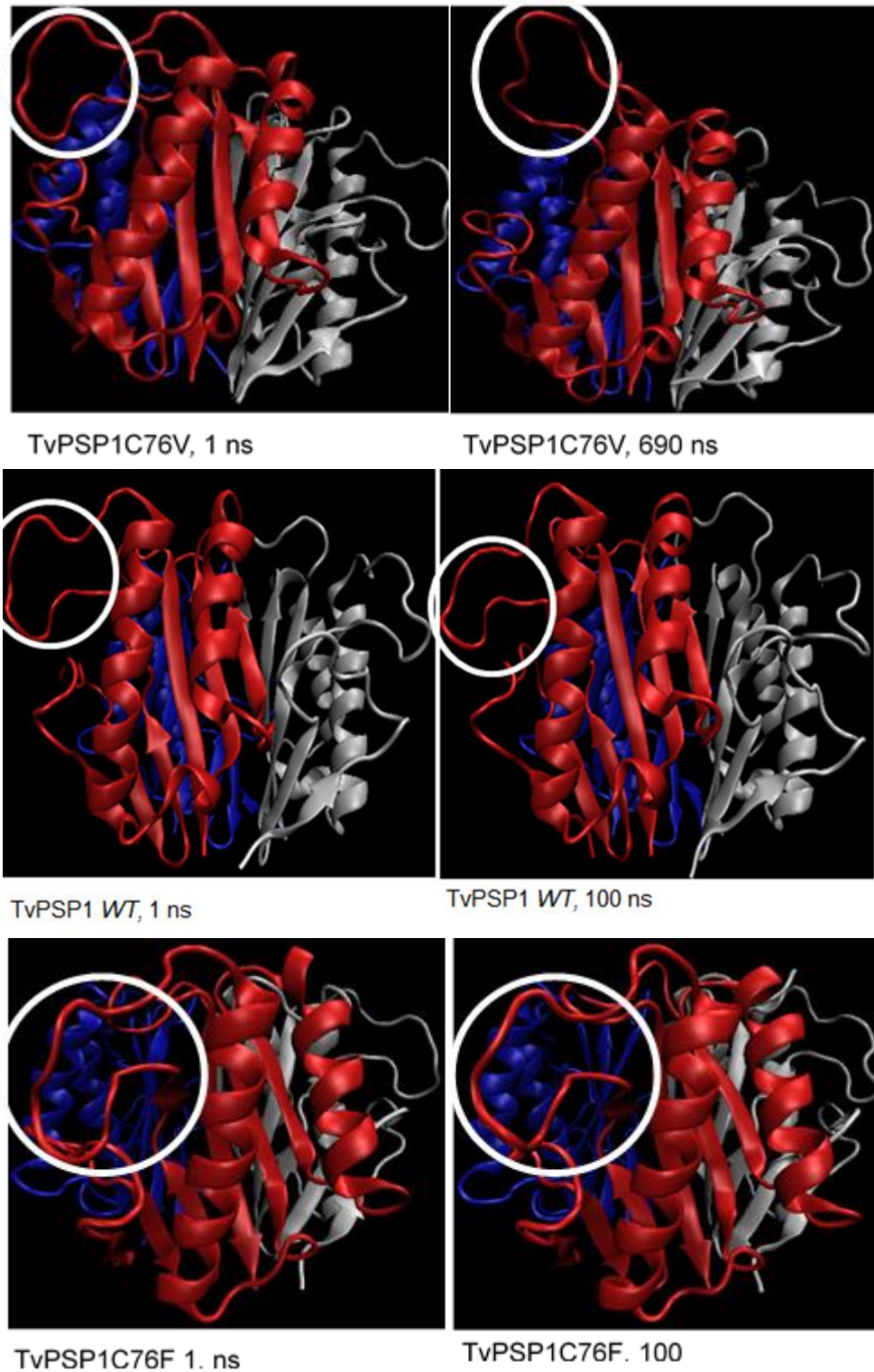


Figura 23. Estructura tridimensional de Tv-PSP1, Tv-PSP2 y Tv-PSP3 en diferentes tiempos. Estructura animada obtenida en el software *VMD*.

8.2 Obtención de rTv-PSP1-His WT (con enlace S-S y sin enlace S/S).

Los resultados de dinámica molecular permitieron observar que existe un movimiento diferente en las mutantes cuando no existe la formación de los enlaces disulfuro, por lo que se continuó con la obtención de la proteína recombinante WT y también de la preteína sin la formación de los enlaces disulfuro. Después de la purificación del DNA genómico de *T. vaginalis* y de la purificación del vector pET28 a (+) se corrió un gel de agarosa al 1% teñido con *GelRed* (Fig. 24).

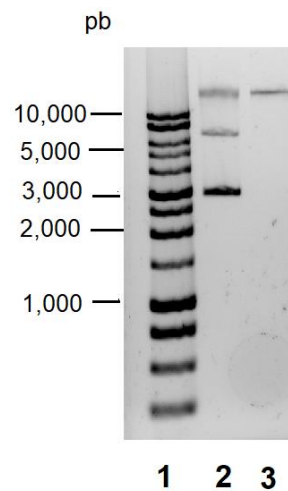


Figura 24. DNA plasmídico (pET28 a +) y DNA genómico de *T. vaginalis* analizado en gel de agarosa al 1% teñido con *GelRed*. El carril 1 muestra al marcador de tamaño (1kb), en el carril 2 se puede observar al vector pET28 a (+) purificado, en el carril 3 se observa el DNA genómico de *T. vaginalis*.

Posteriormente, se procedió a realizar la PCR punto final con los oligonucleótidos y programa mencionados anteriormente utilizando como templado el DNA genómico de *T. vaginalis*. El producto de PCR fue un amplicón de 391 pb correspondiente a Tv-PSP1 (Fig. 25) visualizado en un gel de agarosa 1% teñido con *GelRed*.

