

PRODUCCIÓN Y DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CICLOFILINA RECOMBINANTE DE *Trichomonas vaginalis* TvCyP2

Otero-Pedraza, A., Flores-Pucheta, C.I., Montes-Flores, O., Cárdenas-Guerra, R.E., Arroyo-Verástegui, R., Olin-Sandoval, V., Antonio-Pérez, A. y Ortega-López, J.

CINVESTAV, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Ciudad de México, 07360

alejandroo.pedraza@cinvestav.mx

Palabras clave: tricomoniasis, ciclofilina, actividad.

Introducción. La tricomoniasis es la infección de transmisión sexual no viral más frecuente a nivel mundial. Su diagnóstico tradicional tiene una baja sensibilidad (1). TvLEGU-1 ha sido reportada como un biomarcador para el diagnóstico de la infección (2), es expresada con altos rendimientos, pero en forma de agregados proteicos. Evidencia experimental sugiere que el paso limitante en su correcto plegamiento es la cis/trans isomerización de sus prolinas, reacción catalizada por las ciclofilinas (3). Así entonces, se busca la expresión de una ciclofilina del mismo parásito, TvCyP2, para eventualmente analizar su capacidad de asistir en el replegamiento de proteínas como TvLEGU-1 debido a su actividad enzimática. El objetivo del trabajo es expresar y purificar a la proteína TvCyP2 para posteriormente determinar su actividad.

Metodología. Se clonó la secuencia codificante de TvCyP2 tanto en el plásmido pET-38b(+) como en el plásmido pCri-8a. La expresión de proteínas con el vector pET-38b(+) resulta en la fusión traduccional con un módulo de unión a carbohidratos de la familia II (CBM2), lo que podría ser útil para la inmovilización del producto. Estas construcciones fueron transformadas en *Escherichia coli* BL21 (DE3) para la expresión de las proteínas. La inducción de la expresión se realizó en medio 2TY con 0.5 mM de IPTG a 20°C durante 20 horas. Ambas proteínas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad a Níquel aprovechando las etiquetas de histidinas añadidas por los vectores de expresión. Finalmente, la determinación de actividad se realizó mediante el ensayo de replegamiento de la RNasa T1 (4).

Resultados. En la Fig. 1 se muestra el análisis por SDS-PAGE de las fracciones solubles de la expresión de las proteínas TvCyP2-CBM2 (Fig. 1 A) y TvCyP2 (Fig.1 B), así como sus purificaciones. En ambos casos se consiguió aislar a la proteína (Carriles 3) de la mezcla de proteínas presentes en la fracción soluble previo a la purificación (Carriles 2).

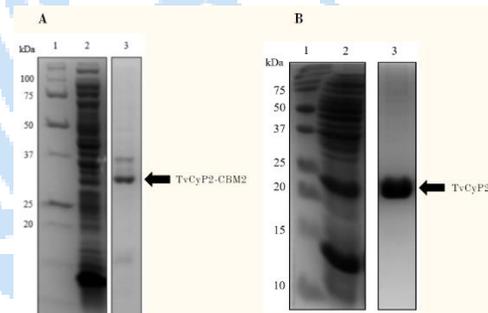


Fig. 1. Análisis electroforético (SDS-PAGE) de la fracción soluble de las expresiones de las proteínas y su purificación. Carriles 1: Precision Plus Protein Standard; Carriles 2: Proteína total previo a la purificación; Carriles 3: Elución de la proteína.

Posteriormente, las proteínas recuperadas fueron cuantificadas para realizar los ensayos de replegamiento de RNasa T1 con los que se determinó su actividad.

Conclusiones. Se expresaron y purificaron las proteínas tras la clonación de la secuencia codificante de TvCyP2 en los vectores pET-38b(+) y pCri-8a. Posteriormente, se realizaron ensayos de replegamiento para la determinación de su actividad; la proteína expresada con el vector pCri-8a presentó una mayor actividad aparente que su contraparte expresada con el vector pET-38b(+).

Agradecimiento. CINVESTAV-IPN (FIDSC2018/268), CONACyT (269657, A1-S34224) y beca CONACyT para estudios de maestría número 800089.

Bibliografía.

1. Gaydos, C. A., Klausner, J.D., Pai, N.P., Kelly, H., Coltart, C. & Peeling, R.W. (2017) *Sexually Transmitted Infections*. 93(S4), S31–S35.
2. Ramón-Luing, L. A., Rendón-Gandarilla, F.J., Cárdenas-Guerra, R.E., Rodríguez-Cabrera, N.A., Ortega-López, J., Avila-González, L., Angel-Ortiz, C., Herrera-Sánchez, C.N., Mendoza-García, M. & Arroyo, R. (2010) *Proteomics*. 10(3):435-44.
3. Takahashi, N., Hayano, T. & Suzuki, M. (1989) *Nature*. 337(6206), 473–475.
4. Zemanova, L., Vaskova, M., Schmidt, M., Roubalova, J., Haleckova, A., Benek, O. & Musilek, K. (1989) *Biochemistry*. 59(17), 1680–1687.