

## CONSTRUCCION Y EXPRESION DE ANTIGENO E7 DE HPV16 FUSIONADO A LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA DE COLERA EN *Pichia pastoris*

J.Alberto Valadez Lira,Eugenio Roman Calderon,Cristina Rodriguez Padilla,Reyes S. Tamez, Juan M. Alcocer Gonzalez, Facultad de Ciencias Biologicas. Lab. de Inmunología y Virología, Edificio "C" Tercer Piso. Pedro de Alba S/N,San Nicolás de los Garza,N.L. Cd. Universitaria C.P. 66450. Fax.83524212. E-mail: [jalcocer@ccr.dsi.uanl.mx](mailto:jalcocer@ccr.dsi.uanl.mx)

**Palabras clave:** *Pichia pastoris*, CTB y papilomavirus

**Introducción.** El uso de adyuvantes de origen microbiano es una estrategia para mejorar la inmunidad, ya que es capaz de modular la respuesta humoral contra un antígeno heterólogo. Las proteínas de expresión temprana de VPH-16 son E6 y E7 estas proteínas están involucradas en la transformación maligna de las células. Los productos de estos oncogenes participan en la inducción y el mantenimiento inmortalizado de las células; dichos genes se expresan selectivamente en tumores genitales de humanos, y se conservan intactos durante la integración del DNA viral al genoma celular (1), son a su vez antígenos específicos de tumores del cerviz y por ende los blancos más importantes para desarrollar vacunas. La subunidad B de la toxina de cólera (CTB) es un reconocido adyuvante sistémico y de mucosas ya que estimula la producción de IgA, genera respuesta de células T citotóxicas o la producción de anticuerpos de tipo IgA secretor (2).. La capacidad de producir proteínas heterólogas en sistemas eucariotas como las levaduras tiene ventajas con relación a procariontes. Entre estas ventajas se encuentra la capacidad de crecer en muy altas densidades celulares y de utilizar como sustrato una fuente de carbono el metanol. En los últimos años las levaduras metilotróficas y dentro de estas se encuentra *Pichia pastoris*, han sido utilizadas exitosamente para el clonaje y expresión de genes heterólogos (3)..

El objeto del presente estudio fue realizar una fusión entre el antígeno E7 de HPV 16 y la subunidad B de la toxina de Colera y producir esta proteína quimérica en *Pichia pastoris*.

**Metodología.** Se amplificaron los genes de interés por la técnica de PCR, en la cual E7 se obtuvo de la línea celular de humano SiHa la cual posee el DNA completo de HPV16. La subunidad B de la toxina de cólera se amplificó del plásmido pGMJ96. Estos genes se clonaron como producto de PCR en un vector T (pGEMT) se subclonaron estos genes con las enzimas KpnI y ApaI a un vector de expresión en eucariotas pCDNA3. Los genes fusionados E7-A2B se subclonaron con los sitios KpnI y ApaI en un vector de expresión en levaduras pPICZA. El plásmido pPICZA E7-A2B se integró a la levadura *Pichia pastoris* por recombinación homologa, en la cual del plásmido pPICZA

E7-A2B se utilizaron 5 µg para linearizar con la enzima BstXI, la cual es una secuencia homóloga de recombinación en *Pichia pastoris*: Se realizaron células electrocompetentes de *P. pastoris*, y se llevó a cabo la electroporación (V=1.5 Kv, 25µF, 200 Ohms, 5 milisec.) para integrar el plásmido que contiene la fusión de los genes E7-A2B, y posteriormente expresar las proteínas fusionadas y purificarlas por columnas de níquel y detectarlas por western blot para observar la expresión de las proteínas fusionadas.

**Resultados y Discusión.** El producto de PCR de e/ fue de 323 pb y de A2B de 523 pb, las clonas resultantes de pPICZA E7-A2B se lograron integrar al genoma de la levadura *Pichia pastoris* por recombinación homologa y las clonas resultantes de *Pichia pastoris* que poseían la fusión de los genes clonados E7-A2B se lograron transformar por electroporación en la levadura, y las clonas resultantes que contenían la fusión de las proteínas se fermentaron con metanol al 0.5% a 30°C por 24 horas. Se analizaron las proteínas por SDS-PAGE, y los geles fueron teñidos con azul de Coomassie para detectar las proteínas y se detectó la proteína E7 y A2B por Western Blot con anticuerpos comerciales.

**Conclusiones.** Se logró la expresión en *Pichia pastoris* de las proteínas fusionadas E7-A2B en mayor cantidad en comparación con los sistemas de expresión de procariontes.

### Bibliografía.

- 1.- Muller M. Viscal. 1992. Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for hpv-16 associated invasive cervical cancer. *Virology*. 187:508-514.
- 2.- Hagiwara Y. 1999. Mutants of cholera toxin as an effective and safe adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine*. Vol.17:2918-2926.
- 3.- Clare J. J. 1991. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of gene. *Bio/Technology*. Vol.9:455-60