



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

Maestría en Investigación En Salud

Identificación y caracterización parcial de un elemento de regulación de expresión génica dependiente de zinc para genes tipo ZIP en *Trichomonas vaginalis*.

Tesis presentada por:

Q.F.B. Antonio de Jesus Euan Canto

En opción al grado de:

Maestro en Investigación en Salud

Director de Tesis:

Dr. Julio César Torres Romero

Mérida, Yucatán, México, 2018



UADY

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

"Luz, Ciencia y Verdad"

*Posgrado Institucional en
Ciencias de la Salud*

PICSA/179/18.

28 de septiembre de 2018.

La tesis "**Identificación y caracterización parcial de un elemento de regulación de expresión génica dependiente de zinc para genes tipo ZIP en Trichomonas vaginalis**", presentada por el Q.F.B. **Antonio de Jesús Euán Canto**, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de **Maestro en Investigación en Salud**, ha sido aprobada en su contenido científico y en cuanto al cumplimiento de los establecido en el Plan de Estudios vigente del **Posgrado Institucional en Ciencias de la Salud**.

ATENTAMENTE

DRA. NORMA ELENA PEREZ HERRERA
COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

UADY



POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

c.c.p.Archivo

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, Dr. Julio C. Torres Romero, por haber confiado en mí, por su paciencia, su valiosa dirección, por compartirme sus experiencias y conocimientos, pero sobre todo por la motivación, consejos y el apoyo recibido de su parte a lo largo de estos años.

Al Dr. Victor Ermilo Arana Argáez, Dr. Ángel Demetrio Caamal Ley, Dra. Yelda Aurora Leal Herrera, Dra. Karla Yolanda Acosta Viana y Dra. Bertha María Jiménez Delgadillo, a todos ustedes gracias por el interés mostrado hacia este trabajo, por las recomendaciones y sugerencias brindadas.

Además, quiero hacer extensiva mi gratitud a todos mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular, así como a mis compañeros del Área de inmunología del Laboratorio de Farmacología, por su amistad, apoyo, colaboración y todos los buenos momentos en las horas laborales y fuera de ellas.

Un especial reconocimiento a Tahali, Ivan, Amalia y Sushally, se merecen muchas y buenas palabras, ya que con ustedes he compartido incontables horas de trabajo, buenos y malos ratos. Gracias por todo el respaldo que me han brindado, por escucharme, apoyarme, por estar ahí en lo bueno y en lo malo.

Así como también quiero agradecer a toda persona que de alguna manera contribuyó a la realización de este trabajo de tesis.

DEDICATORIAS

A mi madre, porque todo esto nunca hubiera sido posible sin el apoyo, la confianza y el cariño que me brinda, que de forma incondicional entendió mis ausencias y mis malos momentos. Que a pesar de la distancia siempre estuvo a mi lado al pendiente y sosteniendo cada uno de mis pasos durante todo este proceso. Nunca tendré palabras suficientes para demostrarle todo mi amor y el agradecimiento infinito hacia usted.

A mis hermanas Berenice y Alejandra, por estar al pendiente de mí siempre, por apoyarme en cada una de mis decisiones y porque a lo largo de nuestras vidas, a pesar de la distancia siempre hemos estado ahí para compartir los buenos y malos momentos.

A mi sobrina, por amarme y estar para mí a pesar de la distancia, aunque no sepas lo que hago, me siento muy feliz de ser tu modelo a seguir y que quieras ser como yo.

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular de la Facultad de Química, de la Universidad Autónoma de Yucatán, como parte del proyecto de investigación “Identificación y caracterización molecular de transportadores de iones divalentes (hierro, zinc y calcio) en el parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*”, con No. de registro SISTPROY FQUI-2015-0002 y financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través de la convocatoria de ciencia básica 2014: No. 237990.

INDICE

ABREVIATURAS.....	i
LISTADO DE CUADROS.....	iii
LISTADO DE FIGURAS	iv
I INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Tricomoniasis.....	1
1.2. Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	1
1.3. Microambiente y nutrientes requeridos por <i>T. vaginalis</i>	2
1.3.1 Metales traza.....	4
1.4. Regulación de entrada de Zn y Fe por proteínas tipo ZIP	5
1.5. Regulación de la expresión génica de los transportadores ZIP por elementos dependientes de Zn.....	7
1.6. Transportadores ZIP en <i>T. vaginalis</i> y su expresión diferencial.....	9
II. HIPÓTESIS.....	13
III. OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo general	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
4.1 TIPO DE ESTUDIO	14
4.2 VARIABLES.....	14
V. METODOLOGÍA.....	15
5.1 Análisis <i>in silico</i>	15
5.2 Obtención de sondas de ADN marcadas con biotina	16
5.3 Obtención de las esplenocitos de ratón y fraccionamiento subcelular. ..	18
5.4 Ensayo de retardo electroforético, competencia.	19

5.5 Ensayo de entrecruzamiento con UV.	20
VI. RESULTADOS.....	22
6.1 Búsqueda de las secuencias MRE <i>in silico</i>	22
6.2 Ensayos de retardamiento electroforético.....	24
6.3 Ensayos de entrecruzamiento con luz UV.	29
VII. DISCUSIONES.....	31
VIII. CONCLUSIONES.....	35
IX. PERSPECTIVAS.....	36
X. BIBLIOGRAFÍA.....	37

ABREVIATURAS

³² P	Fósforo 32
5'UTR	Región 5' no transcrita (5' Untranslated region por sus siglas en inglés)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP120	Adhesina proteasa 120
AP23	Adhesina proteasa 23
AP33	Adhesina proteasa 33
AP51	Adhesina proteasa 51
AP65	Adhesina proteasa 65
ARN	Ácido ribonucleico
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CDC	Centro de control de enfermedades (Control disease center por sus siglas en inglés)
CP30	Cisteína proteinasa 30
CP39	Cisteína proteinasa 39
CP65	Cisteína proteinasa 65
dsDNA	ADN de doble cadena (Double stranded DNA por sus siglas en inglés)
EMSA	Ensayo de retardo electroforético (Electrophoresis mobility shift assay por sus siglas en inglés)
Fe	Hierro
IRT	Transportador regulado por hierro (Iron regulated transporter por sus siglas en inglés)
ITS	Infección de transmisión sexual
KDa	Kilodaltones
MRE	Elementos de respuesta a metales (Metal response element por sus siglas en inglés)
MRE _{TvZIP}	MRE en ZIP de <i>T. vaginalis</i>
MRE _{TvZIP3,5}	MRE en ZIP 3,5 de <i>T. vaginalis</i>

MTF-1	Factor de transcripción de metales 1 (Metal transcription factor 1 por sus siglas en inglés)
NES	Señal de exclusión nuclear (Nuclear export signal por sus siglas en inglés)
NLS	Señal de localización nuclear (Nuclear localization sequence por sus siglas en inglés)
PFO	Piruvato ferredoxina oxidoreductasa
pH	Potencial de hidrogeno
rMTF-1	MTF-1 de ratón
RNP	Ribonucleoproteína
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SER	Elemento regulador de esteroides (Sterol regulatory element por sus siglas en inglés)
<i>T. vaginalis</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
TA	Temperatura ambiente
<i>TvZIP</i>	Zip en <i>T. vaginalis</i>
UV	Ultravioleta
ZAP	Proteína activadora de respuesta a zinc (Zinc activated protein por sus siglas en inglés)
ZIP	Proteína tipo ZRT, IRT (ZRT, IRT-like protein por sus siglas en inglés)
Zn	Zinc
ZRE	Elemento de respuesta a zinc (Zinc response element por sus siglas en inglés)
ZRT	Transportador regulado por zinc (Zinc regulated transporter por sus siglas en inglés)

LISTADO DE CUADROS

	PAGINA
Cuadro 1. Principales elementos de regulación transcripcional de genes tipo ZIP dependientes de zinc.	8
Cuadro 2. Sondas diseñadas para los ensayos de retardamiento.	16
Cuadro 3. Programa de alineamiento de oligonucleótidos complementarios para termociclador.	17
Cuadro 4. Mezcla de reacción para el marcaje con biotina de las sondas de dsDNA.	17
Cuadro 5. Secuencias encontradas mediante el análisis <i>in silico</i> .	22

LISTADO DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	2
Figura 2. Topología predicha para los miembros de la familia ZIP en <i>Trichomonas vaginalis</i> .	7
Figura 3. Esquema representativo de la regulación de genes de tipo ZIP y proteínas de unión a zinc por medio de MTF-1/MRE.	9
Figura 4. Expresión diferencial de los transportadores tipo ZIP de <i>Trichomonas vaginalis</i> a distintas concentraciones de zinc.	10
Figura 5. Expresión diferencial del transportador tipo ZIP10 en ratones con distintas dietas de zinc.	10
Figura 6. Elementos de respuesta a metales encontrados en la región codificante del gen que codifican para la proteína ZIP10 en pez cebra, lo que indicaría un mecanismo de regulación negativa.	11
Figura 7.- Análisis <i>in silico</i> para la búsqueda de elementos reguladores de metales en los genes que codifican para proteínas tipo ZIP.	23
Figura 8.- Localización en las regiones codificantes de los TvMREs encontrados por el análisis <i>in silico</i> .	24
Figura 9. La formación de complejos DNA/proteína entre las secuencias MRE ratón con los extractos proteicos nucleares de ratón se ve afectada por zinc.	25
Figura 10. Formación de complejos DNA/proteína entre las secuencias MRE TvZIP3-5 con los extractos proteicos nucleares de ratón.	26
Figura 11. Ensayo de competitividad con sonda fría para MRE de Ratón.	27
Figura 12. Ensayo de competitividad con sonda Fría para el MRE TvZIP3,5.	28
Figura 13. Ensayo de competitividad con sonda trunca para el MRE TvZIP3,5.	29

Figura 14. Ensayo de entrecruzamiento de los extractos nucleares de ratón con la sonda MRE-Ratón.	30
Figura 15. Representación esquemática del mecanismo de regulación negativa propuesto	34

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo el identificar posibles elementos de regulación a nivel transcripcional en los genes *ZIP* de *Trichomonas vaginalis* con ayuda de análisis bioinformáticos, y posteriormente realizar la comprobación *in vitro* con ayuda de técnicas moleculares como ensayos de retardo electroforético y de entrecruzamiento con UV. La búsqueda de elementos de regulación dependientes de Zn, mediante análisis bioinformáticos en las regiones 5'-UTR y codificantes de los genes *TvZIP1*, *3*, *5* y *7*, arrojó la presencia de secuencias tipo MRE (MRE_{TvZIP}) con un alto nivel de concordancia con la secuencia consenso reportada para los MRE en eucariotas.

Para la caracterización parcial, se seleccionó a la secuencia MRE_{TvZIP3,5}, que fue la que presentó la mayor identidad con la secuencia consenso de eucariotas. Los ensayos de retardo electroforético, de entrecruzamiento con UV y de competencia demostraron que la secuencia MRE_{TvZIP3,5} se une de manera específica a proteínas nucleares de ratón de manera dependiente del Zn con peso similar a la reportada para la proteína MTF-1 de ratón (rMTF-1). Por lo tanto, esto sugiere que la secuencia MRE_{TvZIP3,5} pudiera ser parte de un mecanismo de regulación transcripcional dependiente de Zn para los genes *ZIP* de *T. vaginalis*.

I INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

1.1. Tricomoniasis.

La tricomoniasis es una infección de transmisión sexual (ITS) causada por el parásito protozooario *Trichomonas vaginalis*. Esta ITS es considerada de carácter cosmopolita ya que se estima que aproximadamente de 170 a 180 millones de personas alrededor del mundo presentan tricomoniasis urogenital, de las cuales la mayoría son mujeres principalmente entre 15 y 50 años de edad, sin importar raza ni grupo socioeconómico. De igual manera se ha encontrado en pacientes masculinos, pero se manifiesta en aproximadamente un 90% como una infección asintomática, y los que llegan a presentar sintomatología pueden manifestar prostatitis y uretritis principalmente.¹⁻⁴

El periodo de incubación de *T. vaginalis* post-infección es de 4 a 28 días antes de la presencia de los primeros síntomas, posteriormente a éste, se observa principalmente sintomatología general que únicamente indica la presencia de una ITS.¹⁻³

1.2. Ciclo de vida de *T. vaginalis*.

Con respecto al ciclo de vida del parásito se ha descrito que se encuentra en el tracto urogenital y/o vaginal en forma de trofozoíto que es la forma usual e infectante, por lo que la transmisión es considerada como exclusiva por la vía sexual. Hasta el momento no se han descrito formas quísticas, sin embargo, en situaciones desfavorables se ha podido observar que el parásito interioriza sus flagelos formando así una configuración de pseudoquiste. El trofozoíto de *T. vaginalis* mide de 7 a 23 micrómetros dependiendo de las condiciones microambientales, y tiene una media de 13 micrómetros. En el microscopio en muestras frescas se puede encontrar de manera ovoide o piriforme, sin embargo, tras la adhesión al epitelio genital tiende a adoptar una forma ameboide que le ayuda a fagocitar eritrocitos y bacterias presentes.^{3,5}

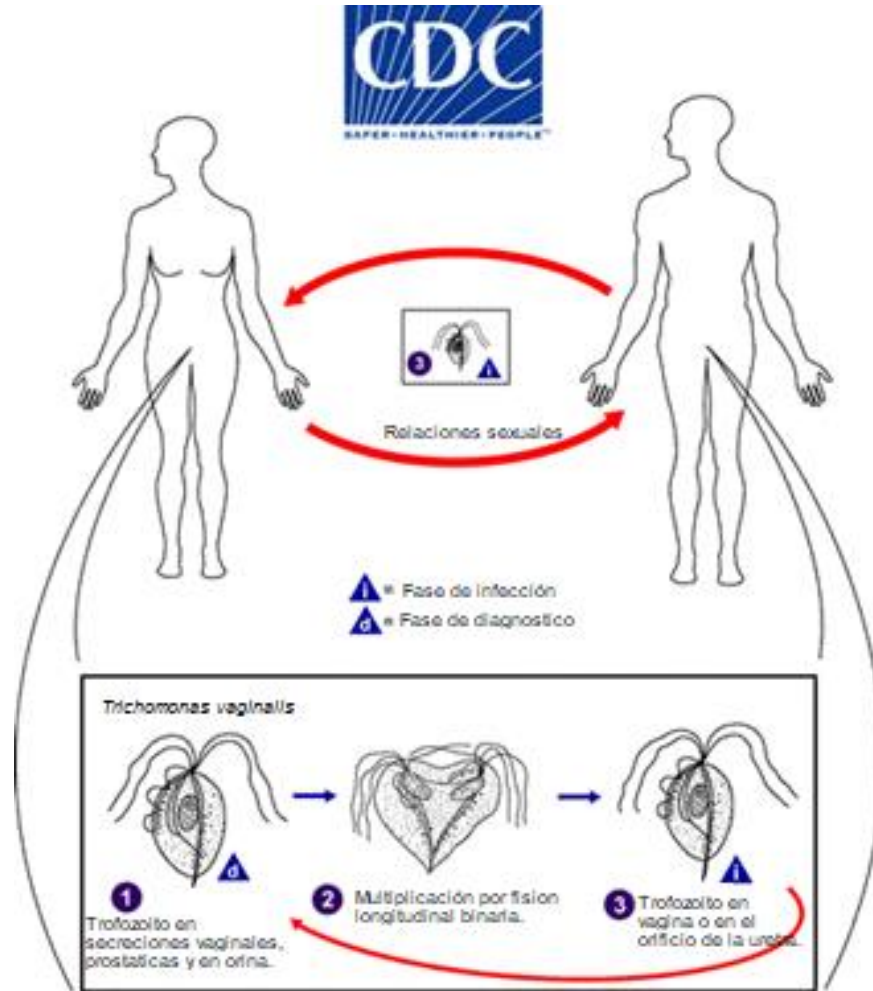


Figura 1. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*. La forma de trofozoíto se transmite de manera sexual y se multiplica por fisión binaria en los órganos sexuales (obtenido de CDC <http://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>).

1.3. Microambiente y nutrientes requeridos por *T. vaginalis*.

El pH alcalino es ideal para que *T. vaginalis* produzca la infección. Durante la excitación y el acto sexual, la mujer secreta fluidos que aumentan el pH vaginal, normalmente ácido; además el semen, que es alcalino, favorece la transmisión del parásito. En varios estudios sobre métodos anticonceptivos, como el anillo vaginal, se ha observado que al aumentar la cantidad de *Lactobacillus acidophilus* este actúa como un factor protector contra la infección por *T. vaginalis*.⁴

En los casos típicos de la infección, el pH normal de la vagina (3.8-4.4) se hace más alcalino, debido a que disminuyen los depósitos de glucógeno de la mucosa, especialmente en las capas superficiales. Los procesos fisiológicos de destrucción celular aportan el glucógeno necesario para el crecimiento del bacilo de Döderlein, que se encarga de metabolizar el mismo y excretar ácido láctico, proceso mediante el cual se mantiene el medio ácido normal de la vagina. En ausencia de los depósitos normales de glucógeno la cantidad de este microorganismo disminuye y en casos severos pueden ser eliminados alterándose la protección fisiológica que ofrece la acidez vaginal estimulando el crecimiento de *T. vaginalis* y otros microorganismos.^{5,6}

T. vaginalis es un parásito obligado, que fagocita bacterias, células epiteliales de la vagina y eritrocitos. Los mecanismos patogénicos son procesos complejos y multifactoriales que involucran la acción coordinada del citoesqueleto, moléculas de adhesión, elementos de evasión de la respuesta inmune y otras modificaciones en su hábitat, entre ellos se encuentran el cambio de la microbiota vaginal, pH, hierro, Zn, poliaminas (putrescina, espermidina), temperatura, activación de la respuesta inmune del hospedero, con la modulación de expresión de genes, entre otros cambios menos significativos.⁷

T. vaginalis no posee mitocondrias, pero sí hidrogenosomas, que son organelos sin ADN formados por tres gránulos cromáticos. Algunos estudios sugieren que el hidrogenosoma es una modificación de la mitocondria, otros sugieren que ambos provienen de un organelo común. Diversos autores plantean que este protozoo es anaerobio microaerotolerante, presentando el sistema enzimático del piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFO), reemplazando la piruvato deshidrogenasa de organismos aerobios. Esta vía metabólica activa fármacos como los 5-nitroimidazoles y ha sido encontrada en bacterias anaerobias susceptibles al metronidazol, pero no en otras eucariotas por lo que se considera a *T. vaginalis* como eucariota primitivo. Los requerimientos energéticos los provee la transformación de glucosa a glicerol y a succinato en el citoplasma, seguido por la ulterior conversión de piruvato y malato a hidrógeno y acetato, en los hidrogenosomas.^{6,8-12}

T. vaginalis no puede vivir naturalmente sin estrecha asociación con el tejido vaginal. Pocos días después de la llegada a la vagina, los parásitos proliferan y provocan degeneración y descamación del epitelio vaginal, con infiltración leucocitaria y aumento de las secreciones vaginales.¹³

1.3.1. Metales traza

Se ha reportado que la presencia de metales traza en algunos organismos son de gran importancia. Por ejemplo, en *Trichomonas* la presencia de hierro regula de manera positiva la adhesión, aumentando la síntesis de al menos 5 adhesinas (AP23, AP33, AP51, AP65 y AP120).^{7,14} Adicionalmente, el hierro regula negativamente la cisteín-Proteinasa CP30 que participa en la citoadherencia de este parásito. Otra característica de este metal en el parásito es su influencia en la regulación negativa de la actividad proteolítica, reducción de la transcripción y expresión de las cisteín proteasas CP65 y CP39.^{15,16}

Estudios proteómicos indican una expresión diferencial de al menos 45 proteínas en presencia de hierro, las cuales participan entre otras funciones en el metabolismo energético, proteólisis y metabolismo hidrogenosomal de *T. vaginalis*. Además, se observa que en ausencia de hierro el parásito es capaz de internalizar los flagelos y el axostilo desarrollando una morfología de pseudoquiste.^{15,17} Esto sugiere que el hierro es un factor importante en la patogénesis, por la cual el protozoario afecta más a las mujeres debido a sus cambios hormonales y a que durante la menstruación el parásito aprovecha el hierro existente en el flujo sanguíneo que le permite aumentar su capacidad de adherencia a tejidos. En los períodos en que no hay menstruación las concentraciones de hierro son reducidas, lo que provoca que el protozoo tenga movilidad y busque alimentarse, esto obliga al parásito a adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes de la vagina para permanecer en ella.^{7,12,13}

Con respecto al Zn, existen estudios que consideran que tiene un efecto tóxico sobre *T. vaginalis*, dependiente de la concentración y que dicho efecto sólo se ve en altas concentraciones. Sin embargo, como elemento traza, se ha propuesto

como posible regulador de muchas proteínas que contienen dominios de “dedos de zinc” las cuales han sido identificadas de acuerdo con su genoma y otros de manera experimental, como la proteína HMP35 que presenta una secuencia de cisteínas similar al dominio de dedos de Zn RING. Recientemente, se describió en *T. vaginalis* que la metaloproteínasa TvMP50 presenta una estructura primaria de aminoácidos residuales (tres histidinas) que interactúan con el ion metálico y forman el sitio catalítico. Está involucrada en la adherencia, citotoxicidad, colonización, hemólisis, evasión de la respuesta inmune, transducción de señal, adquisición de nutrientes, apoptosis y resistencia. Se ha demostrado que los niveles transcripcionales de *TvMP50* aumentan con la presencia de Zn.^{18,19}

En el ser humano, las concentraciones de Zn contenidas en el semen tienen capacidad tricomónica que destruye al protozoario. En varones con niveles bajos de Zn, el parásito vive en estado latente convirtiéndolos en portadores de la infección.^{7,12,13} Sin embargo, la exposición a estos iones metálicos debe ser regulada de manera muy específica, particularmente, a través de mecanismos de transporte de iones, lo que se sugiere que la presencia de transportadores de iones divalentes en este parásito protozoario pueda ser un medio para regular la homeostasis de los iones de hierro y Zn. Se ha reportado que la gran mayoría de los seres vivos regulan dichos elementos a través de transportadores de la familia ZIP.

1.4. Regulación de entrada de Zn y Fe por proteínas tipo ZIP

Se ha observado en organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, que la regulación de la entrada de Zn se da principalmente por los transportadores tipo ZIP. En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado una gran cantidad de genes que codifican para proteínas ZIP y regulan el Zn.

La familia ZIP toma su nombre de los primeros miembros identificados como ZRT, IRT-like Protein (transportador regulado por hierro). Es un transportador de catión de *Arabidopsis spp* que se expresa en las raíces de plantas deficientes en hierro y

ZRT1 y ZRT2 (transportador regulado por Zn), que son los transportadores de Zn de alto y bajo contenido de Zn en levaduras, respectivamente.²⁰⁻²²

Se estima que la mayoría de las proteínas tipo ZIP contienen 8 dominios transmembranales y una topología de membrana similar en los extremos amino y carboxilo terminal, que se encuentran localizados en la superficie externa de la membrana plasmática. La longitud de esta familia de proteínas varía de 309 a 479 residuos de aminoácidos. Esta diferencia se debe en gran medida a la longitud entre los dominios transmembrana III y IV, que son las denominadas regiones variables. En la mayoría de los casos, la región variable contiene un dominio potencial para la unión de metales que es rico en residuos de histidina. Por ejemplo, en el transportador IRT1, este motivo es HGHGHGH.

Algunas de las proteínas ZIP de *Caenorhabditis elegans* tienen este sitio potencial de unión a metal localizado en posiciones distintas de la región variable. La porción más conservada de las proteínas de la familia ZIP se produce en el dominio transmembrana IV, que se considera que forma una hélice anfipática con un residuo de histidina completamente conservado. Este residuo de histidina, junto con un residuo semipolar adyacente, puede comprender parte de un sitio de unión de metal pesado intramembranoso que es parte de la vía de transporte.^{23,24}

Con lo que respecta a los transportadores ZIP en *T. vaginalis*, Fernández-Martín y Cols.²⁵ encontraron, mediante un análisis *in silico*, 8 genes con alta similitud a los que codifican para transportadores ZIP, con regiones transmembranales que varían en cantidad (5 a 8 regiones transmembrana) siendo el TvZIP 7 el que tiene menor cantidad. De igual manera un análisis filogenético de los transportadores mostró mucha similitud con la subfamilia ZIP-II.

