

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA CISTEÍN PROTEINASA RECOMBINANTE TvCP4 DE *T. vaginalis*.

¹Cárdenas-Guerra, R. E.; ²Arroyo, R.; ³Brieba De Castro, L.; ¹Ortega-López, J. †

¹Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, ²Departamento de Patología Experimental, ³Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N, Av. Politécnico Nacional 2508 Col. San Pedro Zacatenco, 07360 México, D.F. Tel: 50613800, Fax: 50613313

†Autor para correspondencia: jortega@cinvestav.mx.

Palabras clave: *Trichomonas vaginalis*, Cisteín-proteinasas, CP4.

Introducción. A nivel mundial existe un incremento de las Enfermedades de Transmisión Sexual entre las que se encuentra la Tricomonosis. Esta enfermedad es causada por el parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*. Este parásito posee múltiples proteinasas, en su mayoría del tipo cisteín proteinasas (CP) que desempeñan un papel importante en la interacción huésped-parásito (1). Recientemente se clonó y secuenció el precursor de una CP de 33.8 kDa denominada TvCP4 (2). El análisis de su secuencia muestran un predominio de 25 aminoácidos (aa), un propéptido de 61 aa y un dominio catalítico de 219 aa que contiene la tríada catalítica (C25, H159, N175) típica de las CPs tipo papaína del clan CA. La TvCP4 contiene “el motif” ERFNIN en la región pro y el subsitio S2 (NKCGGVATMAFVP) por lo que se ha clasificado como una catepsina L (3). A través de ensayos de retardo y entrecruzamiento se demostró que el RNAm de la TvCP4 interacciona específicamente con la IRP (Iron Binding Protein) humana y con proteínas tipo IRP; primer reporte de este tipo de regulación por hierro en *T. vaginalis* y se ha sugerido que la TvCP4 puede causar apoptosis a las células del epitelio vaginal (4).

Para determinar el papel que la TvCP4 pudiera tener en el proceso citopatogénico de *T. vaginalis*, se necesita realizar estudios bioquímicos y dada la dificultad para purificar la TvCP4 a partir del parásito, en este trabajo se clonó, expresó y purificó la TvCP4 recombinante.

Metodología. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR la región completa de 915 pb, pro-madura de 840 pb, madura de 657 pb y el fragmento pre-pro de 258 pb del gen *tvcp4*. Los productos amplificados se ligaron al vector de expresión pCold I en los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III. Con el DNA plasmídico de clonas positivas para cada construcción se transformaron células competentes BL21(DE3). Se comprobó la expresión de las proteínas recombinantes induciendo las clonas seleccionadas con IPTG 1mM a 37° C por 16 h. El análisis de la expresión se realizó por SDS-PAGE y ensayos Western blot utilizando los anticuerpos anti-CP4 y anti-histidina.

Resultados y discusión. Se realizó una doble digestión del DNA plasmídico de clonas seleccionadas de cada construcción para confirmar la liberación del inserto respectivo. Posteriormente se eligió una clona positiva por construcción para comprobar la expresión de la proteína recombinante. En la figura 1 se muestra el perfil electroforético de los extractos de *E. coli* antes y después de 16 h de inducción a 37° C. En todos los casos se observa claramente la sobreexpresión de una proteína con

peso molecular aparente de 37 (carril 3, A), 34 (carril 5, A), 27.5 (carril 7, A) y 13 (carril 3, B) kDa que corresponde al tamaño del fragmento esperado de la TvCP4 completa promadura madura y del fragmento pre-pro respectivamente (Fig.1). Por otra parte, los ensayos de tipo Western blot con el anticuerpos anti-CP4 y anti-histidina confirmaron que las proteínas sobreexpresadas corresponden a la TvCP4 de *T. vaginalis*.

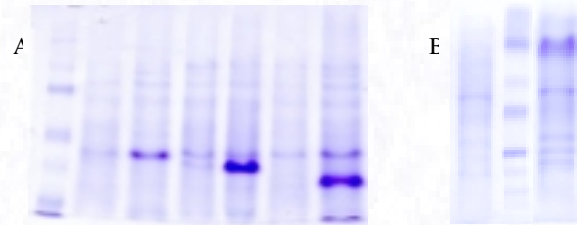


Fig.1. Análisis en SDS-PAGE 12% (A) y al 15 % (B) de expresión de proteínas recombinantes de la TvCP4 en extracto *E.coli*. Carril 1: marcador de amplio rango. Carril 2, 4 y 6: tiempo cero de fragmento completa, promadura, madura. Carril 3, 5, 7: inducción a las 16 h de fragmento completa, promadura, madura. B) Carril 1: marcador de amplio rango. Carril 2: tiempo cero de fragmento Carril 3: inducción a las 16 h de fragmento prepro.

Conclusiones. Se clonaron y expresaron en forma recombinante el fragmento pre-pro, la enzima madura, la proenzima y el precursor de la TvCP4 de *T. vaginalis*. Los ensayos tipo Western-blot indican que efectivamente las proteínas recombinantes corresponden a la TvCP4.

Agradecimiento.

Agradecemos al CINVESTAV-IPN y al CONACYT (proyecto. 40387-Z JOL y Beca 199879 RECG) por el apoyo para realizar este trabajo.

Bibliografía.

- Sajid, M., McKerrow, J. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120: 1-21.
- Solano, E. (2006). Clonación y caracterización de los genes de las cisteín proteinasas TvCP65 y TvCP4 de *Trichomonas vaginales* y el estudio del efecto del hierro en su expresión. Tesis Doctorado. Cinvestav. Mexico, DF.
- Mallinson, D., Lockwood, B., Coombs, G., North, M. (1994). Identification and molecular cloning of four cysteine proteinase genes from the pathogenic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Microbiol.* 140: 2725-2735.
- Sommer, U., Costello, C., Hayes, G., Beach, D., Gilbert, R., Lucas, J., Singh, B. (2005). Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal Epithelial Cells. *The JBC.* 280: 23853–23860