

EXPRESION DE LA PROTEINA E7 DE HPV-16 EN LACTOCOCCUS LACTIS

Luis Bermúdez, Naima Cortes, Deyanira Quistián, Reyes Taméz, Juan Alcocer, Yves Le Loir y Roberto Montes de Oca*.

*Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L. México. Tel: 52 8 3 76 43 19. Fax: 52 8 3 52 42 12.
E-mail: rmontesd@ccr.dsi.uanl.mx

Palabras clave: E7, *Lactococcus lactis*, CaCu.

INTRODUCCION

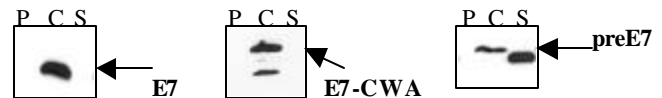
La infección con el virus del papiloma humano, especialmente el tipo 16 (HPV-16) es el principal factor para el desarrollo del cáncer cérvico-uterino (CaCu) (4). Dado que el gene E7 es constitutivamente expresado en carcinomas cervicales se considera un blanco potencial para el desarrollo de una vacuna contra esta neoplasia. En este trabajo se desarrolló un sistema para dirigir la producción de la oncoproteína E7 en tres diferentes compartimentos (citoplasma, anclada a superficie y de secreción) de la bacteria grado alimenticio *Lactococcus lactis*.

METODOLOGÍA

Se construyeron tres cepas de *L. lactis* para expresar la proteína E7 en citoplasma, pared celular y secretada. Las diferentes fusiones génicas (1,2) se colocaron bajo el control del promotor inducible P_{nisA} . Estas construcciones fueron establecidas en la cepa NZ9000 de *L. Lactis* (4). La producción de E7 se corroboró mediante análisis de proteínas aisladas de las tres localizaciones de interés. Los extractos se hicieron de cultivos inducidos (1ng/mL nisina) de las cepas recombinantes. El análisis de las proteínas se hizo por SDS-PAGE y Western Blot revelando con anticuerpo anti-E7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizó por Western Blot la capacidad de *L. lactis* para producir y acumular E7 en las tres localizaciones mencionadas. En la Fig. 1 se presentan los resultados de la revelación con anti-E7 de pared celular (P), citoplasma (C) y sobrenadante (S) de las cepas productoras de E7. En la construcción de secreción (Fig. 1B) calculamos que la producción de E7 es 3 veces mayor que la de la forma citoplasmática (Fig. 1A), esto debido quizá a que gracias a que la proteína entra a la maquinaria de secreción escapa a una posible degradación intracelular. La eficiencia de la secreción es de ~95% la cual es alta comparada con la producción de otras proteínas heterólogas en *L. lactis*. Análisis de la cepa que expresa la E7 en superficie (Fig. 1C) revelan una proteína de el tamaño esperado pero en el citoplasma, lo cual podría ser debido a que al momento de



A B C
Fig. 1. Expresión de E7 en diferentes localizaciones en *Lactococcus lactis*. A) Citoplasma. B) Pared Celular. C) Sobrenadante.

la extracción de las proteínas no se separó completamente la pared del protoplasto. También se detecta una segunda banda, del tamaño de la E7 nativa que seguramente corresponde a una degradación proteolítica. Actualmente se están llevando a cabo en nuestro laboratorio ensayos de inmunofluorescencia para corroborar si realmente la E7 se está presentando en la pared de la bacteria *L. lactis* recombinante.

CONCLUSIONES

Este trabajo representa un útil sistema para la producción *in vitro* de la oncoproteína E7. Además las cepas recombinantes aquí reportadas son potenciales candidatos para el posible desarrollo de una posible vacuna oral contra el CaCu.

BIBLIOGRAFIA

1. Bermúdez L, Langella P, Gruss A, Montes de Oca-Luna R, and Le Loir Y. 2001. Production of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein in *Lactococcus lactis*. Submitted to publication.
2. Cortes N, Bermúdez L, Le Loir Y, Langella P, Gruss A, Reyes Taméz, Alcocer J, and Montes de Oca-Luna-R. 2001. Expression of HPV-16 E7 oncoprotein in the surface of *Lactococcus lactis*. Manuscript in preparation.
3. Kuipers, O, de Ruyter P, Kleerebezen, M, and de Vos W. 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64:15-21.
4. zur Hausen H. 1991. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 184:9-13.