

Expresión y purificación de dos cisteína proteasas recombinantes CP A1 Y CP A4 de *Trichomonas vaginalis*

Miriam Guadalupe Mateo-Cruz¹, Claudia Ivonne Flores-Pucheta², Rosa E. Cárdenas-Guerra², Jaime Ortega-López², Rossana Arroyo¹. Centro de investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, ¹ Depto. de Infectómica y Patogénesis Molecular, ² Depto. de Biotecnología y Bioingeniería, Ciudad de México, CP 07360, miriam.mateo@cinvestav.mx

Palabras clave: *Trichomonas vaginalis*, cisteína proteasas y autofagia

Introducción. Las cisteína proteasas (CPs) son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos y desempeñan papeles fundamentales en la regulación de varias funciones biológicas. En los protozoos las CPs tiene un papel crítico en la patogenicidad, acceso de nutrientes, activación de enzimas, evasión de la respuesta inmune, invasión celular, transformación de fase, procesamiento de proteínas de superficie e inducción de respuestas inflamatorias, entre otros (1). *Trichomonas vaginalis* es un protozoario parásito rico en proteasas del tipo CP que se ha demostrado participan en la citoadherencia (TvCP30, TvCP62, TvLEGU-1), citotoxicidad (TvCP65, TvCP39, TvCP12), hemólisis (TvCP4), evasión de la respuesta inmune (TvCP39) e inducción de apoptosis en células hospederas (CP2, CP4 y CPT) (2). Evidencia de estudios previos sugieren que las CPs A1 y A4, zimógenos de ~35 kDa, son necesarias para el procesamiento de proteínas del proceso autofágico de *T. vaginalis* (3). Por lo descrito anteriormente, el objetivo de este trabajo es obtener a las proteínas recombinantes CP A1 y CP A4 para su caracterización bioquímica y funcional.

Metodología. Los genes correspondientes a *cp a1* y *cp a4* se obtuvieron por Synbio Technologies y se clonaron en el vector de expresión pCri8a. Ambas construcciones se transformaron en células competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3) y se crecieron en medio 2TY. La expresión de las proteínas se indujo con 0.1 mM de IPTG a 18 °C por 14 h. Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ y se analizaron por SDS-PAGE al 10%.

Resultados. El análisis de la expresión por SDS-PAGE indica que las proteínas CP A1 (Fig. 1a) y CP A4 (Fig. 1b) se expresaron principalmente en la fracción insoluble (FI), y aunque en menor proporción también se observó la expresión de las proteasas en la fracción soluble (FS). Por lo que la purificación de las proteasas se realizó a partir de la FS. Las CPs recombinantes presentaron el peso molecular de 35.5 kDa para CP A1 y 35.4 kDa para CP A4.

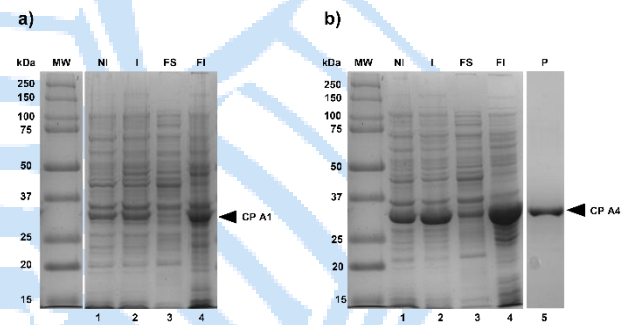


Fig. 1. Expresión de las proteasas CP A1 y CP A4 en *E. coli* BL21 (DE3). La expresión de ambas proteasas recombinantes se observa como bandas proteicas de 35.5 kDa y 35.4 kDa correspondientes a CP A1 y CP A4, respectivamente. Marcador de peso molecular MW; No inducida (NI); Inducida (I); Fracción soluble (FS); Fracción insoluble (FI); Proteína purificada (P). SDS-PAGE al 10%.

Conclusiones. Las proteínas recombinantes CP A1 y CP A4 de *T. vaginalis* se expresaron en *E. coli*, se purificaron por cromatografía de afinidad a partir de la fracción soluble, lo que sugiere que ambas proteínas purificadas están en su conformación nativa.

Agradecimiento. Este proyecto fue financiado con apoyo de CINVESTAV-IPN y Conacyt donativo INFR-2016-01-269657 (JOL) y beca CONACyT para estudios de posgrado (MGMC) número 001931. No. CVU 1002671.

Bibliografía.

1. Rawat, A., Roy, M., Jyoti, A., Kaushik, S., Verma, K., y Srivastava, V. K. (2021). Cysteine proteases: Battling pathogenic parasitic protozoans with omnipresent enzymes. *Microbiological Research*, 249, 126784.
2. Arroyo, R., Cárdenas-Guerra, R. E., Figueroa-Angulo, E. E., Puente-Rivera, J., Zamudio-Prieto, O., y Ortega-López, J. (2015). *Trichomonas vaginalis* Cysteine Proteinases: Iron Response in Gene Expression and Proteolytic Activity. *BioMed Research International*, 2015.
3. Hernández-García, M. S., Miranda-Ozuna, J. F. T., Salazar-Villatoro, L., Vázquez-Calzada, C., Ávila-González, L., González-Robles, A., Ortega-López, J., y Arroyo, R. (2019). Biogenesis of Autophagosome in *Trichomonas vaginalis* during Macroautophagy Induced by Rapamycin-treatment and Iron or Glucose Starvation Conditions. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(4), 654–669.