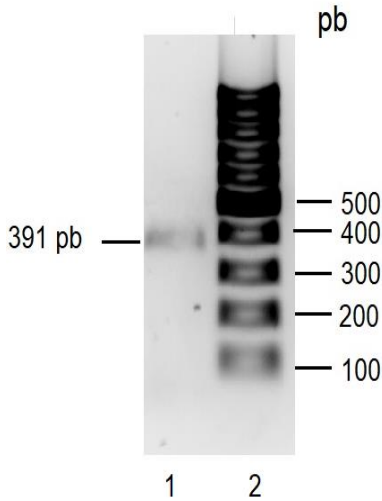


Figura 25. Inserto correspondiente a tv-psp1 obtenido por PCR visualizado en gel de agarosa al 1% teñido con *GelRed*. El carril 1 muestra el producto de PCR correspondiente al gene de tvpsp-1 (391 pb), en el carril 2 se muestra al marcador de tamaño de 100 pb.

El amplicón fue utilizado como inserto en la reacción de ligación con el vector pET28 a (+) siguiendo la metodología descrita anteriormente (previamente restringidos con las enzimas *BamHI* y *XhoI*). Después de la ligación, el plásmido fue utilizado para transformar bacterias *E. coli* de la cepa BL21, las cuales fueron colocadas en placas de agar con antibiótico y se colocaron en incubación durante 16 horas, el experimento se realizó por duplicado. En las cajas Petri correspondientes a bacterias transformadas con el plásmido recombinante se observó el crecimiento de algunas bacterias, en el control negativo correspondientes a bacterias con el mismo tratamiento, pero sin DNA plasmídico no se observó crecimiento alguno.

Las bacterias fueron crecidas en medio LB líquido con antibiótico, posteriormente se purificó el plásmido y se analizó en un gel de agarosa al 1%. Las colonias que crecieron fueron caracterizadas mediante dos métodos: PCR y doble digestión. Para la doble restricción del plásmido se utilizaron las enzimas *BamHI* y *XhoI*. El producto se corrió en un gel de agarosa al 1%. La liberación del inserto sólo se observó en 2/6 clonas, el tamaño de las bandas se encontró entre 400 y 500 pb (Fig. 26B).

A partir del DNA plasmídico se realizó PCR punto final con los oligonucleótidos correspondientes y los productos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con *GelRed*, se observó la presencia de una banda muy cercana a los 400 pb (Fig. 26 A).

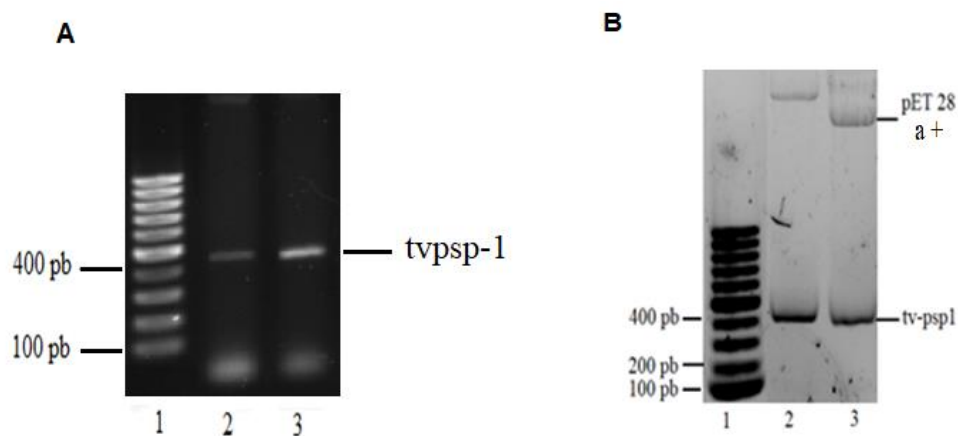


Figura 26. Plásmido recombinante de Tv-PSP1 visualizado en gel de agarosa al 1% teñido con *GelRed*. A) Caracterización por PCR, el carril 1 muestra al marcador de tamaño (100pb), los carriles 2 y 3 muestran el amplicón productor de PCR de algunas colonias analizadas. B) Caracterización por restricción, el carril 1 muestra al marcador de tamaño (100pb), los carriles 2 y 3 muestran al DNAp liberó el inserto correspondiente a 2 colonias, con un tamaño próximo a los 400 pb (391pb).

Después de caracterizar los plásmidos mediante doble restricción y PCR punto final como se mencionó anteriormente, se procedió a realizar PCR para obtener la secuencia a partir del producto de PCR. Una vez obtenida la secuencia se procedió a analizar el electroferograma (Fig. 27) y a realizar un BLASTn en el servidor NCBI, encontrado un 100% de identidad entre la secuencia obtenida y el gen que codifica para la proteína Tv-PSP1 (Fig. 28) reportada con anterioridad (GenBank: JQ406681.1).

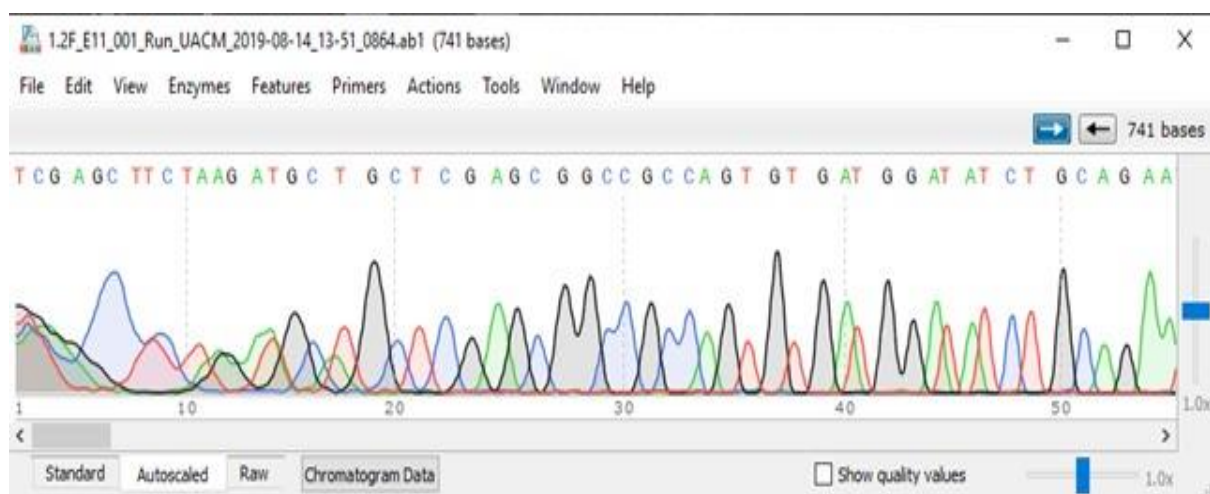


Figura 27. Electroferograma correspondiente al DNA plasmídico (pET 28 a +, con el inserto del gen tv-psp1)

La secuencia del plásmido se analizó encontrando que se estaba en marco de lectura lo anterior se realizó mediante el uso de la herramienta *Translate* del servidor ExPASy.

