



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Zacatenco

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

“Estudio del replegamiento *in vitro* de proteínas de parásitos de difícil expresión en *E. coli*, utilizando peptidil-prolil-cis/trans-isomerasas de parásito y chaperones moleculares”.

T E S I S

Que presenta:

Verónica del Socorro Aranda Chan

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

Director de Tesis:

Dr. Jaime Ortega López

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) por el apoyo proporcionado con la beca de Doctorado (Beca Doctoral 762544).

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) por permitirme estudiar en una institución de alto nivel, pues considero esta institución como mi casa de estudios, por todo el impacto que ha tenido en mi formación profesional, también agradezco por el apoyo brindado a lo largo del posgrado (FIDSC2018/268).

Agradezco al Dr. Jaime Ortega López, por su guía, enseñanzas y consejos brindados, además por todo el apoyo proporcionado a lo largo de este proyecto, gracias a lo cual pude mejorar habilidades, aprender nuevas técnicas y estrategias de trabajo; además gracias por su escucha y paciencia para conmigo, nunca olvidaré su apoyo y enseñanzas. De verdad, muchas gracias Doctor.

Agradezco a los integrantes de mi comité tutorial, la Dra. Rossana Arroyo Verástegui, la Dra. Carmen Montes Horcasitas, Dra. Angélica Meneses Acosta, Dr. Rodolfo Marsch Moreno, por su orientación, consejos, correcciones para la correcta realización del trabajo, así como por su guía y su ejemplo, ha sido para mí un gran honor aprender de profesionales como ustedes.

Gracias también a todos los integrantes del Laboratorio 23 del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, M..C. Ivonne Flores, IBT. Octavio Montes, Dra. Rosa Cárdenas, Maru, Silvia, Esdras, Alejandro, Paola, Marco, Montse, gracias por toda su ayuda, sus consejos, las pláticas, las enseñanzas, gracias por todo su apoyo, son los mejores colegas!

Gracias a los integrantes del Laboratorio 11 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, M.C. Leticia Ávila, Don Oscar, Miriam, Liz, Esly, gracias de verdad por todo su apoyo durante mi estancia en su laboratorio, por su orientación y paciencia.

Gracias al Laboratorio de Bioquímica y Biofísica Computacional de la Escuela Nacional de Homeopatía del IPN, la Dra. Claudia Benitez, Marisol y todos los compañeros que me ayudaron y me orientaron durante mi estancia en su laboratorio.

Gracias a mis amigos y amigas, Pau, Nadia, David, Angie, Raque, Alex, Montse, Lucero, Ani, Marlene, Janet muchas gracias de verdad por estar conmigo en los buenos y malos momentos, gracias por su escucha, sus ánimos, por su compañía en este proceso.

Gracias a mi familia pequeña, Gabriel y puki por estar conmigo siempre y acompañarme en este camino con paciencia y amor.

Gracias a mi familia grande, mis padres Aarón y Verónica, mis hermanos Daniel y Azu, mis tíos y tías y mis primas, por todo, no tengo palabras ni me alcanzara la vida para agradecerles por el apoyo que me han dado, por toda su paciencia, su amor, su motivación y sus enseñanzas, soy lo que soy por ustedes.

Gracias a Dios, a la vida, por permitirme lograr una meta que nunca creí lograr.

Dedicatorias

A mis abuelos, Lilia, Ramiro, Alberto, Antonio y Gregoria, a quienes perdí durante este proceso y cuyo ejemplo de curiosidad, alegría, tenacidad, fuerza y amor fueron mi ejemplo y guía para continuar este camino.

Gracias por cuidarme.

CONTENIDO

RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Peptidil prolil <i>cis-trans</i> isomerasas de parásitos	3
2.2 Dificultad de expresión recombinante de proteínas de parásitos protozoarios	6
2.3 Cistatinas de parásitos protozoarios	7
2.4 Replegamiento de proteínas asistido por chaperonas	9
III. JUSTIFICACIÓN	11
IV. HIPÓTESIS	12
V. OBJETIVOS	12
5.1 General	12
5.2 Específicos	12
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	13
6.1 Análisis Bioinformático de las PPlasas TvCyP19 y TVCyP19.9 de <i>T. vaginalis</i>	14
6.2 Producción de TvCyP19 recombinante de <i>T. vaginalis</i> en <i>E. coli</i>	14
6.2.1 Expresión de rTvCyP19	14
6.2.2 Purificación de rTvCyP19	15
6.3 Determinación de la pureza y concentración de rTvCyP19 purificada.	16
6.4. Expresión y purificación de rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9	16
6.4.1 Expresión de rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9.	16
6.4.2 Purificación de rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9.	17
6.5 Expresión y purificación de la rTC-2 y rTC-2 Δ 11.	18
6.5.1 Expresión de rTC-2	18
6.5.2 Expresión de rTC-2 Δ 11	19
6.5.3 Purificación de rTC-2 y rTC-2 Δ 11.	20
6.6 Inmunodetección por Western Blot de rTC-2 y rTC-2 Δ 11.	20

6.7	Determinación de la actividad de PPlasa de la rTvCyP19 de <i>T. vaginalis</i> ...	21
6.8	Replegamiento asistido por TvCyP19, TvCyP19.9, DsbA, DsbC de rTC-2.	21
6.8.2	Cinéticas de replegamiento espontáneo vs asistido	22
6.9	Análisis de estructura secundaria de rTC-2 por Dicroísmo Circular	23
6.10	Inhibición de la actividad proteolítica por rTC-2 y rTC-2Δ11	23
6.10.1	Inhibición de actividad de papaína con rTC-2 nativas vs replegadas con o sin asistencia de chaperonas.	23
6.10.2	Inhibición de actividad proteolítica de Extractos Totales de proteasas de <i>T. vaginalis</i> por rTC-2 y rTC-2Δ11.....	24
6.11	Inhibición de la citotoxicidad de <i>T. vaginalis</i> sobre células HeLa por rTC-2 y rTC-2Δ11	24
6.11.1	Cultivo de <i>T. vaginalis</i>	24
6.11.2	Cultivo de células HeLa.....	25
6.11.3	Ensayo de Citotoxicidad de <i>T. vaginalis</i> sobre células HeLa en presencia de rTC-2 y rTC-2Δ11.	25
VII.	RESULTADOS	26
7.1.1	Parámetros fisicoquímicos de TvCyP19 y TvCyP19.9.....	27
7.2	Expresión de rTvCyP19 en <i>E. coli</i>	27
7.3	Purificación de rTvCyP19 por cromatografía de afinidad a Níquel.	28
7.4	Pureza de rTvCyP19.	30
7.5.	Producción de las proteínas rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9	30
7.5.1	Expresión de proteínas rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9 en <i>E. coli</i>	30
7.5.2	Purificación de rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9.	31
7.6.	Determinación de actividad PPlasa de TvCyP19 de <i>T. vaginalis</i>	33
7.7	Producción de rTC-2 y rTC-2Δ11.....	35
7.7.1	Expresión de rTC-2 y rTC-2Δ11 en <i>E. coli</i>	35
7.7.2	Purificación de rTC-2 y rTC-2Δ11	37
7.8	Inmunodetección por Western Blot de rTC-2	38
7.9	Replegamiento asistido de rTC-2.....	40
7.9.1	Cinética de Replegamiento espontáneo vs asistido por fluorescencia intrínseca.	40
7.10	Determinación de la estructura secundaria de las proteínas rTC-2 y rTC-2Δ11	45
7.11	Evaluación de la recuperación de función inhibitoria de rTC-2.....	47

7.11.1 Evaluación de la eficacia de replegamiento por recuperación de función de rTC-2 replegada con o sin asistencia de chaperonas.....	47
7.10 Evaluación de función inhibitoria de proteasas de rTC-2 Δ 11 vs rTC-2	51
7.10.1 Ensayos de inhibición de actividad de papaína	51
7.10.2 Evaluación de la capacidad inhibitoria de rTC-2 Δ 11 sobre la actividad proteasa de <i>T. vaginalis</i>	52
7.11 Efecto de rTC-2 Δ 11 sobre la citotoxicidad de <i>T. vaginalis</i> en células HeLa.....	53
VIII. DISCUSIÓN.....	54
IX. CONCLUSIONES	57
X. PERSPECTIVAS	58
XI. BIBLIOGRAFÍAS	59
XII. APÉNDICES.....	65
Apéndice I	65
XIII. ANEXOS.....	67

Lista de Tablas

Tabla 1. Replegamiento de rTC-2 ¹	43
Tabla 2. Efecto del replegamiento espontáneo vs asistido en la actividad inhibitoria de rTC-2.....	48

Lista de figuras

Figura 1. Estructura 3D de TvCyP19 (TvCyP1) y TvCyP19.9 (TvCyP2).....	5
Figura 2. Modelo estructural de la proteína TC-2. Se marcan en morado las prolinas presentes, en rojo las cisteínas presentes y en verde el triptófano.	9
Figura 3. Estrategia experimental general del proyecto.....	13
Figura 4. Estrategia experimental de replegamiento de rTC-2 y rTC-2Δ11.	23
Figura 5. (A). Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de TvCyP19 (TvCyP1), TvCyP19.9 (TvCyP2), TcCyP19, TcCyP22 y Trigger Factor (WP_001198385.1). (B). Cladograma mostrando las agrupaciones de éstas mismas	26
Figura 6. Expresión de rTvCyP19 en <i>E. coli</i>	28
Figura 7. Purificación por cromatografía de afinidad a Níquel de rTvCyP19.....	29
Figura 8. Determinación de la pureza de rTvCyP19	30
Figura 9. Expresión de las proteínas rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9 en <i>E. coli</i>	31
Figura 10. Purificación de las proteínas rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9.	32
Figura 11. Espectro de emisión de RNAsa T1 antes y después de ser replegada.	33
Figura 12. Determinación de actividad de PPIasa de rTvCyP19	34
Figura 13. Expresión de rTC-2 (A) y rTC-2Δ11 (B) en <i>E. coli</i>	36
Figura 14. Purificación por IMAC de rTC-2 (A) y rTC-2Δ11 (B).	37
Figura 15. Inmunodetección de rTC-2 y rTC-2Δ11 por Western Blot.....	39
Figura 16. Espectros de emisión de rTC-2.	41
Figura 17. Cinéticas de replegamiento de RNAsa T1 asistido por chaperones moleculares.....	42
Figura 18. Espectros de emisión de rTC-2 desnaturalizada (negro) y replegada con (azul) o sin asistencia de chaperones moleculares (naranja).	44
Figura 19. Determinación de la estructura secundaria de rTC-2 y rTC-2Δ11.	46

Figura 20. Efecto de rTC-2 replegada vs nativa en la actividad de papaína.	49
Figura 21. Efecto de rTC-2 replegada vs nativa en la inhibición de actividad de papaína.....	50
Figura 22. Ensayos de inhibición de actividad de papaína con rTC-2 y rTC-2Δ11 nativas.	51
Figura 23. Evaluación del efecto de rTC-2Δ11 vs rTC-2 sobre la actividad proteasa de <i>T. vaginalis</i>	52
Figura 24. Inhibición de citotoxicidad de <i>T. vaginalis</i> sobre células HeLa por rTC-2Δ11 y rTC-2.....	53

RESUMEN

El parásito *Trichomonas vaginalis* es el agente causal de la tricomoniasis, la enfermedad de transmisión sexual no viral más frecuente a nivel mundial. El estudio de su biología y patogenia ha requerido de la expresión en *Escherichia coli* de proteínas recombinantes; sin embargo, una gran mayoría no se expresan en su conformación nativa debido a muchas cisteínas y prolinas en su secuencia. Por lo tanto, es necesario un paso de replegamiento para su caracterización como posibles objetivos diagnósticos o terapéuticos. *In vivo*, el plegamiento de proteínas es asistido por chaperones y foldases moleculares, como las disulfuro oxidoreductasas y Peptidil-Protil cis-trans-Isomerasas (PPIasa). Las PPIasas son enzimas ubicuas que catalizan la isomerización -cis-trans del enlace peptídico que precede a una prolina y disulfuro oxidoreductasas catalizando la formación correcta de los enlaces disulfuro. Estudios previos han demostrado que DsbA y DsbC, disulfuro oxidoreductasas de *E. coli*, y PPIasas como la ciclofilina humana, asisten el replegamiento de proteínas. También, se ha demostrado que la PPIasas TvCyP19 y TvCyP19.9 de *T. vaginalis in vivo* son esenciales para la isomerización de los enalces -Gly-Pro- lo que sugiere que son buenos candidatos para la el replegamiento proteínas recombinantes de *T. vaginalis*, que son difíciles de expresar en forma soluble en *E. coli*. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue expresar, purificar y evaluar la actividad PPIasa de TvCyP19 y TvCyP19.9 recombinantes y evaluar su uso en el replegamiento asistido de la proteína Trichocistatina-2 recombinante (rTC-2) de *T. vaginalis* que contine cinco cisteínas y dos prolinas en su secuencia. Nuestros resultados muestran que TvCyP19 y TvCyP19.9 se expresan en *E. coli* enzimáticamente activas y asisten el replegamiento de rTC-2 con mayor eficiencia que DsbA y DsbC, sugiriendo que la cis-trans isomerización del los enlaces -X-Pro- es el paso limitante en el replegamiento de rTC-2. Adicionalmente, para disminuir la formación de agregados multiméricos de rTC-2 se eliminaron cuatro de las cinco cisteínas deletando 11 residuos del N-terminal (rTC-2 Δ 11). Se observó que en esta proteína se redujo la formación de multímeros sin afectar su actividad inhibitoria con extractos totales de proteasas y de la citotoxicidad de *T. vaginalis* sobre células HeLa. .

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is the causal agent of trichomoniasis, the most common nonviral sexually transmitted disease worldwide. The study of its biology and pathogenesis has required the expression of recombinant proteins; however, most are not expressed in *Escherichia coli* in their native conformation due to many cysteines and prolines in their sequence. Therefore, a refolding step is necessary for their characterization as possible diagnostic or therapeutic targets. In vivo, protein folding is assisted by molecular chaperones and foldases, such as disulfide oxidoreductases and Peptidyl-Prolyl cis-trans-isomerases (PPIase). PPIases are ubiquitous enzymes that catalyze the -cis-trans-isomerization of the peptide bond preceding a proline, and disulfide oxidoreductases catalyze the correct formation of disulfide bonds. Previous studies have shown that DsbA and DsbC, disulfide oxidoreductases from *E. coli*, and PPIases like human cyclophilin assist protein refolding. Also, the PPIases TvCyP19 and TvCyP19.9 from *T. vaginalis* have been shown in vivo to be essential for the isomerization of -Gly-Pro- junctions, suggesting that they are good candidates for the refolding of recombinant *T. vaginalis* proteins, which are difficult to express in soluble form in *E. coli*. Therefore, this work aimed to express, purify, and evaluate the PPIase activity of recombinant TvCyP19 and TvCyP19.9 and to evaluate their use in assisted refolding of recombinant *T. vaginalis* Trichocystatin-2 (rTC-2) protein containing five cysteines and two prolines in its sequence. Our results show that TvCyP19 and TvCyP19.9 are expressed in enzymatically active *E. coli* and assist rTC-2 refolding more efficiently than DsbA and DsbC, suggesting that cis-trans isomerization of the -X-Pro- bonds is the rate-limiting step in rTC-2 refolding. Additionally, to decrease the formation of multimeric aggregates of rTC-2, four of the five cysteines were eliminated by deleting 11 residues from the N-terminus (rTC-2 Δ 11). In this protein, the formation of multimers was observed to be reduced without affecting its inhibitory activity with total protease extracts and the cytotoxicity of *T. vaginalis* on HeLa cells.

I. INTRODUCCIÓN

Los parásitos son un grupo de diversos organismos que viven sobre o dentro de otro organismo, llamado huésped, y obtiene su alimento y refugio a expensas del huésped. Los parásitos pueden ser unicelulares o multicelulares y dependen de su huésped para sobrevivir y proliferar (Jordan & Kreuels, 2022) . Muchas enfermedades parasitarias pueden causar severas manifestaciones al ser humano, se consideran endémicas en 149 países y afectan más de mil millones de personas (Kato, 2020). Dentro de este grupo, se encuentran varios protozoarios, que son organismos unicelulares microscópicos que pueden reproducirse dentro de los seres humanos para su supervivencia, por lo que muchas especies producen enfermedades graves, afectando a millones de personas alrededor del mundo, con altos índices de morbilidad y mortalidad (Vaisusuk & Saijuntha, 2021; Wani, 2019). Para el estudio de su biología, patogenia, desarrollo de herramientas de diagnóstico e inmunógenos para vacunación, se requiere la producción de proteínas recombinantes en su conformación nativa. (Fernández-Robledo & Vasta, 2010). Sin embargo, una gran mayoría de proteínas recombinantes de protozoarios parásitos producidas en *Escherichia coli*, no logran alcanzar su conformación nativa y tienden a acumularse en agregados insolubles de proteína mal plegada con conocidos como cuerpos de inclusión (Schrödel & de Marco, 2005) y el porcentaje general de obtención de productos recombinantes que sean solubles permanece bajo (Gräslund et al., 2008; Vedadi et al., 2007). El uso de proteínas recombinantes para aplicaciones biotecnológicas y biomédicas requiere alto grado de pureza, estabilidad durante su almacenamiento, especialmente en casos de proteínas que se prevé tienen potencial uso terapéutico por lo que es deseable que se expresen solubles y en su conformación nativa (Vazquez et al., 2011).

En caso de que una proteína recombinante no se exprese en forma soluble y en su conformación nativa existen metodologías para su replegamiento, incluyendo dilución, diálisis y métodos cromatográficos (Basu et al., 2011). De éstos, la dilución de la proteína solubilizada en condiciones desnaturalizantes directamente en el amortiguador de renaturalización es uno de los métodos más comúnmente

utilizados para el replegamiento de proteínas a pequeña y gran escala, sin embargo, proteínas que tienen múltiples cisteínas y prolinas necesitan de procesos más complejos de replegamiento (Singh & Panda, 2005; Yamaguchi & Miyazaki, 2014). La formación de enlaces disulfuro incorrectos e isómeros de enlaces peptidil-prolil de *cis* a *trans* limita su correcto plegamiento (De Bernardez Clark et al., 1998). Tal es el caso de proteínas de *Trichomonas vaginalis* que son de interés terapéutico como las cisteína proteasas (CP), consideradas factores de virulencia del parásito o como la Trichocistatina-2, que se ha observado que juega un papel en la inhibición de estas proteínas y cuya expresión se logra en la fracción soluble e insoluble, pero durante su almacenamiento se forman agregados multiméricos debido posiblemente a las cinco cisteínas presentes en su secuencia (Puente-Rivera et al., 2014; Ramón-Luing et al., 2010).

Además, se sabe que en la célula los chaperones moleculares son proteínas que mantienen la homeostasis al unirse con péptidos recién sintetizados o proteínas sin plegar, que pueden inhibir interacciones moleculares no deseadas y agregaciones, permitiendo el plegamiento correcto y eficiente en su conformación nativa (Ma et al., 2020). Por otro lado, existe un grupo especial de proteínas auxiliares, llamadas enzimas de plegamiento, que aceleran el plegamiento de proteínas catalizando las reacciones que constituyen pasos limitantes, como la formación de puentes disulfuro y la isomerización de enlaces peptidil-prolil, catalizados por enzimas disulfuro isomerasas y peptidil-prolil-cis/trans isomerasas, respectivamente (Lee et al., 2009; Nagradova, 2007). Estas características se han aprovechado para el replegamiento de proteínas usando mini chaperonas libres en solución o inmovilizadas a soportes insolubles como la celulosa (Antonio-Pérez et al., 2014; Antonio-Pérez, Ramón-Luing, et al., 2012; Paul et al., 2007).

II. ANTECEDENTES

2.1 Peptidil prolil *cis-trans* isomerasas de parásitos.

A finales de década 1980 se identificó que proteínas con actividad peptidil-prolil-cis-trans isomerasa eran las mismas proteínas que las ciclofilinas (Fischer et al., 1989), y se expresan de forma ubicua en los seres vivos, están estructuralmente conservadas y todas exhiben actividad PPIasa, por lo que catalizan la interconversión de enlaces imido-peptidil-prolil responsables de cambios conformacionales o del correcto plegamiento de proteínas (P. Wang & Heitman, 2005). Así, aunque los enlaces -X-Pro- de los polipéptidos nacientes emergen del ribosoma en una conformación -trans, hay un porcentaje de proteínas cambia a la conformación -cis, por lo que existe una heterogeneidad en las conformaciones cis/trans de los enlaces X-Pro. La catálisis de las PPIasas permite a los polipéptidos participar en reacciones isómero específicas y se considera la isomerización (aa-Pro) uno de los pasos limitantes en el plegamiento de proteínas (Bell et al., 2006; Perrone et al., 2018). En los protozoarios parásitos, las PPIasas son particularmente importantes porque están involucradas en la supervivencia, el desarrollo y la patogenicidad de estos organismos. Pueden actuar como factores de virulencia, influyendo en la forma en que estos microorganismos interactúan con sus huéspedes y contribuyen a la enfermedad. La presencia de PPIasas en parásitos protozoarios clínicamente significativos, como *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* y *Plasmodium spp.*, subraya su relevancia en la salud pública y el potencial para dirigir estas enzimas en estrategias terapéuticas. En el caso de *T. vaginalis* G3, su genoma codifica para un total de 13 ciclofilinas (CyP), 9 proteínas de unión a FK506 (FKBP) y 3 parvulinas (Par), lo que hace un total de 25 PPIasas identificadas en este protozoo. Esta diversidad de PPIasas sugiere un papel complejo en varios procesos celulares y posibles implicaciones para la patogenicidad del organismo y la respuesta al estrés ambiental (Aranda-Chan et al., 2024).

Además, es importante destacar que ensayos enzimáticos demuestran que no cada enlace peptidil prolil es igualmente isomerizado por cada PPIasa, ya que el

aminoácido que precede a la prolina es crucial para la actividad y selectividad enzimática, encontrándose preferencias diferentes entre las PPlasas de las diferentes especies (humana, bacteriana, levaduras, etc.) (Ünal & Steinert, 2014).