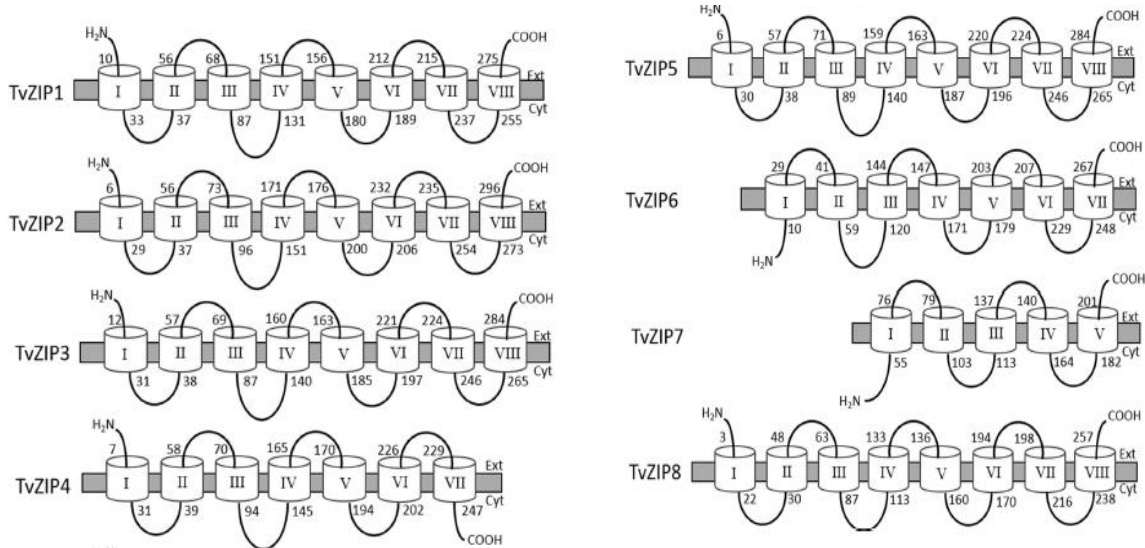


Figura 2. Topología predicha para los miembros de la familia ZIP en *Trichomonas vaginalis*. El modelo contiene los 8 dominios transmembrana, las regiones variables se encuentran entre los dominios 3 y 4 (empezando desde el extremo amino-terminal) los ZIP 4, 6 y 7 son la excepción a esta topología.²⁵

1.5. Regulación de la expresión génica de los transportadores ZIP por elementos dependientes de Zn.

En todos los organismos, la captación de Zn está controlada de manera muy precisa para asegurar que los niveles adecuados del metal se mantengan, y evitar la sobreacumulación que resulta potencialmente tóxica. En las levaduras, este control se ejerce a ambos niveles transcripcional y postraduccional. A nivel transcripcional, la expresión de los genes *ZRT1* y *ZRT2* se induce más de 10 veces en células con bajos niveles de Zn.^{21,22} La regulación de estos genes en respuesta a Zn está mediada por el producto del gen de *ZAP1*, cuya proteína actúa como activador transcripcional en respuesta a las concentraciones de Zn, es decir detecta los niveles intracelulares de Zn y traduce esa señal en cambios en la expresión génica. Se ha demostrado que *ZAP1* se une a un río arriba de varios genes regulados por Zn como los *ZTR1* y *ZTR2*, la región de unión es denominada como Elemento de Respuesta a Zn (ZRE, por sus siglas en inglés), la cual corresponde a una secuencia consenso: ACCYYNAAGGT (donde Y significa base pirimídica y N cualquier nucleótido).^{26,27} En caso de eucariotas inferiores se ha encontrado en

Trypanosoma cruzi la presencia de una proteína con múltiples dedos de Zn que sirve como mecanismo de regulación postraduccional formado el complejo PZFP1 con secuencias conservadas por ejemplo la secuencia minicírculo universal (UMS por sus siglas en inglés) teniendo como secuencia (UMS, 5'-GGGGTTGGTGTA-3'), además se une al elemento de respuesta a esteroides (SRE por sus siglas en inglés).²⁸ Sin embargo, se ha encontrado que existen otros mecanismos de regulación transcripcional dependientes de Zn. En el cuadro 1 se hace un resumen de los elementos de regulación mediados por Zn en diversos organismos, tanto procariotas como eucariotas.

Cuadro 1. Principales elementos de regulación transcripcional de genes tipo ZIP dependientes de zinc.^{29,30}

<i>Elemento</i>	<i>Secuencia consenso</i>	<i>Proteína de unión</i>
<i>ZRE</i>	ACCYNAAGGT	ZAP1
<i>Caja CACCC</i>	CACCC	KLF4
<i>ArsR</i>	(A/T) TTTAT(A/G) TTT(A/T)	SmtB
<i>MRE</i>	TTTTGCGCACGGCACTAAAT	MFT1

1.5.1. Regulación transcripcional de genes ZIP por el sistema MRE/MTF-1.

El mecanismo de regulación más estudiado para la regulación de genes tipo ZIP mediados por Zn es el MRE/MTF-1. Este sistema se puede presentar de dos maneras. La primera y más común es la unión de la proteína del tipo MTF a la secuencia consenso en la región 5'-UTR del gen para promover su expresión (Figura 3a y 3b). La otra forma, menos común pero igualmente caracterizada, es la unión a la secuencia consenso dentro de la región codificante del gen, lo que provoca que las proteínas que participan durante la transcripción del gen no se unan a la cadena de ADN y por lo tanto sea la regulación de manera negativa (Figura 3c y 3d). Cabe mencionar que este complejo necesita otra proteína del tipo metalotioneína para poder llevar a cabo su mecanismo de regulación.³¹⁻³³

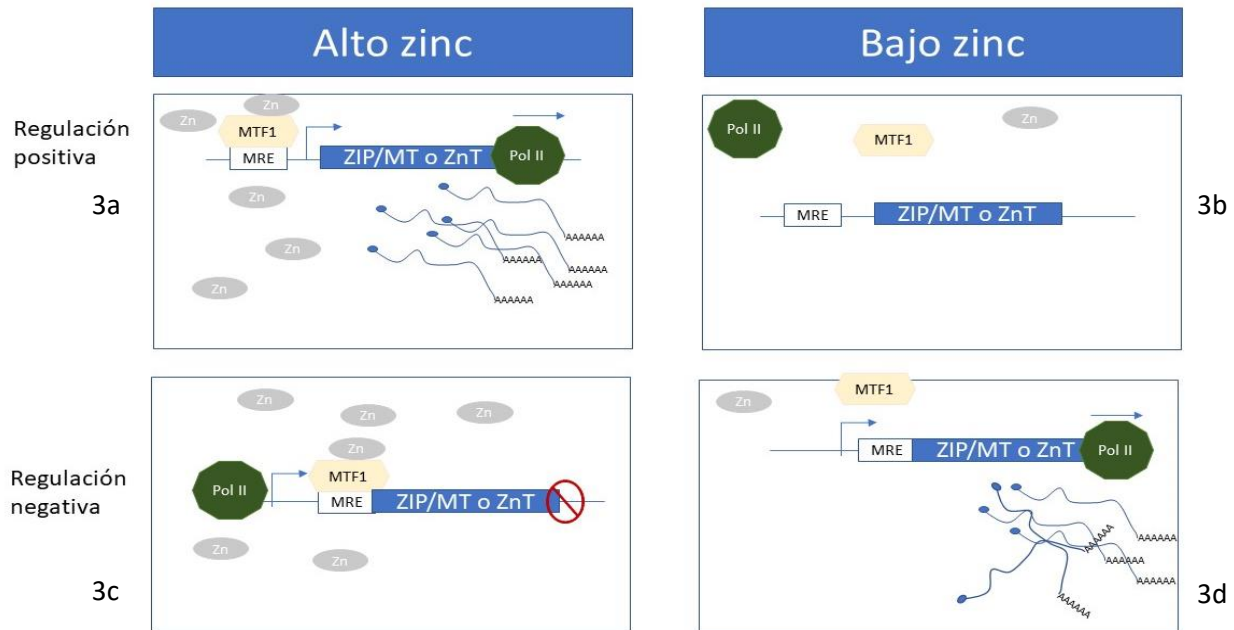


Figura 3. Esquema representativo de la regulación de genes de tipo ZIP y proteínas de unión a zinc por medio de MTF-1/MRE. 3^a) se observa el mecanismo de regulación positivo en altas concentraciones de Zn, 3b) mecanismo de regulación positiva en bajo Zn, 3c) mecanismo de regulación negativa en altas concentraciones de Zn, 3d) mecanismo de regulación negativa en bajas concentraciones de Zn.

El sistema MRE/MTF-1 fue descrito primeramente en ratones.³⁴ La proteína MTF-1 de ratón está constituida por seis dedos de Zn tiene un peso aproximado de 75 kDa, además contiene un dominio de unión al ADN y tres dominios de activación transcripcional. Además la estructura del MTF-1 incluye una secuencia de localización nuclear (NLS), un dominio ácido y una señal de exclusión nuclear (NES).³³⁻³⁵

1.6. Transportadores ZIP en *T. vaginalis* y su expresión diferencial.

Fernández-Martín y cols,²⁵ al evaluar la expresión a nivel transcripcional de los 8 genes que codifican proteínas que presentan alta conservación de secuencias aminoacídicas con proteínas ZIP de otros organismos, encontraron que bajo condiciones control (sin adicionar Fe y Zn) todos los genes encontrados se expresan de manera basal, por otra parte cuando los medios de cultivo se suplementan con

sales de Zn, la expresión de los transportadores *TvZIP 1,3,5* y *7* se ven disminuidas (Figura 4). Sin embargo, los otros genes no se afectaron por estas concentraciones de Zn.

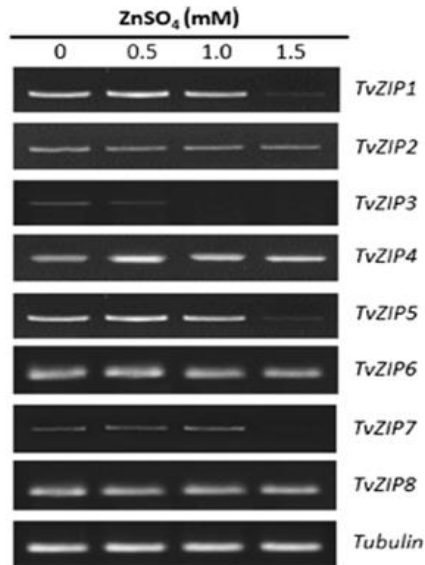


Figura 4. Expresión diferencial de los transportadores tipo ZIP de *Trichomonas vaginalis* a distintas concentraciones de zinc.²⁵

Esto concuerda con estudios realizados por Lichten y cols.³¹ en ratones, en los cuales con una dieta rica en Zn (30 mg/kg) se puede observar la represión en la expresión del transportador ZIP10 presente en este modelo de estudio en contraste con una dieta deficiente (>1 mg/kg) de Zn aumentan los niveles de expresión de este transportador (Figura 5).

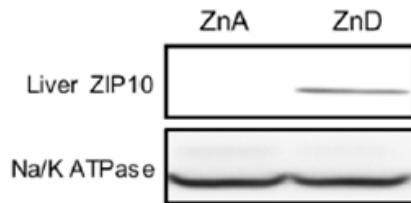


Figura 5. Expresión diferencial del transportador tipo ZIP10 en ratones con distintas dietas de zinc (ZnA = Zn adecuado, ZnD = Zn deficiente).³¹

Por otro lado, estudios realizados con peces cebra por Dongling y cols.³² confirman el mecanismo de regulación negativa o por supresión en genes que codifican para genes tipo *ZIP10*, encontrando específicamente MREs en las regiones codificantes, tanto de las cadenas codificantes como en las cadenas complementarias como se observa en la figura 6.