El DNA plasmídico de las colonias analizadas se utilizó para transformar bacterias de la cepa Rosetta gami. Las bacterias fueron colocadas en placas de agar LB con antibiótico, de las colonias que crecieron solo se utilizó una y se colocó en condiciones de cultivo en medio LB líquido, posteriormente se tomó una alícuota para preparar con glicerol (50% glicerol, 50% H₂O v/v), posteriormente se colocó un preinóculo tanto de la cepa BL 21 como de la cepa Rosetta gami y se realizó la inducción de los plásmidos siguiendo el protocolo descrito de la sección materiales y métodos.

Trichomonas vaginalis putative translation initiation inhibitor mRNA, complete cds

Sequence ID: [JQ406681.1](#) Length: 375 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 375 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
693 bits(375)	0.0	375/375(100%)	0/375(0%)	Plus/Plus
Query 73	ATGTCTAAAGTCATCAGCACACCAGACGCTCCAGCAGCCATCGGCCATACTGCCAGGCT	132		
Sbjct 1	ATGTCTAAAGTCATCAGCACACCAGACGCTCCAGCAGCCATCGGCCATACTGCCAGGCT	60		
Query 133	CGTCTTTGCGATCGCACACTCTACACATCCGGCATCATCGGAAACGACCCACACGGCGGA	192		
Sbjct 61	CGTCTTTGCGATCGCACACTCTACACATCCGGCATCATCGGAAACGACCCACACGGCGGA	120		
Query 193	CCAAACCCGGAAACAGTCGAAGGCCAGGCTGAATTGATCATGAAGTCCCTCGACGCCATG	252		
Sbjct 121	CCAAACCCGGAAACAGTCGAAGGCCAGGCTGAATTGATCATGAAGTCCCTCGACGCCATG	180		
Query 253	CTCAAGGCTGCTGGCTACGAAAAGACAGATGTTGTCAAGTGCAACTGCTACCTTGCTGAT	312		
Sbjct 181	CTCAAGGCTGCTGGCTACGAAAAGACAGATGTTGTCAAGTGCAACTGCTACCTTGCTGAT	240		
Query 313	ATCGCTGACTTCAGAAAGTTCAACAAGATCTACGCTGACTACTTCGGCGACCACAAGCCA	372		
Sbjct 241	ATCGCTGACTTCAGAAAGTTCAACAAGATCTACGCTGACTACTTCGGCGACCACAAGCCA	300		
Query 373	TGCCGCTGCTGCATCCAGGCTGGCAAGCTCCAGCTGGCAAGCTTGTGCAACTTGATGCC	432		
Sbjct 301	TGCCGCTGCTGCATCCAGGCTGGCAAGCTCCAGCTGGCAAGCTTGTGCAACTTGATGCC	360		
Query 433	ATCGCTTACAAGTAA	447		
Sbjct 361	ATCGCTTACAAGTAA	375		

Figura 28. BLASTn, secuencia nucleotídica del gen *tv-psp1* obtenido comparada con la reportada. Se observa un 100 de identidad entre la secuencia obtenida y la secuencia reportada.

Las proteínas expresadas tanto en Rosetta gami como en BL21 fueron purificadas mediante FPLC en el equipo AKTA Prime Plus como se describió antes, y se realizó electroforesis SDS-PAGE para observar la presencia de proteínas, posteriormente a través de un gel en espejo que se transfirió a nitrocelulosa se realizó un Western blot con los anticuerpos α -HIS-TAG y α -Tv-PSP1. La proteína fue identificada con ambos anticuerpos (Fig. 29), cercana a los 25 kDa, correspondiente a la forma dimérica de la proteína, sin embargo, también se logró detectar la forma monomérica (datos no mostrados) con ambos anticuerpos.

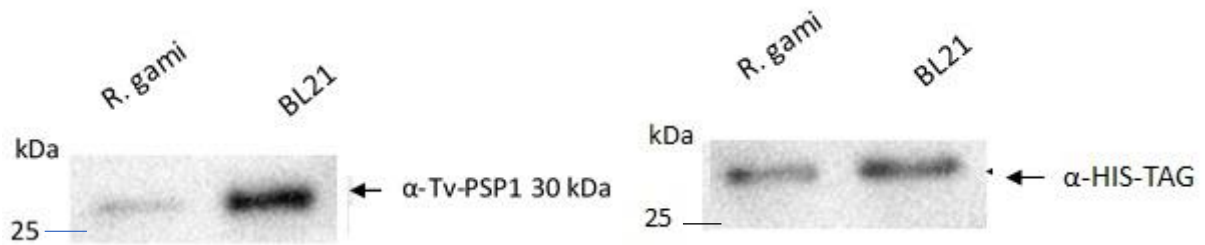


Figura 29. Western blot de Tv-PSP1 purificada de dos cepas de *E. coli*. A) anticuerpo policlonal α -Tv-PSP1, proteína purificada por FPLC a partir de bacterias de la cepa Rosetta gami y BL21, B) Anticuerpo policlonal α -HIS-TAG.

8.3. Análisis funcional de rTv-PSP1-His WT con enlace S-S, en presencia y ausencia de cloración)

La finalidad de tener la proteína Tv-PSP1 en dos cepas diferentes de *E. coli* fue que al purificarla se pudiera tener dos proteínas diferentes; una con presencia de enlaces disulfuro S-S (Rosetta gami) y otra sin los enlaces disulfuro formados S/S (BL21). Una vez teniendo comprobada la presencia de la proteína Tv-PSP1 tanto en Rosetta gami, así como en BL21 mediante *WB*, se procedió a realizar la purificación de RNA total de *Trichomonas vaginalis* (Fig. 30), con la finalidad de poder realizar los ensayos funcionales.

