

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



“Desarrollo de una Vacuna Probiótica para Combatir
el Cáncer Cérvico-Uterino: Construcción de Cepas
Recombinantes de *Lactococcus lactis* que expresan la E7
del VPH-16 y la IL-12 murina”

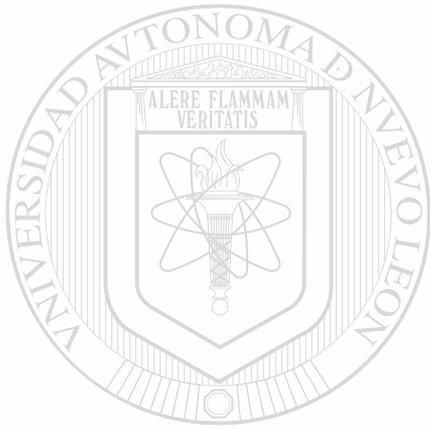
TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

LUIS GILBERTO BERMUDEZ HUMARAN

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
MAYO DEL 2002



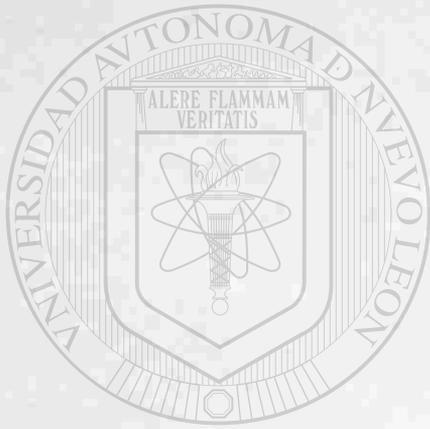
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**“Desarrollo de una Vacuna Probiótica,
para combatir el Cáncer Cérvico Uterino”**

TD
RC280
.U8
B4
2002
c.1



1080124503



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

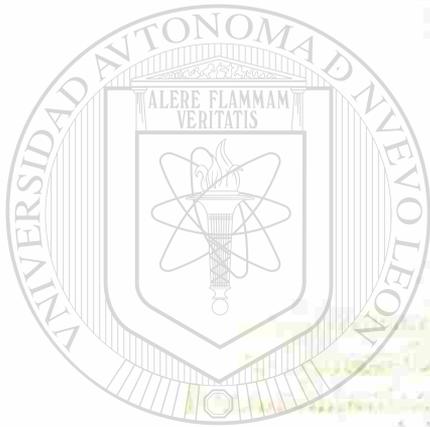
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE TESIS DE BIBLIOTECAS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

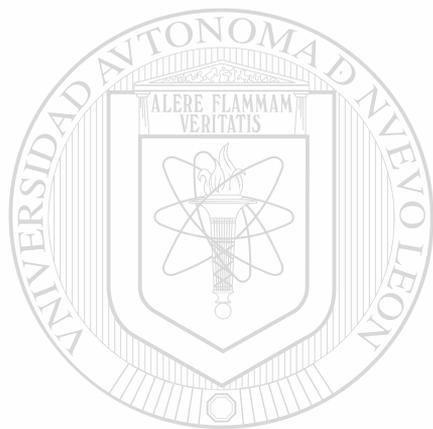
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

LUIS GILBERTO BERMUDEZ HUMARAN

SAN NICOLÁS DE LOS RÍOS, N. L.



TD
RC280
.U8
B4
2002



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



**“Desarrollo de una Vacuna Probiótica para Combatir el Cáncer
Cérvico-Uterino: Construcción de Cepas Recombinantes de
Lactococcus lactis que expresan la E7
del VPH-16 y la IL-12 murina”**

TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**DIRECCIÓN GENERAL DE CONTRATOS PARCIALES
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

LUIS GILBERTO BERMUDEZ HUMARAN

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEON

MAYO DEL 2002

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



**“Desarrollo de una Vacuna Probiótica para Combatir el Cáncer
Cérvico-Uterino: Construcción de Cepas Recombinantes de
Lactococcus lactis que expresan la E7
del VPH-16 y la IL-12 murina”**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

TESIS

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

LUIS GILBERTO BERMUDEZ HUMARAN

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEON

MAYO DEL 2002

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

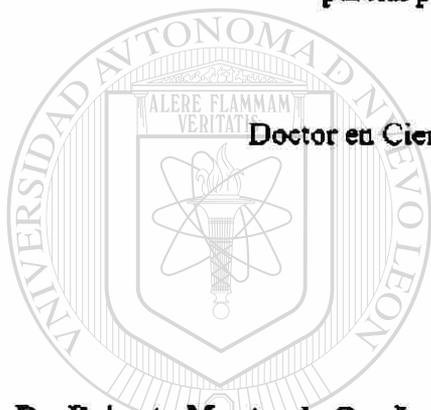
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA

Los miembros de esta comisión recomendamos que la presente tesis de

Luis Gilberto Bermúdez Humarán sea aceptada como requisito

parcial para obtener el grado académico de

Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología



COMISION DE TESIS

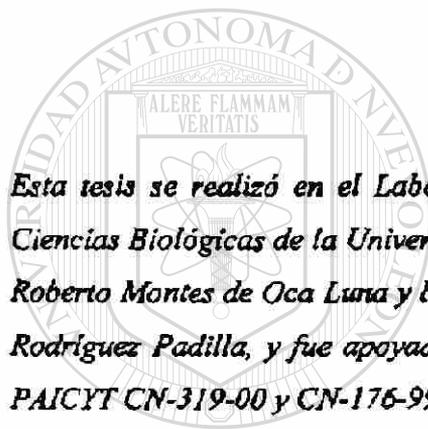
Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Presidente

Dr. Juan Manuel Alcocer Gozáles
Secretario

Dr. Carlos Hernández Luna
Vocal

Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Vocal



Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Roberto Montes de Oca Luna y la asesoría del Dr. Reyes Tamez Guerra y la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, y fue apoyada por la beca de CONACYT 129084 y los proyectos de PAICYT CN-319-00 y CN-176-99 y de CONACYT 37523-N.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Contenido

Capítulo 1

1.1	Introducción General	6
1.2	Antecedentes	9
1.2.1	Cáncer cérvico-uterino	9
1.2.2	Tratamiento del CaCu	10
1.2.3	Virus del papiloma humano	11
1.2.4	Infección y transformación por el VPH	12
1.2.5	Función de la oncoproteína E7	14
1.2.6	Respuesta inmune contra el VPH	15
	Respuesta inmune humoral	16
	Respuesta inmune celular	16
1.2.7	Papel de las citocinas en el CaCu	18
1.2.8	Estrategias en el desarrollo de vacunas contra el VPH	19
	Vacuna profiláctica contra el VPH	20
	Vacuna terapéutica contra el VPH	21
1.2.9	Uso de bacterias en el desarrollo de vacunas	22
	<i>Lactococcus lactis</i> como vector de expresión	23
1.2.10	Uso de adyuvantes para el desarrollo de vacunas	24
	Interleucina-12	25
1.3	Justificación de la tesis	26
1.4	Referencias	27

Capítulo 2

2.1	Producción de la proteína E7 del VPH-16 en <i>Lactococcus lactis</i>	37
2.2	Introducción	38
2.2	Material y métodos	41
2.2.1	Cepas, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos	41
2.2.2	Manipulaciones del ADN	41
2.2.3	Enzimas	41

Contenido

2.2.4	Amplificación del gene <i>E7</i>	43
2.2.5	Construcción de vectores para la expresión de <i>E7</i> en <i>Lactococcus lactis</i>	43
2.2.6	Caracterización del gene <i>E7</i>	43
2.2.7	Transformación de <i>Lactococcus lactis</i>	43
2.2.8	Extracción de proteínas de <i>Lactococcus lactis</i>	44
2.2.9	Western Blot de la proteína <i>E7</i>	45
2.3	Resultados	46
2.3.1	Caracterización de <i>E7</i>	46
2.3.2	Construcción de cassettes para la expresión de <i>E7</i>	49
2.3.3	Producción de <i>E7</i> en <i>Lactococcus lactis</i>	49
2.3.4	CipP no esta involucrada en la degradación de <i>E7</i>	51
2.3.5	DnaK no esta involucrada en la presentación de <i>E7</i> para su proteolisis	52
2.4	Discusión	54
2.4.1	Producción de <i>E7</i> en <i>Lactococcus lactis</i>	54
2.4.2	Estabilidad de <i>E7</i> en el citoplasma de <i>Lactococcus lactis</i>	54
2.4.3	Secreción de <i>E7</i> y perspectivas	55
2.5	Referencias	56
Capitulo 3		
3.1	Estabilización en la producción de <i>E7</i> en <i>Lactococcus lactis</i>	62
3.2	Introducción	63
3.3	Material y métodos	65
3.3.1	Cepas, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos	65
3.3.2	Manipulaciones del ADN	66
3.3.3	Fusión del propéptido sintético LEISSTCDA a <i>E7</i>	66
3.3.4	Fusión de Nuc al extremo N- de <i>E7</i>	66
3.3.5	Fusión de LEISSTCDA al extremo N- de Nuc- <i>E7</i>	66
3.3.6	Fusión de Nuc al extremo N- ó C- de <i>E7</i>	66
3.3.7	Condiciones para la inducción con la nisina	67

Contenido

3.3.8	Ensayo de la nucleasa	67
3.3.9	Inmunodetección	67
3.4	Resultados	69
3.4.1	LEISSTCDA no mejora la secreción de E7	69
3.4.2	La fusión Nuc al extremo N- de E7 rescata su producción en <i>Lactococcus lactis</i>	70
3.4.3	Nuc protege a E7 de la degradación cuando es fusionada al extremo N- ó al C-	74
3.4.4	Parámetros para la inducción con la nisina	75
3.5	Discusión	78
3.5.1	Estabilización de proteínas heterólogas en <i>Lactococcus lactis</i>	78
3.5.2	Perspectivas en el uso de <i>Lactococcus lactis</i> para la producción de proteínas heterólogas	78
3.6	Referencias	80