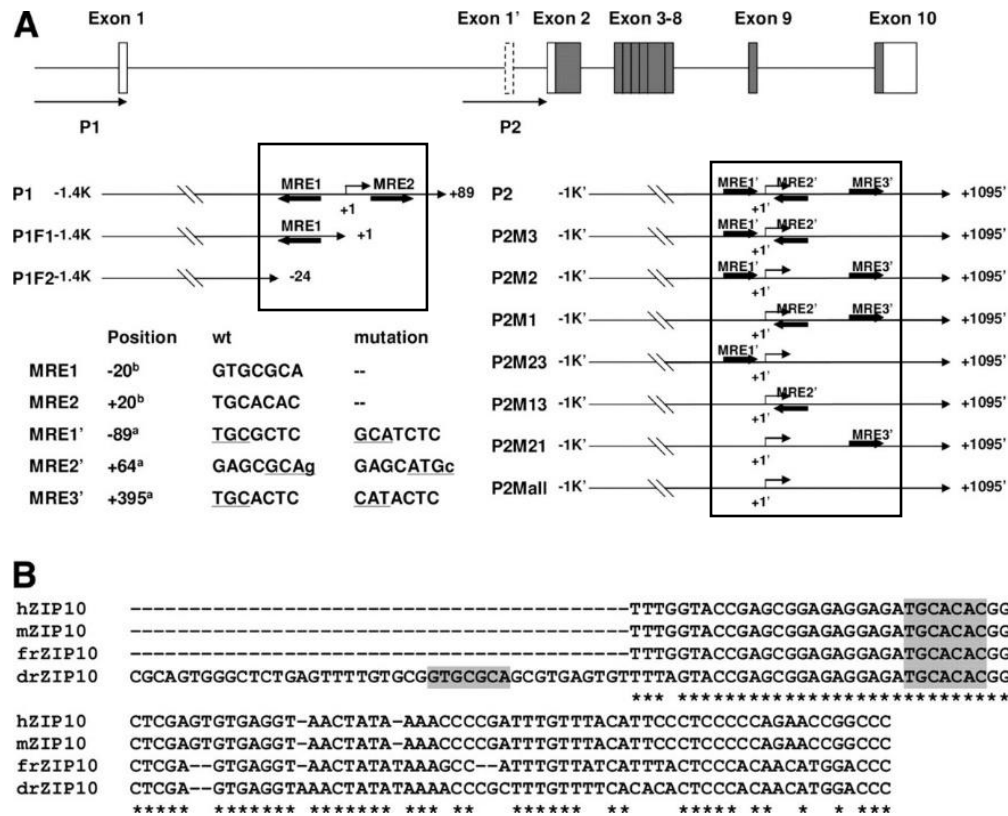


Figura 6. Elementos de respuesta a metales encontrados en la región codificante del gen que codifican para la proteína ZIP10 en pez cebra. A) se observa en recuadros la localización de los MRE encontrados en las secuencias genómicas de interés el sentido de la flecha indica secuencia codificante o secuencia complementaria, B) se observa el alineamiento múltiple de genes *ZIP10* de diversos organismos mostrando la secuencia de los MREs.³²

Sin embargo, teniendo todos estos antecedentes no se ha descrito ni caracterizado, el mecanismo de homeostasis de Zn que permita observar los cambios en la expresión de los diversos transportadores de tipo ZIP en este microorganismo, por lo que se propone que los genes *ZIP* presentes en este parásito pudieran contar con elementos de respuesta a Zn de tipo MRE.

El presente trabajo tuvo como objetivo de demostrar la presencia de un elemento de regulación a nivel transcripcional para los genes que codifican para proteínas tipo *ZIP*, caracterizar su presencia, y verificar la especificidad.

II. HIPÓTESIS

Las secuencias de los genes que codifican proteínas tipo ZIP en *Trichomonas vaginalis* presentan posibles elementos de regulación transcripcional dependientes de zinc.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Identificar y caracterizar de manera parcial un elemento de regulación de expresión génica dependiente de zinc para genes tipo ZIP en *Trichomonas vaginalis*.

3.2. Objetivos específicos

1. Identificar *in silico* secuencias homólogas a elementos regulatorios dependientes de zinc en las secuencias de los genes que codifican proteínas tipo ZIP de *T. vaginalis*, cuya expresión es dependiente del zinc.
2. Caracterizar *in vitro* la afinidad del (los) elemento(s) regulador(es) identificado(s) en un sistema heterólogo empleando proteínas provenientes de esplenocitos de ratón bajo diferentes condiciones de zinc por ensayos de retardo electroforético (EMSA).
3. Comprobar la especificidad de la interacción entre la(s) proteína(s) y el(los) fragmento(s) de ADN por ensayos de entrecruzamiento.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

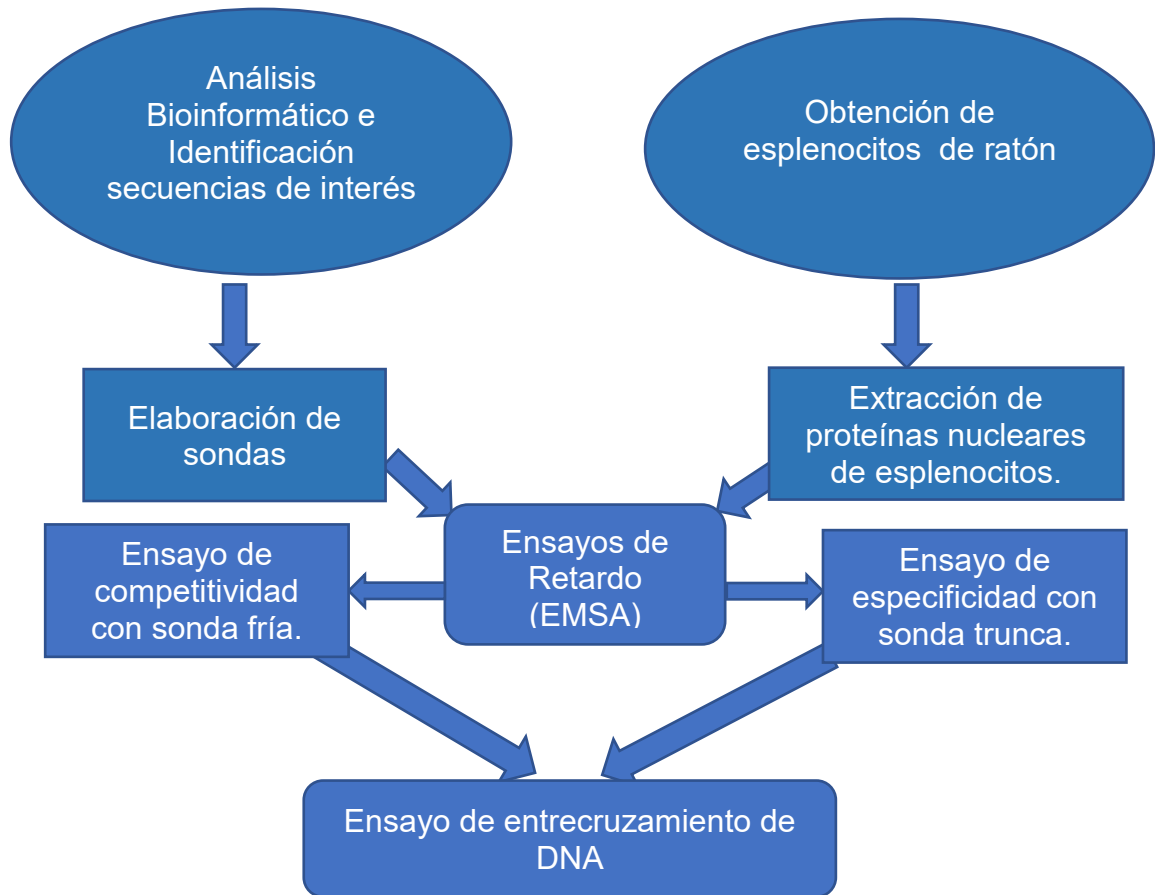
4.1. TIPO DE ESTUDIO

El estudio que se llevó a cabo fue de investigación básica, empleando en el estudio una variable de tipo dicotómica indicando presencia o ausencia de los elementos de regulación encontrados.

4.2. VARIABLES

Variable	<i>Definición operacional</i>	<i>Tipo</i>	<i>Escala de medición</i>	<i>Instrumento de medición</i>
<i>Elementos de regulación</i>	Secuencia consenso de ADN a la cual se unen proteínas que activan y/o desactivan regulación de genes	Dicotómica	Presencia/ ausencia	Análisis bioinformáticos, Ensayos de retardo electroforético, Ensayos de entrecruzamiento

V. METODOLOGÍA



5.1. Análisis *in silico*

Se obtuvieron las secuencias codificantes de los genes transportadores *ZIP1*, *3*, *5* y *7* de la base de datos TrichDB (<http://trichdb.org/trichdb/>) y la secuencia consenso del MRE de ratón reportada por Lichten y cols.³¹ Se realizó la búsqueda del elemento de regulación por medio del algoritmo del software MEME-Suite (<http://meme-suite.org/tools/meme>). Posteriormente se analizaron las secuencias obtenidas, su posición y su ubicación dentro de los genes y el porcentaje de identidad. Para la caracterización parcial, se seleccionó a la secuencia MREtZIP3-5, que fue la que presentó la mayor identidad con la secuencia consenso de eucariotas.

5.2. Obtención de sondas de ADN marcadas con biotina

Una vez terminado el análisis *in silico* y diseñadas las sondas a partir de las secuencias de ADN obtenidas, se enviaron a sintetizar a manera de oligonucleótidos complementarios (cuadro 2).

Cuadro 2. Sondas diseñadas para los ensayos de retardamiento.

Sonda	Sentido	Secuencia
MRE-Ratón	Secuencia	GCTCT <u>TGCACTC</u> CGCCCGAA
	Complementario	CGAG <u>ACGTGAG</u> GCGGGCTT
MRE-TvZIP3-5	Secuencia	GACTGATT <u>TGAGCAT</u> CACTGAG
	Complementario	CTGACTA <u>ACTCGTA</u> GTGACTC
MRE-TvZIPMut	Secuencia	GACTGATT <u>TGAC</u> CACTGAG
	Complementario	CTGACTA <u>ACT</u> GTGA-CTC

Nota: La secuencia Core del MRE se encuentra subrayado y con negritas.

Los oligonucleótidos se resuspendieron a una concentración final de 100 mM, según las instrucciones del proveedor. Posteriormente se realizó el alineamiento de las secuencias complementarias para obtener el ADN de doble cadena (dsDNA) como se indica a continuación: se mezclaron los oligonucleótidos complementarios en una relación equimolar 1:1 en un tubo de 1.5 mL, posteriormente se realizó una dilución 1:10 con un amortiguador de sales (NaH₂PO₄ 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) para un volumen final de 50 µL. Una vez obtenida la mezcla se siguió el protocolo para el alineamiento de oligonucleótidos complementarios en termociclador siguiendo el programa descrito en el cuadro 3.

Cuadro 3. Programa de alineamiento de oligonucleótidos complementarios para termociclador.

Paso	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	5 minutos
2	40	95°C -1°C por ciclo	1 minuto
3	1	55°C	30 minutos
4	20	55°C – 1°C por ciclo	1 minuto
5		4°C	Hasta el almacenaje.

Posteriormente al tiempo de ciclado, se realizó el marcaje de las sondas de dsDNA con el estuche comercial Biotin 3' End DNA Labeling Kit (Thermo scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones como se describe a continuación (cuadro 4).

Cuadro 4. Mezcla de reacción para el marcaje con biotina de las sondas de dsDNA.

Componente	Volumen (μL)	Concentración final
Agua ultrapura	25	---
Amortiguador de reacción TdT 5X	10	1 x
dsDNA (10 mM)	5	1000 nM
Biotin-11-UTP (5 mM)	5	0.5 μM
TdT diluido	5	1.5 U/μL
Total	50	---

Nota: Se diluye la enzima TdT a una concentración de 1.5 U/μL en amortiguador de reacción TdT 1X. Al momento de emplearse.

La mezcla se homogenizó suavemente por pipeteo y se incubó a 37°C por 30 min. Pasado el tiempo se paró la reacción añadiendo 2.5 μL de EDTA 0.2 M y se le añadió 50 μL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) para extraer el TdT, se mezcló

por vortex y se centrifugó 12000 x g, 2 min a TA. Se recuperó la fase acuosa y se almacenó a -20°C protegido de la luz.

5.3. Obtención de los esplenocitos de ratón y fraccionamiento subcelular.

Se sacrificaron ratones BALB-C por dislocación cervical de acuerdo con lo descrito por la norma NOM-062-ZOO-1999. Siguiendo con la metodología se le dio un aseo con etanol al 70% en esterilidad, se extrajo el bazo y se colocó en una caja Petri con 5 mL de solución salina y se extrajeron las células totales por perfusión del bazo con la solución salina (hasta que el órgano obtenga una apariencia clara). El sobrenadante fue transferido a un tubo cónico de 15 mL. Se centrifugaron a 1800 x g, 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular obtenido y se le añadió 3 mL de solución hemolizante (NH₄Cl 130 mM, Tris 40mM) sin remover, se incubó 15 min a TA. La reacción hemolizante se detuvo añadiendo solución salina hasta alcanzar un volumen de 10 mL, a continuación, se centrifugó a 1800 x g, 10 min a TA. Se resuspendió El botón celular en 3 mL de PBS y se realizó el conteo en una cámara de Neubauer con azul de tripano a una concentración de 0.04%.