Ortólogos de la ciclofilina humana han sido localizados en parásitos protozoarios, cuyas secuencias en general son similares a la hCyP18 (ciclofilina humana), éstas se han detectado por ejemplo en el citosol ó secretadas al medio extracelular, como la TcCyP19 de *T. cruzi* ó la TgCyP20 de *T. gondii* (Bayer-Santos et al., 2013; High et al., 1994; Potenza et al., 2006). Además, hay estudios que señalan a las ciclofilinas de parásitos como potenciales blancos farmacológicos (Perrone et al., 2018). Se ha evaluado también la actividad PPlasa de ciclofilinas de parásitos producidas de forma recombinante en organismos como *P. falciparum*, *B. malayi* ó *S. mansoni* (Bell et al., 2006; Kiang et al., 1996).

En el caso del parásito *Trichomonas vaginalis*, se identificó una proteína homóloga a la proteína hCyP18, la proteína TvCyP19 (TvCyP1), la cual se localizó en múltiples compartimentos en *T. vaginales*, incluyendo hidrogenosomas y proteínas asociadas al factor de transcripción Myb1, estos estudios también indican que TvCyP1 cataliza la conversión cis-trans de enlaces imido glycyl-prolil en este factor de transcripción para facilitar su translocación al núcleo (Hsu et al., 2014). Estudios posteriores identificaron una segunda proteína, TvCyP19.9 (TvCyP2) localizada principalmente en retículo endoplasmático (RE) también catalizando la interconversión de enlaces -Gly-Pro- de Myb3, regulando el tráfico de Myb3 hacia los hidrogenosomas y la membrana plasmática, en una nueva ruta de tráfico de proteínas en *T. vaginalis* (Hsu et al., 2020). La estructura de ambas proteínas ya se determinó experimentalmente observándose que la TvCyP19 es un homodímero que presenta 9 β -plegadas, dispuestas en forma opuesta y 3 hélices alfa (Figura 1 A); mientras que TvCyP19.9 es un monómero que muestra 8 β -plegadas y 3 hélices alfa, con un extremo N-terminal extendido que es capaz de interactuar con otras proteínas (Figura 1 B). En las figura 1B se muestra la diferencia entre los extremos N-terminal de TvCyP19.9 y la ciclofilina humana (Aryal et al., 2020; Martin et al., 2018).

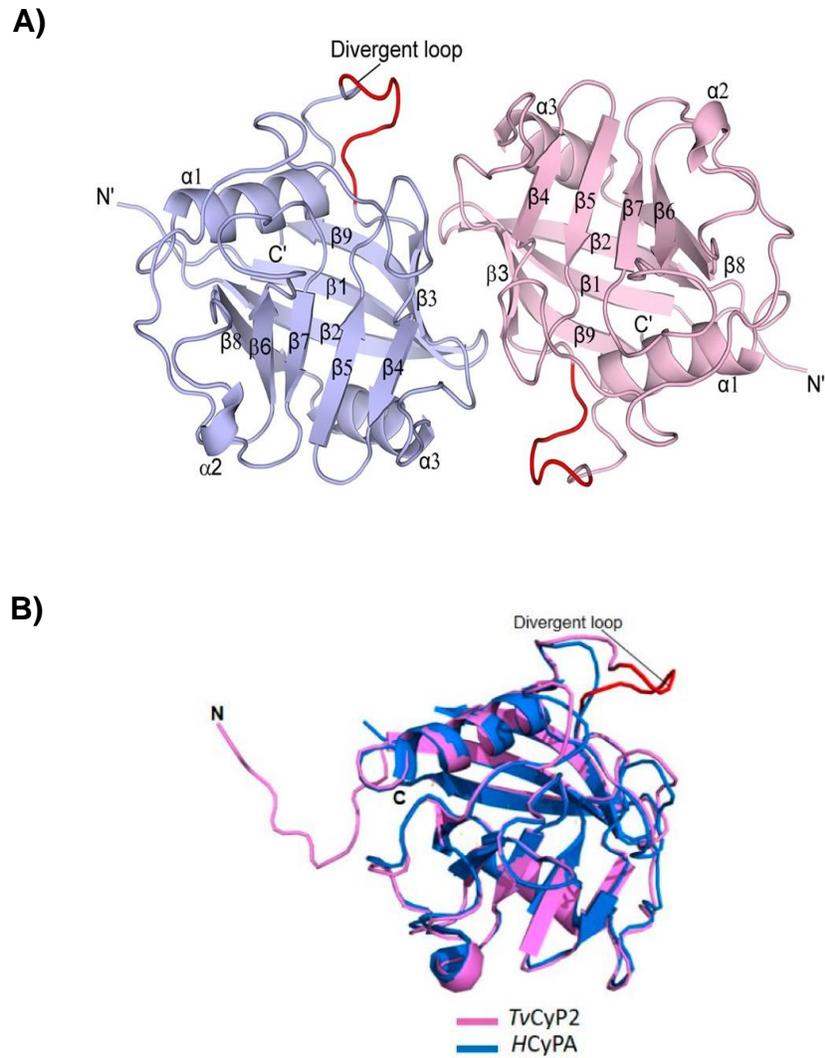


Figura 1. Estructura 3D de TvCyP19 (TvCyP1) y TvCyP19.9 (TvCyP2). A) Dímero de TvCyP19. B) TvCyP19.9 (azul) superpuesta con la hCyP18 (rosa) (Aryal et al., 2020; Martin et al., 2018).

Además de su papel biológico, la capacidad de las PPlasas para ayudar en el plegamiento de proteínas las convierte en herramientas valiosas para la producción recombinante y el replegamiento de otras proteínas. Esta aplicación biotecnológica es crucial para producir proteínas funcionales con fines de investigación y terapéuticos (Aranda-Chan et al., 2024).

2.2 Dificultad de expresión recombinante de proteínas de parásitos protozoarios

El desarrollo de vacunas contra parásitos protozoarios usando proteínas como antígenos es más difícil que para otros organismos como bacterias y virus debido a que son eucariontes, un ciclo de vida complejo que incluye fases sexuales y asexuales, son de mayor tamaño que las bacterias, entre otros (Kato, 2020). Por otro lado, difícilmente se pueden obtener grandes cantidades de proteínas a partir de cultivos del propio parásito por lo que es necesario producirlas y purificarlas a partir de su expresión en forma heteróloga, siendo la plataforma de *E. coli* la más utilizada. Sin embargo, muchas de las proteínas de parásitos protozoarios contiene en su secuencia cisteínas y prolinas que limitan su obtención heteróloga en forma soluble y funcional (Fernández-Robledo & Vasta, 2010).

Así, diversas enzimas de parásitos producidas de forma recombinante, aunque logren ser expresadas en *E. coli*, no muestran actividad enzimática, como es el caso de varias CP de *T. vaginalis*, reflejando un problema en el plegamiento de las mismas (Arroyo et al., 2015; Cárdenas-Guerra et al., 2013).

De este modo, se han explorado diversas estrategias para lograr la expresión recombinante y soluble de estas proteínas, como la co-expresión con chaperonas y enzimas de plegamiento (Guerra et al., 2016) o la clonación de secuencias optimizadas para cepas de *E. coli* modificadas (Guerra Á et al., 2016). Aunque estrategias como el uso de chaperonas para un replegamiento cromatográfico asistido, que resultan efectivas para otras proteínas (Antonio-Pérez, Ramón-Luing, et al., 2012), pero aún no se han probado con proteínas de parásitos protozoarios.

2.3 Cistatinas de parásitos protozoarios

Las cistatinas son inhibidores reversibles competitivos de CP como la papaína o las catepsinas. Las cistatinas están compuestas por un dominio que incluye tres regiones: un bucle de glicina N-terminal, un bucle Q-X-V-X-G y un bucle C-terminal PW (Ochieng & Chaudhuri, 2010). Las cistatinas se pueden clasificar en tres familias principales: estefinas, cistatinas y quinínógenos. Las estefinas son principalmente intracelulares, mientras que las cistatinas y los quinínógenos son extracelulares (Wickramasinghe et al., 2020).

Las cistatinas participan en roles cruciales de regulación de actividad proteasa en diversos organismos incluyendo los protozoarios, organismos en los cuales se ha observado que muestran una conservación evolutiva de función, por lo que pueden inhibir CP en diferentes especies de protozoos (Sanderson et al., 2003). Debido al rol tan importante que juegan las CP, como factores de virulencia, en la modulación de la respuesta inmune del huésped, en la evasión inmune y facilitando la supervivencia y proliferación del parásito dentro de las células huésped, las cistatinas son de especial interés como inhibidores que bloquean este tipo de procesos en los parásitos siendo potenciales biomarcadores, antígenos vacunales o blancos farmacológicos (Abaza, 2019). Se reportado que las cistatinas de protozoos como *Giardia intestinalis* y *Trypanosoma cruzi* son potentes inhibidores de las CP similares a la papaína, las cuales son esenciales para la biología y patogenicidad de los parásitos por lo tanto de interés terapéutico, como en el caso de *G. intestinalis*, donde se mostró además poca inhibición hacia proteínas humanas (Jingyi Liu et al., 2019; Monteiro et al., 2001).

En el caso de *T. vaginalis*, un protista flagelado y agente causal de la tricomoniasis, una infección de transmisión sexual común (Harfouche et al., 2024), también se ha encontrado la presencia de proteínas de tipo cistatina. Este organismo es conocido por su actividad proteolítica, mediada principalmente por CP (Arroyo et al., 2015). Para regular estas proteasas, en *T. vaginalis* se han reportado tres inhibidores endógenos de CP conocidos como tricocistatinas de los cuales dos se han caracterizado (Puente-Rivera et al., 2014; Sánchez-Rodríguez et al., 2018). La

Tricocistatina-2 fue la primera estudiada, ésta es una proteína intracelular que carece de una secuencia señal y que cuenta con cinco cisteínas, se determinó que es capaz de inhibir las CP de tipo papaína, comportándose como un inhibidor de tipo estefina, se encontró asociada con TvCP39 y localizada principalmente en vesículas citoplasmáticas del parásito. Además, se encontró que rTC-2, es capaz de proteger las células HeLa del daño celular al inhibir la actividad proteolítica (Puente-Rivera et al., 2014). Por su parte Trichocistatina (TC-3) se localiza en el complejo de Golgi, el citoplasma, las vesículas grandes y la membrana plasmática de *T. vaginalis*, posee un péptido señal en el extremo N-terminal y dos posibles sitios de glicosilación, pero carece de los residuos de cisteína típicos de la familia de las estefinas. TC-3 funciona también como un inhibidor de las CP de catepsina L, y protege a las células de los efectos citotóxicos de *T. vaginalis* (Sánchez-Rodríguez et al., 2018). Ambas proteínas son consideradas con potencial bioterapéutico.

La proteína TC-2 tiene en su secuencia cinco cisteínas y dos prolinas, una de estas la Pro78, localizada cerca del único Trp como se observa en la Figura 2. Estas características hacen de esta proteína de *T. vaginalis* un modelo adecuado para determinar su cinética de replegamiento midiendo la intensidad de fluorescencia intrínseca del único Trp y permite probar la asistencia de las PPlasas TvCyP19 y TvCyP19.9 en la isomerización de los enlaces -X-Pro, especialmente de la Pro78. Dado que rTC-2 se expresa parcialmente en forma soluble, es posible purificarla y conocer su conformación nativa. Adicionalmente, será interesante determinar si las cinco cisteínas favorecen la formación de agregados multiméricos que se presentan en la rTC-2 purificada y se favorecen durante su almacenamiento.

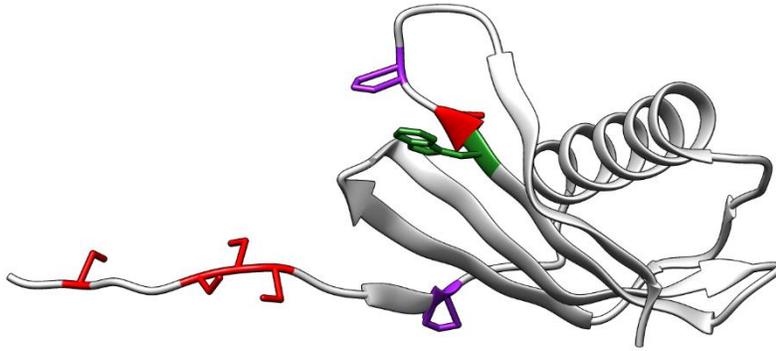


Figura 2. Modelo estructural de la proteína TC-2. Se marcan en morado las prolinas presentes, en rojo las cisteínas presentes y en verde el triptófano.

2.4 Replegamiento de proteínas asistido por chaperonas

La plataforma de expresión de *E. coli* mantiene una posición dominante en la producción de proteínas recombinantes, sin embargo, una desventaja importante es la agregación de polipéptidos mal plegados formando los denominados cuerpos de inclusión (Lee et al., 2009). Para resolver este problema se han modificado cepas y condiciones de cultivo para facilitar el plegamiento correcto “in vivo” y se han desarrollado protocolos para el replegamiento “in vitro” de diversas proteínas. Por ejemplo, trabajos previos han demostrado que el dominio apical de la chaperonina GroEL (ADGroEL) en fusión traduccional con el dominio de unión a celulosa (CBD) de *Cellulomonas fimi* es una alternativa eficiente para la preparación de biocatalizadores de plegamiento (Ramón-Luing et al., 2006). También se demostró que las disulfuro oxidoreductasas DsbA y DsbC junto con el dominio ADGroEL inmovilizados en celulosa asisten el replegamiento cromatográfico oxidativo de lisozima, un modelo de proteína humana soluble, donde se encontró que la cinética de replegamiento de lisozima se pueden describir por un modelo de replegamiento sencillo de tres estados y se confirmó que la fusión del dominio de unión a celulosa al dominio apical de la chaperonina GroEL (ADGroEL) y las disulfuro oxidoreductasas, DsbA y DsbC es una alternativa eficiente para su purificación e inmovilización en celulosa (Antonio-Pérez, Rivera-Hernández, et al., 2012). Además, ya se ha determinado que la ADGroEL, DsbA y DsbC inmovilizados en

celulosa soportan altas concentraciones de desnaturalizantes y agentes reductores lo que permite su uso en una columna de replegamiento cromatográfico al menos hasta seis ciclos de replegamiento sin modificar su capacidad catalíticas (Antonio-Pérez, Ramón-Luing, et al., 2012). Sin embargo, en este sistema podría mejorar incluyendo PPIasa para facilitar la isomerización de los posibles enlaces -X-Pro- de las proteínas a replegar, ya que como lo reporta Lee et al., (2009) la Ciclofilina A humana inmovilizada, en conjunto con la chaperonina GroEL, la DsbA, asistieron el replegamiento cromatográfico oxidativo de una RNAsa y la CHMO-(ciclohexanona monooxigenasa), ambas proteínas ricas en cisteínas y prolinas y la última expresada en *E. coli* como cuerpos de inclusión, logrando una eficiencia de replegamiento de un 73% de RNAsa A con asistencia de la hPPIasa y chaperonas en comparación con un 68% que se obtiene sólo con la asistencia de DsbA y la mini-chaperona respectivamente, sin embargo esta efecto en el replegamiento se ve aún más prominente cuando se repliega la CHMO, en la cual se encuentra una eficiencia del replegamiento de hasta un 53% cuando se incluye la PPIasa en comparación de un 27% sin esta enzima.

III. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de los mecanismos de patogénesis o virulencia de protozoarios parásitos es aún muy limitado, así como de metodologías para el tratamiento o vacunación contra las enfermedades que causan. Por lo que la producción de proteínas recombinantes de parásitos protistas se requiere para un gran número de aplicaciones (Fernández-Robledo & Vasta, 2010). En el caso de las proteínas con fines terapéuticos, es un prerrequisito que la proteína esté en su conformación nativa. Sin embargo, la producción de proteínas no es una tarea sencilla pues no sigue un único protocolo, aunado al hecho de que muchas de estas proteínas se expresan en bajas cantidades o en forma de agregados de intermediarios de plegamiento (Amarasinghe & Jin, 2015). Así, el replegamiento eficiente y correcto de proteínas depende de muchas variables, que difieren de una proteína a otra, como su composición de aminoácidos. Por lo que el replegamiento de proteínas es un paso limitante y un punto importante de investigación y desarrollo. Dado de que se ha reportado que las moléculas chaperonas y enzimas de plegamiento juegan un papel importante en el plegamiento correcto de nuevos péptidos sintetizados *in vivo*, se han desarrollado también estrategias de replegamiento *in vitro* asistido por estas proteínas (Antonio-Pérez et al., 2014; Antonio-Pérez, Ramón-Luing, et al., 2012; Gao et al., 2003). Debido a lo anterior, en el presente trabajo se propuso adicionar peptidil-prolil-cis/trans isomerasas TvCyP19 y TvCyP19.9 de *T. vaginalis* al sistema de replegamiento asistido por disulfuro óxido-reductasas DsbA y DsbC para mejorar el replegamiento de proteínas con enlaces -X-Pro-.

IV. HIPÓTESIS

Peptidil-prolil-cis/trans-isomerasas de parásitos mejoran la eficiencia del repliegamiento de proteínas de parásitos protozoarios que tienen prolinas catalizando la *cis-trans*-isomerización de enlaces X-Pro.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Demostrar que la adición de las peptidil-prolil-*cis/trans*-isomerasas TvCyP19 y/o TvCyP19.9 de *T. vaginalis* y las disulfuro oxidoreductasas DsbA y DsbC mejora el repliegamiento de proteínas de *T. vaginalis* conteniendo cisteínas y prolinas en su secuencia.

5.2 Específicos

1. Caracterizar la expresión heteróloga en *E. coli* y funcionalidad de la proteína Peptidil-prolil-*cis/trans* isomerasa, TvCyP19 de *Trichomonas vaginalis*.
2. Evaluar la capacidad del sistema de repliegamiento asistido con chaperonas y rPPlasas TvCyP19 y TvCyP19.9 de *T. vaginalis* para mejorar el repliegamiento de la proteína rTC-2 (Trichocistatina-2) del mismo parásito.
3. Evaluar el efecto de las cuatro cisteínas presentes en el extremo N-terminal de rTC-2 en la formación de agregados multiméricos y en la inhibición de la actividad de cisteína proteasa de *T. vaginalis*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

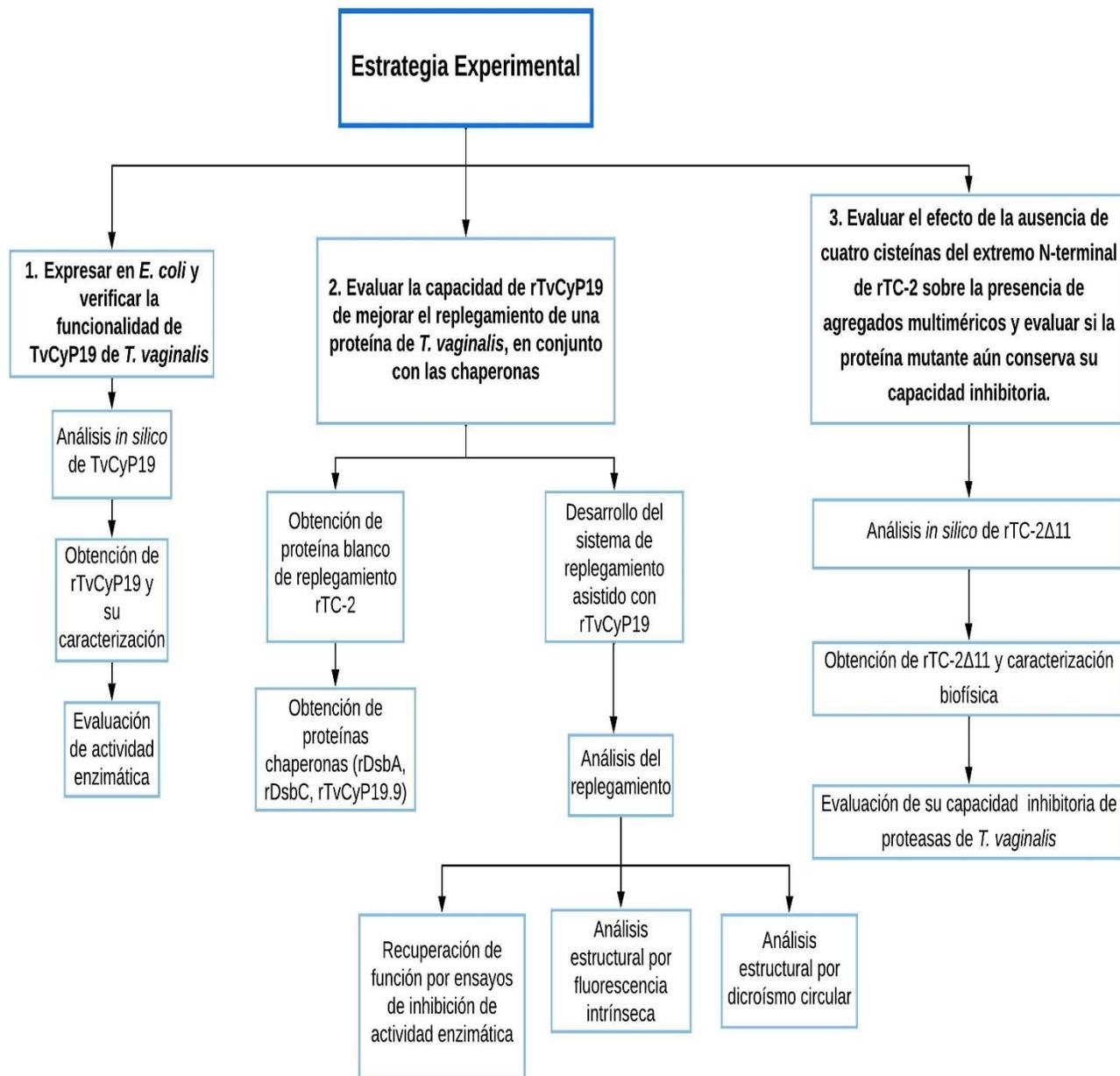


Figura 3. Estrategia experimental general del proyecto.

6.1 Análisis Bioinformático de las PPlasas TvCyP19 y TVCyP19.9 de *T. vaginalis*.

Dado que las ciclofilinas son proteínas ubicuas en los seres vivos, se procedió a realizar primeramente un alineamiento múltiple de secuencias con ayuda de la herramienta Clustal Omega para conocer las similitudes y diferencias entre ciclofilinas de *T. vaginalis* (TvCyP19 y TvCyP19.9), de otro parásito protozoario, *Trypanosoma cruzi* (TcCyP-19 y TcCyP22) y la proteína homóloga a las ciclofilinas en *E. coli* (Trigger Factor). Aunado a ello, también se realizó un árbol filogenético para agrupar estas mismas proteínas con ayuda de la herramienta MEGA 11.0, utilizando el método de Maximum Likelihood (Máxima verosimilitud), con un Bootstrap de 1000 réplicas utilizando la matriz WAG+G. Por otro lado, se realizaron también las predicciones de punto Isoeléctrico y Coeficiente de extinción para ambas proteínas por medio de la herramienta ProtParam.

