



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## EXPRESION HETEROLOGA Y PURIFICACION DE LA TVLEGU-1 DE TRICHOMONAS VAGINALIS EN PICHIA PASTORIS.

Gerardo Reséndiz-Cardiel<sup>1</sup>, Rossana Arroyo<sup>2</sup>, Juan Pedro Luna Arias<sup>3</sup> y Jaime Ortega-López<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, <sup>2</sup>Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, <sup>3</sup>Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, C.P.07360, México D.F., México. Correo electrónico: [gresendiz@hotmail.com](mailto:gresendiz@hotmail.com).

*Cisteín proteasas, legumainas, Trichomonas vaginalis.*

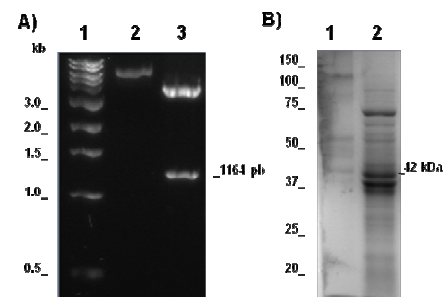
**Introducción.** Las asparaginil endopeptidasas o legumainas son una familia de cisteín proteasas (CPs) que se han encontrado en plantas, mamíferos y en parásitos como *Schistosoma* spp y recientemente en *Trichomonas vaginalis*. En *T. vaginalis* una de las legumainas, la TVLEGU-1, es una CP de la región de 30 kDa involucrada en la citoadherencia (1). Como otras CPs de *T. vaginalis* involucradas en la virulencia, TVLEGU-1 es regulada por hierro a nivel de la transcripción y traducción. Adicionalmente, por estudios de proteómica se obtuvo el degradoma de *T. vaginalis* y por ensayos tipo Western blot en dos dimensiones, utilizando sueros de pacientes con trichomonosis, se encontró que la TVLEGU-1 es una de las CPs más inmunogénicas, por lo que se considera como un potencial biomarcador para esta infección de transmisión sexual (2). Todo lo anterior indica que la caracterización bioquímica de esta CP ayudaría a entender la participación de esta proteína en la virulencia de *T. vaginalis*.

Como una primera etapa para lograr este objetivo, en este trabajo se usó la levadura *Pichia pastoris* X33 como sistema de expresión para obtener la TVLEGU-1 recombinante en forma soluble para su caracterización bioquímica y estructural.

**Metodología.** La amplificación del gen *tvlegu-1* se realizó a partir de DNA genómico de *T. vaginalis* como templado y los oligonucleótidos diseñados para amplificar el fragmento de DNA correspondiente al precursor de la TVLEGU-1. El fragmento amplificado se clonó en el plásmido de expresión pPICZα B que confiere resistencia a zeocina y se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* DH5α. Posteriormente el vector *pPICZα B-TVLEGU-1*, linearizado con la enzima de restricción *Sac* I (10 µg) y purificado, se utilizó para transformar la cepa X33 de *P. pastoris* como lo detalla el manual de Invitrogen (3). Una de las colonias que creció bajo la selección a zeocina (Invitrogen) se seleccionó y se creció en 10 mL de medio YPD. Este cultivo se usó para inocular 200 mL de medio amortiguado con fosfatos donde se indujo la expresión de la TVLEGU-1 con 1% de metanol durante 48 h.

**Resultados.** La doble digestión de la construcción *pPICZα B-TVLEGU-1* con las enzimas de restricción *Pst* I y *Not* I, libera un fragmento de 1164 pb (Fig. 1A),

correspondiente a la secuencia codificante de la TVLEGU-1. Con esta construcción se transformó la cepa X33 de la levadura *P. pastoris* y en la figura 1B, se observa claramente la expresión de una proteína de 42 kDa, peso molecular esperado de la proteína TVLEGU-1. Para purificar la proteína recombinante, primero se hizo una precipitación fraccionada con sulfato de amonio y después se solubilizó la fracción obtenida al 60% de saturación, y se purificó la TVLEGU-1 por cromatografía de afinidad a Ni.



**Fig. 1.** Expresión de la TVLEGU-1 en *P. pastoris* **A)** Construcción *pPICZα B-TVLEGU-1*, 1) Marcador de peso molecular, 2) DNA plasmídico sin digerir, 3) Fragmento de 1164 pb (*tvlegu-1*) liberado por la doble digestión. **B)** Expresión de la proteína TVLEGU-1. 1) Proteína soluble de la cepa X33 de *P. pastoris* no transformada, 2) Proteína soluble de la cepa X33 transformada con la construcción *pPICZα B-TVLEGU-1*.

**Conclusiones.** Se clonó el fragmento de DNA que codifica para la proteína TVLEGU-1 en el vector de expresión pPICZα B. La proteína se expresó en forma soluble y se purificó por cromatografía de afinidad a níquel.

**Agradecimiento.** Agradecemos al CINVESTAV-IPN y al CONACYT por la beca de doctorado otorgada (172909), así como por el financiamiento del proyecto 128694 (JOL).

### Bibliografía.

1. Leon-Felix, J., Ortega-López, J., Orozco-Solís, R. y Arroyo, R. 2004. *Gene*.335: 25-35.
2. Ramón-Luing, L., Rendón-Gandarilla, F., Cárdenas-Guerra, R., Rodríguez-Cabrera, N., Ortega-López, J., Avila-González, L., Angel-Ortiz, C., Herrera-Sanchez, C. Mendoza-García, M. y Arroyo, R. 2010. *Proteomics*. 10:435-444.
3. EasySelect *Pichia* Expression Kit, Invitrogen Manual. Junio 2010.