Posteriormente al conteo los esplenocitos se centrifugaron a 500 x g, 10 minutos a 4°C se retiró el sobrenadante y se lavaron 3 veces con PBS pH 7.0 frío. El botón celular se resuspendió en 1 mL de amortiguador EB (Hepes 10 mM pH7.5, MgCl₂ 3 mM, KCl 40 mM, DTT 0.5 mM, NP-40 0.4%, glicerol 5%) frío, adicionando los inhibidores de proteasas TLCK y leupeptidín a una concentración final de 7.5 mM y 1.6 mM, respectivamente. La mezcla se homogenizó en vortex por 15 s y se incubó 15 min a 4°C repitiendo nuevamente este paso, se centrifugó por 10 min a 1000 x g a 4°C. El botón celular obtenido se resuspendió en 300 µL de amortiguador de extracción nuclear 1 (Sacarosa 0.35 M, MgCl₂ 0.5 mM en agua estéril) y se sonicó 10 veces por pulsos de 10 s a 4°C con un sonicador de inmersión de aguja a 100% de amplitud (Ultrasonic Processor GE X 130PB). Sobre esta mezcla se añadió 300 µL de amortiguador de extracción nuclear 2 (Sacarosa 0.88 M, MgCl₂ 0.5 mM en agua estéril) y se centrifugó a 2000 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -70°C como extractos nucleares.³⁶

5.4. Ensayo de retardo electroforético, competencia.

El ensayo de retardo electroforético es una técnica utilizada para investigar interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos. Esta técnica se basa en la interacción de un ácido nucleico en forma de sonda marcada con ^{32}P (radiactivo) o con biotina (no radiactivo) y una proteína o algún complejo proteico, posterior a la interacción se realiza el corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida nativa, en caso de haber interacción el corrimiento de la sonda se verá retrasado con respecto a la sonda sin interacción proteica (control negativo). El revelado de la sonda puede realizarse con algún método por color o con algún método quimioluminiscente.³⁷

El ensayo de retardo electroforético se realizó de la siguiente manera, 50 μg de extractos nucleares se incubaron por 10 min a temperatura ambiente (TA) con el amortiguador de unión a una concentración final de 1X (Hepes, pH 7.5 2 mM, MgCl_2 0.2 mM, DTT 0.2 mM, KCl 0.8 mM, glicerol 0.8 %). Después se añadió 20 fmoles de las sondas marcadas con biotina (ver cuadro 2) y se incubaron por 30 min a 4°C. Posteriormente se le añadieron 2 μL de amortiguador de muestra para electroforesis y se cargaron en geles de poliacrilamida nativa al 6% en TBE a una concentración final de 0.5x. Las muestras se corrieron en TBE 0.5x por 1 h a 100V constantes a una temperatura de 25°C y posteriormente se electrotransfirieron a una membrana de nylon (Amershan™ Hybond-N⁺) en cámara húmeda con TBE 0.5x frío a 100 V constantes por 1 h a 4°C.

La membrana se expuso a luz UV por 15 min en un fotodocumentador de 302 nm (Gel Doc™ XR Gel Documentation System) y se bloqueó con albumina bovina sérica al 3% en amortiguador STMT (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 1M, MgCl_2 2 mM, Tritón X-100 0.05%) por 1 h a 37°C. Posteriormente se añadió estreptavidina acoplada a peroxidasa (Invitrogen: 1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a una dilución de 1:1250 en el mismo amortiguador y se incubó por 1 h a TA cubierta de luz. Posteriormente las membranas se lavaron 5 veces con amortiguador STMT y se revelaron por color (1-Step™ Ultra TMB-Blotting Solution, Thermo scientific), según las instrucciones del fabricante.

Para el ensayo de competitividad se empleó la sonda sin marca de biotina (MRE frío) y la sonda trunca sin marca, ambos a una concentración de 25 y 50X. Las sondas no marcadas se incubaron durante 15 min a 4°C con la mezcla de reacción antes de añadir las sondas marcadas. Como condiciones de alto zinc se le añadió una concentración final de 5µM de sulfato de Zn a la mezcla de reacción previo a la incubación con la sonda.

5.5. Ensayo de entrecruzamiento con UV.

El ensayo de entrecruzamiento con UV es un método estándar utilizado para detectar la interacción proteína-ácido nucleico. Este método aprovecha la irradiación UV para desencadenar la formación del complejo RNP (ribonucleoproteína) unido covalentemente que es más estable y hace posible aislarse en las condiciones desnaturalizantes. Los complejos de oligorribonucleótido-proteína se analizan mediante SDS-PAGE, y las señales se visualizan mediante autorradiografía de las emisiones producidas por el ³²P o por la visualización de bandas de precipitado insoluble de complejos biotina-sustrato de acuerdo al método de marcaje empleado.³⁸

El ensayo de entrecruzamiento se realizó de la siguiente manera: 50 µg de extractos nucleares se incubaron por 10 min TA con el amortiguador de unión a una concentración final de 1X (Hepes, pH 7.5 2 mM, MgCl₂ 0.2 mM, DTT 0.2 mM, KCl 0.8 mM, glicerol 0.8 %). Después se añadió 20 fmoles de las sondas marcadas con biotina y se incubaron por 30 min a 4°C. La mezcla se irradió con luz UV por 15 min a TA en un fotodocumentador de 302 nm (Gel Doc™ XR Gel Documentation System). A continuación, se le añadió 5 µL de amortiguador de muestra para electroforesis (Laemli) y se hirvieron por 5 min. Finalmente se resolvieron en geles de SDS-PAGE al 15% 1.5 Hrs a 100V constantes a una temperatura de 25°C y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa en cámara húmeda. Las membranas se bloquearon con leche al 5% en amortiguador EB (Hepes 10 mM pH 7.6, MgCl₂ 3 mM, KCl 40 mM, DTT 0.5mM, Np40 4% y glicerol 5%) a 4°C por 18 h y se lavaron 5 veces con amortiguador EB. La membrana llevo un segundo bloqueo con albumina bovina sérica al 3% en amortiguador STMT (Tris-HCl 10 mM pH 7.5,

NaCl 1M, MgCl₂ 2 mM. Tritón X-100 0.05%) por 1 h a 37°C. Enseguida a la membrana se le añadió estreptavidina acoplada a peroxidasa (Invitrogen: 1.25 µg/µL) a una dilución de 1:1250 en el mismo amortiguador, por 1 h a TA cubierta de Luz. Posteriormente las membranas se lavaron 5 veces con amortiguador STMT y se revelaron por color (1-Step™ Ultra TMB-Blotting Solution, Thermo Scientific), según las condiciones del fabricante.³⁶

VI. RESULTADOS

6.1. Búsqueda de las secuencias MRE *in silico*.

Con el fin de obtener una perspectiva del posible mecanismo de regulación asociado a los genes tipo *ZIP* de *T. vaginalis* cuya expresión a nivel transcrito es regulada por Zn, según lo reportado por Fernández-Martín y cols.,²⁵ se analizaron las regiones codificantes de los genes *TvZIP 1, 3, 5 y 7*. En este análisis, llevado a cabo con el software MEME suite, comparamos las 4 secuencias codificantes de los genes *TvZIP* con la secuencia consenso y “core” del MRE de ratón, encontrando una coincidencia en las regiones codificantes de los genes analizados. En los genes que codifican para *TvZIP 1 y 7* la secuencia se encontraba en las hebras codificantes en posiciones similares a partir del codón de inicio con una identidad del 80% aproximadamente entre ellas y de 73% con respecto a la secuencia consenso introducida (Figura 7a y cuadro 5). Con respecto a los genes que codifican para *TvZIP 3 y 5* se encontraron en la hebra complementaria, ambos en la misma posición con referencia al codón de inicio mostrando una identidad del 100% entre ellas y en un 73% aproximadamente en comparación a la secuencia consenso introducida (Figura 7a y cuadro 5). Debido a la elevada similitud que tienen ambas secuencias entre sí, se tomó la decisión de diseñar la sonda en base a la secuencia encontrada en el *TvZIP 3 y 5*.

Cuadro 5. Secuencias encontradas mediante el análisis *in silico*.

NOMBRE	SECUENCIA	PORCENTAJE IDENTIDAD CON CONSENSO	DE CON EL
<i>TVMREZIP1</i>	TTGAGCATCTC	73%	
<i>TVMREZIP3</i>	TTGAGCATCAC	73%	
<i>TVMREZIP5</i>	TTGAGCATCAC	73%	
<i>TVMREZIP7</i>	GTGAGCATGAC	73%	
CORE CONSENSO	TTGCGCATGGC		

En la figura 7b podemos observar a mayor detalle la secuencia generada por el software que mayor porcentaje de similitud tenía con la secuencia consenso, esta imagen representa en letras de mayor tamaño las pares de bases que coinciden en todas las secuencias. La localización en las secuencias de los genes se ejemplifica de manera más gráfica en la figura 8.

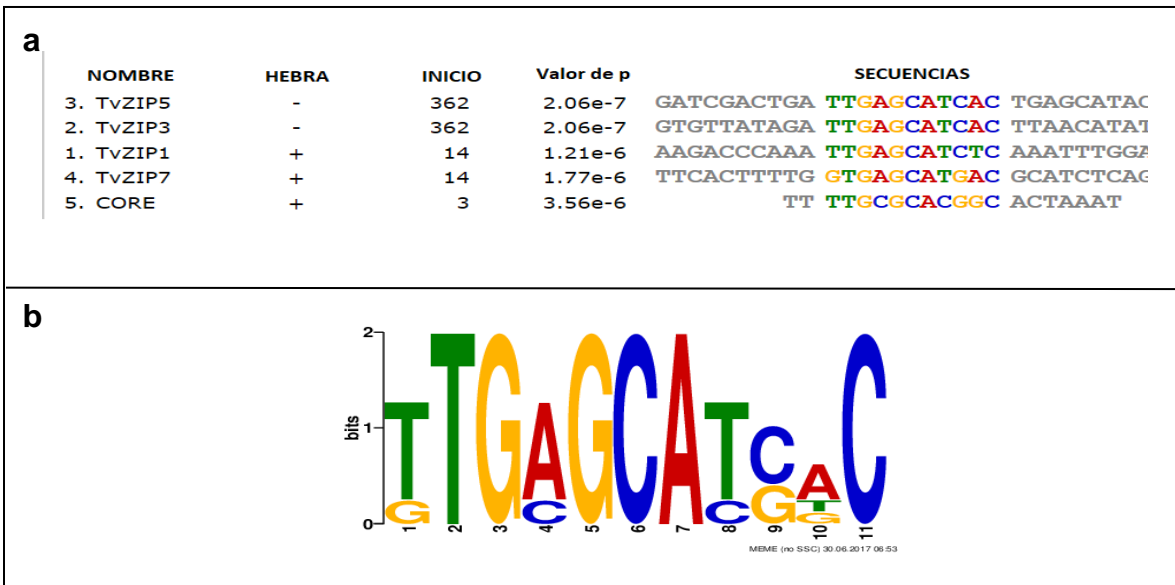


Figura 7.- Análisis *in silico* para la búsqueda de elementos reguladores de metales en los genes que codifican para proteínas tipo ZIP a) Localización del motivo similar a MRE en las regiones codificantes de los genes ZIP, ubicación con respecto a la hebra y la distancia a partir del codón de inicio. b) Motivo encontrado con el análisis del software MEME suite que concuerda con la secuencia consenso del MRE se puede observar que al menos 5 de las 7 pares de bases que se encuentran de la posición 2 a la 8 coinciden entre las secuencias de *T. vaginalis*.