6.2 Producción de TvCyP19 recombinante de *T. vaginalis* en *E. coli*

6.2.1 Expresión de rTvCyP19

A partir de muestras previamente crio-preservadas de bacterias *E. coli* BL21-DE3 transformadas con el plásmido pET28a-TvCyP1 – (TvCyP19) (donado por el Dr. J. Tai del Instituto de Ciencias Biomédicas, Academia Sinica, Taiwán), se prepararon pre-inóculos en 5 ml de medio Luria-Berthani (LB) con Kanamicina (50 ug/ ml), se incubaron a 37°C en agitación orbital (220 rpm) durante 14-16 h.

De este cultivo, se tomaron 500 µl para inocular un matraz de 50 ml de medio LB con Kanamicina (50 mg/ml). Este cultivo se creció a 37°C por aproximadamente 2.5 h hasta alcanzar un OD₆₀₀= 0.6-0.8 y se usó para inocular un matraz conteniendo 500 ml de medio LB + Kan 50 mg/ml, que se dejó crecer a 37°C por 3 h hasta alcanzar un OD₆₀₀= 1.0. En este punto se indujo la expresión de la proteína rTvCyP19 con 1 mM de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) x 16 h a 16°C. La biomasa se separó por centrifugación a 3,400 x g por 30 min y se lavó con PBS 1X, para luego almacenarla a -80°C hasta su posterior uso para la purificación de la

proteína recombinante. Adicionalmente, se tomaron muestras de 1 ml para determinar la expresión de la proteína por SDS-PAGE 12, cada muestra se diluyó para que alcanzaran un $OD_{600} = 1$, posteriormente se centrifugaron a $1000 \times g$ por 20 min, los sobrenadantes se descartaron y se reservaron los paquetes celulares. Éstos, se lisaron con 50 μ L de una solución de “BugBuster” (Merck) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Se obtuvo el sobrenadante (fracción soluble) y se separó del sedimento (fracción insoluble). Los extractos totales se resuspendieron con 30 μ L de Tris HCl 20 mM pH 8.0 y 10 μ L de Buffer de Laemmli 4X.

6.2.2 Purificación de rTvCyP19

Para la lisis se pesó una muestra de biomasa y se le añadieron 10 ml de Buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 Mm PMSF) por gramo de biomasa húmeda, inmediatamente después se añadió Lisozima (0.5 mg/ml) y se incubó x 30 min a 220 rpm (30°C). La muestra posteriormente se sometió a Sonicación en hielo en el equipo de ultrasonido 550 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific), con ciclos de 30 s, a 30% de amplitud de onda por 3 minutos. Posteriormente la muestra se centrifugó a $20,784 \times g$ durante 30 min (4°C).

La proteína rTvCyP19 se purificó de la fracción soluble previamente obtenida, para ello se utilizó una Columna de 10 cm (Econo-pack, BioRad) empacada con 3 ml de Ni-Sefarosa 6 Fast flow (Cytiva) acoplada a un cromatógrafo NGC de Bio-Rad™.

El esquema de purificación fue el siguiente: la columna se equilibró con 10 volúmenes de columna (CV) de amortiguador A (20 mM Tris HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 10% Glicerol, Inhibidores de Proteasas Sigma Fast EDTA-Free (Sigma-Aldrich)) a un flujo de 1 mL/min, seguido se cargó la muestra, posteriormente se lavó con 10 CV de Buffer-A+ Tritón X-100 0.1% y se hicieron lavados de 10 CV con concentraciones crecientes de imidazol (50 mM, 70 mM, y 100 mM). Finalmente, la elución de la proteína se llevó a cabo con 10 CV de amortiguador B (20 mM Tris HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 10% Glicerol e Inhibidores de Proteasas Sigma Fast EDTA-Free (Sigma-Aldrich)).

Para el almacenamiento de las muestras purificadas se cambió al amortiguador de almacenamiento (20 mM NaH₂PO₄ pH 6.0, 50 mM NaCl, NaN₃ 0.02%, 1 mM DTT, 10% Glicerol) mediante cromatografía de filtración en gel usando columnas PD10 (GE Healthcare) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Posteriormente las muestras fueron almacenadas en alícuotas a 4°C, -20°C y -80°C.

6.3 Determinación de la pureza y concentración de rTvCyP19 purificada.

Para la determinación de la concentración de la proteína rTvCyP19 purificada, se mezclaron todas las fracciones rTvCyP19, se determinó su absorbancia a 280 nm y por el análisis densitométrico de SDS-PAGE al 12% usando como estándar rTc24 previamente purificada. El análisis se realizó con apoyo del Software Image J. También se utilizó el método de BCA para estimación de concentración de proteína (Thermo Fischer Scientific) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

Posteriormente, la pureza de la proteína rTvCyP19 se determinó por análisis electroforético en SDS-PAGE al 12% de muestras en condiciones reductoras y no reductoras. Para ello, las muestras se trataron con amortiguador de Laemmli 4X con y sin β-mercaptoetanol (condiciones reductoras y no reductoras, respectivamente), que se incubaron por 5 min (100°C). En todos los casos se aplicaron 4 µg de proteína en geles que posteriormente se tiñeron con Coomassie. La cantidad porcentual de cada especie en las muestras se determinó por densitometría con la Software Image J.

6.4. Expresión y purificación de rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9

6.4.1 Expresión de rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9.

Las proteínas chaperonas se clonaron previamente en el equipo de trabajo, rDsbA y rDsbC se obtuvieron a partir de los vectores pET-39 y pET40 respectivamente y rTvCyP19.9 a partir de pCri-8a, cabe señalar que ésta último carece de los primeros 14 aminoácidos del extremo N-terminal. La expresión de las proteínas rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9 se llevó a cabo a partir de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) transformadas previamente con los plásmidos pET-39, pET40 y pCri-TvCyP2Δ14 (Antonio-Pérez, 2012; Otero-Pedraza, 2024) en 0.5 L de medio 2xTY, una vez que

el cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ de 0.6 se llevó a cabo la inducción de la expresión adicionando 0.5 mM de IPTG durante 20 horas a 20°C para DsbA y DsbC; mientras que para rTvCyP19.9 la inducción de la expresión se llevó a cabo durante 16 horas a 37°C.

6.4.2 Purificación de rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9.

La biomasa se lisó añadiendo 10 ml de Amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, Glicerol 5%, 1 mM PMSF) y se procedió de acuerdo a lo descrito con anterioridad (Materiales y Métodos 6.2.2).

Se procedió a purificar las proteínas rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9 a partir de la fracción soluble previamente obtenida. Para ello se utilizó una Columna de 10 cm (BioRad) empacada con 5 ml de resina Ni-Sefarosa 6 Fast flow (Cytiva) y acoplada a un cromatógrafo NGC (BioRad).

En el caso de la DsbC el esquema de purificación fue el siguiente: la columna se equilibró con 10 CV (Volúmenes de Columna) de amortiguador A (20 mM NaH₂PO₄ pH 7.5, 0.2 M NaCl, 10 mM imidazol, 0.02% NaN₃, cóctel de inhibidores de proteasas SIGMAFAST sin EDTA), seguido de la inyección de muestra, posteriormente se lavó con 10 CV de Amortiguador A y se hicieron lavados de 10 CV con concentraciones crecientes de imidazol por gradiente (2-10%). Finalmente, se realizó la elución de la proteína con un gradiente de 10 CV del 10%-80% de Amortiguador B. El esquema de purificación para la DsbA fue similar, con un cambio en los amortiguadores (20 mM Tris HCl pH 8.0, 0.2 M NaCl, 10 mM imidazol, 0.02% NaN₃, cóctel de inhibidores de proteasas SIGMAFAST sin EDTA, con o sin 500 mM Imidazol).

En el caso de TvCyP19.9 la purificación se llevó a cabo previamente en el equipo de trabajo (Otero-Pedraza, 2024). Brevemente, en una columna preempacada de Níquel-Sefarosa His-Trap de 1 ml (Cytiva), la columna se equilibró con 5 CV del amortiguador A (20 mM Tris HCl pH 7.2, 0.5 M NaCl, 5% glicerol, 10 mM imidazol, 0.02% NaN₃, cóctel de inhibidores de proteasas SIGMAFAST sin EDTA), seguido de la inyección de muestra, posteriormente se eluyó con 10 CV de Amortiguador B

al 30% (20 mM Tris HCl pH 7.2, 0.5 M NaCl, 5% glicerol, 0.5 M imidazol, 0.02% NaN₃, cóctel de inhibidores de proteasas SIGMAFAST sin EDTA). El análisis de las fracciones se realizó con SDS-PAGE al 12 %. El amortiguador de almacenamiento incluyó Tris HCl 20 mM pH 7.2, NaCl 0.1 M, Glicerol 20% y NaN₃ 0.02% y las muestras se almacenaron a -20°C. Las muestras obtenidas se concentraron utilizando los filtros Amicon Ultra-4 (Merck Millipore) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Para la cuantificación de la proteína se determinó su concentración por el método de BCA (Thermo Fischer Scientific) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

6.5 Expresión y purificación de la rTC-2 y rTC-2Δ11.

6.5.1 Expresión de rTC-2

Con el objetivo de obtener cantidades suficientes de la proteína rTC-2, se escaló a un cultivo en un biorreactor. Para ello, se utilizó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido pColdI1-TC2, (Puente-Rivera et al., 2014). A partir muestras crio-preservadas se preparó un inóculo de 50 ml de medio Luria-Berthani (LB) con el antibiótico de selección Ampicilina (Sigma) (100 µg/ ml). Posteriormente, estos cultivos fueron incubados a 37°C en agitación orbital (220 rpm) hasta que alcanzaran una OD₆₀₀ (Densidad óptica) de 0.6- 1.

De este inóculo, se tomó el volumen del medio necesario para inocular el bioreactor (controlador BioFlo/Celligen 310, Eppendorf. Jarra Applikon 3.0L) e iniciar con una OD de 0.05AU en 2 Litros de medio BSM (KH₂PO₄ 3.5g/L, K₂HPO₄ 5g/L, (NH₄)₂HPO₄ 3.5g/L, MgSO₄ 1M 4mL, glicerol 20 g/L, Extracto de levadura 5g/L, Metales trazas 1mL/L) con Ampicilina (Sigma) (100 µg/ ml), antiespumante 204 (sigma) al 10% 0.5mL. Este cultivo se creció a 37°C por aproximadamente 12 h hasta terminar el Glicerol. En este punto se indujo la expresión de la proteína rTC-2 adicionando 0.5 mM de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido, Merck) x 16 h a 18°C y se alimentando Glicerol al 50% por el mismo tiempo. La Biomasa obtenida se centrifugó a 4, 500 x g por 30 min y se lavó con PBS 1X, para luego almacenarla a -80°C hasta su uso para lisis y purificación.

Además, se tomaron muestras de 1 ml para determinar la expresión de la proteína por SDS-PAGE 15%. Cada muestra se diluyó para que alcanzaran un $OD_{600} = 1$, posteriormente se centrifugaron a $1000 \times g$ por 20 min, los sobrenadantes se descartaron y se reservaron los paquetes celulares. Éstos, se lisaron con 45 μ L de una solución de “BugBuster” (Merck) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Se obtuvo el sobrenadante (fracción soluble) y se separó del sedimento (fracción insoluble). Los extractos totales se resuspendieron con 30 μ L de Tris HCl 20 mM pH 8.0 y 10 μ L de Buffer de Laemmli 4X.

6.5.2 Expresión de rTC-2 Δ 11

Con el objetivo de determinar la participación de las cisteínas en la formación de agregados multiméricos de la rTC-2, se envió a sintetizar la secuencia de DNA eliminando las bases que codifican para los primeros 11 residuos del N-terminal (TC-2 Δ 11) que incluyen cuatro de las cinco cisteínas a Synbio Technologies, USA. Esta secuencia se recibió clonada en el plásmido pUC57-rTC-2 Δ 11, se subclonó en el vector de expresión pCri8a en los sitios NcoI y XhoI y se transformaron células competentes de *E. coli* BL21(DE3) para su expresión.

La expresión de la proteína recombinante se comprobó con la inducción con IPTG en medio 2TY a 18 °C. A partir de pDNA purificado de la construcción pCri8a-rTC-2 Δ 11 se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3). Una colonia de las células transformadas se inoculó en 5 mL de LB-Kn por 12 h a 37 °C y 200 rpm. Para la expresión se transfirieron 500 μ L del preinóculo a 50 mL de medio 2TY adicionado con 50 μ g/ml de kanamicina. Se incubó el cultivo a 37 °C y 200 rpm hasta que se alcanzaron 0.6 unidades de densidad óptica (DO_{600} nm). Se inició la inducción con 0.2 mM de IPTG y se mantuvo a 37 °C por 12 h a 200 rpm. Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida al 15 % y teñidos con azul de Coomassie R-250.

Una vez corroborada la inducción de la expresión, se escaló el cultivo a un fermentador de 2 L, siguiendo el procedimiento previamente señalado para la TC-2 nativa (Materiales y Métodos, 6.5.1).

6.5.3 Purificación de rTC-2 y rTC-2Δ11.

Se procedió a purificar la proteína rTC-2 y rTC-2Δ11 de la fracción soluble previamente obtenida. Para ello se utilizó una Columna de 20 cm de Econo-pac (BioRad), utilizando 12.5 ml de resina Ni-Sefarosa 6 Fast flow (Cytiva).

El esquema de purificación fue el siguiente: la columna se equilibró con 10 CV (Volúmenes de Columna) de Buffer A (Tris/HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, Glicerol 20%, NaN₃ 0.02%), seguido de la muestra, posteriormente se lavó con 5 CV de Buffer-A y se hicieron lavados de 15 CV con Buffer A e imidazol (50 mM). Finalmente, la elución de la proteína se llevó a cabo con 10 CV de Buffer B (20 mM Tris HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, NaN₃ 0.02%). El análisis de las fracciones se realizó con SDS-PAGE al 15 %. Adicionalmente, se corrieron muestras por triplicado de rTC-2 a y se incluyó como proteína de referencia a la Lisozima, dado que tiene un peso molecular cercano al esperado para la proteína (14 kDa), colocando ~ 2 µg de proteína por carril. El cambio de amortiguador se realizó como se describió previamente (Materiales y métodos 6.2.2.2) utilizando el amortiguador de almacenamiento Tris/HCl 50 mM pH 8, 50 mM NaCl, Glicerol 20%, NaN₃ 0.02% y las muestras se almacenaron a 4°C, -20°C y -80°C. La cuantificación de proteína se describe (Materiales y métodos 6.3).

6.6 Inmunodetección por Western Blot de rTC-2 y rTC-2Δ11.

Membranas de nitrocelulosa (NC) transferidas se bloquearon con Leche al 10 % por 1 h (37°C), se lavaron cinco veces con PBS-T 0.05 % (Amortiguador de fosfatos Salino-Tween 20) y se incubaron con el anticuerpo α- rTC-2, (donado por la Dra. Rossana Arroyo, Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular- Cinvestav) a una dilución 1:100, ON a 4°C. Al día siguiente la membrana de NC se lavó con PBS/T 0.05% y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (BioRad) a una dilución 1:3000 durante 2 h (37 °C). Por último, los sitios de unión del anticuerpo se revelaron por colorimetría acoplada a HRP (Peroxidasa de rábano) (BioRad).

6.7 Determinación de la actividad de PPlasa de la rTvCyP19 de *T. vaginalis*

Para evaluar la actividad de la PPlasa de rTvCyP19 purificada se usó el método reportado por Zemanova et al., 2020 basado en replegamiento de RNAsa T1 determinando el incremento de la fluorescencia intrínseca, a una longitud de onda de excitación de 268 y una longitud de onda de emisión de 325 nm, con apertura de excitación de 2 y de emisión de 4 en un espectrofluorómetro FluoroMax-3 (Horiba).

Antes de realizar los ensayos de replegamiento asistido, se desnaturalizó la RNAsa T1 (50 μ M) incubándola el amortiguador de desnaturalización (Urea 8 M, NaH_2PO_4 20 mM pH 6.0,) por 12-14h a temperatura ambiente y se midieron los espectros de emisión de fluorescencia correspondientes a la RNAsa T1 nativa y desplegada.

Se realizaron cinéticas midiendo intensidad de fluorescencia vs tiempo del replegamiento por dilución de la RNAsa T1 (50 μ M) desplegada a una concentración final de 2 μ M, en amortiguador de replegamiento (NaH_2PO_4 20 mM pH 6.0) por replegamiento espontáneo (control negativo) o con la adición de TvCyP19 a una concentración final de 25 nM o de la ciclofilina A humana (25 nM) como control positivo.

Adicionalmente, después de los ensayos de replegamiento se midieron los espectros de la RNAsa T1 en un rango de 300 a 400 nm. Los datos obtenidos fueron analizados y graficados con el programa GraphPad Prism 9.0.

6.8 Replegamiento asistido por TvCyP19, TvCyP19.9, DsbA, DsbC de rTC-2.

Para evaluar la actividad de las PPlasas TvCyP19 y TvCyP19.9 en el replegamiento asistido se decidió utilizar la rTC-2 por ser una proteína del propio parásito que se puede usar como modelo de replegamiento ya que se puede obtener de forma soluble e insoluble, además posee prolinas y cisteínas en su secuencia, además de que posee un triptófano en su secuencia que permitiría monitorear el replegamiento por fluorescencia, como se mencionó anteriormente, de manera análoga a la RNAsa T1 propuesta por Zemanova et. al, (2020).

Para poder comparar los espectros de emisión de rTC-2 desnaturalizada vs nativa, la proteína rTC-2 (50 μ M) fue incubada 16h a temperatura ambiente en Urea 8 M

(Urea 8 M) y β -mercaptoetanol 5 mM y se compararon con los espectros de emisión de la proteína nativa, para poder observar si había indicadores de cambios estructurales antes y después del replegamiento y para poder conocer el nivel máximo de emisión de la proteína nativa con el fin de utilizar esta longitud de onda para el monitoreo del replegamiento de la proteína. Para los espectros de emisión se utilizaron las siguientes condiciones: excitación a 280 nm y emisión de 300 a 450 nm, apertura de excitación=3 y de emisión=7 en un espectrofluorómetro FluoroMax 4 (Horiba).

6.8.2 Cinéticas de replegamiento espontáneo vs asistido

Se realizaron cinéticas midiendo intensidad de fluorescencia vs tiempo para determinar la eficiencia del sistema de replegamiento asistido con los chaperones (DsbA 40 nM, DsbC 40 nM) y las Ciclofilinas de *T. vaginalis* (TvCyP19 y TvCyP19.9, 25 nM), tomando como punto de partida los análisis de replegamiento de RNAsa T1 con ciclofilina humana reportadas por Zemanova *et al.*, 2020. Estas condiciones se optimizaron para poder evaluar el efecto del amortiguador de replegamiento (Tris HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 20 mM) sobre la proteína rTC-2. Para ello, se incubó rTC-2 (50 μ M) previamente desnaturalizada en Urea 8 M + β -Mercaptoetanol 5 mM, para replegarla por dilución en amortiguador de replegamiento a una concentración final de 2 μ M con o sin la asistencia de proteínas chaperonas.

Así, para el ensayo se colocó en una cubeta de 1 ml la proteína desnaturalizada, y posteriormente el amortiguador de replegamiento con o sin chaperonas. De inmediato, se midió la cinética de replegamiento en un tiempo de 200-300 s, para ello se utilizó una excitación a 280 nm, la emisión a 342 nm, apertura de excitación= 3 y de emisión= 7. Por otro lado, después de replegar la también se midieron los espectros de emisión, para corroborar que la proteína r-TC-2 estuviera replegada. Cabe señalar que la contribución de emisión de fluorescencia de las chaperonas en dilución fue despreciable debido a la baja concentración de las chaperonas. Los datos obtenidos fueron analizados y graficados con el programa GraphPad Prism 9.0.

6.9 Análisis de estructura secundaria de rTC-2 por Dicroísmo Circular

Se realizó un análisis cualitativo del espectro de emisión por Dicroísmo Circular de la rTC-2 nativa y de rTC-2 Δ 11 (2 μ M), desnaturalizada y replegada de forma espontánea o con asistencia de las chaperonas previamente obtenidas: rTvCyP-1, rTvCyP-2, rDsbA, rDsbC. El replegamiento se llevó a cabo como se explicó previamente (Materiales y métodos, 6.9.2). Para ello se utilizó un espectropolarímetro JASCO J815 y celdas de 1 cm de paso óptico (con la asesoría de la Dra. Claudia Benitez de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN).

6.10 Inhibición de la actividad proteolítica por rTC-2 y rTC-2 Δ 11

6.10.1 Inhibición de actividad de papaína con rTC-2 nativas vs replegadas con o sin asistencia de chaperonas.

Los ensayos de inhibición de las recombinantes replegadas se realizaron con el motivo de comprobar si las estructuras alcanzadas por las proteínas replegadas retenían las propiedades inhibitorias de las proteínas nativas, lo que indicaría que están alcanzando un plegamiento correcto. Los replegamientos se llevaron a cabo en las condiciones indicadas en la Figura 4.



Figura 4. Estrategia experimental de replegamiento de rTC-2 y rTC-2 Δ 11.

Los ensayos se realizaron evaluando la actividad de papaína en presencia de rTC-2 y rTC-2 Δ 11 nativa o replegada con o sin chaperonas utilizando el sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-MCA (Sigma) y E64 como control negativo de actividad. Para ello la papaína (2 ng/ μ l) se activó con amortiguador de activación (50 mM Tris, pH 6.5, 5 mM DTT) por 10 minutos a 25 °C. Después, la papaína se incubó con una única concentración (0.7 μ M) de rTC-2, rTC-2 Δ 11 o E64 y la reacción inicia al añadir Z-Phe-Arg-MCA (40 μ M). La fluorescencia se midió a una λ de excitación de 355 nm y λ de emisión de 460 nm en un espectrofluorómetro SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices), de acuerdo con lo reportado por Puente-Rivera et. al., (2014). La actividad relativa de papaína se calculó dividiendo el valor de la pendiente obtenida (IFR/s) de la parte lineal de la cinética de actividad y se tomó como el 100% de actividad. Para el porcentaje de inhibición, sólo se realizó el cálculo del valor inverso de actividad.