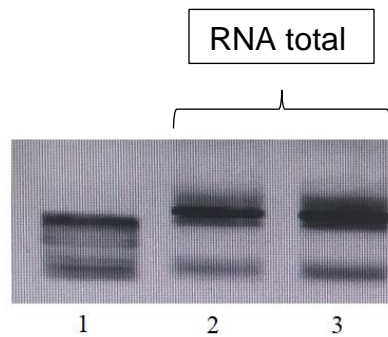


Figura 30. RNA total de *T. vaginalis* analizado en gel de agarosa al 1% teñido con *GelRed*. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño, los carriles 2 y 3 corresponden a RNA total purificado mediante la técnica de TRIZOL.

El objetivo de clorar la proteína fue conocer si la modificación postraducciona podría estar involucrada en la actividad funcional como ribonucleasa de Tv-PSP1, por lo que se procedió a realizar el ensayo funcional en presencia de la proteína con RNA total de *T. vaginalis*. El ensayo funcional consistió en primer lugar, en clorar la proteína purificada de la cepa R. gami y ponerla en contacto con RNA total del parásito a temperatura ambiente durante 2 horas. Se observó una degradación parcial en el caso de la proteína sin cloración, no así cuando el RNA fue incubado en presencia de la proteína clorada (Fig. 31). El resultado anterior puede ser debido a las concentraciones de cloro en la disolución donde se colocó la proteína después de ser purificada y eliminar el HOCl, es probable también que exista una concentración de cloro en la cual la proteína pudiera llevar a cabo su función catalítica.

Es importante mencionar que la modificación postraducciona ocasionada por la cloración es capaz de alterar la cadena principal y lateral de diversos aminoácidos, entre ellos las cisteínas (Gray, Wholey, & Jakob, 2013), por lo que al eliminar la presencia de cloro en el medio donde se encuentra la proteína, este ya no podría llevar a cabo modificación alguna en la proteína.

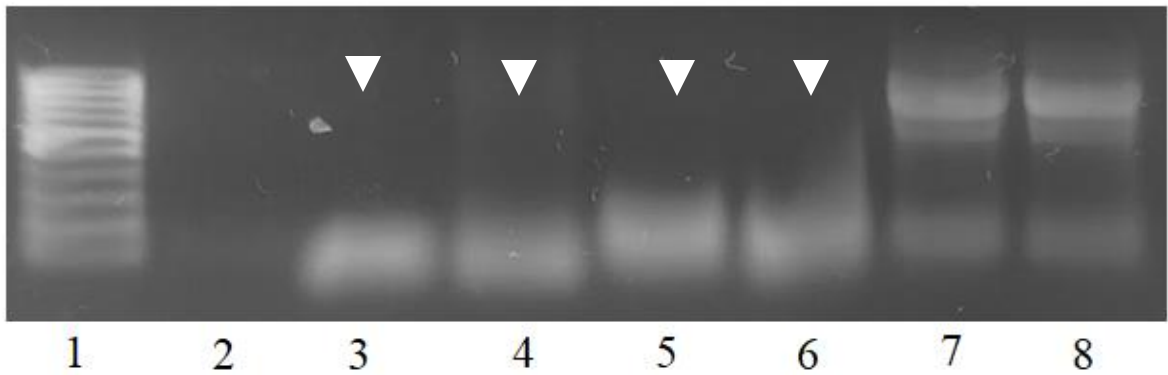


Figura 31. Ensayo funcional de Tv-PSP1. Carril 1: marcador de tamaño, carril 2: RNA incubado con RNasa A, carriles 3, 4, 5 y 6 RNA incubado en presencia de Tv-PSP1 sin clorar de Rosetta gami (cabeza de flecha), carril 7 RNA en presencia de Tv-PSP1 clorada con enlaces disulfuro formados, carril 8 RNA en presencia de Tv-PSP1 clorada sin enlaces disulfuro formados.

9. Discusión:

Trichomonas vaginalis es un parásito de importancia en salud, y en su genoma posee tres genes que codifican para tres proteínas PSP, se sugiere que cada una de ellas podría realizar funciones diferentes dependiendo del microambiente en donde se expresen, el parásito ha pasado por distintos eventos de duplicación de genes y se cree que esto podría estar involucrado con la capacidad que tiene para adaptarse a distintos microambientes (Cui, *et al.*, 2010).

En diferentes estudios se han dado a conocer las funciones importantes de diversas proteínas que juegan papeles relevantes dentro de la patogenia de diversos microorganismos causantes de enfermedades que afectan al humano.

Tv-PSP1 podría tener una región intrínsecamente desordenada, concretamente hacia uno de los *loops* de uno de los monómeros (Villalobos-Osnay, *et al.*, 2018), este tipo de proteínas pueden realizar diversas funciones cuando adquieren conformaciones tridimensionales diferentes, en algunas plantas pueden incluso favorecer la sobrevivencia en ambientes extremos o con estrés hídrico (Cuevas-Velázquez & Covarrubias-Robles, 2011).

En otros parásitos se ha observado presencia de este tipo de proteínas, las cuales podrían estar involucradas en el proceso de infección e incluso en la evasión del sistema inmune del hospedero (Guy, *et al.*, 2015).

Los análisis de la trayectoria de la Tv-PSP1 *WT*, a través de Radio de Giro y RMSD permitieron observar que uno de los monómeros presenta un movimiento diferente en comparación con los otros dos a lo largo de 1,000ns.

Es relevante mencionar que el campo de fuerza influye mucho en la dinámica molecular, por lo que no se descarta que con otro campo de fuerza se pudieran observar resultados diferentes, sin embargo, el campo de fuerza utilizado en este trabajo (CHARMM36), se caracteriza por estar optimizado para funcionar con

proteínas plegadas o con regiones intrínsecamente desordenadas (Huang, *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos de la trayectoria correspondiente a la mutante C76F mostraron tener una fluctuación en el movimiento de los monómeros, parecido a lo que sucede con la proteína *WT*, sin embargo, con la mutante C76V ocurre algo diferente pues se incrementa el RMSD del trímero. Medir el RMSD global del modelo puede generar algunas dificultades debido a que la superposición a menudo se ve comprometida por un pequeño número de fragmentos (*loops*) significativamente desviados (Kufareva & Abagyan, 2012).