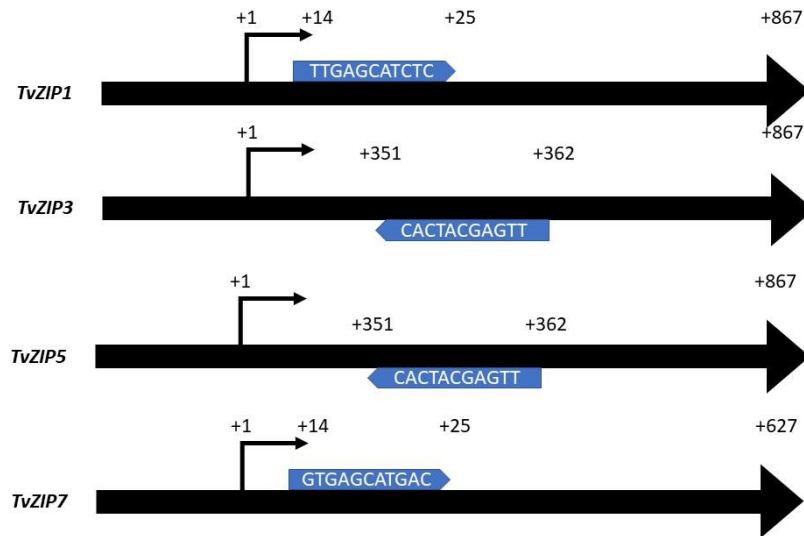


Figura 8.- Localización en las regiones codificantes de los TvMREs encontrados por el análisis *in silico*. Se puede observar que en el *TvZIP1* y *7*, el elemento de regulación se encuentra en el sentido de la hebra y se encuentra en ambos en la misma posición, en el caso de *TvZIP3* y *5*, se encuentran en la hebra complementaria encontrándose ambos en la misma posición y teniendo exactamente la misma secuencia para ambos.

6.2. Ensayos de retardamiento electroforético.

Para determinar la capacidad de las secuencias MRE identificadas de interactuar con proteínas tipo MTF-1 presentes en las células eucariotas, se realizaron ensayos de retardo electroforético. Primero, realizamos el retardo control empleando la sonda MRE-ratón en presencia de extractos nucleares provenientes del mismo organismo (Figura 9), apreciando la formación de un complejo. En el carril 1 se observa la sonda libre sin formación de complejos, en el carril 2 el MRE de ratón con extractos proteicos suplementados con Zn en donde se observa la formación de un complejo de mayor intensidad. En el carril 3 extractos MRE de ratón con extractos proteicos en ausencia de Zn en los cuales disminuye de intensidad las bandas y se observa la presencia de una banda secundaria con un poco más de retardamiento, y en el último carril la mezcla de EMSA tratada con DNAsa y proteinasa K se observa disminución de la sonda libre y la desaparición de la banda de complejo.

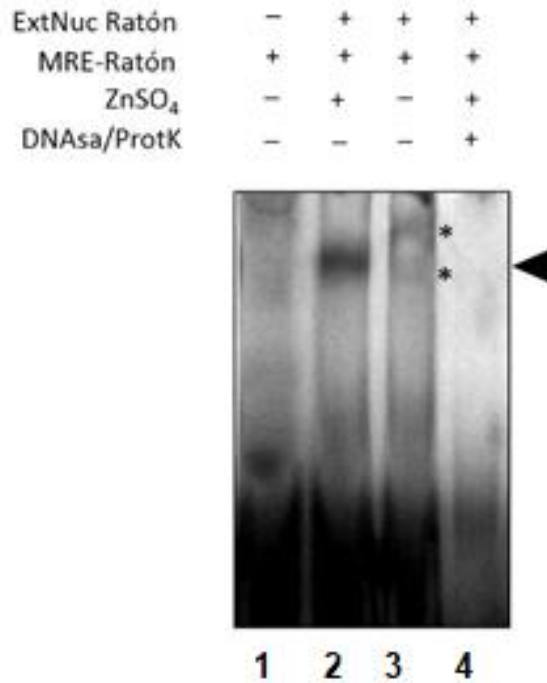


Figura 9. La formación de complejos DNA/proteína entre las secuencias MRE ratón con los extractos proteicos nucleares de ratón se ve afectada por zinc. En el carril 1 se observa la sonda libre, en el carril 2 el MRE de ratón con extractos proteicos suplementados con Zn⁺², en el carril 3 extractos MRE de ratón con extractos proteicos sin Zn⁺² y en el carril 4 mezcla de EMSA tratada con DNAsa y proteinasa K. La cabeza de flecha indica la altura a la que se encuentran las bandas.

Para demostrar la funcionalidad de la secuencia encontrada en los genes *TvZIP3,5*, se realizaron los experimentos siguiendo las mismas condiciones de interacción que en el sistema heterólogo, en este caso se encontró la formación de un complejo entre los extractos nucleares del ratón y la secuencia tipo MRE (*TvMRE3-5*) encontrada en los genes *ZIP* de *T. vaginalis* que migra a la misma distancia que el complejo formado con el MRE-ratón. Esto nos indica un comportamiento similar en el sistema heterólogo según lo descrito por otros investigadores y lo obtenido con el sistema homólogo de ratón.^{31,35}

Con respecto a las concentraciones de Zn en el sistema MRE *TvZIP3-5*/ extractos nucleares de ratón se observa la aparición de una banda de aspecto más intenso que en presencia de Zn que en ausencia de este, además a la par de ese experimento se realizaron las mezclas con la sonda mutada, observándose la

ausencia de complejos en todas las mezclas (Figura 10), indicando la especificidad de la unión ADN/Proteína.

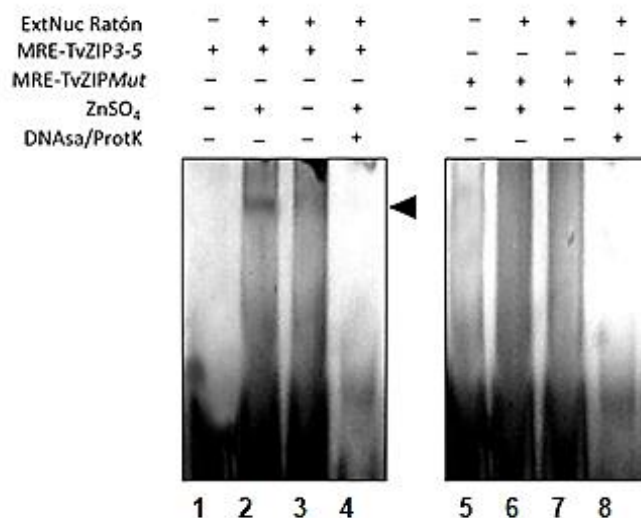


Figura 10. Formación de complejos DNA/proteína entre las secuencias MRE TvZIP3-5 con los extractos proteicos nucleares de ratón. En el carril 1 se observa la sonda libre, en el carril 2 el MRE TvZIP3-5 con extractos proteicos suplementados con Zn, en el carril 3 extractos MRE de ratón con extractos proteicos sin Zn y en el carril 4 mezcla de EMSA tratada con DNAsa y proteinasa K. Carril 5 se encuentra la sonda TvZIPMut como sonda libre, en el carril 6 y 7 la sonda con extractos proteicos con y sin Zn respectivamente y en el carril 8 la mezcla de EMSA tratada con DNAsa y proteinasa K.

En los ensayos de competitividad se emplearon para en MRE de ratón la sonda fría de MRE TvZIP3-5 a 25 y 50 X observándose la disminución de la intensidad de la banda del complejo con el aumento del competidor frío (Figura 11). En el carril 1 se observa la sonda libre, en el carril 2 el MRE-Ratón con extractos proteicos con la banda característica del complejo a una intensidad mayor, en el carril 3 extractos MRE-Ratón con extractos proteicos en competencia con exceso molar de 25 X del MRE TvZIP3-5 se aprecia la disminución de la intensidad de la banda y en el carril 4 extractos MRE de ratón con extractos proteicos en competencia con exceso molar de 50 X del MRE TvZIP3-5 se puede apreciar la desaparición total de la banda referente al complejo.

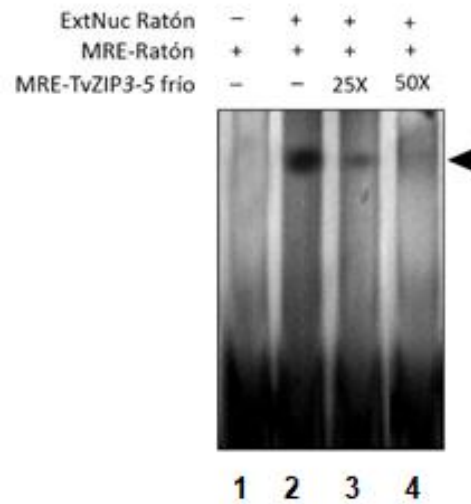


Figura 11. Ensayo de competitividad con sonda fría para MRE de Ratón. En el carril 1 se observa la sonda libre, en el carril 2 el MRE-Ratón con extractos proteicos, en el carril 3 extractos MRE-Ratón con extractos proteicos en competencia con exceso molar de 25 X del MRE TvZIP3-5 y en el carril 4 extractos MRE de ratón con extractos proteicos en competencia con exceso molar de 50 X del MRE TvZIP3-5.

Para el ensayo de competitividad con la sonda MRE TvZIP3-5 se empleó la misma sonda fría a unas concentraciones de 25 y 50 X (Figura 12). En el carril 1 se observa la sonda libre, en el carril 2 el MRE TvZIP3-5 con extractos proteicos con la aparición de una banda de mayor intensidad, en el carril 3 extractos MRE TvZIP3-5 con extractos proteicos en competencia con exceso molar de 25 X del MRE TvZIP3-5 sin marcar se puede apreciar la disminución de la banda que indica el complejo y en el carril 4 extractos MRE TvZIP3-5 con extractos proteicos en competencia con exceso molar de 50 X del MRE TvZIP3-5 sin marcar se puede apreciar la desaparición de la banda, debido a la competitividad por la formación del complejo.

Por último, se realizó el ensayo de competitividad con la sonda trunca en la mezcla del MRE TvZIP3-5 observándose la especificidad de la unión entre el complejo proteico y la sonda del parásito (Figura 13). En el carril 1 se observa la sonda libre, en el carril 2 el MRE TvZIP3-5 con extractos proteicos se puede apreciar la aparición de la banda indicando el complejo, en el carril 3 extractos MRE TvZIP3-5 con extractos proteicos en competencia con exceso molar de 25 X del MRE TvZIPMut

sin marcar y en el carril 4 extractos MRE TvZIP3-5 con extractos proteicos en competencia con exceso molar de 50 X del MRE TvZIPMut sin marcar. En este caso se observa la conservación de las bandas aun con el exceso 50 X lo que indica la especificidad de la o las proteínas involucradas en la formación del complejo DNA/proteína.

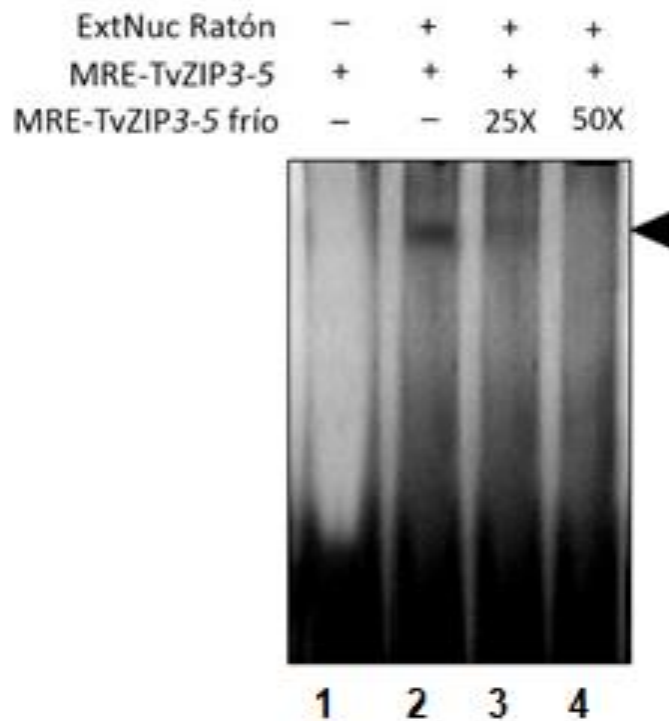


Figura 12. Ensayo de competitividad con sonda fría para el MRE TvZIP3-5. En el carril 1 se observa la sonda libre, en el carril 2 el MRE TvZIP3-5 con extractos proteicos, en el carril 3 extractos MRE TvZIP3-5 con extractos proteicos en competencia con exceso molar de 25 X del MRE TvZIP3-5 sin marcar y en el carril 4 extractos MRE TvZIP3-5 con extractos proteicos en competencia con exceso molar de 50 X del MRE TvZIP3-5 sin marcar.