6.10.2 Inhibición de actividad proteolítica de Extractos Totales de proteasas de *T. vaginalis* por rTC-2 y rTC-2 Δ 11.

En cuanto a los ensayos de actividad con extracto total de proteasas (ETP) de *T. vaginalis*, se utilizó el aislado CNCD 188 de *T. vaginalis*, (como se preparó el extracto). 20 μ g de ETP se incubaron con diferentes concentraciones de rTC-2, rTC-2 Δ 11, E64 (0, 0.7 μ M, 2 μ M, 2.7 μ M) en el amortiguador de activación (50 mM NaOAc pH 5.0, 4 mM EDTA, 8 mM DTT). El procedimiento de medición de la reacción se realizó de manera análoga a la medición de actividad de papaína.

6.11 Inhibición de la citotoxicidad de *T. vaginalis* sobre células HeLa por rTC-2 y rTC-2 Δ 11

6.11.1 Cultivo de *T. vaginalis*

Para los ensayos de citotoxicidad se utilizó el aislado CNCD 188 de *T. vaginalis*, las cuales se crecieron por una semana en medio Triptona-Extracto de levadura-Maltosa (TYM) adicionado con suero bovino adulto inactivado por calor (HIBS) a 37°C (Alvarez-Sánchez et al., 2000).

6.11.2 Cultivo de células HeLa.

Células HeLa se sembraron en medio DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco) (Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA, USA) adicionado con suero bovino adulto inactivado por calor (HIBS) a una temperatura de 37°C por 48 horas con flujo constante de CO₂ al 5% y se incubaron hasta la confluencia.

6.11.3 Ensayo de Citotoxicidad de *T. vaginalis* sobre células HeLa en presencia de rTC-2 y rTC-2Δ11.

Para realizar los ensayos se interaccionaron parásitos *T. vaginalis* con monocapas de células HeLa en una proporción 5:1 de acuerdo con lo reportado (referencia). Los parásitos se incubaron previamente en un medio de interacción (DMEM: TY, 2:1) en presencia de rTC-2 y rTC-2Δ11, L-trans-3-carboxoxiran-2-carbonil-L-leucilagmatina (E64), como control positivo, o albúmina de suero bovino (BSA), como control negativo a concentraciones de 18 μM, 36 μM y 54 μM. La interacción de los parásitos con las células se llevó a cabo durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, la destrucción de la monocapa fue cuantificada con el espectrofotómetro VersaMax (Molecular Devices) a una longitud de onda de 570 nm y se realizaron en triplicados técnicos y biológicos.

se observaron aminoácidos altamente conservados, algunos de ellos forman parte de secuencias que poseen actividad catalítica previamente reportadas (Hsu et al., 2014). En el cladograma (Figura 5 B), se observa que las ciclofilinas de *T. vaginalis* se encuentran agrupadas con las ciclofilinas de *T. cruzi* en un clúster distante al Trigger factor de *E. coli*. Estas diferencias significativas, respaldan la importancia que podría tener una PPlasa de parásitos protozoarios participando en el repliegamiento de proteínas de organismos de este grupo.

7.1.1 Parámetros fisicoquímicos de TvCyP19 y TvCyP19.9

Se observaron que los puntos Isoeléctricos teórico de 8.57 y 8.93 para TvCyP19 y TvCyP19.9 respectivamente, lo que señalaría un carácter básico de ambas proteínas. Además, el coeficiente de extinción molar se usó para calcular la concentración de la proteína en casos de purificación.

7.2 Expresión de rTvCyP19 en *E. coli*.

Se expresó la proteína rTvCyP19 en *E. coli*. BL21-DE3 a escalas de 500 ml y 1L. En la Figura 6, se muestra análisis electroforético del extracto total antes y después de la inducción con 1 mM de IPTG y de las fracciones soluble (carril 3) e insoluble (carril 4). Como se puede observar la rTvCyP19 se expresó parcialmente soluble.

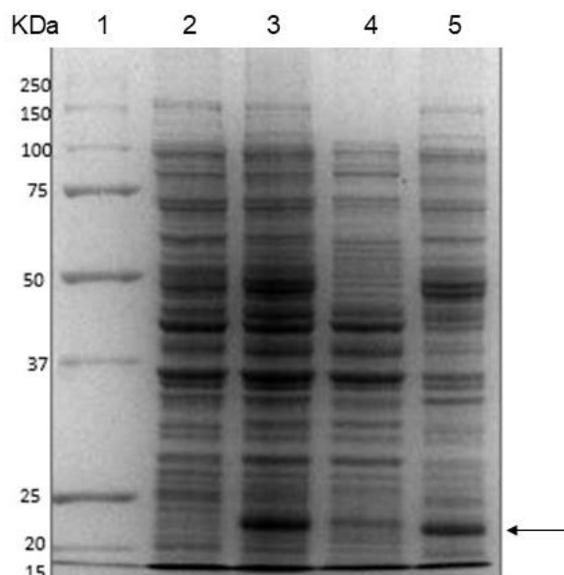
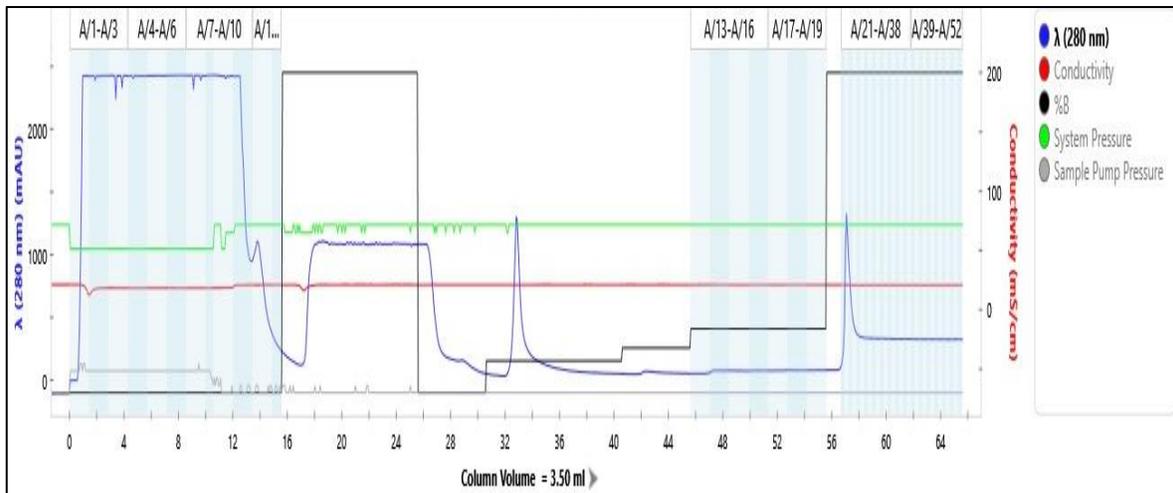


Figura 6. Expresión de rTvCyP19 en *E. coli*. Análisis electroforético de la expresión de la rTvCyP19 en SDS-PAGE al 12%. Marcadores de Peso Molecular (carril 1), Extracto total antes (carril 2) y después (carril 3), fracción soluble (carril 4) e insoluble (carril 5). La flecha indica la presencia de rTvCyP19 en el peso esperado.

7.3 Purificación de rTvCyP19 por cromatografía de afinidad a Níquel.

De la proteína obtenida en la fracción soluble, se procedió a purificarla por cromatografía de afinidad a Níquel. Para ello, se estandarizaron las condiciones de purificación para rTvCyP19. En la Figura 7 A se muestra el perfil cromatográfico de la purificación de la proteína, en donde se observa en color azul la A_{280} y la elución de la proteína con el Buffer B (500 mM Imidazol). En la figura 7 B se muestra el análisis por SDS-PAGE al 12% de las fracciones obtenidas, con presencia de rTvCyP19 en el peso esperado. Se obtuvo la proteína rTvCyP19 purificada a una concentración 1.2 mg/ml, obteniéndose rendimientos de 24 mg/ml de proteína recombinante por litro de cultivo, concentraciones que fueron suficientes para poder llevar a cabo los experimentos posteriores.

A)



B)

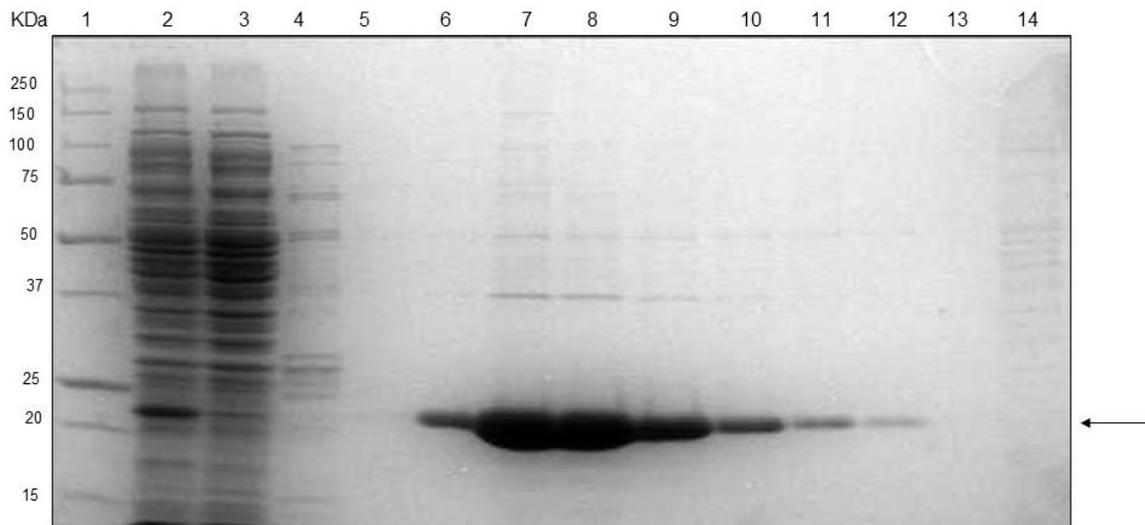


Figura 7. Purificación por cromatografía de afinidad a Níquel de rTvCyP19.

(A) Perfil cromatografico de la purificación de rTvCyP19 en azul la Abs a 280 nm. (B) Electroforesis en SDS-PAGE al 12%. MPM (carril 1), fracción soluble (carril 2), proteína no unida (carril 3), lavados con 50 mM Imizadol (carriles 4, 5) y elución con 500 mM Imizadol (carriles 6-12).

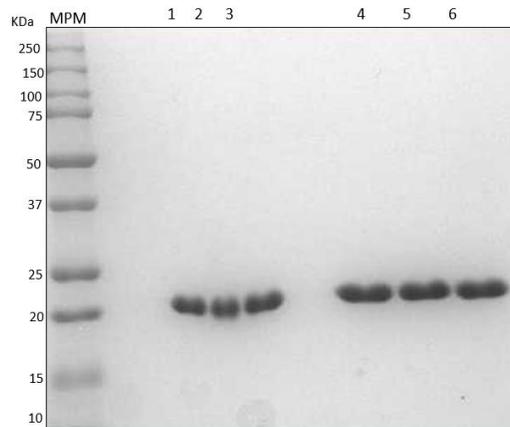


Figura 8. Determinación de la pureza de rTvCyP19 . Electroforesis en gel de Poliacrilamida SDS-PAGE al 12% de 4 ug de rTvCyP19 purificada por cromatografía de afinidad a Níquel. MPM (marcadores de peso molecular), Muestra en condiciones no reductoras (carriles 1-3) y reductoras (carriles 4-6).

7.4 Pureza de rTvCyP19.

Como se muestra en la Figura 8, se observa una sola banda en condiciones reductoras y no reductoras lo que indica una pureza estimada >95 % suficiente para los ensayos de repliegamiento a realizar.

7.5. Producción de las proteínas rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9 .

7.5.1 Expresión de proteínas rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9 en *E. coli*.

En conjunto con el estudiante de maestría Alejandro Otero-Pedraza (2024) se expresaron las proteínas chaperonas DsbA, DsbC y TvCyP19.9 en *E. coli* BL21-DE3 en 500 ml de medio 2xTY. En la Figura 9, se muestra el perfil electroforético del extracto total antes (carril 1) y después (carril 2) de la inducción con 1 mM de IPTG. Todas las proteínas chaperonas se expresaron en ambas fracciones, soluble e insoluble, por lo que en se partió de la fracción soluble para su purificación.

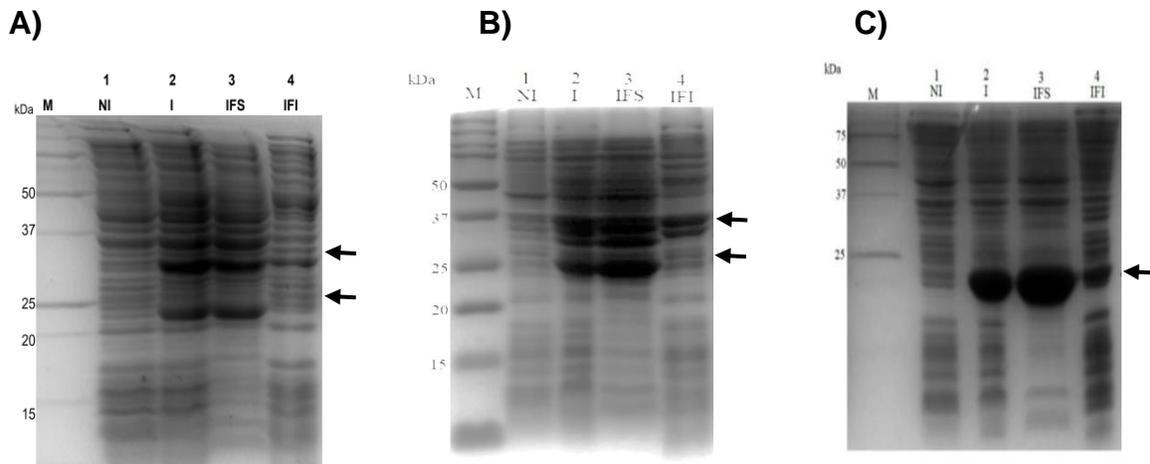


Figura 9. Expresión de las proteínas rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9 en E. coli. Perfiles electroforéticos de expresión de las proteínas recombinantes en gel de Poliacrilamida SDS-PAGE al 15%. **(A)** rDsbA, **(B)** rDsbC y **(C)** rTvCyP19.9. En todos los casos para la inducción se adicionó 0.5 mM IPTG a una $OD_{600}=1$, y se incubaron por, 20 h a 20°C o a agitación de 200 rpm. Marcadores de Peso Molecular (M), extracto total antes (carril 2) y después (carril 3) de la inducción, fracción soluble (carril 3) e insoluble (carril 4). La flecha indica la presencia de las proteínas en el peso esperado.

7.5.2 Purificación de rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9.

Como se observa en la Figura 14, al durante la purificación, las proteínas chaperonas comienzan a eluir pronto; rDsbA comienza a eluir a partir de los lavados a 10 mM de imidazol, presentando picos altos de elución a 250 mM de imidazol; mientras que la proteína rDsbC eluye a partir de 75 mM imidazol. De forma similar, la proteína rTvCyP19.9 comienza a eluir a partir de 150 mM de imidazol. Además, cabe señalar que rDsbA y rDsbC presentan dos bandas de pesos cercanos, en el caso de DsbA de 23 y 32 kDa y para DsbC de 25 y 35 kDa. Ambas bandas son inmunodetectadas por Western Blot por reconocimiento de α -Histidinas (Datos no mostrados), lo que corrobora que se trata de la proteína recombinante. Se presume, que las bandas corresponden a las proteínas con una etiqueta (de menor peso) y dos etiquetas de histidinas (de mayor peso). Las proteínas eluidas en las fracciones de mayor concentración y con menor número de contaminantes, se conjuntaron en un pool a partir del cual se concentró la proteína (Materiales y Métodos, 6.4.2). Para rDsbA se obtuvo una concentración de 1.2 mg/ml, para rDsbC 2 mg/ml y para rTvCyP19.9 se obtuvo 1 mg/ml (Figura 10 A, B, C).

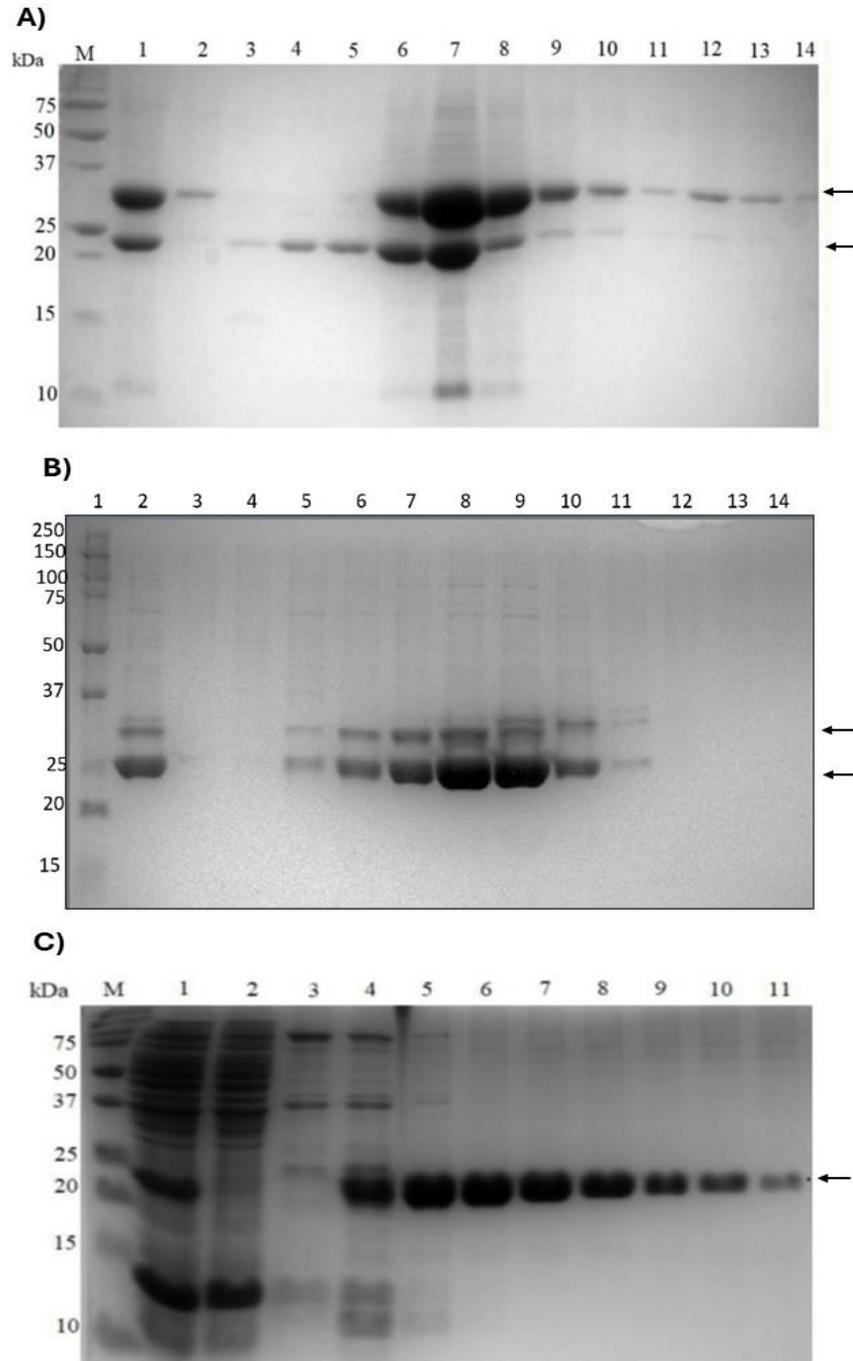


Figura 10. Purificación de las proteínas rDsbA, rDsbC y rTvCyP19.9.

Perfil electroforético en SDS-PAGE al 15% de la purificación por cromatografía de afinidad a Niquel de las proteínas **A)** rDsbA, fracción soluble (carril 1), proteína no unida (carril 2), lavados imidazol 10mM (carril 3-5), 250 mM (carriles 6-10) elución 500mM (carriles 11-14). **B)** rDsbC, fracción soluble (carril 2) , proteína no unida (carril 3), Lavados imidazol 10 mM (carril 4), Gradiente 0-80% de amortiguador B (carriles 5-11). **C)** rTvCyP-2 , fracción soluble (carril 1), proteína no unida (carril 2), Elución con 30% de Amortiguador B (carriles 3-11).

7.6. Determinación de actividad PPlasa de TvCyP19 de *T. vaginalis*

En la Figura 11 se muestra en rojo el espectro de emisión de la RNAsa T1 (50 μ M) desnaturalizada, donde se observa que el un pico máximo a una longitud de onda que corresponde con el espectro de emisión reportado previamente para la RNAsa T1 desnaturalizada (Zemanova et al., 2020) y en azul el espectro de emisión de la proteína replegada, similar a de la proteína nativa, (Walters et al., 2009), corroborando que efectivamente hay una renaturalización al finalizar cada ensayo.

