



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL TRIPSINÓGENO RECOMBINANTE DEL CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO *LITOPENAEUS VANNAMEI*

Mauricio Castillo-Galván, José A. Fuentes-Garibay, José M. Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán
Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL,
Av. Pedro de Alba s/n Col. Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México, 66450.
(81) 83294000 ext. 6439, mguerrer@fcb.uanl.mx

Palabras clave: Tripsinógeno, *Litopenaeus vannamei*, *Pichia pastoris*

Introducción. En crustáceos, la tripsina juega un papel importante en el metabolismo de proteínas. Sin embargo, su precursor inactivo (tripsinógeno) no ha podido ser aislado de su fuente natural (1), por lo tanto, su mecanismo de activación es aún desconocido.

En el presente trabajo, hemos producido, purificado y caracterizado bioquímicamente la forma recombinante del tripsinógeno del camarón Blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*.

Metodología. El tripsinógeno recombinante de *Litopenaeus vannamei* se obtuvo realizando un cultivo en tres etapas (lote con glicerol, lote alimentado con glicerol y lote alimentado con metanol) empleando un biorreactor de 5 L y una cepa recombinante de *Pichia pastoris* Mut^s que contiene el DNAC del tripsinógeno del camarón Blanco del Pacífico *L. vannamei* fusionado a la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*. El medio de cultivo libre de células (1.4 L) se concentró y diafiltró a 100 mL por ultrafiltración. El tripsinógeno recombinante se purificó por cromatografía de intercambio aniónico utilizando una solución amortiguadora de 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) y 20 mM CaCl₂ y un gradiente de concentración de NaCl. Las diferentes fracciones obtenidas fueron concentradas a 5 mL y diafiltradas por ultrafiltración y se analizaron en geles de SDS-poliacrilamida y por Western blot. Con las fracciones que resultaron positivas en el Western blot, se evaluó la posible N-glicosilación mediante tratamiento con Endo Hf y se realizaron estudios de autoactivación del tripsinógeno recombinante determinando el incremento de la actividad enzimática de tripsina evaluada con N α -benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilida (BAPNA) como sustrato. Se empleó un extracto de hepatopáncreas de *L. vannamei* y tripsinógeno bovino como controles. Los resultados obtenidos se interpretaron con ayuda de un modelo molecular de la tripsina de *L. vannamei* obtenido con *Swiss-Model*.

Resultados y discusión. Los análisis en geles de SDS-poliacrilamida y Western blot del medio de cultivo libre de células confirmaron la producción del tripsinógeno recombinante. A partir de la cromatografía de intercambio aniónico, se colectaron cuatro fracciones que mostraron bandas en geles de SDS-poliacrilamida de 29 kDa para la fracción 1, 32 y 23 kDa para la fracción 2, 23 kDa para la fracción 3 y 41 kDa para la fracción 4, todas ellas fueron positivas al análisis de Western blot y mostraron

actividad de tripsina (7.6, 4.6, 7.3 y 5.7 mU/mL, respectivamente). El tratamiento con Endo Hf demostró que la banda de 32 kDa es una proteína N-glicosilada. En los ensayos de autoactivación, la actividad de tripsina de la fracción 1 aumentó casi un 100% a los 30 min de incubación, posteriormente disminuyó alcanzando un valor mínimo a los 90 minutos de incubación, y volvió a aumentar y disminuir nuevamente. Al realizar el ensayo en presencia de albúmina sérica bovina (ASB), la actividad de tripsina aumentó un 120%. Para la fracción 3 y en ausencia de ASB, la actividad de tripsina descendió durante los primeros 60 min de incubación, mientras que en presencia de ASB aumentó llegando a un nivel máximo a los 120 min de incubación y posteriormente fue disminuyendo. El extracto de hepatopáncreas mostró un perfil de autoactivación similar al de la fracción 1, aunque en menor intensidad. El tripsinógeno bovino mostró un aumento de actividad de tripsina máxima del 86% a los 330 min de incubación. Los análisis bioinformáticos sugirieron que la banda de 23 kDa podría corresponder a una forma bicatenaria del tripsinógeno de camarón formada por la ruptura del enlace Lys²¹¹-Asp²¹² y la presencia de un puente disulfuro entre la Cys¹⁵⁷-Cys²²⁴. Además se observó que el sitio activo de la tripsina de *L. vannamei* tiene alta similitud espacial con la tripsina catiónica humana (RMS de siete C α de 0.33 Å), a excepción de la Tyr²⁴⁰ e Ile¹²³ que se corresponden con Asp²¹⁸ y Leu¹⁰⁴ de la tripsina humana.

Conclusiones. En el presente trabajo se ha producido y purificado por primera vez cuatro isoformas del tripsinógeno recombinante del camarón *L. vannamei*, una probable forma bicatenaria y tres isoformas monocatenarias (no glicosilada, N-glicosilada y otra probablemente O-glicosilada). La forma monocatenaria no glicosilada presenta una rápida autoactivación en comparación con el tripsinógeno bovino.

Agradecimientos. Agradecemos el apoyo por parte de CONACyT-SEP (CB-2005-01-25618) y PAICyT (CN1109-05), el apoyo técnico brindado por el QBP Juan A. Gallegos López. MCG Agradece la beca del CONACyT.

Bibliografía

1. Klein B., Le Moullac G., Sellos D., Van Wormhoudt A.V. (1996). Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Panaeus vannamei* (Crustacea Decapoda): use in assessing gene expression during the moult cycle. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28(5): 551-563.