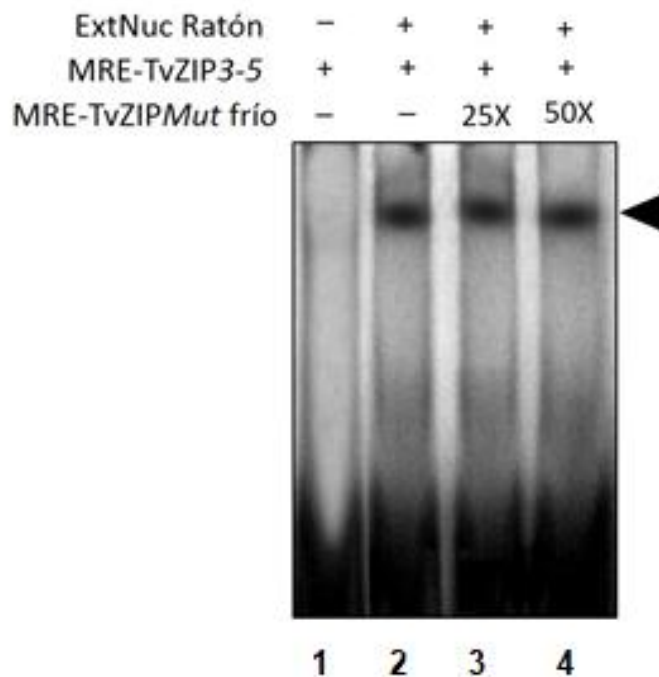


Figura 13. Ensayo de competitividad con sonda trunca para el MRE TvZIP3,5. En el carril 1 se observa la sonda libre, en el carril 2 el MRE TvZIP3-5 con extractos proteicos, en el carril 3 el MRE TvZIP3-5 con extractos proteicos en competencia con exceso molar de 25 X del MRE TvZIPMut sin marcar y en el carril 4 extractos MRE TvZIP3-5 con extractos proteicos en competencia con exceso molar de 50 X del MRE TvZIPMut sin marcar.

6.3. Ensayos de entrecruzamiento con luz UV.

Para los ensayos de entrecruzamiento con luz ultravioleta, los extractos nucleares de ratón se pusieron en interacción con la sonda (carril 3), como controles negativos se empleó la sonda libre (carril 2), se emplearon competidores fríos para demostrar la especificidad de la unión, MRE-Ratón (Carril 4), MRE TvZIP3-5 (carril5), MRE TvZIPMut (carril 6) y ADN inespecífico (carril 7) en un exceso molar de 50 X, además la muestra sin el tratamiento de entrecruzamiento (carril 8) y la muestra con el tratamiento previo de DNAsa y proteinasa K (Carril 9). Se puede observar que los complejos DNA/proteína se forman a la altura aproximada de 75 kDa como lo indica la flecha (Figura 13).

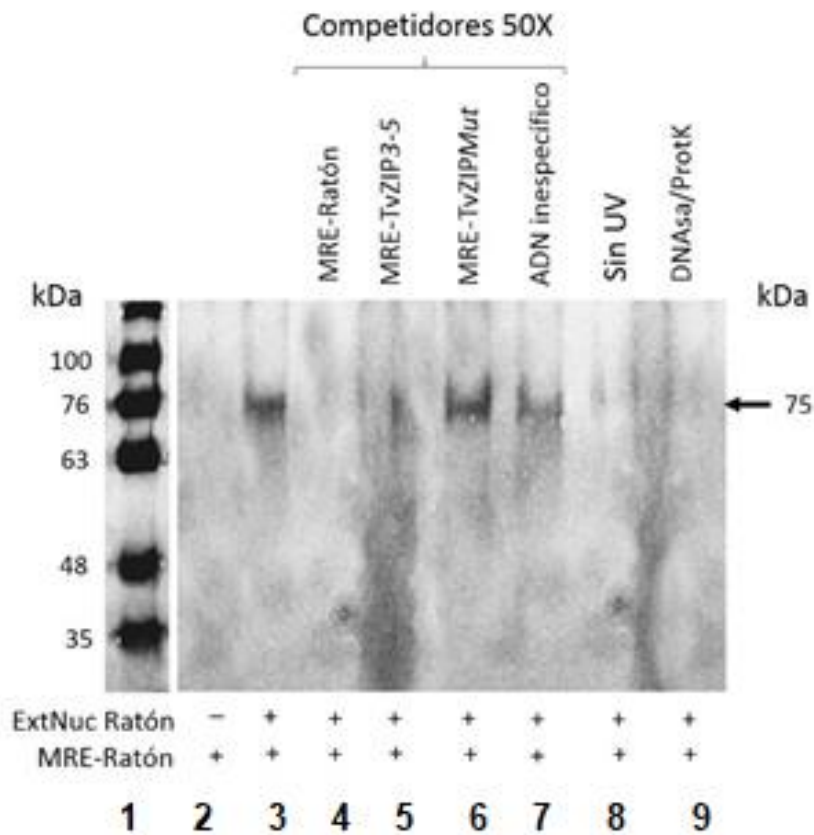


Figura 14. Ensayo de entrecruzamiento de los extractos nucleares de ratón con la sonda MRE-Ratón. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 sonda libre, carril 3 sonda de ratón con extractos nucleares de ratón, carril 4 sonda de ratón marcada con extractos nucleares en competencia con un exceso molar 50x de sonda de ratón sin marcar, carril 5 sonda de ratón marcada con extractos nucleares en competencia con un exceso molar 50x de sonda de *T. vaginalis* sin marcar, carril 6 sonda de ratón marcada con extractos nucleares en competencia con un exceso molar 50x de sonda mutada sin marcar, carril 7 sonda de ratón marcada con extractos nucleares en competencia con un exceso molar 50 x de ADN inespecífico, carril 8 sonda de ratón marcada con extractos nucleares sin exposición al UV, carril 9 sonda de ratón marcada con extractos nucleares con tratamiento de DNAsa y proteinasa K.

VII. DISCUSIONES.

El Zn es un microelemento esencial para los organismos vivos. Tiene un papel central como cofactor de numerosas enzimas y proteínas de unión a ADN. En el parásito protozoario *Trichomonas vaginalis* se han reportado una serie de genes que codifican para diversas proteínas de unión al Zn, además de presentar una dependencia directa del Zn para la expresión de algunos factores de virulencia.^{5,7} Sin embargo, a altas concentraciones, este elemento se ha reportado que es tóxico para *T. vaginalis*, por lo que se plantea pueda presentar un sistema de regulación dependiente de este metal, como lo presentan diversos organismos eucariotas.

El sistema de regulación MRE/MTF-1 es uno de los sistemas que se ha conservado a lo largo de los procesos evolutivos, debido a la descripción en diversos organismos de los elementos de ADN tipo MRE y a las proteínas de unión a los mismos de tipo MTF. En el presente trabajo se identificó al menos un motivo de tipo MRE en los genes que codifican para transportadores ZIP (*TvZIP 1, 3, 5 y 7*), que tienen una expresión diferencial a concentraciones moderadas y altas de Zn según lo reportado por Fernández-Martín²⁵. En este trabajo se muestran resultados concordantes con lo reportado para secuencias consenso de tipo MRE, con un alto porcentaje de similitud. Además la ubicación dentro de las secuencias génicas coincide con lo reportado por Dongling y cols.³² en cuyo estudio encontraron la presencia de MREs tanto en la secuencia codificante como en la secuencia complementaria de estos genes que codifican para proteínas tipo ZIP.

Tanto la identidad como la ubicación de estos elementos tipo MRE que encontramos en los genes ZIP que se regulan por Zn, sugieren la presencia de un mecanismo de regulación por represión de los genes a nivel transcripcional. Sin embargo, de igual manera se observa una diferencia considerable (más del 25%) entre la secuencia consenso reportada y las secuencias que encontramos en los genes de *T. vaginalis* lo que nos indicaría un motivo “tipo” MRE (MRE-like) con características un poco distintas a lo reportado hasta el momento. Cabe mencionar que estos elementos de tipo MRE en *T. vaginalis* son los primeros en identificarse en genes de protozoarios primitivos. Antes del presente trabajo, el único organismo inferior en el que se había

identificado una secuencia de tipo MRE era en *Drosophila melanogaster*.³⁹ Con respecto a lo observado en los ensayos de retardamiento se puede inferir que existe una especificidad de la secuencia encontrada en el análisis *in silico* comprobada con los ensayos de competitividad con sonda fría y con sonda trunca. Este tipo de comportamiento coincide con lo descrito por diversos grupos de investigación, entre ellos Lichten y cols.³¹, Dongling y cols.³², Laity y cols.³³ y Fernández y cols.²⁵ donde se demuestra la unión de un complejo proteico a la secuencia consenso de ratón y una secuencia descrita en humano. Sin embargo, al realizar la comparación de la sonda mutada sin la secuencia principal completa no se puede observar la ausencia de interacción ADN-proteína.

También es interesante observar que los resultados de las interacciones ADN-proteína y los datos de competencia sugieren que la estructura *TvZIPMRE3,5* tiene una mayor afinidad para las proteínas de las células murinas que el propio MRE de ratón. Por lo tanto, esta nueva secuencia de tipo MRE de los genes *TvZIP3* y *5* puede representar una nueva secuencia MRE encontrada de modo natural relacionada con la homeostasis del Zn que podría regularse mediante interacciones de ADN-proteína mediadas por sistemas similares a MRE/MTF-1, como se ha descrito en otros organismos.^{31,32,40}

Complementando los ensayos de retardo electroforético se realizaron los ensayos de entrecruzamiento en los cuales lo encontrado en el presente trabajo, coincide con lo reportado por Potter y cols.³⁵ y Laity y cols.³³ donde una proteína de aproximadamente 75 kDa que está caracterizada como un factor de transcripción de metales (MTF-1) en ratones, presenta una alta afinidad por los MREs. Estos resultados son muy importantes ya que el comportamiento de la secuencia identificada en los genes tipo *ZIP* de *Trichomonas vaginalis* y la afinidad hacia la proteína de 75 kDa de ratón ayuda a precisar sobre el mecanismo de regulación presente en este tipo de genes en respuesta a un estrés con Zn y coincide con lo reportado previamente para la caracterización de los MTF-1-like y de los MREs. Para *T. vaginalis*, la unión de una proteína de tipo MTF proveniente de un organismo eucariota superior (roedor) a la nueva secuencia tipo MRE identificada en las

secuencias génicas de *TvZIP*, sugiere la existencia de un mecanismo de regulación transcripcional mediado por Zn. Nuestro modelo sugiere que ante la presencia de un alto contenido de Zn, una proteína MTF-like (aún por identificar en *T. vaginalis*) se une al elemento MRE-like identificado de los genes *TvZIP* inhibiendo la síntesis del ARNm de los ZIP, en los cuales de los 8 reportados, 4 contienen secuencias que indican represión en presencia de concentraciones altas de este metal^{25,41-43} y por ende reduciendo su expresión para así evitar se traduzcan mayores cantidades de *TvZIP* (Figura 15). Este modelo es consistente con nuestros datos experimentales y respalda la sugerencia de un sistema regulador de Zn en *T. vaginalis*, similar al que se ha identificado en ZIP10. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que un sistema regulador de Zn similar al MRE/MTF-1 se identifica en *Trichomonas vaginalis* y en protozoarios.