Cabe destacar que es probable que existan artefactos en cuanto al modelo tridimensional de la proteína, que estuvieran involucrados en el movimiento de algunas regiones durante la simulación de dinámica molecular, sin embargo, no se tomó en cuenta pero el campo de fuerza podría ayudar a estabilizar la proteína, sumado a los pasos de minimización de energía que fueron agregados.

La visualización de la estructura a lo largo de los 1,000 ns a través de *VMD* permitió observar que efectivamente existe un movimiento diferente en uno de los loops, esto podría estar involucrado en el incremento del RMSD global. Es importante mencionar que este loop se encuentra físicamente cercano tanto al enlace disulfuro S-S (C76-C104) como a la región que se ha propuesto podría reconocer al RNA (posible sitio catalítico), lo anterior permitiría hipotetizar que el loop podría llevar a cabo una función para el posible reconocimiento del RNA y/o posicionamiento adecuado en la región de reconocimiento.

La primera hipótesis del trabajo fue que los enlaces S-S presentes en cada uno de los monómeros estaban involucrados en la estabilidad estructural de Tv-PSP1, sin embargo, el homotrímero correspondiente a las dos mutantes no perdió estabilidad estructural aún cuando no poseían los enlaces disulfuro. Por lo que se descartó que los enlaces disulfuro estuvieran involucrados en el mantenimiento estructural de la proteína y se hipotetizó que podrían estar involucrados en una función biológica.

La dinámica molecular es una técnica muy poderosa y altamente precisa, pero los datos obtenidos siempre deben corroborarse con resultados experimentales para contrastar la información obtenida *in silico*.

Una vez obtenidos los resultados de dinámica molecular, se procedió a obtener la Tv-PSP1 *WT* con enlaces disulfuro formado y sin la presencia del mismo, lo anterior con la finalidad de verificar la posible acción funcional como endoribonucleasa de Tv-PSP1. Se clonó a *tv-psps1* en el vector de expresión pET28 a (+), posteriormente se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa Rosetta gami y de la cepa BL21, esta última no posee la capacidad de generar enlaces disulfuro en las proteínas que sintetiza.

La cepa Rosetta gami permite la formación de enlaces disulfuro y expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raramente utilizados en *E. coli* (MERCK, 2020), existen otras cepas disponibles para favorecer la formación de enlaces disulfuro como la cepa SHuffle, sin embargo, se utilizó Rosetta gami debido a la disponibilidad de la misma en nuestro grupo de trabajo.

Como se mencionó anteriormente, la obtención de una proteína mutante a partir de sustitución de aminoácidos fue propuesto como un camino alternativo para el desarrollo del proyecto, teniendo en cuenta que la cepa BL21 no es capaz de favorecer la producción de enlaces disulfuro debido a que posee un ambiente poco favorable (reductor) en su citoplasma, fue utilizada a forma de “proteína sin enlaces disulfuro”.

Es importante mencionar que la proteína recombinante fue inmunodetectada con dos anticuerpos diferentes, como puede observarse en las imágenes colocadas en el apartado de resultados, la proteína detectada con el anticuerpo α -Histidinas detecta a la proteína Tv-PSP1 en un peso mayor en comparación con el anticuerpo α -Tv-PSP1, lo anterior se explica debido a que el anticuerpo que detecta a las Histidinas podría estar reconociendo el aumento de peso que las mismas proporcionan a Tv-PSP1, no así cuando se utiliza al anticuerpo para Tv-PSP1.

Se ha descrito previamente que Tv-PSP1 podría funcionar como ribonucleasa debido a que es capaz de reconocer el ARN mensajero del gen que codifica para la proteína TV-CP39. Estructuralmente este RNAm posee un plegamiento de tallo y burbuja (ERE), localizado en el extremo 3' UTR del ARNm, es importante mencionar que existe otro elemento estructuralmente similar denominado IRE en *T. vaginalis* (Carvajal-Gamez, *et al.*, 2016), estos dos RNA son capaces de ser reconocidos por Tv-PSP1 (Villalobos-Osnaya, *et al.*, 2018). Lo anterior es importante debido a que Tv-CP39 participa en la citotoxicidad de *T. vaginalis*, por lo que Tv-PSP1 podría estar directamente involucrada en mecanismos importantes de patogénesis en el parásito.

Una modificación postraduccional de una proteína es la alteración química de su estructura primaria después de la traducción del RNAm. Estas modificaciones incluyen tanto la formación de enlaces cruzados covalentes de naturaleza intra o intermolecular (con un ligando/otra proteína) como la escisión de enlaces covalentes, incluida la ruptura de un enlace peptídico y la eliminación de grupos de tipos de aminoácidos únicos, cabe destacar que una proteína puede sufrir varias modificaciones durante su vida útil (Eisenhaber & Eisenhaber, 2010).

En múltiples estudios se ha observado que la cloración de proteínas puede cambiar su función, un ejemplo de cambio de función debido a esta modificación es la proteína YabJ de *Staphylococcus aureus*, después de ser clorada adquiere función como endoribonucleasa, cabe resaltar que la actividad es reversible mediante la adición de DTT (Kim, *et al.*, 2018), en la proteína Rid A de *E. coli* se ha observado que cambia defunción cuando es clorada, adquiriendo la función de chaperona, puesto que puede proteger otras proteínas modificadas por el mismo ácido hipocloroso (Müller, *et al.*, 2014).

Aquí, nos propusimos clorar la proteína Tv-PSP1 tanto con presencia como con ausencia de los enlaces disulfuro con la finalidad de conocer la probable función de la modificación postraduccional en la actividad funcional de Tv-PSP1.