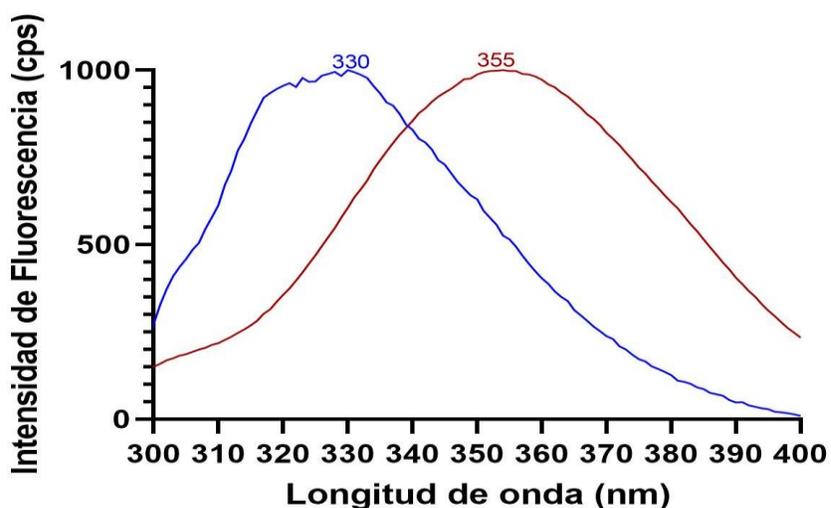
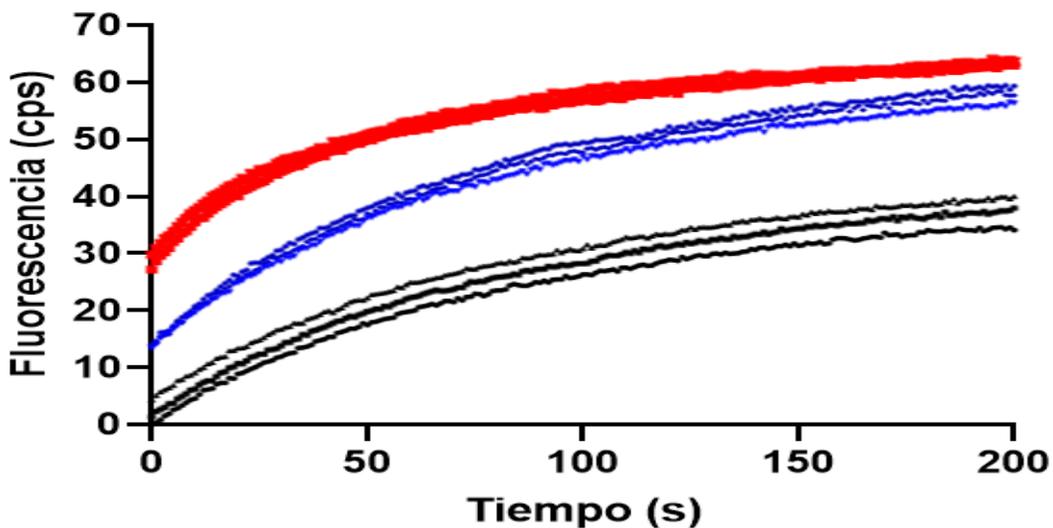


Figura 11. Espectro de emisión de RNAsa T1 antes y después de ser replegada. Excitación a 280 nm. RNAsa T1 (50 μ M) en 8 M de Urea (rojo), RNAsa T1 (2 μ M) replegada en amortiguador de replegamiento y en presencia de rTvCyP19 (25 nM) (azul). Ambos espectros se normalizaron.

7.6.1 Cinética de Replegamiento espontáneo vs asistido por TvCyP19

Se evaluó la participación de rTvCyP19 de *T. vaginalis* en una concentración 25 nM de acuerdo con lo reportado (Zemanova et al., 2020) en el replegamiento asistido de RNAsa T1 (Concentración final 2 μ M), para ello se comparó la parte lineal del gráfico de cinética de replegamiento obtenido y se expresó como Intensidad de Fluorescencia/ Tiempo. Se observaron diferencias importantes entre las intensidades de fluorescencia obtenidas en los tres tratamientos, así como en los valores de las pendientes entre los tratamientos con y sin asistencia de la ciclofilina humana (Control positivo) y de la ciclofilina 1 de *T. vaginalis* (Figura 12 A,B).

A)



B)

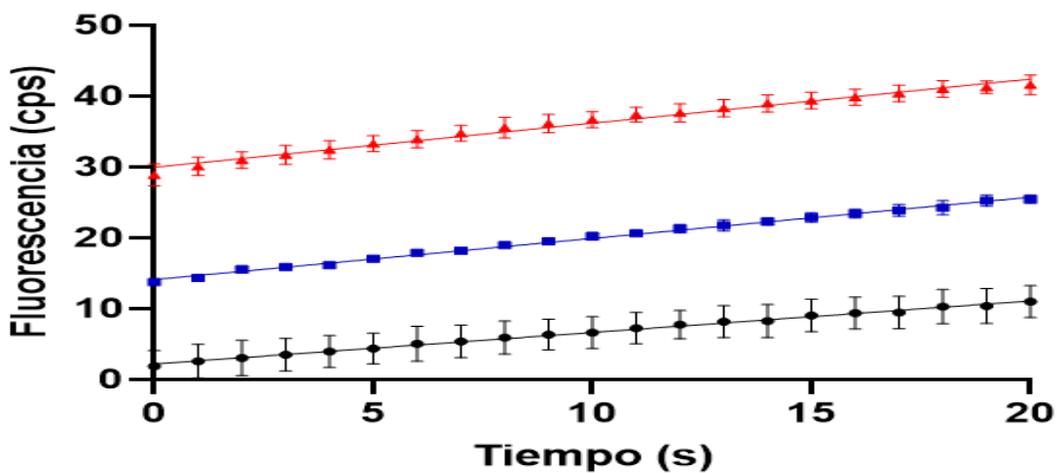


Figura 12. Determinación de actividad de PPlasa de rTvCyP19 . A) Cinéticas de replegamiento de la RNAsa T1 Espontáneo (negro) asistida por hCyPA (en rojo) y por rTvCyP19 (en azul). **B)** Determinación de la actividad de PPlasa (pendiente) a los primeros 20 segundos (parte lineal) de hCyPA (rojo), TvCyP19 (azul), Sin asistencia (negro). Los replegamiento se realizaron como se indica en materiales y métodos.

Al realizar un análisis de regresión lineal sobre el promedio de las pendientes observadas en los primeros 20 segundos de reacción, se observaron diferencias con respecto al replegamiento espontáneo (sin asistir), de 0.13 Δ IFR/s (5.44 Δ IFR/s nmol) para rTvCyP19 y de 0.17 Δ IFR/s (7.08.44 Δ IFR/s nmol) para el control positivo con ciclofilina humana. Se tomó como referencia el valor obtenido para ciclofilina humana como un 100% de actividad y 0% de actividad para el replegamiento espontáneo, por lo que rTvCyP19 presentó una actividad del 77%. Estos resultados indican la rTvCyP19 purificada es enzimáticamente activa y apta para los experimentos de replegamiento con las proteínas de *T. vaginalis*, en este caso con la rTC-2.

7.7 Producción de rTC-2 y rTC-2 Δ 11.

7.7.1 Expresión de rTC-2 y rTC-2 Δ 11 en *E. coli*.

Se puede observar que rTC-2 y rTC-2 Δ 11 se obtuvieron en las fracciones soluble e insoluble, por lo que, para los pasos posteriores de purificación, se procedió a partir de la fracción soluble. En la Figura 13, se muestra el perfil electroforético del extracto total antes (carril 2) y después (carril 3) de la inducción con 1 mM de IPTG. Se observa también la fracción soluble (carril 4) y la fracción insoluble (carril 5). Además, gracias al cultivo en fermentador, se obtuvieron aproximadamente 36 g/L de biomasa en cada caso. Se puede observar que la proteína rTC-2 tiene una tendencia a formar dímeros y trímeros desde su expresión recombinante (Figura 13 A). Por el contrario, la proteína rTC-2 Δ 11 no muestra presencia de multímeros al momento de su expresión (Figura 13 B).

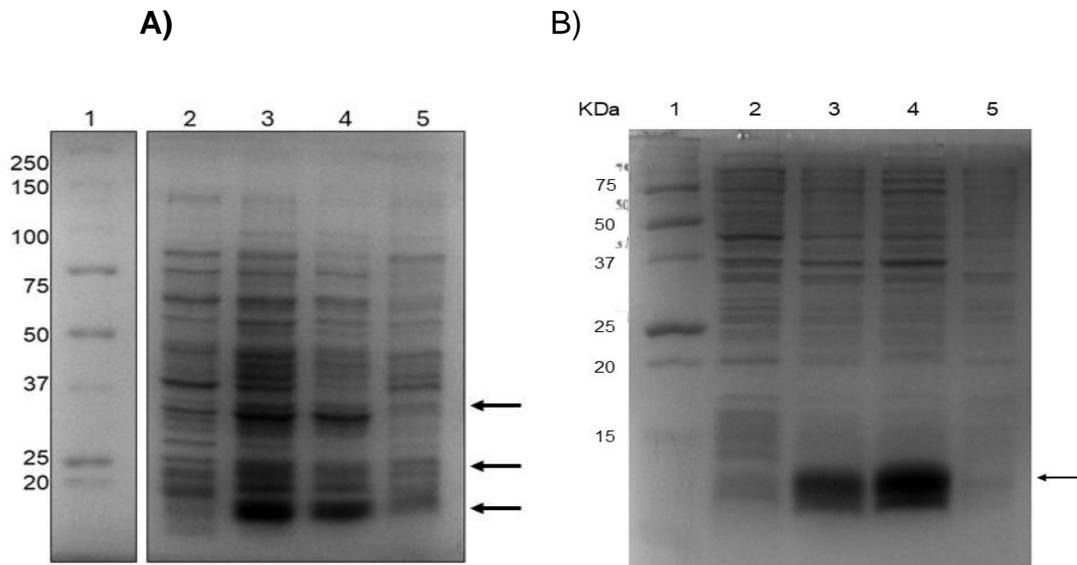


Figura 13. Expresión de rTC-2 (A) y rTC-2Δ11 (B) en *E. coli*. Perfiles electroforéticos de expresión de las proteínas recombinantes en gel de Poliacrilamida SDS-PAGE al 15%. Marcadores de Peso Molecular (M), extracto total antes (carril 2) y después (carril 3) de la inducción, fracción soluble (carril 3) e insoluble (carril 4). La flecha indica la presencia de las proteínas en el peso esperado.

7.7.2 Purificación de rTC-2 y rTC-2Δ11

En el caso de la proteína r-TC2 desde su expresión hasta su purificación se observan al menos dos bandas prominentes (Figura 14 A). En este caso se obtuvieron concentraciones de proteína de proteína purificada 4 mg/ml y 6 mg/ml, obteniendo un rendimiento de 72 mg totales de medio litro de cultivo. En contraste, la proteína rTC-2Δ11 no muestra presencia de multímeros al momento de su expresión ni en su posterior purificación (Figura 14 B), obteniéndose un total de 449.5 mg de proteína de medio litro de cultivo, a una concentración de 9.9 mg/ml de proteína, una diferencia importante en el rendimiento de producción de estas dos proteínas.

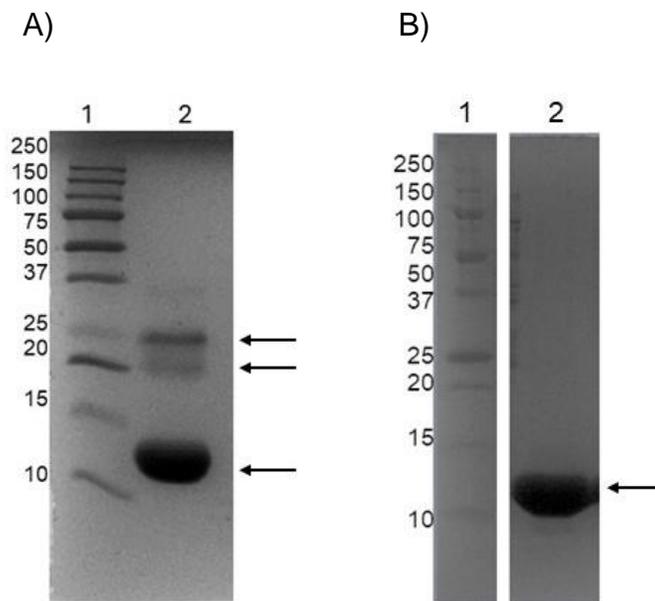


Figura 14. Purificación por IMAC de rTC-2 (A) y rTC-2Δ11 (B). Purificación de proteínas para la maquinaria de repliegamiento. Electroforesis en gel de Poliacrilamida SDS-PAGE al 15%. Carriles: 1= MPM 250 kDa, 2= rTC-2 o rTC-2Δ11.

7.8 Inmunodetección por Western Blot de rTC-2

La inmunodetección con anticuerpos policlonales α -rTC-2 se realizó para corroborar que las bandas que se observan en los geles de la proteína purificada correspondan efectivamente a multímeros de la misma proteína y no a proteínas contaminantes.

Como se observa en la Figura 15 A), hay un reconocimiento claro por parte del anticuerpo de las bandas a 12.5 kDa y en pesos superiores de ~20, 25, 37 kDa, cabe señalar que estas bandas se pueden observar en el gel copia SDS-PAGE (Figura 15 B), algunas con menor intensidad.

Este análisis, corrobora la fuerte capacidad que tiene rTC-2 de formar multímeros, aún en presencia de agentes reductores como el β -MeOH. Esta capacidad de asociación es muy plausible que se debiera a la presencia de cuatro cisteínas libres presentes en el extremo N-terminal de la molécula, ya que la formación de multímeros se ve drásticamente disminuida en la rTC-2 Δ 11, la cual carece de estas cisteínas (Figura 15 C, D).

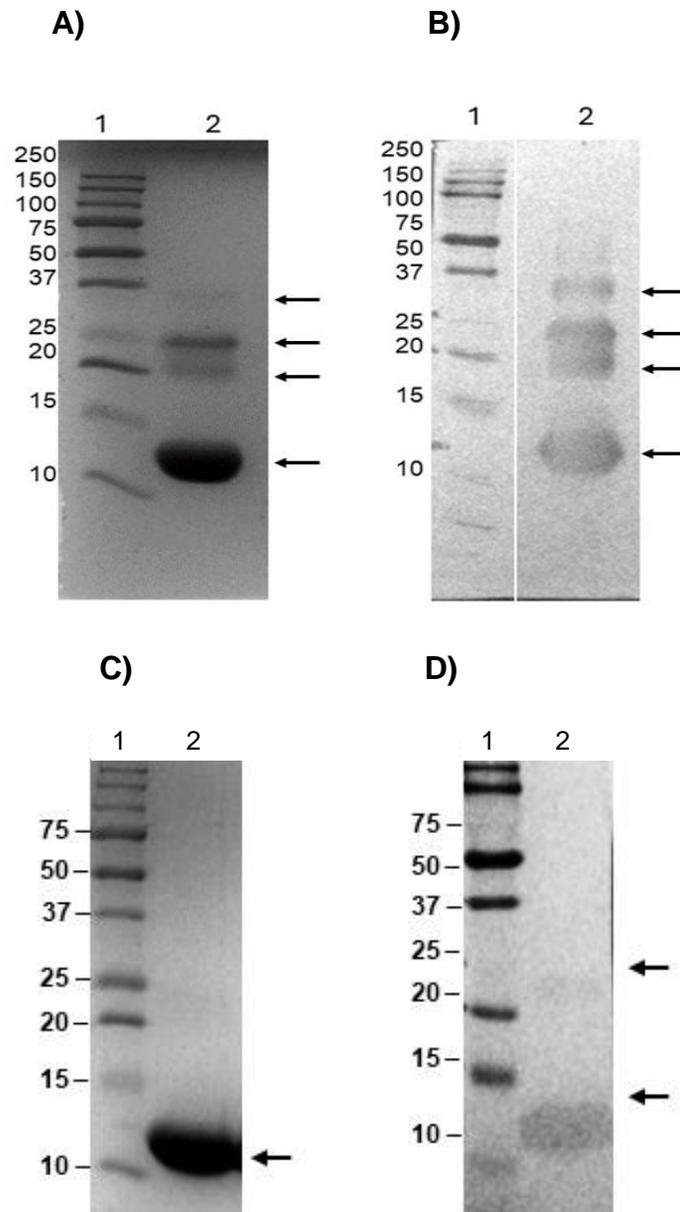


Figura 15. Inmunodetección de rTC-2 y rTC-2 Δ 11 por Western Blot. En panel **A)** y **C)** SDS-PAGE al 15% con rTC-2 y rTC-2 Δ 11 respectivamente, **B)** y **D)** Western Blot de rTC-2 y rTC-2 Δ 11 respectivamente incubados con α -rTC-2 Dilución 1:100.

7.9 Replegamiento asistido de rTC-2.

El espectro de emisión de la rTC-2 (50 μ M) en 8 M urea + 5 mM de 2-Mercaptoetanol corresponde al de una proteína desnaturalizada, pues se observa un pico máximo a una mayor longitud de onda (358 nm) en comparación con el pico máximo del espectro de la proteína nativa incubada con 2-Mercaptoetanol (342 nm) o sin 2-Mercaptoetanol (345 nm), ya que, de acuerdo a lo reportado, éstas presentan un desplazamiento hacia la izquierda (longitud de onda menor) en comparación con la proteína desnaturalizada (Figura 16). Además, también se observan diferencias en los niveles de intensidad de fluorescencia obtenidos, ya que como es esperado, las proteínas desnaturalizadas tienen menores intensidades de fluorescencia en comparación con las proteínas nativas (Walters et al., 2009).

7.9.1 Cinética de Replegamiento espontáneo vs asistido por fluorescencia intrínseca.

De acuerdo con los datos obtenidos en la cinética de replegamiento espontáneo vs asistido por chaperones de rTC-2 (Figura 17) se observaron diferencias significativas en las pendientes obtenidas al analizar la parte lineal del gráfico expresado como Intensidad de Fluorescencia/ Tiempo por regresión lineal (Tabla 1).

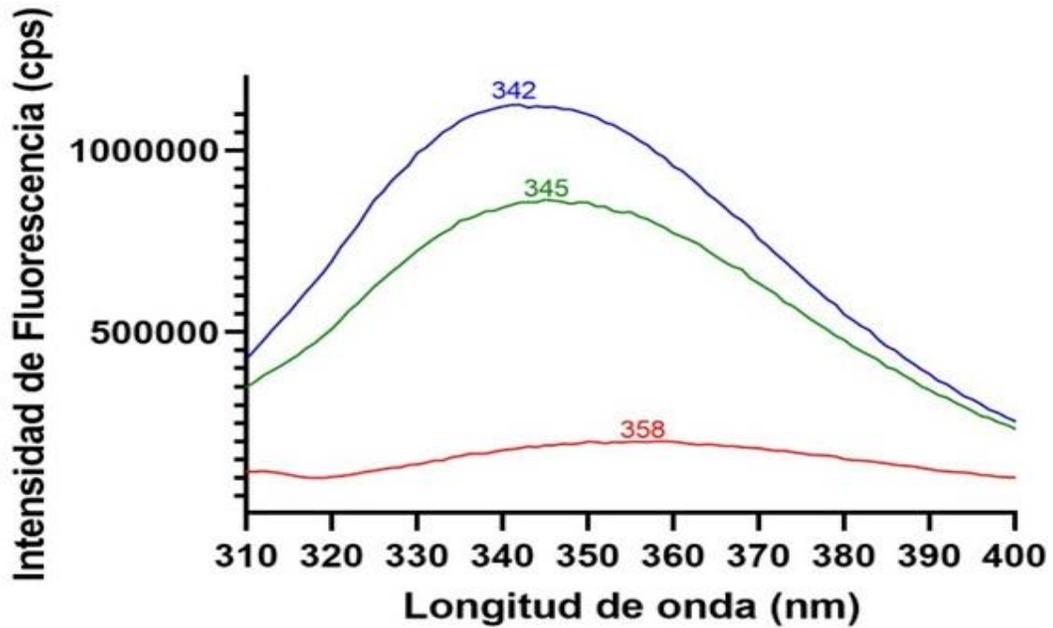


Figura 16. Espectros de emisión de rTC-2.

Los espectros de emisión de la proteína rTC-2 2uM nativo en amortiguador (Tris HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, NaN₃ 0.02%) en condiciones reductoras (5 mM β-MeOH-azul) y no reductoras (verde) y desnaturalizada (rojo). Los espectros se realizaron a una excitación a 280 nm, emisión 310-450 nm, aperturas de excitación/emisión= 3/7 y temperatura 10°C..

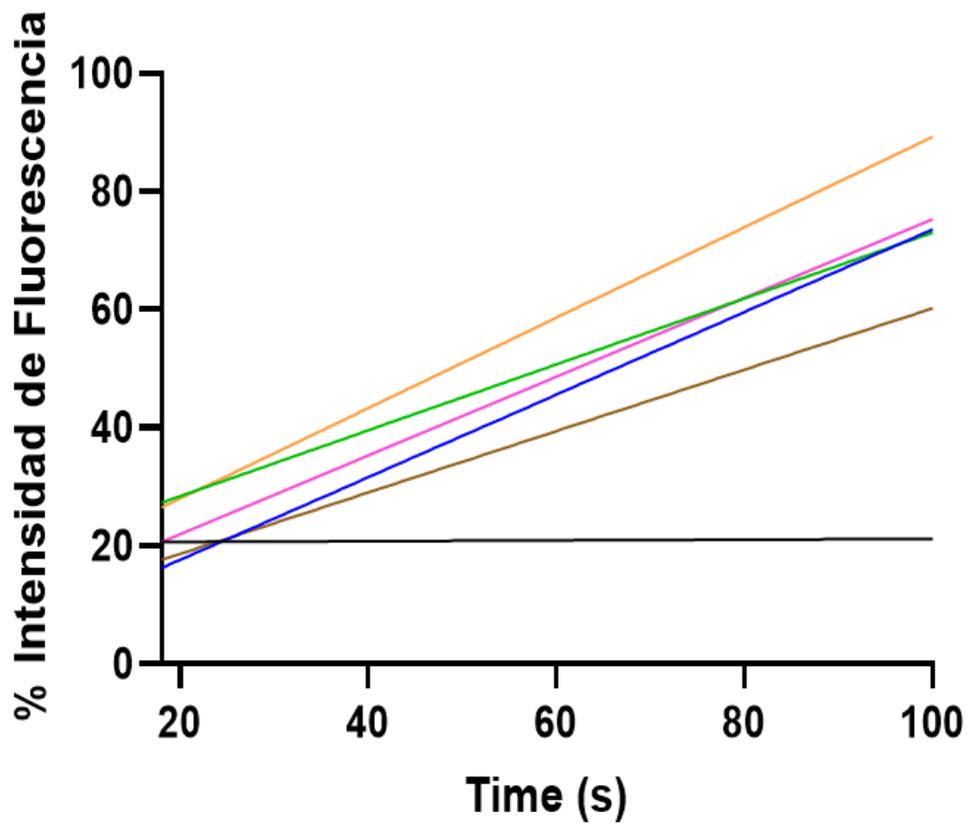


Figura 17. Cinéticas de replegamiento de RNAsa T1 asistido por chaperones moleculares. Replegamiento espontaneo (negro), con asistencia de rTvCyP19 (verde); rTvCyP19.9 (naranja); rDsbA (dorado) y rDsbC (rosado); rDsbA + rDsbC + rTvCyP1 +rTvCyP2 (azul).

Tabla 1. Replegamiento de rTC-2¹.

