

## EXPRESION Y PURIFICACIÓN DE UNA CISTEÍNA PROTEINASA DE *TRICHOMONAS VAGINALIS* TIPO ASPARAGINIL ENDOPEPTIDASA Y SU INHIBIDOR

Claudia Ivonne Flores-Pucheta<sup>1</sup>, Octavio Montes-Flores, Miriam Guadalupe Mateo-Cruz<sup>2</sup>, Esly Alejandra Euceda-Padilla<sup>2</sup>, Rossana Arroyo<sup>2\*</sup>, Jaime Ortega-López<sup>1\*</sup>. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, 1 Depto. de Biotecnología y Bioingeniería, 2 Depto. de Infectómica y Patogénesis Molecular, Ciudad de México CP 07360, [cflores@cinvestav.mx](mailto:cflores@cinvestav.mx)

*Palabras clave:* *Trichomonas vaginalis*, cisteína proteinasa, replegamiento

**Introducción.** Las legumainas, presentes en la mayoría de los organismos, son cisteína proteinasas (CPs) del clan CD de la familia C13 de las asparaginil endopeptidasas (AEPs) que participan tanto en procesos biológicos como de patogenicidad, como se describe en Dall, 2016 (1).

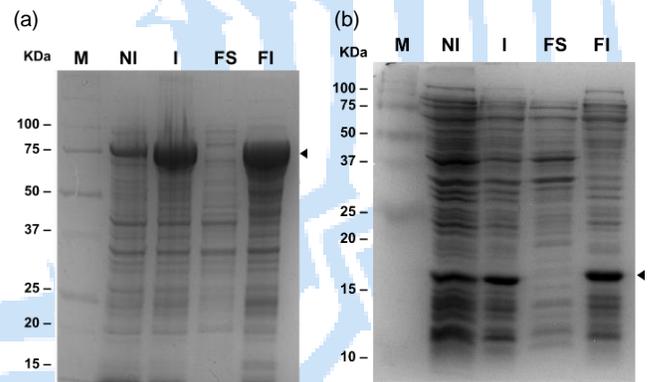
Es sabido que AEPs se sobre expresan en algunos tumores en células de mamífero, lo cual la convierte en candidato para el diseño de fármacos anticáncer. Por otro lado, los inhibidores naturales de CPs de tipo AEPs de parásitos, también pueden ser candidatos para el diseño de fármacos contra la enfermedad causada por los parásitos. *Trichomonas vaginalis* es un protozooario parásito de transmisión sexual desatendido que tiene 10 genes que codifican para AEPs de la familia C13 del clan CD, las cuales se sintetizan como precursores inactivos (proenzima) de entre 43.5 y 45 kDa. Los zimógenos se procesan a su forma enzimáticamente activa después de perder regiones tanto del amino como del carboxilo terminal (2).

El objetivo de este trabajo fue obtener una de las AEPs de *T. vaginalis* sin el péptido señal (TvAEP-ΔSP) y a su inhibidor (TvAEP-INH) como proteínas recombinantes en su conformación nativa para su caracterización bioquímica y funcional.

**Metodología.** Los genes *tvaep-Δsp* y *tvaep-inh* fueron sintetizados por Synbio y se subclonaron en los sitios *NcoI* y *XhoI* en los vectores pCri1a y pCri8a, respectivamente. Células competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3) se transformaron con cada construcción y se crecieron en medio 2TY. La expresión de las proteínas se indujo con 0.2 mM de IPTG a 20 °C por 16 h. Las proteínas se solubilizaron en urea 8 M y 2-ME 1 mM y se purificaron por cromatografía de afinidad a níquel en condiciones desnaturizantes. Ambas proteínas se replegaron por diálisis. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 o 12 %, respectivamente.

**Resultados.** El análisis de la expresión por SDS-PAGE indica que la TvAEP-ΔSP fusionada al MBP (Fig. 1a) y TvAEP-INH (Fig. 1b) se expresaron como cuerpos de inclusión, por lo que se recuperaron de la fracción

insoluble para su purificación. En ambos casos las proteínas obtenidas corresponden al tamaño molecular esperado de 85.6 kDa para TvAEP-ΔSP+MBP y 15.4 kDa para el inhibidor TvAEP-INH. La fusión de la TvAEP-ΔSP al MBP permitió mejorar las propiedades de los cuerpos de inclusión al solubilizarlos. Las condiciones de replegamiento implementadas para ambas proteínas permitieron recuperar proteínas estables sin agregados aparentes. Interessantemente los ensayos de inmunodetección utilizando un anticuerpo contra TvLEGU-1r, otra AEP de tricomonas (2,3) no mostró reactividad cruzada contra TvAEP-ΔSP.



**Fig. 1.** Expresión de TvAEP-SP (a) y TvAEP-INH (b) en BL21(DE3). Marcador M, No inducido NI, inducido I, fracción soluble FS e insoluble FI. SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 y 12%.

**Conclusiones.** La TvAEP-ΔSP de *T. vaginalis*, así como su inhibidor TvAEP-INH son susceptibles de expresarse de forma recombinante y replegarse para obtener una conformación estable.

**Agradecimiento.** Este proyecto fue financiado con apoyo de CINVESTAV-IPN y Conacyt CB-A1-S-34224 (JOL).

### Bibliografía.

- Dall, E., & Brandstetter, H. (2016). *Biochimie*. 122, 126–150.
- León-Felix J., Ortega-López J., Orozco-Solis R and Arroyo R. (2004). *Gene* 335: 25-35.
- Rendón-Gandarilla FJ, et al., (2013). *Biomed Res Internal*.2013; 561979. doi:10.1155/2013/561979.