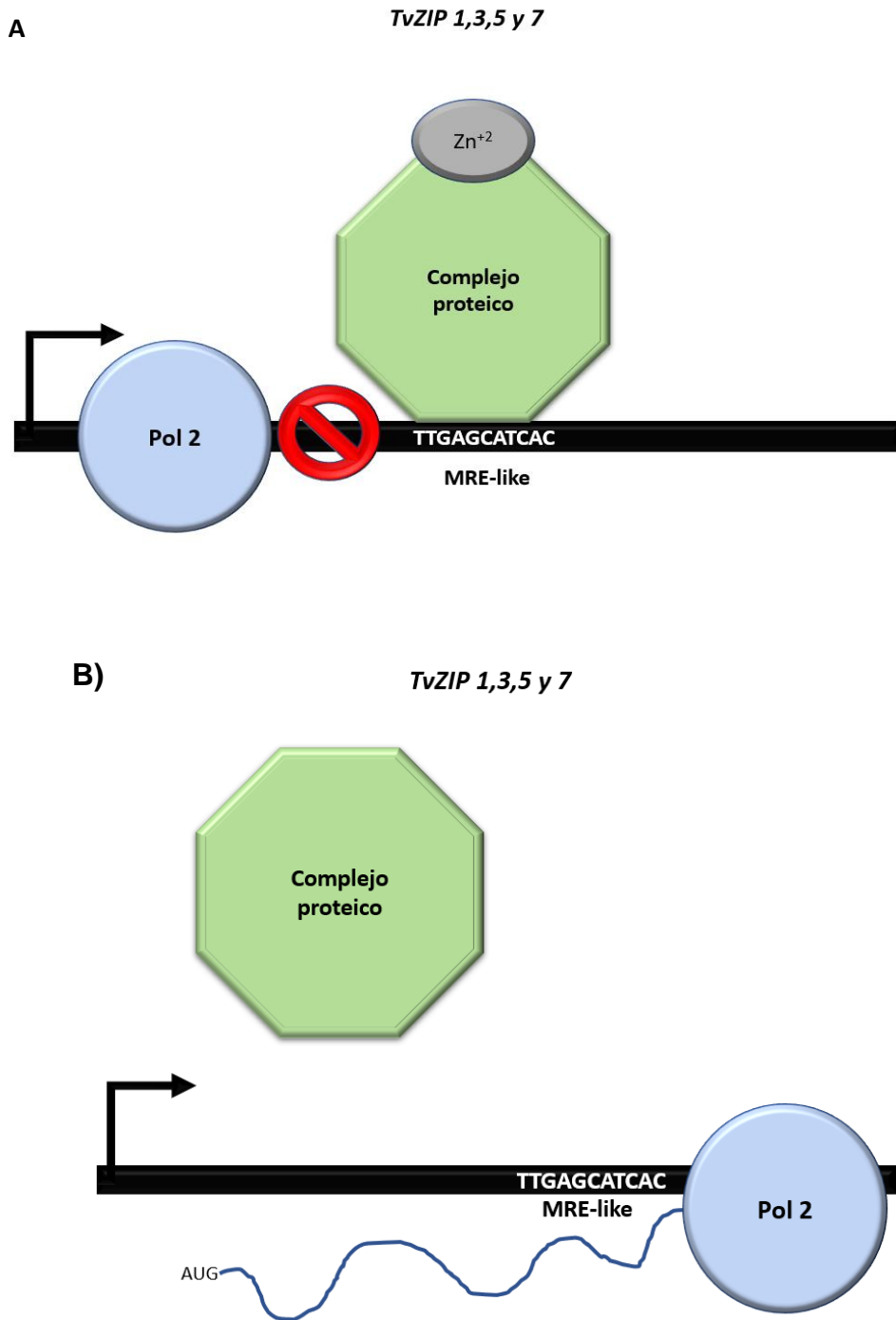


Figura 15. Representación esquemática del mecanismo de regulación negativa propuesto. Tomando como base los resultados obtenidos proponemos el siguiente mecanismo de regulación negativa para los genes que contienen MREs en la región codificante para *T. vaginalis*. A) en condiciones altas de Zn el complejo proteico o proteína se activa y reconoce la secuencia MRE evitando por impedimento estérico que se transcriba el gen. B) en condiciones bajas de Zn el complejo proteico o proteína se encuentra inactiva y no hay reconocimiento de la secuencia MRE.

VIII. CONCLUSIONES.

Se identificó al menos 1 secuencia con 75% de identidad a elementos de respuesta a metales (MRE), presentes en las regiones codificantes de los genes de posibles transportadores de Zn en *T. vaginalis*: *TvZIP 1,3 5 y 7*.

Se caracterizó de manera parcial la unión del motivo MRE-*TvZIP3-5* de *T. vaginalis* en presencia de extractos nucleicos provenientes de ratón, comprobando su afinidad hacia proteínas específicas en una interacción heteróloga.

El motivo MRE-*TvZIP3-5* de *T. vaginalis* es capaz de unirse a una proteína de 75 kDa proveniente de los extractos de ratón, con un peso similar al reportado para el MTF-1 del roedor.

Los resultados en conjunto nos sugieren la presencia de un mecanismo de regulación por Zn tipo MRE/MTF-1 de regulación negativa, identificado por primera vez en un parásito protozoario.

IX. PERSPECTIVAS

Realizar la búsqueda y caracterización bioinformática por medio de BLAST y alineamientos múltiples con diversas secuencias de otros organismos de la proteína tipo MTF en *T. vaginalis*.

Obtener de manera recombinante la proteína y demostrar la interacción homóloga entre los elementos MRE identificados mediante ensayos de retardo electroforético y ensayos de entrecruzamiento con luz UV.

Caracterizar el mecanismo de MRE/MTF de *T. vaginalis* por ensayos *in vitro* con condiciones fluctuantes de Zn en el cultivo parasitario.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. CDC (Centers for Prevention and Control). Trichomoniasis: hoja informativa. <http://www.cdc.gov/std/spanish/tricomoniasis/stdfact-trichomoniasis-s.htm>.
2. WHO (World Health Organization). Sexually transmitted infections (STIs). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en>.
3. Alvarez HMM, Ramos IS, Pérez JS. Infección humana por *Trichomonas vaginalis* y su relación con otros agentes patógenos. *Rev Cuba Obstet y Ginecol*. 2009;35(4):108-117.
4. Diéguez IS. Tricomoniasis: Una vision amplia. *Iatreia*. 2014;27(2):198-205.
5. Costamagna SR, & Figueroa MP. On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes. *Parasitol al día*. 2001;25(3-4):100-108. doi:10.4067/S0716-07202001000300006.
6. Muller M. Review Article: The hydrogenosome. *J Gen Microbiol*. 1993;139(12):2879-2889. doi:10.1099/00221287-139-12-2879.
7. Figueroa-Angulo EE, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, et al. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect*. 2012;14(15):1411-1427. doi:10.1016/j.micinf.2012.09.004.
8. Alderete JF, Benchimol M, Lehker MW, Crouch M-L. The complex fibronectin *Trichomonas vaginalis*, Interactions and Trichomonosis. *Parasitol Int*. 2002;51(3):285-292.
9. Cavalier-Smith T. Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*. 1987;326(6111):332-333. doi:10.1038/326332a0.
10. Upcroft P, Upcroft JA. Organization and structure of the giardia genome. *Protist*. 1999;150(1):17-23. doi:10.1016/S1434-4610(99)70005-2.
11. Upcroft P, Upcroft J a. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(1):150-164.

doi:10.1128/CMR.14.1.150.

12. González-Salazar F, Garza-González JN, Hernandez-Luna CE, et al. Sphingomyelinase activity of *Trichomonas vaginalis* extract and subfractions. *Biomed Res Int*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/679365.
13. Rojas L, Loop A, et al. Trichomonas. en: *Microbiología y Parasitología Médicas*. ed Ciencias Médicas, la Habana, Cuba, 2001.
14. Lehker MW, Arroyo R, Alderete JF. The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J Exp Med*. 1991;174(2):311-318. doi:10.1084/jem.174.2.311.
15. Moreno-Brito V, Yáñez-Gómez C, Meza-Cervantez P, et al. A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cell Microbiol*. 2005;7(2):245-258. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00455.x.
16. Mendoza-lópez MR, Becerril-garcia C, Avila-gonzalez L, et al. CP30 , a Cysteine Proteínase Involved in *Trichomonas vaginalis* Cytoadherence CP30 , a Cysteine Proteínase Involved in *Trichomonas vaginalis* Cytoadherence. 2000;68(9):4907-4912. doi:10.1128/IAI.68.9.4907-4912.2000.Updated.
17. De Jesus JB, Cuervo P, Junqueira M, et al. A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics*. 2007;7(12):1961-1972. doi:10.1002/pmic.200600797.
18. Quintas-Granados LI, Villalpando JL, Vázquez-Carrillo LI, Arroyo R, Mendoza-Hernández G, Álvarez-Sánchez ME. TvMP50 is an Immunogenic MetalloProteínase during Male Trichomoniasis. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12(7):1953-1964. doi:10.1074/mcp.M112.022012.
19. Dyall SD, Lester DC, Schneider RE, et al. *Trichomonas vaginalis* Hmp35, a putative pore-forming hydrogenosomal membrane protein, can form a complex in yeast mitochondria. *J Biol Chem*. 2003;278(33):30548-30561.

doi:10.1074/jbc.M304032200.

20. Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93(11):5624-5628. doi:10.1073/pnas.93.11.5624.
21. Zhao H, Eide D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(6):2454-2458. doi:10.1073/pnas.93.6.2454.
22. Zhao H, Eide D. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1996;271(38):23203-23210. doi:10.1074/jbc.271.38.23203.
23. Eng BH, Guerinot ML, Eide D, Saier MH. Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *J Membr Biol*. 1998;166(1):1-7. doi:10.1007/s002329900442.
24. Paulsen IT, Saier Jr. MH. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol*. 1997;156(2):99-103. doi:10.1007/s002329900192.
25. Fernández-Martín KG, Alvarez-Sánchez ME, Arana-Argáez VE, Alvarez-Sánchez LC, Lara-Riegos JC, Torres-Romero JC. Genome-wide identification, *in silico* characterization and expression analysis of ZIP-like genes from *Trichomonas vaginalis* in response to Zinc and Iron. *BioMetals*. 2017:1-13. doi:10.1007/s10534-017-0034-x.
26. Zhao H, Eide DJ. Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1997;17(9):5044-5052. doi:10.1128/MCB.17.9.5044.
27. H, Zhao, E Butler, Rodgers J, Spizzo T, Duesterhoeft S EE. Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc responsive elements. *J Biol Chem*. 1998;273(44):7.

doi:10.1074/jbc.273.44.28713.

28. Espinosa JM, Portal D, Lobo GS, et al. *Trypanosoma cruzi* poly-zinc finger protein: A novel DNA/RNA-binding CCHC-zinc finger protein. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;131(1):35-44. doi:10.1016/S0166-6851(03)00187-7.
29. Coneyworth LJ, Jackson KA, Tysons J, et al. Identification of the human zinc transcriptional regulatory element (ZTRE): A palindromic protein-binding DNA sequence responsible for zinc-induced transcriptional repression. *J Biol Chem.* 2012;287(43):36567-36581. doi:10.1074/jbc.M112.397000.
30. Deshpande AM, Newlon CS. The ARS consensus sequence is required for chromosomal origin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1992;12(10):4305-4313. doi:10.1128/MCB.12.10.4305.Updated.
31. Lichten LA, Ryu MS, Guo L, Embury J, Cousins RJ. MTF-1-mediated repression of the Zinc transporter Zip10 is alleviated by Zinc restriction. *PLoS One.* 2011;6(6):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0021526.
32. Zheng D, Feeney GP, Kille P, Hogstrand C. Regulation of ZIP and ZnT zinc transporters in zebrafish gill: zinc repression of ZIP10 transcription by an intronic MRE cluster. *Physiol Genomics.* 2008;34(2):205-214. doi:10.1152/physiolgenomics.90206.2008.
33. Laity JH, Andrews GK. Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1). *Arch Biochem Biophys.* 2007;463(2):201-210. doi:10.1016/j.abb.2007.03.019.
34. Radtke F, Heuchel R, Georgiev O, et al. Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *EMBO J.* 1993;12(4):1355-1362.
35. Potter BM, Feng LS, Parasuram P, et al. The six zinc fingers of metal-responsive element binding transcription factor-1 form stable and quasi-ordered structures with relatively small differences in zinc affinities. *J Biol*

- Chem.* 2005;280(31):28529-28540. doi:10.1074/jbc.M505217200.
36. Torres-Romero JC. Analisis de las estructuras IRE y caracterización de una de las Proteínas tipo IRP de *Trichomonas vaginalis*. (Tesis doctoral) CINVESTAV, México, 2010.
 37. Smith MF. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). In: *Colorectal Cancer. Methods in Molecular Medicine*. ed. Press H, Charlottesville, 2001.
 38. Ying-Wen H, Hsu Y-H. UV Cross-linking Assay and Competition Assay. *Bio Protoc.* 2012;2:3-8.
 39. Günther V, Lindert U, Schaffner W. The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2012;1823(9):1416-1425. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.01.005.
 40. Li S, Zhou X, Huang Y, et al. Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (*ZIP*) gene family in maize. *BMC Plant Biol.* 2013;13(1):114. doi:10.1186/1471-2229-13-114.
 41. Stoytcheva ZR, Vladimirov V, Douet V, Stoychev I, Berry MJ. Metal transcription factor-1 regulation via MREs in the transcribed regions of selenoprotein H and other metal-responsive genes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2010;1800(3):416-424. doi:10.1016/j.bbagen.2009.11.003.
 42. Giedroc DP, Chen X, Apuy JL. Metal Response Element (MRE)-Binding Transcription Factor-1 (MTF-1): Structure, Function, and Regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2001;3(4):577-596. doi:10.1089/15230860152542943.
 43. Wang Y, Lorenzi I, Georgiev O, Schaffner W. Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) selects different types of metal response elements at low vs. high zinc concentration. *Biol Chem.* 2004;385(7):623-632. doi:10.1515/BC.2004.077.