Chaperones	Pendiente ²		Actividad relativa ³
	(Δ FI/s)	(Δ FI/s nMol)	
No	0 \pm 5	N/A	0 %
TvCyP1	147.8 \pm 6.4	5848	72.7%
TvCyP2	202.8 \pm 11	8048	100 %
DsbA	137.7 \pm 8.8	3402	42.3%
DsbC	176.7 \pm 5	4377	54.4%
TvCyP1, TvCyP2, DsbA y DsbC.	185.2 \pm 6.7	N/A	91.3%

¹Todos los replegamiento se realizaron por dilución de rTC-2 desnaturalizada como se indica en materiales y métodos. ²El valor representa la diferencia entre la pendiente del replegamiento asistido-espontaneo. ³Los valores se normalizaron tomando la máxima pendiente como 100%.

Como se observa en la Tabla 2, se encontraron diferencias en los valores de pendientes obtenidas con respecto al replegamiento espontaneo en todos los tratamientos. La mayor velocidad de replegamiento se obtuvo con TvCyP219.9 y el que incluyó TvCyP19, TvCyP19.9, DsbA y DsbC, seguido por TvCyP19, DsbC y DsbA. En todos los casos la cinética de replegamiento se incrementó al menos 40% a la observada en el replegamiento espontaneo. En la figura 18 se muestran los espectros de emisión de la TC-2 replegada, donde se puede observar que el espectro de emisión de la rTC-2 replegada con chaperones coincide con el espectro de emisión de la proteína nativa, no así con la replegada de manera espontanea que muestra un espectro de emisión con un pico máximo mayor indicando que solo una fracción de la proteína se ha plegado.

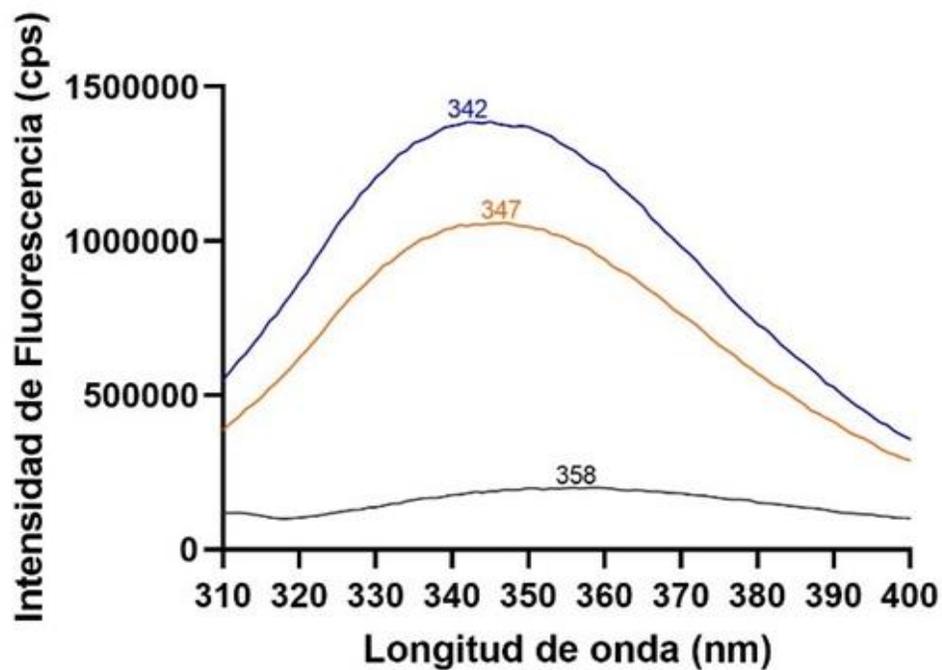


Figura 18. Espectros de emisión de rTC-2 desnaturalizada (negro) y replegada con (azul) o sin asistencia de chaperones moleculares (naranja). Los espectros se obtuvieron a una excitación= 280 nm, emisión= 310-450 nm. Aperturas de excitación/ emisión= 3/7. Temperatura 10°C. Amortiguador: Tris HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, NaN₃ 0.02%.

7.10 Determinación de la estructura secundaria de las proteínas rTC-2 y rTC-2Δ11 .

Para evaluar la recuperación de estructura secundaria se midieron los espectros de emisión de la proteína rTC-2 nativa y se compararon con los espectros de emisión de la rTC-2Δ11 (Figura 19), con los datos cuantitativos obtenidos se pudo obtener la proporción de estructuras secundarias, en las que se observaron diferencias menores entre la proporción de hélices alfa (19% para rTC-2 y del 14% para rTC-2Δ11) y láminas beta de ambas proteínas, con una proporción del 31% de láminas beta para rTC-2 y del 36% para rTC-2Δ11.

Además, ambas proteínas recombinantes también se compararon con los espectros de emisión de las proteínas rTC-2 y rTC-2Δ11 replegadas con y sin asistencia de chaperonas, así como la proteína desnaturalizada en urea, obteniendo una descripción cualitativa por comparación entre las mismas estructuras ().

Así, se pudo observar que los tratamientos que alcanzan los valores máximos de emisión son la proteína rTC-2Δ11 nativa, la rTC2 replegada con chaperones y la rTC-2Δ11 replegada por Dilución, esto podría indicar que estas proteínas están adquiriendo una mejor conformación de la estructura secundaria en comparación con los otros tratamientos. Por otro lado, la menor intensidad en el espectro de emisión de la rTC2 se podría deber a su multimerización, que evita que su espectro sea parecido al monómero. Finalmente, los tratamientos de la rTC2 replegada por dilución, muestran una emisión muy baja, que podría indicar una conformación de estructura secundaria diferente a la nativa. Esto se estaría corroborando en los análisis por fluorescencia, en donde el replegamiento por dilución no muestra una pendiente inicial elevada y los espectros de emisión se ven diferentes a la proteína nativa. Finalmente, llama la atención que la muestra replegada de rTC-2Δ11 replegada con chaperonas no muestra espectros de Dicroísmo similares a la conformación nativa.

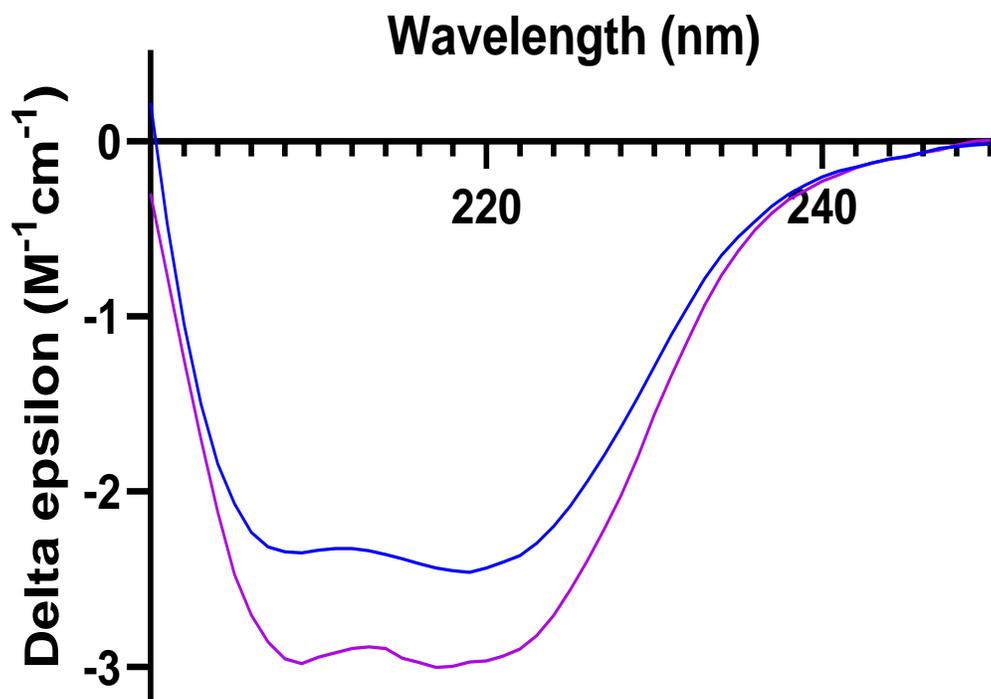


Figura 19. Determinación de la estructura secundaria de rTC-2 y rTC-2 Δ 11. Espectro de emisión por Dicroísmo circular de rTC-2 nativa (morado) y rTC-2 Δ 11 (azul). En X= Longitud de onda (nm), en Y= Unidades de absorción molar por residuo de dicroísmo circular (Delta ϵ $M^{-1} cm^{-1}$).

7.11 Evaluación de la recuperación de función inhibitoria de rTC-2.

7.11.1 Evaluación de la eficacia de replegamiento por recuperación de función de rTC-2 replegada con o sin asistencia de chaperonas.

El plegamiento correcto de rTC-2 también se evaluó por recuperación de función, para lo cual se realizaron ensayos de inhibición de actividad de papaína con las proteínas rTC-2 replegadas de forma espontánea o con asistencia de las chaperonas, la cinética de datos obtenidos se presenta en el Apéndice II. Así, se tomaron los valores de pendiente obtenidos para la parte lineal de la cinética de cada tratamiento, los cuales reflejan la actividad de papaína en las diferentes condiciones (Figura 20 A y B), obteniendo también los porcentajes de inhibición a partir de estos datos tomando en cuenta el inverso de la actividad enzimática (Figura 21 A,B).

De esta manera se evaluó la influencia que tendría cada chaperona en el replegamiento por medio de análisis del porcentaje de recuperación de actividad inhibitoria de rTC-2. Como se puede apreciar en la Tabla 2 para la inhibición de la actividad de papaína por rTC-2 después 3 minutos) de replegamiento, las chaperonas que influyen en un mejor replegamiento son la TvCyP19.9 (76.6%), TvCyP19 y DsbC (71%), ya que en estos tratamientos rTC-2 logra los mayores porcentajes de inhibición y en comparación con la proteína replegada de forma espontánea que sólo alcanza un 29% inicialmente. En comparación, el replegamiento de 12 horas, se observa que nuevamente TvCyP19 (80%), TvCyP19.9 (76%), en conjunto con DsbA (73%), muestran el mayor impacto sobre la preservación de actividad inhibitoria de rTC-2, en comparación con el replegamiento espontáneo que alcanza un 50%. Esto, nos estaría reflejando la importancia que tienen los enlaces proliil para el replegamiento de este tipo de proteínas en la conformación de una adecuada estructura cuaternaria.

En el caso de las Disulfuro oxidorreductasas, la que tiene mayor impacto a un mayor tiempo de replegamiento sería la DsbA, mientras que la DsbC podría estar ayudando con efectos más inmediatos sobre las cisteínas. Es interesante observar que los tratamientos con las 4 chaperonas en su conjunto muestran un menor

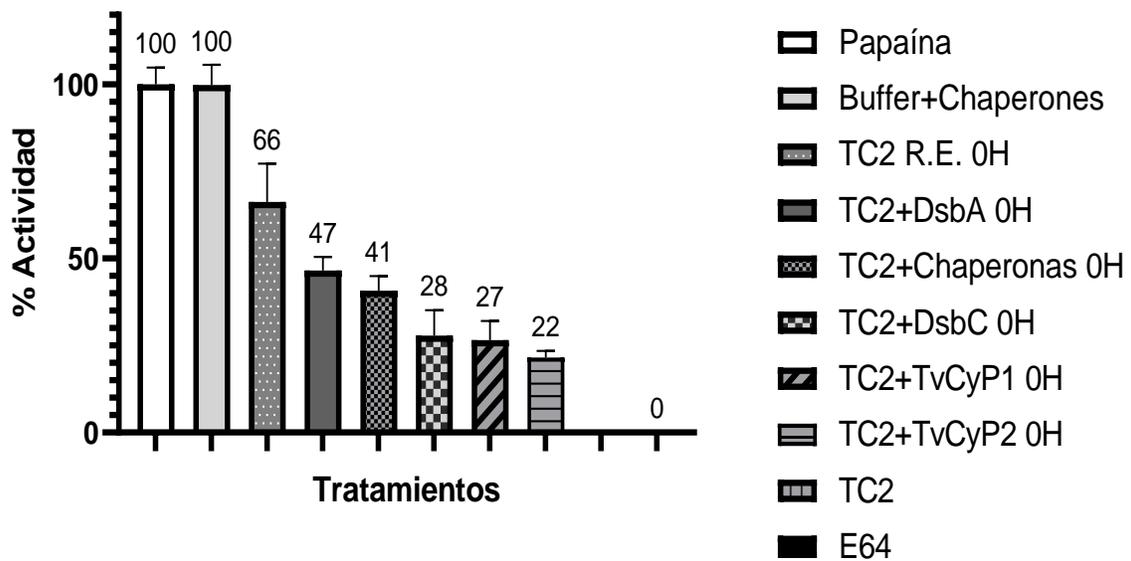
porcentaje de inhibición al de las ciclofilinas en individual a las 12 H y sólo están por encima de DsbA en el replegamiento inmediato. Esto podría deberse a que quizá alguna de las chaperonas podría estar entorpeciendo la actividad de las otras, por lo que no se alcanza un replegamiento eficiente. También podría deberse, a que en el caso de rTC-2, sea más importante la *cis-trans* isomerización de prolina que la reducción de cisteínas, por lo que la presencia de DsbA y DsbC en conjunto con las PPIasas resulta más perjudicial que benéfico para un correcto plegamiento.

De este modo, se pudo comprobar que en general el replegamiento asistido de rTC-2 muestra una mayor eficacia que replegamiento espontáneo. Se observó que la inhibición de rTC-2 replegada de forma asistida con las enzimas de replegamiento individualmente por 3 minutos es similar a la inhibición que se observa después de 12 horas de replegamiento. En el caso del replegamiento espontáneo, si se ve un incremento en el porcentaje de inhibición de un 26 a 50 %.

Tabla 2. Efecto del replegamiento espontáneo vs asistido en la actividad inhibitoria de rTC-2

Replegamiento 3 min		Replegamiento 12 Horas	
Tratamiento	% Inhibición	Tratamiento	% Inhibición
TC2	99	TC2	100.3
TC2+TvCyP19.9	76.6	TC2+TvCyP19 12 H	80.3
TC2+TvCyP19	71	TC2+DsbA 12 H	76.5
TC2+DsbC	71	TC2+TvCyP19 12 H	73.5
TC2+Chaperonas	59	TC2+DsbC 12 H	53.7
TC2+DsbA	50.4	TC2+Chaperonas 12 H	51
TC2 R.E 0H	29.2	TC2 R.E. 12 H	50.2
Buffer+Chaperonas	-0.4	Buffer+Chaperonas	0.1

A)



B)

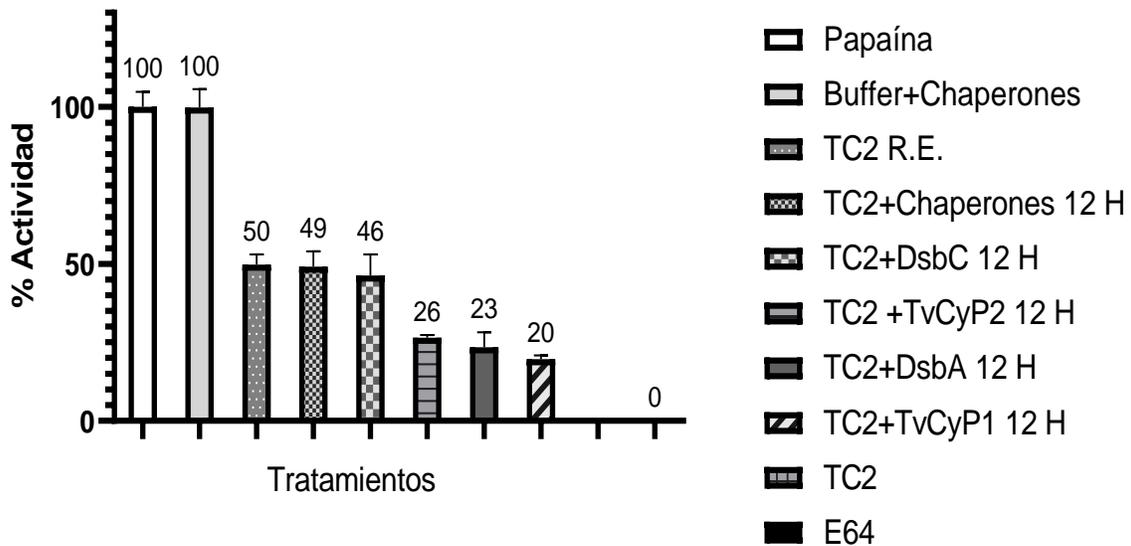
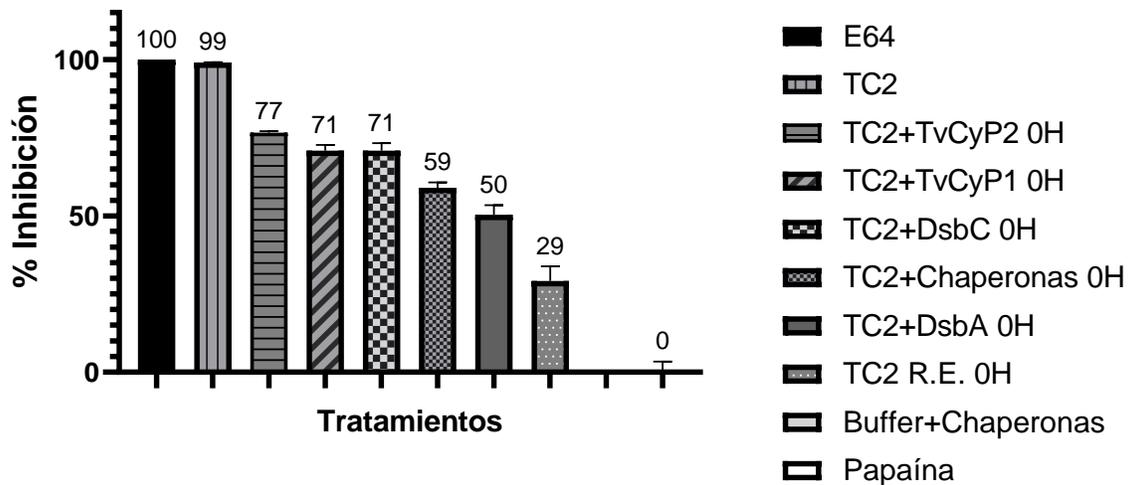


Figura 20. Efecto de rTC-2 replegada vs nativa en la actividad de papaína. Actividad de papaína en presencia o ausencia de rTC-2 nativa o replegada 3 minutos (A) o 12 horas (B). A la derecha de cada gráfico se presenta la señalética utilizada.

A)



B)

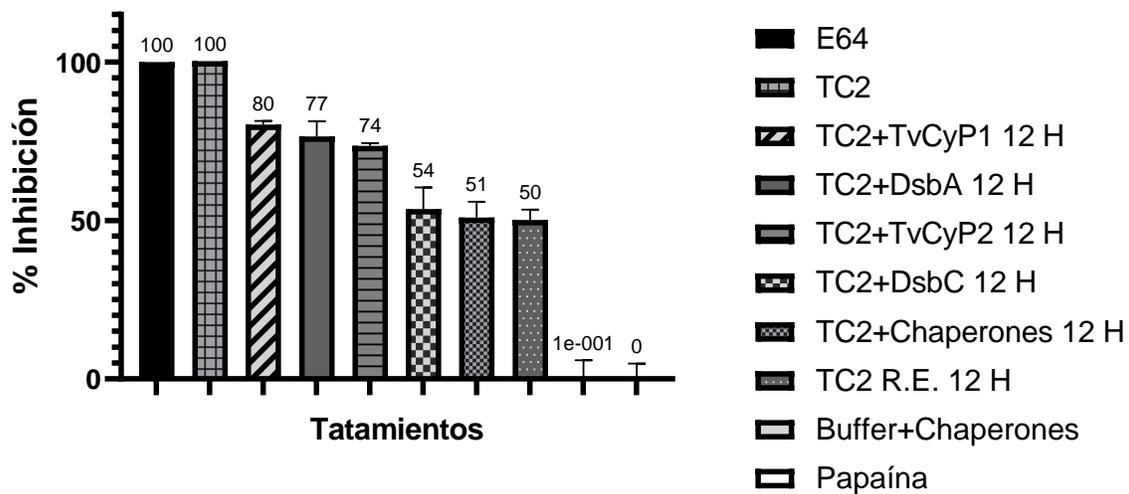


Figura 21. Efecto de rTC-2 replegada vs nativa en la inhibición de actividad de papaína. Inhibición de actividad de papaína, en presencia o ausencia de rTC-2 nativa o replegada 3 minutos (A) o 12 horas (B). A la derecha de cada gráfico se presenta la señalética utilizada

7.10 Evaluación de función inhibitoria de proteasas de rTC-2 Δ 11 vs rTC-2

7.10.1 Ensayos de inhibición de actividad de papaína

Los ensayos de inhibición con estas dos recombinantes se realizaron para corroborar si la proteína mutada del N-terminal conservaba las propiedades inhibitorias de la rTC-2. Así, se pudo observar que a diferencia de la rTC-2 nativa, la rTC-2 Δ 11 pierde su capacidad de inhibición de la actividad de papaína (Figura 22). Esto podría deberse a que la papaína es una proteasa que proviene de una especie no relacionada con *T. vaginalis*, por lo que es posible que la afinidad del inhibidor sea más baja que su afinidad por proteasas de *T. vaginalis* y que esta situación se acentúe al retirarle el extremo N-terminal.