El RNA total fue reconocido y degradado por la proteína TvPSP-1 clorada de *T. vaginalis*, purificada de la cepa Rosetta gami. Es relevante mencionar que se realizó un paso extra de purificación con la finalidad de eliminar el exceso de ácido hipocloroso, al realizar el ensayo duncional en ausencia de cloro se observó que Tv-PSP1 perdía la capacidad de degradación de RNA. Lo anterior permite proponer que la modificación postraduccionaI podría estar involucrada en la actividad funcional como endorribonucleasa.

Los resultados mostrados en este trabajo son similares a lo reportado por (Villalobos-Osnay, *et al.*, 2018), pues también había reportado la actividad de ribonucleasa de Tv-PSP1, sin embargo, no se tomó en cuenta la posible acción del ácido hipocloroso para modificar la proteína.

La presencia de cloro en solución donde se encuentra la proteína parece ser importante para que pueda llevar a cabo la función como nucleasa, puesto que se ha reportado previamente que en otras proteínas de la familia L-PSP que la cloración juega un papel crucial para la función catalítica.

Experimentos adicionales son requeridos para poder comparar lo que sucede con la proteína clorada en ausencia de los enlaces disulfuro, estos experimentos no pudieron realizarse debido a la contingencia de salud pública causada por la pandemia del nuevo coronavirus SARS-CoV2. Por lo anterior, se propone como una perspectiva para este trabajo, sumado a la obtención de una proteína mutante por sustitución con Valina en la posición 76 (C76V).

10. Conclusiones

Mediante dinámica molecular se logró observar que Tv-PSP1 mutante C76V posee un mayor movimiento con respecto a la mutante C76F y con respecto a la proteína Tv-PSP1 *WT*.

La dinámica molecular muestra un movimiento diferente en un *loop* perteneciente a Tv-PSP1 con respecto a los otros dos monómeros, el cual podría estar involucrado en la actividad funcional de la proteína.

La cloración podría estar involucrada en la actividad funcional de la proteína, debido a que cuando Tv-PSP1 se encuentra en un ambiente mínimo de cloro no presenta actividad de ribonucleasa

CONCLUSION GENERAL:

Los enlaces disulfuro presentes en Tv-PSP1 *WT* no se encuentran involucrados en el mantenimiento de la estructura homotrimérica de Tv-PSP1, sin embargo, podrían estar involucrados en la función biológica.

Referencias

1. Bosshard , H., Marti , D., & Jelesarov , I. (2004). Protein stabilization by salt bridges: oncepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *Journal of Molecular Recognition* , 1–16.
2. Christopherson, M., Schmitz, G., & Downs , D. (2008). YjgF is required for isoleucine biosynthesis when Salmonella enterica is grown on pyruvate medium . *Journal of Bacteriology*, 3057-3062.
3. Sun , X., Butterworth , M., MacFarlane , M., Dubiel , W., Ciechanover, A., & Cohen , G. (2004). Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Molecular Cell*, 81-93.
4. Acun, B., Hardy, D., Kale, L., Li, K., Phillips, J., & Stone, J. (2018). Scalable Molecular Dynamics with NAMD on the Summit System. *IBM Journal of Research and Development*, 4:1–4:9.
5. Alberts, B., Johnson , A., Lewis , J., Walter, P., Raff, M., & Roberts, K. (2002). Protein Function. In J. A. Alberts B, *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.
6. Alder, B., & Wainwright, T. (1957). Phase Transition for a Hard Sphere System. *Journal of Chemistry Physics*, 1208-9.
7. Berman, H., Henrick, K., & Nakamura, H. (2003). Announcing the Worldwide Protein Data Bank. *Nature Structural & Molecular Biology* .
8. Chapman, A., Hampton, M., Senthilmohan, R., Winterbourn , C., & Kettle, A. (2002). Chlorination of Bacterial and Neutrophil Proteins during Phagocytosis and Killing of Staphylococcus aureus. *The Journal of Biological Chemistry*, 9757–9762.
9. Chong , L., Huang, S., Hu, C., Chen, Y., Chou, H., Chau, G., & Tsai, Y. (2008). Decreased Expression of UK114 Is Related to the Differentiation Status of

- Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 535-542.
10. Coleman , J., Green, E., & Gouaux, E. (2016). X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter. *Nature*, 334-9.
 11. Cuevas-Velázquez, C., & Covarrubias-Robles, A. (2011). Las proteínas desordenadas y su función: una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 97-105.
 12. Cui , J., Das , S., Smith , T., & Samuelson , J. (2010). Trichomonas transmembrane cyclases result from massive gene duplication and concomitant development of pseudogenes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, e782.
 13. Dunne , R., Dunn, L., Upcroft, P., O'Donoghue, P., & Upcroft, J. (2003). Drug Resistance in the Sexually Transmitted Protozoan Trichomonas Vaginalis. *Cell Research*, 239–249.
 14. Dutta, S., Young, J., Swaminathan, G., Matsuura, T., Henrick, K., Nakamura, H., & Berman, H. (2009). Data Deposition and Annotation at the Worldwide Protein Data Bank. *Molecular Biotechnology*, 1-13.
 15. Eisenhaber , B., & Eisenhaber, F. (2010). Prediction of Posttranslational Modification of Proteins. In O. Carugo, & F. Eisenhaber, *Data Mining Techniques for the Life Sciences* (pp. 365-84). Humana Press.
 16. Garduño-Jiménez, J. C. (2017). *Análisis teórico de la formación de puentes disulfuro vecinales*. Estado de México: Universidad Autónoma del Estado de México.
 17. Gray, M., Wholey, W., & Jakob, U. (2013). Bacterial Responses to Reactive Chlorine Species. *Annual Reviews Microbiology*, 141-60.
 18. Green , J., Kettle , A., & Winterbourn , C. (2014). Protein chlorination in neutrophil phagosomes and correlation with bacterial killing. *Free Radical Biology and Medicine*, 49-56.

