

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE UNA PROTEASA DE *Entamoeba histolytica* EN FUSIÓN TRADUCCIONAL CON UN DOMINIO DE UNIÓN A CELULOSA CON FINES DE INMUNODIAGNÓSTICO

Laura Itzel Quintas Granados^{1*}, Beatriz Xoconostle Cázares¹, Roberto Ruiz Medrano¹, Esther Orozco Orozco², Jaime Ortega López¹. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería y, ²Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV-I.P.N., fax 57473313, lquintas@mail.cinvestav.mx

Palabras clave: cisteín-proteasa, dominio de unión a celulosa, *E. histolytica*

Introducción. La amibiasis es una infección causada por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*. Se estima que el 10% de la población mundial se encuentra infectada (1). En México, ésta junto con otras enfermedades parásito infecciosas son la diecisieteava causa de muerte (2). El diagnóstico temprano de esta enfermedad, mediante un sistema de fácil uso, sensible y de bajo costo, sobre todo en pacientes asintomáticos, ayudaría a tratamientos adecuados, con lo que se evitaría que esta enfermedad se agudice. Entre las moléculas del parásito que intervienen en el proceso de daño, se ha identificado una cisteín-proteasa de 49 kDa localizada en la membrana del parásito y que participa en los mecanismos citolíticos. Esta cisteín-proteasa es inmunogénica, candidato para el desarrollo de nuevos métodos de inmunodiagnóstico. El gen *Ehcp112* que codifica esta proteína se clonó y secuenció recientemente (3). En el presente trabajo se realizó la fusión traduccional del gen *Ehcp112* (1.3 Kb) de *E. histolytica* con un dominio de unión a celulosa para su expresión, purificación e inmovilización en membranas de celulosa y su posterior uso como sistema de inmunodiagnóstico.

Metodología. Se partió del vector de expresión, pET38b+ (Novagen) que contiene el gen de un dominio de unión a celulosa (CBD) de 10.8 kDa de *Cellulomonas fimi* y de la clona pTrcHis2C-Ehcp112 que contiene el gen *Ehcp112*. El vector pET38b+ fue linearizado con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III (BioLabs) mediante una doble digestión secuencial, de la misma manera, el gen *Ehcp112* fue liberado con las mismas enzimas. La subclonación dirigida del gen *Ehcp112* en el vector pET38b+ se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del manual del vector (pET System Manual) manteniendo una proporción del inserto respecto al vector de 10:1. Con la mezcla de ligación se transformaron, células de *E. coli* genotipo *DH5*?. Las clonas candidatas fueron analizadas por PCR con los oligonucleótidos sentido (CBD_{Cex}) y antisentido (ASCBD_{Cex}) universales del vector. Las clonas seleccionadas por PCR fueron analizadas mediante una doble digestión secuencial con las enzimas *Hind*III y *Bam*HI para liberar el inserto. Posteriormente, se transformó la cepa *E. coli* BL21*pLys* para la expresión de la proteína recombinante. La inducción se realizó con IPTG 1mM por 4 horas. Finalmente, la proteína recombinante fue purificada por cromatografía de afinidad a celulosa.

Resultados y discusión. Posterior a la doble digestión secuencial con *Hind*III y *Bam*HI del vector pET38b+ y de la clona pTrcHis2C-Ehcp112, se ligó 1 ?g del inserto a 100 ng

del vector pET38b+. Enseguida se analizaron 11 clonas por PCR. En todas las clonas analizadas se amplificó un fragmento de 1.5 Kb con los oligonucleótidos CBD_{Cex} y ASCBD_{Cex}. El fragmento obtenido correspondió a la amplificación del gen *Ehcp112* (1.3 Kb) más 200 pb del vector pET38b+. Finalmente se seleccionó por restricción enzimática con *Hind*III y *Bam*HI una clona candidata para la expresión de la proteína recombinante. Esta clona, nombrada pET38b+-Ehcp112, liberó un inserto de 1.3 Kb correspondiente al tamaño del gen *Ehcp112* (figura 1). La proteína recombinante se expresó, purificó e inmovilizó en membranas de celulosa.

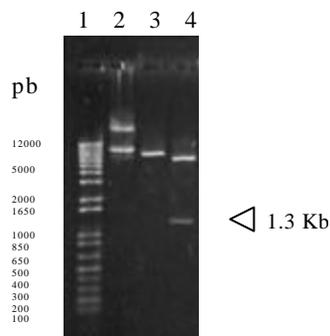


Figura 1: Perfil electroforético de la doble digestión secuencial de la clona pET38b+-Ehcp112. Carril 1) Marcadores de peso molecular, Carril 2) pET38b+-Ehcp112 sin digerir, Carril 3) pET38b+-Ehcp112 *Hind*III, Carril 4) pET38b+-Ehcp112 *Hind*III/*Bam*HI.

Conclusiones. La subclonación dirigida del gen *Ehcp112* en el vector de expresión pET38b+ fue exitosa con una proporción inserto:vector de 10 a 1. Se logró expresar una cisteín-proteasa recombinante de *E. histolytica*, la cual fue purificada e inmovilizada por afinidad a una matriz de celulosa, para su uso posterior en diagnóstico. La validación de este sistema como posible método de inmunodiagnóstico se realizará con sueros de pacientes.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado en parte por el CONACyT, proyecto 40387 JOL y beca 165515 LIQG.

Bibliografía.

- 1.WHO. (1997). Amoebiasis, *WHO Weekly Epidemiol Record*. 72:97-100.
- 2.DGIEDSS. (2001). Estadística de egresos hospitalarios de la Secretaría de Salud, 2000. *Salud Pública de Mex*. 43(5):494-510.
- 3.García Rivera, G., Rodríguez, M. A., Ocádiz, R., Martínez, M., Arroyo, R., González, A., Orozco, E. (1999). *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol Microb*. 33(3):556-568.