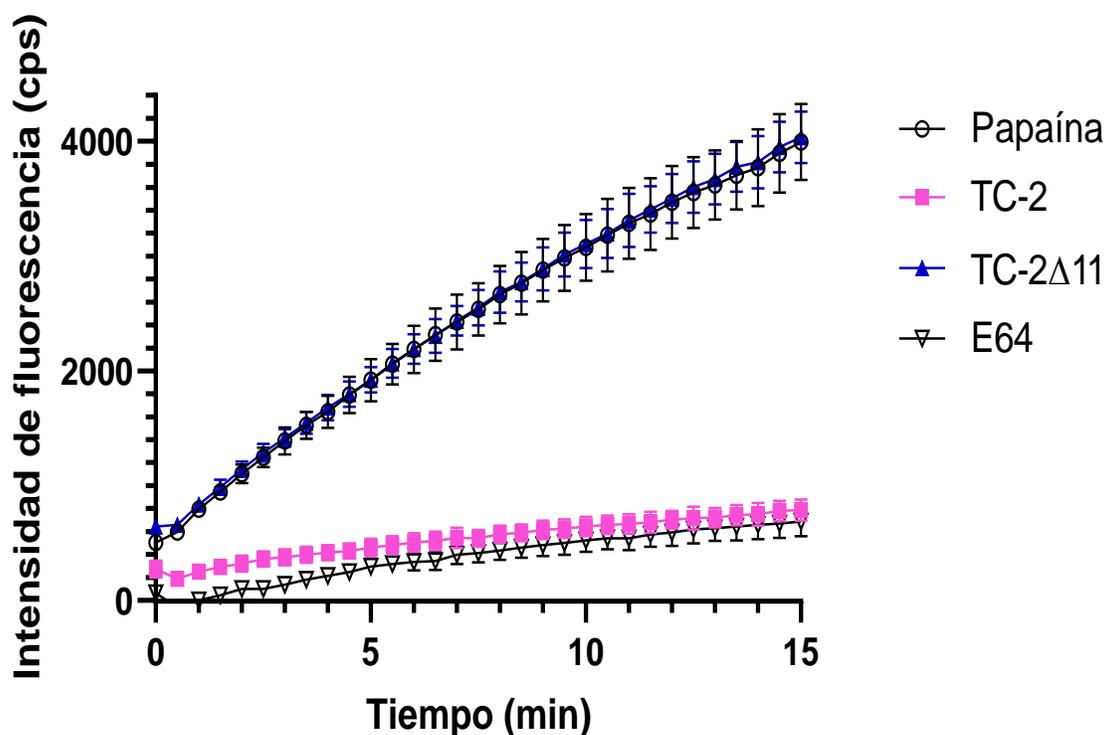


Figura 22. Ensayos de inhibición de actividad de papaína con rTC-2 y rTC-2 Δ 11 nativos. En eje X= Tiempo en minutos, eje Y= Intensidad de fluorescencia (cps). A la derecha se observa la simbología utilizada.

7.10.2 Evaluación de la capacidad inhibitoria de rTC-2Δ11 sobre la actividad proteasa de *T. vaginalis*.

Al haber obtenido una proteína que se expresa y se purifica sin agregados multiméricos y dado que su gran potencial para usos posteriores era importante evaluar si ésta rTC-2Δ11 preservaba su capacidad de inhibición de proteasas de *T. vaginalis*, para lo cual se probaron diferentes concentraciones de rTC-2Δ11 debido a que se desconocía si en alguna de éstas habría un efecto sobre la actividad proteasa. Así, en la cinética de inhibición de actividad proteasa, se observa que por el contrario de lo que se observó con la inhibición a papaína, la proteína rTC-2Δ11 mostró capacidad de inhibición de la actividad proteasa de *T. vaginalis*, abatiendo por completo su actividad en todas las concentraciones probadas, de forma similar a la inhibición causada por TC-2 nativa (Figura 23) (Aranda-Chan et. al., 2024, en revisión).

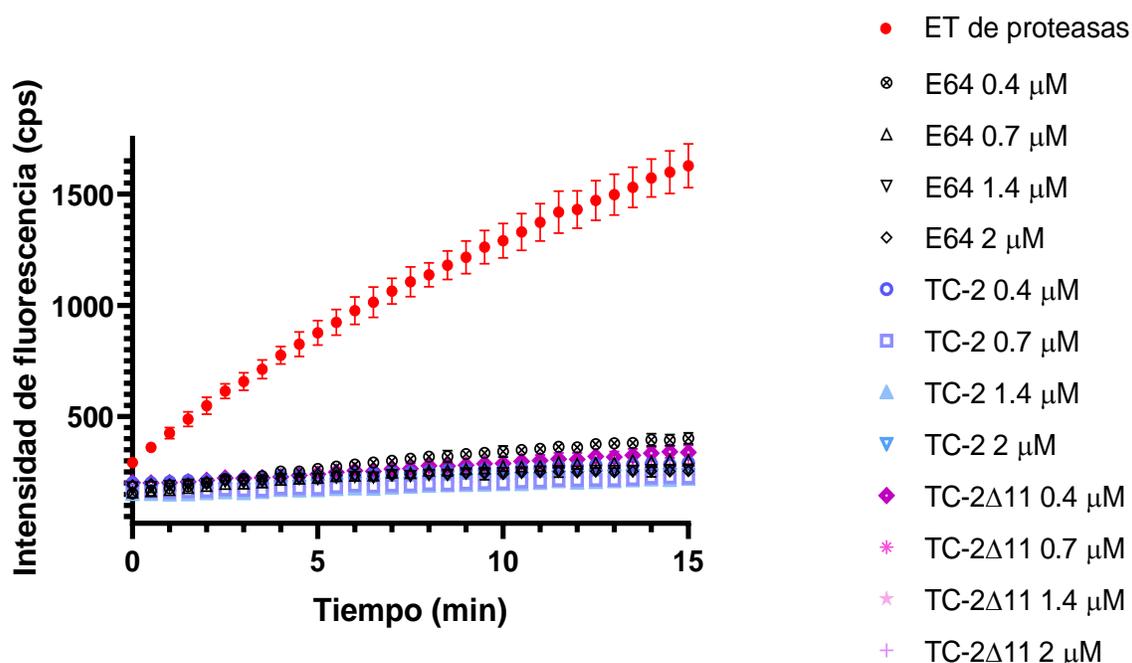


Figura 23. Evaluación del efecto de rTC-2Δ11 vs rTC-2 sobre la actividad proteasa de *T. vaginalis*. Cinética de inhibición de actividad proteasa de *T. vaginalis* en presencia o ausencia de rTC-2Δ11 y rTC-2 (0.4 μM, 0.7 μM, 1.4 μM).

7.11 Efecto de rTC-2Δ11 sobre la citotoxicidad de *T. vaginalis* en células HeLa.

Dado que rTC-2Δ11 mostró efectos inhibitorios sobre proteasas de *T. vaginalis* comparables a la de rTC-2 nativa, se decidió evaluar si también tenía efecto protector contra la citotoxicidad de *T. vaginalis* como la rTC-2 nativa. Los resultados mostraron que rTC-2Δ11 muestra una capacidad de protección de la citotoxicidad comparable a la protección que brinda rTC-2 nativa (Figura 24) (Aranda-Chan et. al., 2024, en revisión).

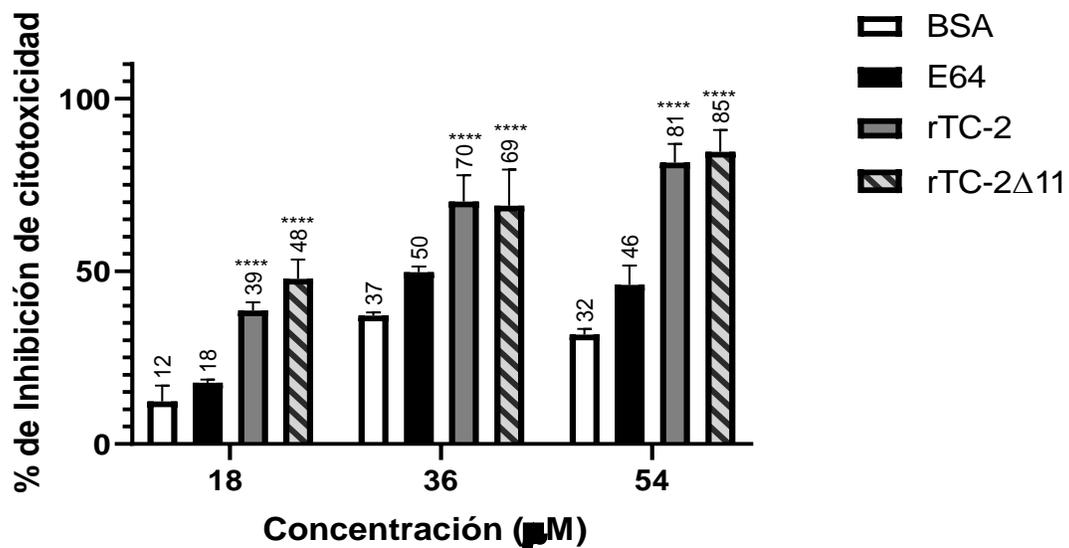


Figura 24. Inhibición de citotoxicidad de *T. vaginalis* sobre células HeLa por rTC-2Δ11 y rTC-2. En eje X= Concentraciones utilizadas de rTC-2Δ11 y rTC-2, en eje Y= % de inhibición de la citotoxicidad. En el panel derecho se muestra la simbología utilizada.

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró que las PPlasas TvCyP19 y TvCyP19.9 de *T. vaginalis* asisten el replegamiento de la proteína recombinante de *T. vaginalis* Trichocistatina-2 (rTC-2), surgiendo que TvCyP19 y TvCyP19.9 pueden usarse para el replegamiento de proteína de parásitos que muestran dificultades en su expresión soluble en *E. coli* debido al contenido de prolinas en su secuencia. Adicionalmente, dado que rTC-2 o rTC-2 Δ 11 se expresan en forma soluble en *E. coli* son una alternativa para determinar la actividad de PPlasa en lugar de RNAsa T1. El seleccionar rTC-2 purificada de fracción soluble como modelo de replegamiento, es una estrategia usada en estudios previos, por ejemplo Lisozima, Rhodanasa, Anhidrasa B carbónica, creatina-cinasa muscular (CK-MM) (Antonio-Pérez, Ramón-Luing, et al., 2012; Rozema & Gellman, 1996; Zemanova et al., 2020).

En este caso, las ciclofilinas TvCyP19 y TvCyP19.9 de *T. vaginalis*, éstas mostraron tener un papel más importante en el replegamiento de rTC-2 que las Disulfuro oxidorreductasas A y C, lo que sugiere que la *cis-trans* isomerización podría ser el paso limitante de su plegamiento, como fue en el caso del replegamiento de otras proteínas como la creatina quinasa o la anhidrasa carbónica humanas, en donde las PPlasas aceleraron su replegamiento (Moparthi et al., 2009; Yang et al., 1997). Además de su papel en la *cis-trans* isomerización de los enlaces prolil, TvCyP19 y TvCyP19.9 también podrían estar teniendo un papel como chaperonas, ya que se ha encontrado que PPlases como la ciclofilina de 18 kDa porcina o la FkPA de *E. coli* participan en el replegamiento de proteínas previniendo la agregación, independiente a la *cis-trans* isomerización (Arié et al., 2001; Ou et al., 2001).

Por otro lado, la mayor velocidad de replegamiento que se obtiene con la presencia de la TvCyP19.9 y no con la TvCyP19, podría deberse a las diferencias estructurales que hay entre ellas. En el caso de TvCyP19.9 esta proteína es un monómero, mientras TvCyP19 es un dímero, ya que se ha visto que para otras enzimas, estas muestran una mayor de velocidad de replegamiento cuando hay concentraciones suficientes del sustrato, en comparación con los dímeros (Ehrig et al., 1993). Además, ya que en nuestro caso la TvCyP19.9 carece de los primeros aminoácidos

del N-terminal, es posible que esto sea de beneficio para la aceleración del replegamiento asistido, ya que este extremo N-terminal participa en la autoasociación de la proteína (Aryal et al., 2020), sería interesante evaluar su papel en otros ensayos de replegamiento.

Por otro lado, el menor efecto que se observó sobre la cinética de replegamiento de rTC-2 en presencia de las cuatro chaperonas, podría deberse a que la interacción de la rTC-2 desplegada o sus intermediarios con las diferentes chaperonas afecta negativamente el replegamiento, como por ejemplo el caso de la Hsp90 que se demostró que se une y mantiene desplegada la β -galactosidasa, afectando su replegamiento por la Hsp70 (Freeman & Morimoto, 1996).

Respecto al papel de la ausencia del extremo N-terminal de la rTC-2 Δ 11 en la inhibición de las proteasas del parásito, fue interesante observar resultados contrastantes entre la inhibición a papaína y a los extractos totales de proteasas de *T. vaginalis* ya que la proteína perdió completamente su capacidad de inhibición con la papaína. Esto sería resultado de una menor afinidad entre rTC-2 y papaína en comparación con su afinidad por proteasas de *T. vaginalis* como la TvCP2 o TvCP39. Diferentes afinidades entre cistatinas carentes de su extremo N-terminal y la papaína se han reportado previamente, como en el caso de la cistatina A humana, que al ser deletada de los seis aminoácidos del extremo N-terminal exhibe una interacción de menor afinidad hacia la papaína (Pol et al., 1995). El papel del extremo N-terminal de las cistatinas en la inhibición de la papaína ya ha sido descrito en la literatura. Por ejemplo, el cristal de la cistatina de pollo interaccionando con papaína mostró que el tronco N-terminal de las cisteínas está involucrado en el bloqueo del sitio reactivo de la proteasa diana. Junto con un bucle, esta región estabiliza la estructura inhibidora a través de interacciones con una lámina β y una hélice α , lo que ayuda a mantener la integridad del complejo de unión (Tušar et al., 2021).

Al contrario de lo que ocurre con la papaína, en el caso de la inhibición hacia Extractos totales de *T. vaginalis*, se observó que la capacidad inhibidora de rTC-2 Δ 11 no se vio afectada por carecer de los primeros 11 aminoácidos en el extremo

N-terminal. De forma análoga a lo que se observó en las diferencias de inhibición hacia papaína y proteasas de parásitos, también se han encontrado este tipo de diferencias en la inhibición en cistatinas de otros parásitos hacia las Cisteín proteasas de otros organismos, por ejemplo, en el caso de las cistatinas de *G. intestinalis*, estas tienen una fuerte inhibición hacia las proteasas del mismo parásito pero muestran un menor grado de inhibición hacia la catepsina B humana (J. Liu et al., 2019). Esto podría deberse a que las cistatinas exhiben una especificidad y diversidad significativas entre diferentes especies, lo que refleja sus adaptaciones evolutivas y roles funcionales. En plantas, animales y parásitos, las cistatinas han desarrollado secuencias, estructuras y patrones de expresión únicos que les permiten realizar funciones especializadas, particularmente en la regulación de la actividad de las proteasas y la modulación de las respuestas inmunes. Esta diversidad subraya la importancia de las cistatinas en varios procesos biológicos y su potencial como blancos terapéuticos (Cuesta-Astroz et al., 2014; Margis et al., 1998).

Finalmente, también fue posible confirmar que el rTC-2 Δ 11 también conserva su capacidad para reducir el efecto citotóxico de las proteasas de *T. vaginalis* en células HeLa, en las condiciones analizadas. Además, se observó un efecto protector dependiente de la concentración para ambas proteínas recombinantes cuando se interacciona el aislado CNCD 188 de *T. vaginalis* con las células HeLa, lo que es comparable con lo reportado previamente para rTC-2 con el aislado CNCD 147 de *T. vaginalis* (Puente-Rivera et al., 2014). Este efecto puede deberse a que las cistatinas inhiben las Cisteín proteasas del parásito, vitales para varias etapas de su ciclo de vida, incluido el desarrollo, la invasión de los tejidos del huésped y la migración. Debido a eso, la inhibición de estas enzimas puede alterar estos procesos, lo que podría conducir a una reducción de la supervivencia y la reproducción de los parásitos. Además, la inhibición de estas proteasas puede obstaculizar la capacidad del parásito para obtener los nutrientes necesarios, lo que puede afectar su crecimiento y virulencia (Rascón & McKerrow, 2013). Por ejemplo, la inhibición de las proteasas de *Streptococcus pneumoniae* puede bloquear la evasión de la respuesta inmunitaria y la invasión tisular de los patógenos, lo que

reduce la infección y la virulencia, que son funciones relacionadas con las proteasas (Z. Wang et al., 2020).

IX. CONCLUSIONES

A partir de los datos obtenidos se puede concluir que se obtuvo una estrategia de replegamiento asistido con PPIasas de tipo ciclofilina (TvCyP19 y TvCyP19.9) de *T. vaginalis*, el cual es efectivo para la proteína Tricocistatina-2, proteína que se produce de forma parcialmente soluble, ya que las proteínas replegadas alcanzan una adecuada conformación a nivel de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, ya que las proteínas replegadas alcanzan un alto porcentaje de recuperación de función. Además, se concluye que, de las cuatro chaperonas evaluadas, son las Ciclofilina 19 y 19.9 de *T. vaginalis* las que demuestran tener el efecto de mayor beneficio en el replegamiento de rTC-2, lo que confirma que ya sea la *cis-trans* isomerización y/o su acción chaperona es el paso limitante para el plegamiento de ésta proteína.

Además, también se obtuvo la rTC-2 Δ 11, que carece del extremo N-terminal, como una alternativa al replegamiento. Esto demostró que los primeros 11 aminoácidos de la TC-2 no tienen influencia en su inhibición con proteínas del parásito, ocurriendo lo opuesto con proteasas de otras especies como la papaína. Esta proteína recombinante, además de preservar su capacidad de inhibición con proteasas de *T. vaginalis*, también carece de la formación de agregados multiméricos durante el proceso de su expresión y purificación y esto se estaría relacionado con la falta de las cuatro cisteínas libres del extremo N-terminal. En este trabajo también se realizó el primer reporte de inhibición de Citotoxicidad de rTC-2 y rTC-2 Δ 11 para el aislado CNCD 188 de *T. vaginalis*, lo que abre las puertas para futuros estudios con este aislado.

De este modo, se observó congruencia entre los resultados observados de las conformaciones estructurales a nivel de estructura secundaria, terciaria se corroboran con los ensayos de recuperación de función para las proteínas

replegadas, por lo que la estrategia de replegamiento asistido podría ser una alternativa para el replegamiento de proteínas de parásitos con alguna dificultad en su expresión. Además, dado que la ausencia de las cuatro cisteínas ayuda a que la proteína TC-2 se produzca de forma recombinante sin agregados y a que la proteína permanece como monómero durante más tiempo que la proteína TC-2 completa, se plantea como una estrategia de prevención de la agregación, importante para la producción de esta proteína y que puede aplicarse a otras proteínas con características similares.

En conjunto, estos resultados pueden ayudar a mejorar la producción recombinante y el almacenamiento de TC-2, que son de importancia dado el potencial terapéutico de esta proteína.

X. PERSPECTIVAS

- ✓ Replegamiento asistido de otras proteínas recombinantes de *T. vaginalis* que se expresan como cuerpos de inclusión como la CP39.
- ✓ Evaluar el papel de las 5 cisteína presentes en TC-2, produciendo una proteína que carezca de todas ellas y observar el impacto que tienen en la prevención de formación de agregados a largo plazo y en la capacidad inhibitoria de la proteína.

XI. BIBLIOGRAFÍAS

- Abaza, S. z. (2019). Expression of cysteine proteinases and cystatins in parasites and use of cysteine proteinase inhibitors in parasitic diseases. Part III: Protozoa (3): Kinetoplastids. *Parasitologists United Journal*, 12(3), 163-186. doi:10.21608/puj.2019.20020.1055
- Alvarez-Sánchez, M. a. E., Avila-González, L., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L. V., Ortega-López, J., & Arroyo, R. (2000). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis*, 28(4), 193-202. doi:<https://doi.org/10.1006/mpat.1999.0336>
- Amarasinghe, C., & Jin, J.-P. (2015). The Use of Affinity Tags to Overcome Obstacles in Recombinant Protein Expression and Purification. *Protein and Peptide Letters*, 22(10), 885-892.
- Antonio-Pérez, A. (2012). *Replegamiento cromatográfico oxidativo de proteínas recombinantes asistido por chaperones moleculares*. CINVESTAV-IPN, Retrieved from <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/1329>
- Antonio-Pérez, A., Aldaz-Martínez, L., Meneses-Acosta, A., & Ortega-López, J. J. R. m. d. i. q. (2014). Refolding of lysozyme assisted by molecular chaperones immobilized in cellulose: the operational conditions that affect refolding yields. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1), 83-91.
- Antonio-Pérez, A., Ramón-Luing, L. A., & Ortega-López, J. (2012). Chromatographic refolding of rhodanese and lysozyme assisted by the GroEL apical domain, DsbA and DsbC immobilized on cellulose. *Journal of Chromatography A*, 1248, 122-129. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.086>
- Antonio-Pérez, A., Rivera-Hernández, T., Aldaz-Martínez, L. M., & Ortega-López, J. (2012). Oxidative refolding of lysozyme assisted by DsbA, DsbC and the GroEL apical domain immobilized in cellulose. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(4), 703-710. doi:10.1007/s12257-011-0663-9
- Aranda-Chan, V., Cárdenas-Guerra, R. E., Otero-Pedraza, A., Pacindo-Cabrales, E. E., Flores-Pucheta, C. I., Montes-Flores, O., . . . Ortega-López, J. (2024). Insights into Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerases from Clinically Important Protozoans: From Structure to Potential Biotechnological Applications. *Pathogens*, 13(8). doi:10.3390/pathogens13080644
- Arié, J.-P., Sassoon, N., & Betton, J.-M. (2001). Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 39(1), 199-210. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02250.x>
- Arroyo, R., Cárdenas-Guerra, R. E., Figueroa-Angulo, E. E., Puente-Rivera, J., Zamudio-Prieto, O., & Ortega-López, J. (2015). *Trichomonas vaginalis* Cysteine Proteinases: Iron Response in Gene Expression and Proteolytic Activity. *BioMed Research International*, 2015(1), 946787. doi:<https://doi.org/10.1155/2015/946787>
- Aryal, S., Hsu, H.-M., Lou, Y.-C., Chu, C.-H., Tai, J.-H., Hsu, C.-H., & Chen, C. (2020). N-Terminal Segment of TvCyP2 Cyclophilin from *Trichomonas vaginalis* Is Involved in Self-Association, Membrane Interaction, and Subcellular Localization. *Biomolecules*, 10(9). doi:10.3390/biom10091239