19. Guy , A., Irani , V., MacRaild , C., Anders, R., Norton , R., Beeson , J., . . . Ramsland , P. (2015). Insights into the Immunological Properties of Intrinsically Disordered Malaria Proteins Using Proteome Scale Predictions. *PLoS One*, e0141729.
20. Hobbs, M., & Seña, A. (2013). Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sexually Transmitted Infections*, 434-8.
21. Hodge-Hanson , K., & Downs , D. (2017). Members of the Rid protein family have broad imine deaminase activity and can accelerate the *Pseudomonas aeruginosa* D-arginine dehydrogenase (DauA) reaction in vitro. *PLoS One*, e0185544.
22. Hollingsworth, S., & Dror, R. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 1129-1143.
23. Hospital, A., Goñi, J., Orozco, M., & Gelpi, J. (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and Application in Bioinformatics Chemistry*, 37–47.
24. Huang, J., Rauscher, S., Nawrocki, G., Ting, R., Feig, M., & Groot, B. (2017). CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nature Methods*, 71-73.
25. Jelesarov , I., & Karshikoff, A. (2009). Defining the role of salt bridges in protein stability. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 227-260). Humana Press.
26. Kanouchi , H., Matsumoto, M., Taga, M., Yamada , K., Oka , T., Toné , S., & Minatogawa , Y. (2005). Nuclear transfer of perchloric acid-soluble protein by endoplasmic reticulum stressors. *Protein Science*, 2344-2349.
27. Kim , J., Yoshikawa , H., & Shirahige, K. (2001). A member of the YER057c/yjgf/Uk114 family links isoleucine biosynthesis and intact mitochondria maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*, 507-517.
28. Kim, H., Kwon, A., & Lee, B. (2018). A novel chlorination-induced ribonuclease YabJ from *Staphylococcus aureus*. *Bioscience Reports*, BSR20180768.

29. Krieger, J., Jenny, C., Verdon, M., Springwater, R., Critchlow, C., & Holmes, K. (1993). Clinical manifestations of trichomoniasis in men. *Annals of Internal Medicine*, 844-9.
30. Kufareva, I., & Abagyan, R. (2012). Methods of protein structure comparison. *Methods in Molecular Biology*, 231–257.
31. Kumar, G., & Prabhakar, N. (2008). Post-translational modification of proteins during intermittent hypoxia. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 272-276.
32. Kumari, I., Sandhu, P., Ahmed, M., & Akhter, Y. (2017). Molecular Dynamics Simulations, Challenges and Opportunities: A Biologist's Prospective. *Current Protein & Peptide Science*, 1163-1179.
33. LANCAD. (2020, MARZO 30). LANCAD. Retrieved from LABORATORIO NACIONAL DE COMPUTO DE ALTO DESEMPEÑO: <http://www.lancad.mx/?p=59>
34. Lindahl, E. (2008). Molecular dynamics simulations. *Methods in Molecular Biology*, 3-23.
35. Liu, T., Wang, Y., Luo, X., Li, J., Reed, S., Xiao, H., . . . Schultz, P. (2016). Enhancing protein stability with extended disulfide bonds. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, 5910-5915.
36. Marianayagam, N., Fawzi, N., & Head-Gordon, T. (2004). Protein folding by distributed computing and the denatured state ensemble. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, 16684–89.
37. Marous, M., Huang, W., Rabkin, C., Hayes, R., Alderete, J., Rosner, B., . . . Sutcliffe, S. (2017). Trichomonas vaginalis infection and risk of prostate cancer: associations by disease aggressiveness and race/ethnicity in the PLCO Trial. *Cancer Causes & Control*, 889-898.
38. Matsumoto, M., Kanouchi, H., Suzuki, K., Kaneki, K., Kawasaki, Y., & Oka, T. (2003). Purification and Characterization of Perchloric Acid Soluble Protein From

- Rat Lung. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 255-262.
39. McCammon, J., Gelin, B., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, 585-90.
40. McClelland, R., Sangare, L., Hassan, W., Lavreys, L., Mandaliya, K., Kiarie, J., . . . Baeten, J. (2007). Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *Journal of Infection Disease*, 698–702.
41. Meites, E. (2013). Trichomoniasis: the "neglected" sexually transmitted disease. *Infectious Disease Clinics of North America*, 755-764.
42. Menezes, C., Frasson, A., & Tasca, T. (2016). Trichomoniasis - are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? *Microbial cell*, 404-419.
43. MERCK. (2020, April 25). *Rosetta-gami 2(DE3) Competent Cells - Novagen*. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/71351m?lang=es®ion=MX>
44. Minor, D. (2007). The neurobiologist's guide to structural biology: a primer on why macromolecular structure matters and how to evaluate structural data. *Neuron*, 511-33.
45. Morishita, R., Kawagoshi, A., Sawasaki, T., Madin, K., Ogasawara, T., Oka, T., & Endo, Y. (1999). Ribonuclease activity of rat liver perchloric acid-soluble protein, a potent inhibitor of protein synthesis. *Journal of Biology Chemistry*, 20688-20692.
46. Müller, A., Langklotz, S., Lupilova, N., Kuhlmann, K., Bandow, J., & Leichert, L. (2014). Activation of RidA chaperone function by N-chlorination. *Nature Communications*, 5804.

47. O'Donoghue , A., Bibo-Verdugo , B., Miyamoto , Y., Wang , S., Yang, J., Zuill , D., . . . Eckmann, L. (2019). 20S Proteasome as a Drug Target in *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, e00448-19.
48. Oka , T., Tsuji, H., Noda, C., Sakai, K., Hong, Y., Suzuki , I., . . . Natori, Y. (1995). Isolation and characterization of a novel perchloric acid-soluble protein inhibiting cell-free protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 30060-30067.
49. Olivares, L., & Garcia, L. (2004). Plegamiento de las proteínas: Un problema interdisciplinario. *Revista de la Sociedad Química de México*, 95-105.
50. Panerai , A., Sacerdote , P., Bianchi , M., Nicoletti, F., Manfredi, B., Gaspani, L., . . . Ronchi, S. (1999). Chronic administration of UK-114, a multifunctional emerging protein, modulates the Th1/Th2 cytokine pattern and experimental autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Science*, 229-235.
51. Parasuraman, S. (2012). Protein data bank. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapy*, 351-352.
52. Reynaud, E. (2010). Protein Misfolding and Degenerative Diseases. *Nature Education*.
53. Salomon-Ferrer, R., Götz, A., Poole, D., Le Grand, S., & Walker, R. (2013). Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations With AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 3878-88.
54. Tanaka, K. (2009). The proteasome: overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 12-36.
55. Ulfig , A., Schulz , A., Müller , A., Lupilov , N., & Leichert , L. (2019). N-chlorination mediates protective and immunomodulatory effects of oxidized human plasma proteins. *Elife*, e47395.
56. van der Spoel, D., van Maaren , P., & Caleman, C. (2012). GROMACS molecule & liquid database. *Bioinformatics*, 752-3.