- Basu, A., Li, X., & Leong, S. S. J. (2011). Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(2), 241-251. doi:10.1007/s00253-011-3513-y
- Bayer-Santos, E., Aguilar-Bonavides, C., Rodrigues, S. P., Cordero, E. M., Marques, A. F., Varela-Ramirez, A., . . . Almeida, I. C. (2013). Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Secretome: Characterization of Two Populations of Extracellular Vesicles and Soluble Proteins. *Journal of Proteome Research*, 12(2), 883-897. doi:10.1021/pr300947g
- Bell, A., Monaghan, P., & Page, A. P. (2006). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (immunophilins) and their roles in parasite biochemistry, host-parasite interaction and antiparasitic drug action. *Int J Parasitol*, 36(3), 261-276. doi:10.1016/j.ijpara.2005.11.003
- Cárdenas-Guerra, R. E., Arroyo, R., Rosa de Andrade, I., Benchimol, M., & Ortega-López, J. (2013). The iron-induced cysteine proteinase TvCP4 plays a key role in *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Microbes and Infection*, 15(13), 958-968. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.09.002>
- Cuesta-Astroz, Y., Scholte, L. L., Pais, F. S., Oliveira, G., & Nahum, L. A. (2014). Evolutionary analysis of the cystatin family in three *Schistosoma* species. *Front Genet*, 5, 206. doi:10.3389/fgene.2014.00206
- De Bernardez Clark, E., Hevehan, D., Szela, S., & Maachupalli-Reddy, J. (1998). Oxidative renaturation of hen egg-white lysozyme. Folding vs aggregation. *Biotechnol Prog*, 14(1), 47-54. doi:10.1021/bp970123w
- Ehrig, T., Muhoberac, B. B., Brems, D., & Bosron, W. F. (1993). Monomers of human beta 1 beta 1 alcohol dehydrogenase exhibit activity that differs from the dimer. *Journal of Biological Chemistry*, 268(16), 11721-11726. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50259-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50259-9)
- Fernández-Robledo, J. A., & Vasta, G. R. (2010). Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends in Parasitology*, 26(5), 244-254. doi:10.1016/j.pt.2010.02.004
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., & Schmid, F. X. (1989). Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*, 337(6206), 476-478. doi:10.1038/337476a0
- Freeman, B. C., & Morimoto, R. I. (1996). The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *The EMBO Journal*, 15(12), 2969-2979-2979. doi:<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00660.x>
- Gao, Y. G., Guan, Y. X., Yao, S. J., & Cho, M. G. (2003). On-column refolding of recombinant human interferon-gamma with an immobilized chaperone fragment. *Biotechnol Prog*, 19(3), 915-920. doi:10.1021/bp025775l
- Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., . . . Gunsalus, K. C. (2008). Protein production and purification. *Nat Methods*, 5(2), 135-146. doi:10.1038/nmeth.f.202
- Guerra Á, P., Calvo, E. P., Wasserman, M., & Chaparro-Olaya, J. (2016). Production of recombinant proteins from *Plasmodium falciparum* in *Escherichia coli*. *Biomedica*, 36(0), 97-108. doi:10.7705/biomedica.v36i3.3011
- Harfouche, M., Gherbi, W. S., Alareeki, A., Alaama, A. S., Hermez, J. G., Smolak, A., & Abu-Raddad, L. J. (2024). Epidemiology of *Trichomonas*

- vaginalis infection in the Middle East and North Africa: systematic review, meta-analyses, and meta-regressions. *eBioMedicine*, 106. doi:10.1016/j.ebiom.2024.105250
- High, K. P., Joiner, K. A., & Handschumacher, R. E. (1994). Isolation, cDNA sequences, and biochemical characterization of the major cyclosporin-binding proteins of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(12), 9105-9112. doi:10.1016/S0021-9258(17)37083-7
- Hsu, H. M., Chu, C. H., Wang, Y. T., Lee, Y., Wei, S. Y., Liu, H. W., . . . Tai, J. H. (2014). Regulation of nuclear translocation of the Myb1 transcription factor by TvCyclophilin 1 in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem*, 289(27), 19120-19136. doi:10.1074/jbc.M114.549410
- Hsu, H. M., Huang, Y. H., Aryal, S., Liu, H. W., Chen, C., Chen, S. H., . . . Tai, J. H. (2020). Endomembrane Protein Trafficking Regulated by a TvCyP2 Cyclophilin in the Protozoan Parasite, *Trichomonas vaginalis*. *Sci Rep*, 10(1), 1275. doi:10.1038/s41598-020-58270-6
- Jordan, S., & Kreuels, B. (2022). Parasiten – wichtige endemische und importierte Erreger. [Parasites – important endemic and imported pathogens]. *Dtsch Med Wochenschr*, 147(11), 687-696. doi:10.1055/a-1664-7518
- Kato, H. (2020). Chapter 50 - Mucosal Vaccine for Parasitic Infections. In H. Kiyono & D. W. Pascual (Eds.), *Mucosal Vaccines (Second Edition)* (pp. 841-854): Academic Press.
- Kiang, D., El Ghazalie, N. E., Medhat, A. M., Abdel-Fattah, M., Karim, A. M., & LoVerde, P. T. (1996). Identification and characterization of *Schistosoma mansoni* p17.7, a cyclophilin. *Mol Biochem Parasitol*, 76(1-2), 73-82. doi:10.1016/0166-6851(95)02542-1
- Lee, D.-H., Kim, S.-G., Kweon, D.-H., & Seo, J.-H. (2009). Folding machineries displayed on a cation-exchanger for the concerted refolding of cysteine- or proline-rich proteins. *BMC Biotechnology*, 9(1), 27. doi:10.1186/1472-6750-9-27
- Liu, J., Svärd, S. G., & Klotz, C. (2019). *Giardia intestinalis* cystatin is a potent inhibitor of papain, parasite cysteine proteases and, to a lesser extent, human cathepsin B. *FEBS Lett*, 593(12), 1313-1325. doi:<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13433>
- Liu, J., Svärd, S. G., & Klotz, C. (2019). *Giardia intestinalis* cystatin is a potent inhibitor of papain, parasite cysteine proteases and, to a lesser extent, human cathepsin B. *FEBS Lett*, 593(12), 1313-1325. doi:10.1002/1873-3468.13433
- Ma, F. H., Li, C., Liu, Y., & Shi, L. (2020). Mimicking Molecular Chaperones to Regulate Protein Folding. *Adv Mater*, 32(3), e1805945. doi:10.1002/adma.201805945
- Margis, R., Reis, E. M., & Villeret, V. (1998). Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. *Arch Biochem Biophys*, 359(1), 24-30. doi:10.1006/abbi.1998.0875
- Martin, T., Lou, Y.-C., Chou, C.-C., Wei, S.-Y., Sadotra, S., Cho, C.-C., . . . Chen, C. (2018). Structural basis of interaction between dimeric cyclophilin 1 and Myb1 transcription factor in *Trichomonas vaginalis*. *Sci Rep*, 8(1), 5410. doi:10.1038/s41598-018-23821-5

- Monteiro, A. C., Abrahamson, M., Lima, A. P., Vannier-Santos, M. A., & Scharfstein, J. (2001). Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci*, 114(Pt 21), 3933-3942. doi:10.1242/jcs.114.21.3933
- Moparthy, S. B., Hammarström, P., & Carlsson, U. (2009). A nonessential role for Arg 55 in cyclophilin18 for catalysis of proline isomerization during protein folding. *Protein Science*, 18(2), 475-479. doi:<https://doi.org/10.1002/pro.28>
- Nagradova, N. (2007). Enzymes catalyzing protein folding and their cellular functions. *Curr Protein Pept Sci*, 8(3), 273-282. doi:10.2174/138920307780831866
- Ochieng, J., & Chaudhuri, G. (2010). Cystatin superfamily. *J Health Care Poor Underserved*, 21(1 Suppl), 51-70. doi:10.1353/hpu.0.0257
- Otero-Pedraza, A. (2024). *Replegamiento de proteínas asistido por el dominio apical de GroEL (ADGroEL), DsbA, DsbC y la ciclofilina recombinante de Trichomonas vaginalis TvCYP2*. CINVESTAV-IPN, Retrieved from <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/5163>
- Ou, W.-B., Luo, W., Park, Y.-D., & Zhou, H.-M. (2001). Chaperone-like activity of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase during creatine kinase refolding. *Protein Science*, 10(11), 2346-2353. doi:<https://doi.org/10.1110/ps.23301>
- Paul, S., Punam, S., & Chaudhuri, T. K. (2007). Chaperone-assisted refolding of *Escherichia coli* maltodextrin glucosidase. *Febs j*, 274(22), 6000-6010. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06122.x
- Perrone, A. E., Mildubeger, N., Fuchs, A. G., Bustos, P. L., & Bua, J. (2018). A Functional Analysis of the Cyclophilin Repertoire in the Protozoan Parasite *Trypanosoma Cruzi*. *Biomolecules*, 8(4). doi:10.3390/biom8040132
- Pol, E., Olsson, S. L., Estrada, S., Prasthofer, T. W., & Björk, I. (1995). Characterization by spectroscopic, kinetic and equilibrium methods of the interaction between recombinant human cystatin A (stefin A) and cysteine proteinases. *Biochem J*, 311 (Pt 1)(Pt 1), 275-282. doi:10.1042/bj3110275
- Potenza, M., Galat, A., Minning, T. A., Ruiz, A. M., Duran, R., Tarleton, R. L., . . . BUA, J. (2006). Analysis of the *Trypanosoma cruzi* cyclophilin gene family and identification of Cyclosporin A binding proteins. *Parasitology*, 132(6), 867-882. doi:10.1017/S0031182005009558
- Puente-Rivera, J., Ramón-Luing Lde, L., Figueroa-Angulo, E. E., Ortega-López, J., & Arroyo, R. (2014). Trichocystatin-2 (TC-2): an endogenous inhibitor of cysteine proteinases in *Trichomonas vaginalis* is associated with TvCP39. *Int J Biochem Cell Biol*, 54, 255-265. doi:10.1016/j.biocel.2014.04.005
- Ramón-Luing, L. A., Cruz-Migoni, A., Ruíz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., & Ortega-Lopez, J. (2006). One-step Purification and Immobilization in Cellulose of the GroEL Apical Domain Fused to a Carbohydrate-binding Module and its use in Protein Refolding. *Biotechnology Letters*, 28(5), 301-307. doi:10.1007/s10529-005-5714-x
- Ramón-Luing, L. A., Rendón-Gandarilla, F. J., Cárdenas-Guerra, R. E., Rodríguez-Cabrera, N. A., Ortega-López, J., Avila-González, L., . . . Arroyo, R. (2010). Immunoproteomics of the active degradome to identify biomarkers for *Trichomonas vaginalis*. 10(3), 435-444. doi:<https://doi.org/10.1002/pmic.200900479>

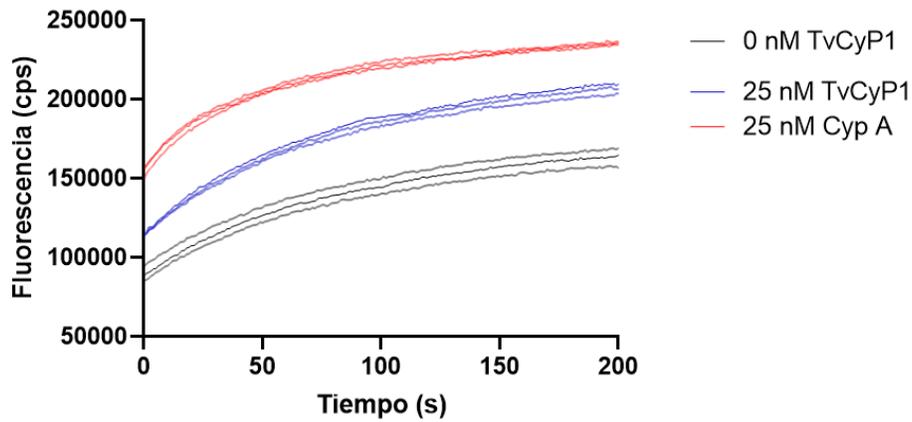
- Rascón, A. A., Jr., & McKerrow, J. H. (2013). Synthetic and natural protease inhibitors provide insights into parasite development, virulence and pathogenesis. *Curr Med Chem*, 20(25), 3078-3102. doi:10.2174/0929867311320250005
- Rozema, D., & Gellman, S. H. (1996). Artificial chaperone-assisted refolding of denatured-reduced lysozyme: modulation of the competition between renaturation and aggregation. *Biochemistry*, 35(49), 15760-15771. doi:10.1021/bi961638j
- Sánchez-Rodríguez, D. B., Ortega-López, J., Cárdenas-Guerra, R. E., Reséndiz-Cardiel, G., Chávez-Munguía, B., Lagunes-Guillen, A., & Arroyo, R. (2018). Characterization of a novel endogenous cysteine proteinase inhibitor, trichocystatin-3 (TC-3), localized on the surface of *Trichomonas vaginalis*. *Int J Biochem Cell Biol*, 102, 87-100. doi:10.1016/j.biocel.2018.07.005
- Sanderson, S. J., Westrop, G. D., Scharfstein, J., Mottram, J. C., & Coombs, G. H. (2003). Functional conservation of a natural cysteine peptidase inhibitor in protozoan and bacterial pathogens 1. *FEBS Lett*, 542(1-3), 12-16. doi:[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00327-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00327-2)
- Schrödel, A., & de Marco, A. (2005). Characterization of the aggregates formed during recombinant protein expression in bacteria. *BMC Biochemistry*, 6(1), 10. doi:10.1186/1471-2091-6-10
- Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*, 99(4), 303-310. doi:10.1263/jbb.99.303
- Tušar, L., Usenik, A., Turk, B., & Turk, D. (2021). Mechanisms Applied by Protein Inhibitors to Inhibit Cysteine Proteases. *Int J Mol Sci*, 22(3). doi:10.3390/ijms22030997
- Ünal, C. M., & Steinert, M. (2014). Microbial peptidyl-prolyl cis/trans isomerases (PPLases): virulence factors and potential alternative drug targets. *Microbiol Mol Biol Rev*, 78(3), 544-571. doi:10.1128/mubr.00015-14
- Vaisusuk, K., & Saijuntha, W. (2021). Intestinal Protozoa: Their Role as Human Pathogens and Zoonoses. In T. N. Petney, W. Saijuntha, & H. Mehlhorn (Eds.), *Biodiversity of Southeast Asian Parasites and Vectors causing Human Disease* (pp. 35-61). Cham: Springer International Publishing.
- Vazquez, E., Corchero, J. L., & Villaverde, A. (2011). Post-production protein stability: trouble beyond the cell factory. *Microb Cell Fact*, 10, 60. doi:10.1186/1475-2859-10-60
- Vedadi, M., Lew, J., Artz, J., Amani, M., Zhao, Y., Dong, A., . . . Hui, R. (2007). Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related Apicomplexan organisms. *Mol Biochem Parasitol*, 151(1), 100-110. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.10.011
- Walters, J., Milam, S. L., & Clark, A. C. (2009). Chapter 1 Practical Approaches to Protein Folding and Assembly: Spectroscopic Strategies in Thermodynamics and Kinetics. In *Methods in Enzymology* (Vol. 455, pp. 1-39): Academic Press.
- Wang, P., & Heitman, J. (2005). The cyclophilins. *Genome Biol*, 6(7), 226. doi:10.1186/gb-2005-6-7-226
- Wang, Z., Rahkola, J., Redzic, J. S., Chi, Y. C., Tran, N., Holyoak, T., . . . Eisenmesser, E. (2020). Mechanism and inhibition of Streptococcus

- pneumoniae IgA1 protease. *Nat Commun*, 11(1), 6063. doi:10.1038/s41467-020-19887-3
- Wani, R. S. (2019). Parasites and Worms. In Tutorial Topics in Infection for the Combined Infection Training Programme (pp. 0): Oxford University Press. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/oso/9780198801740.003.0010>. doi:10.1093/oso/9780198801740.003.0010
- Wickramasinghe, P. D. S. U., Kwon, H., Elvitigala, D. A. S., Wan, Q., & Lee, J. (2020). Identification and characterization of cystatin B from black rockfish, *Sebastes schlegelii*, indicating its potent immunological importance. *Fish & Shellfish Immunology*, 104, 497-505. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.068>
- Yamaguchi, H., & Miyazaki, M. (2014). Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules*, 4(1), 235-251. doi:10.3390/biom4010235
- Yang, H.-P., Zhong, H.-N., Zhou, H.-M. J. B. e. B. A.-P. S., & Enzymology, M. (1997). Catalysis of the refolding of urea denatured creatine kinase by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1338(2), 147-150.
- Zemanova, L., Vaskova, M., Schmidt, M., Roubalova, J., Haleckova, A., Benek, O., & Musilek, K. (2020). RNase T1 Refolding Assay for Determining Mitochondrial Cyclophilin D Activity: A Novel In Vitro Method Applicable in Drug Research and Discovery. *Biochemistry*, 59(17), 1680-1687. doi:10.1021/acs.biochem.9b01025

XII. APÉNDICES

Apéndice I

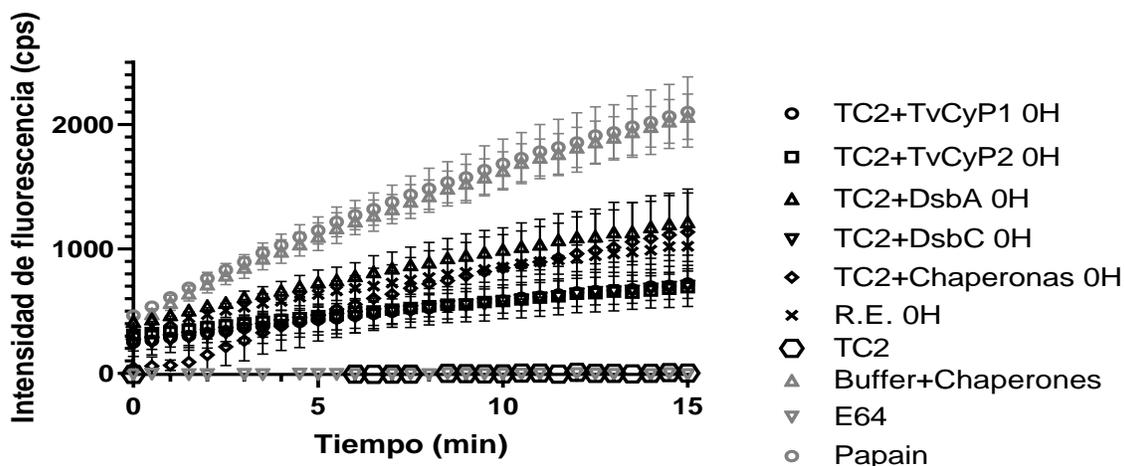
Ensayo de actividad por replegamiento de RNAsa T1 a 25°C. Incubación de 2 μ M RNAsa T1 sin ciclofilina (en negro), con 25 nM TvCyP1 (en azul) o en presencia de 25 nM hCypA (rojo). Eje X= Tiempo en segundos (s). Eje Y= Fluorescencia en cuentas por segundo (cps).



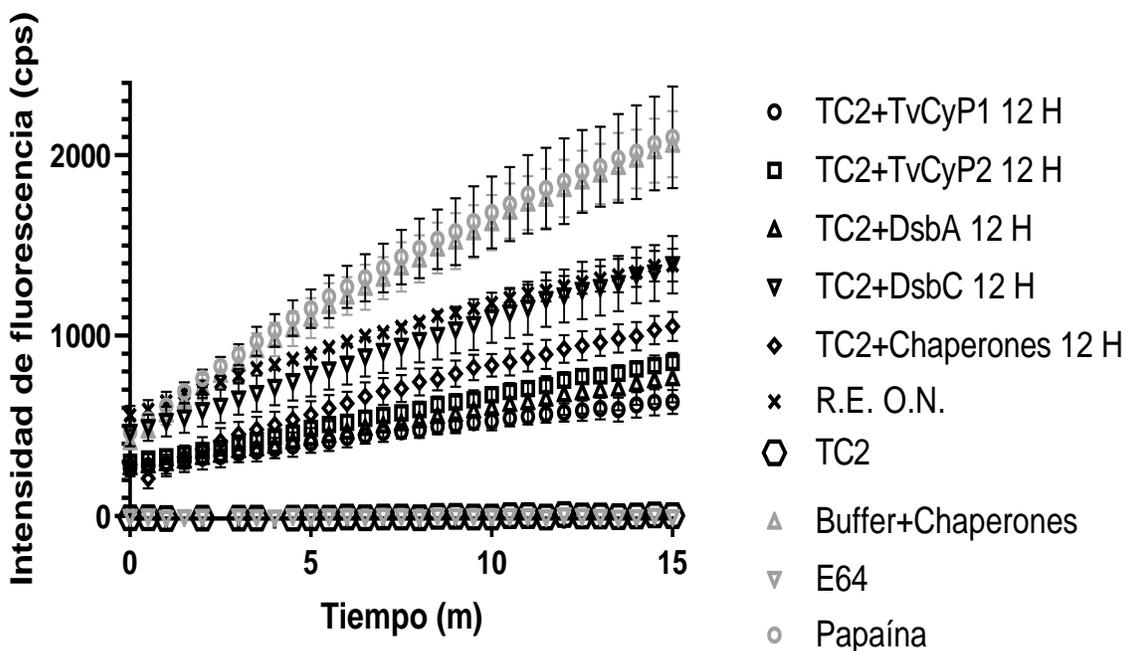
Apéndice II.

Efecto de rTC-2 replegada vs nativa en la inhibición de actividad de papaína. En A)-B), Cinética de actividad papaína en presencia o ausencia de rTC-2 nativa o replegada de forma inmediata (A), después de 12 horas de replegamiento (B). Eje X= Tiempo en minutos, eje Y= Intensidad de fluorescencia (cps).

A)



B)



XIII. ANEXOS



 **pathogens**
an Open Access Journal by MDPI

Indexed in: PubMed
CITESCORE 6.4
IMPACT FACTOR 3.3

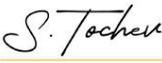
CERTIFICATE OF PUBLICATION

The certificate of publication for the article titled:
Insights into Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerases from Clinically Important Protozoans: From Structure to Potential Biotechnological Applications

Authored by:
Verónica Aranda-Chan; Rosa Elena Cárdenas-Guerra; Alejandro Otero-Pedraza; Esdras Enoc Pacindo-Cabrales; Claudia Ivonne Flores-Pucheta; Octavio Montes-Flores; Rossana Arroyo; Jaime Ortega-López

Published in:
Pathogens 2024, Volume 13, Issue 8, 644

 Academic Open Access Publishing since 1996
Basel, October 2024


Stefan Tochev
Chief Executive Officer

My Submissions

Search by title or ID Status: All Article types: All

1 All **0** In Preparation **0** Initial Validation **0** Editorial Assignment **1** Independent Review **0** Interactive Review **0** Review Finalized **0** Accepted **0** Deleted

In Independent Review
Original Research

Trichocystatin-2 from *Trichomonas vaginalis*: Role of N-terminal cysteines in aggregation and protease inhibition

Verónica Aranda-Chan, Montserrat Gutiérrez-Soto, Claudia Ivonne Flores-Pucheta Flores-Pucheta, Octavio Montes-Flores, Rossana Arroyo and Jaime Ortega-Lopez

Handling Editor:
Tiana Tasca

 Frontiers in Parasitology
Antiparasitic Drugs and Drug Resistance