57. Villalobos-Osnaya , A., Garza-Ramos , G., Serratos , I., Millán-Pacheco, C., González-Robles , A., Arroyo , R., . . . Alvarez-Sanchez, M. (2018). Identification of a perchloric acid-soluble protein (PSP)-like ribonuclease from *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*, 3639-3652.
58. Villalobos-Osnaya, A. (2019). *Tesis de doctorado: Caracterización de la proteína Tv-PSP1 y su posible participación en la degradación del RNAm de tvcp39 en Trichomonas vaginalis* . Universidad Autónoma de la Ciudad de México.
59. Wang, J. (2020). Fast Identification of Possible Drug Treatment of Coronavirus Disease -19 (COVID-19) Through Computational Drug Repurposing Study. *ChemRxiv*.
60. Winter, J., Ilbert, M., Graf, P., Ozcelik, D., & Jakob, U. (2008). Bleach Activates a Redox-Regulated Chaperone by Oxidative Protein Unfolding. *Cell*, 691-701.

11. Apéndice:

Software y servidores

- Linux Ubuntu 19.10: <https://ubuntu.com/>
- Gromacs 2019.3: <http://www.gromacs.org/Downloads>
- VMD 1.9.4a31: <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>
- Grace 1.5.1.25-7: <https://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>
- PyMOL molecular graphics: <https://pymol.org/2/#download>
- MEGA X: <https://www.megasoftware.net/>
- BioEdit 7.2: <https://bioedit.software.informer.com/Descargar-gratis/>
- CHARMM-GUI: <http://www.charmm-gui.org/>
- SnapGene: <https://www.snapgene.com/>
- NCBI: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch
- ExPASy: <https://web.expasy.org/translate/>

Hardware (Super cómputo: MIZTLI-UNAM):

Procesamiento X86:

- 332 nodos de cómputo HP Proliant SL230 y SL250.
- Dos procesadores Intel Xeon por nodo.
- 5312 núcleos totales de procesamiento.
- Capacidad de 118 Teraflop/s.

Procesamiento GPU

- 16 GPUs NVIDIA M2090.

Memoria RAM

- 23 *Terabytes*.

Almacenamiento:

- 750 *Terabytes* en disco duro.

Red:

- Mellanox Infiniband QDR a 40 Gbps.
- Red de administración Ethernet a 1 Gbps.

Sistema Operativo:

- RedHat Enterprise Linux.
- Scientific Linux RedHat Enterprise.

Soluciones:

Gel de agarosa al 1%

Agarosa (Gibco BRL) 0.20 g

TAE 1X 20 ml

Amortiguador TAE 50X

Trizma base 242 g

Ácido acético glacial 57.1 ml

EDTA 37.2 g

*Aforado a 1 litro de H₂O, pH 8.5.

PBS 1X pH 7.0

NaCl 8 g

KCl 8 g

Na₂HPO₄ 0.65 g

KH₂PO₄ 0.2 g

*Aforado a 1 litro de agua destilada.

Etanol al 70% (100 ml)

Etanol al 100% 70 ml

H₂O 30 ml

Medio LB 1 Litro

Luria Bertani (LB) 20 g

1000 ml H₂O

Esterilizado en autoclave

Acrilamida al 30%/ bisacrilamida al 0.8%

Acrilamida 29.2 g

Bisacrilamida 0.8 g

*Disuelto en 40 ml de agua destilada, aforado a 100 ml de H₂O

Filtrado con papel "Whatman" No.1, se almacena a 4°C en frasco Ámbar.

Persulfato de amonio (PSA) 10%

10 mg de PSA

1 ml de H₂O

*Se mantiene a -20°C hasta su uso

Azul de Coomassie (tinción de proteínas)

Metanol 500 ml

Ácido acético glacial 100 ml

Agua destilada 400 ml

Azul de Coomassie 0.5 g

*Es disuelto durante toda la noche, filtrado con papel "Whatman" No. 1.

Solución decolorante de geles

Metanol 165 ml

Ácido acético glacial 50 ml

Agua destilada 785 ml

PBS 1X– EDTA 0.2%

PBS 1X pH 7.4 500 ml

EDTA 1g

*Se disuelve el EDTA y se esteriliza por autoclave.

Solución para extracción de proteínas (TNTE)

Tris-HCl pH 7.4 0.6 g

NaCl 0.87 g

Tritón X-100 500 µl

EDTA 0.186 g

*Se afora a 100 ml con H₂O

Dodecilsulfato sódico (SDS) al 10 %:

100 g de SDS se disuelven en 1 L de agua destilada

Buffer de carga para proteínas (2X)

Tris-HCl 2.5 ml

SDS 0.4 mg

Glicerol 2 ml

2-Mercapto-etanol 200 µg

Azul de bromofenol 0.1 mg

*Aforado en un volumen final de 10 ml

Tris-base + Glicina (10X)

Tris-base 30 g

Glicina 144 g

*Se afora a 1 L con agua destilada.

Solución bloqueadora para Western blot

5% de leche descremada en PBS 1x pH 7.4

Leche 5 gr

Disuelto en 100 ml de PBS 1x pH 7.4

Certificate of Participation

This is to certify that

**Victor Hugo Morales-Bernardino, Rodrigo Arreola, Enrique Rudiño-Piñera
and María Elizabeth Alvarez Sánchez**

Presented a poster entitled

Structural characterization of Tv-PSP1 of *Trichomonas vaginalis*

**During the 8th Symposium of the Mexican Proteomics Society
3rd PanAmerican-Human Proteome Organization (Pan-HUPO) Meeting
2nd Ibero-American Symposium on Mass Spectrometry
October 20-23th, 2019. Held in Acapulco, Guerrero, Mexico.**



Dr. Sergio Encarnación Guevara
President of Mexican Proteomics Society