Capítulo 4

4.1	Producción de la Interleucina-12 murina en <i>Lactococcus lactis</i>	83
4.2	Introducción	84
4.3	Material y métodos	87
4.3.1	Cepas, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos	87
4.3.2	Métodos usados	88
4.3.3	Mutagénesis dirigida	88
4.3.4	Construcción de una cepa de <i>Lactococcus lactis</i> que expresa las subunidades p35 y p40 de la IL-12	89
4.3.5	Construcción del cassette de expresión de una IL-12 de fusión	90
4.3.6	Ratones C57BL/6	90
4.3.7	Inducción <i>in vitro</i> de IFN- γ	90

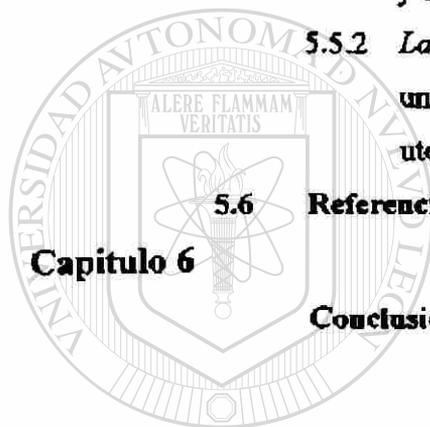
Contenido

4.3.8	Administración de la cepa recombinante de <i>Lactococcus lactis</i> recombinante que expresa la IL-12	90
4.3.9	Inducción <i>in vivo</i> de IFN- γ	90
4.3.10	Estadísticas	90
4.4	Resultados	91
4.4.1	Las subunidades p35 y p40 son procesadas correctamente por <i>Lactococcus lactis</i>	91
4.4.2	Producción de una IL-12 de fusión en <i>Lactococcus lactis</i>	96
4.4.3	Bioactividad de la IL-12 producida por <i>Lactococcus lactis</i>	97
4.4.4	La administración de la cepa recombinante de <i>Lactococcus lactis</i> recombinante induce la producción de IFN- γ	98
4.5	Discusión	100
4.5.1	<i>Lactococcus lactis</i> como un vector para la producción de IL-12	100
4.5.2	<i>Lactococcus lactis</i> como vector de expresión para el desarrollo de una vacuna y para terapia antitumoral	101
4.6	Referencias	104
Capítulo 5		
5.1	Inducción de una respuesta inmune contra la proteína E7	110
5.2	Introducción	111
5.3	Material y métodos	114
5.3.1	Cepas y métodos usados	114
5.3.2	Preparación de células para ensayos <i>in vitro</i>	114
5.3.3	Inmunización	114
5.3.4	Obtención de células de bazo	114
5.3.5	Inducción de IFN- γ e IL-2	114
5.3.6	Estadísticas	115

Contenido

Resultados	116
5.4.1 La proteína híbrida Nuc-E7 es más inmunogénica que la E7 nativa	116
5.4.2 La co-administración de las cepas de <i>Lactococcus lactis</i> expresando la proteína Nuc-E7 y la IL-12 aumenta la producción de IFN- γ e IL-2	117
5.4 Discusión	120
5.5.1 <i>Lactococcus lactis</i> como vector para expresar antígenos y citocinas a través de mucosas	120
5.5.2 <i>Lactococcus lactis</i> como un vector para el desarrollo de una nueva vacuna para combatir el cáncer cérvico-uterino (CaCu)	120
5.6 Referencias	122
Conclusiones	123

Capítulo 6



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



RESUMEN

El virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16) es considerado como el principal agente etiológico del cáncer cérvico-uterino (CaCu). Por lo tanto es necesario el desarrollo de una vacuna terapéutica y/o profiláctica contra el VPH para combatir el CaCu. La oncoproteína viral E7 es constitutivamente producida en neoplasias cervicales y es considerada como un potencial candidato para el desarrollo de una vacuna terapéutica contra el CaCu. En este trabajo desarrollamos un sistema inducible para producir la proteína E7 del VPH-16, tanto en citoplasma como secretada al medio de cultivo en la bacteria láctica (BL) grado alimenticio, *Lactococcus lactis*. Además, la administración intranasal en ratones con estos lactococos recombinantes fueron capaces de despertar una respuesta inmune específica de antígeno. Por otro lado, construimos una cepa recombinante de *L. lactis* capaz de secretar la Interleucina-12 (IL-12), una citocina heterodimérica, que juega un papel importante en la inmunidad celular contra varias infecciones bacterianas, virales y por parásitos, y que, ha mostrado ser un buen adyuvante cuando es coadministrada con vacunas de ADN. Los resultados obtenidos muestran que, cuando los ratones son inmunizados intranasalmente con las cepas recombinantes de *L. lactis* expresando la E7 y la IL-12 simultáneamente, la respuesta inmune específica de antígeno aumenta significativamente. Esta es la primera vez que se reporta la producción de la oncoproteína E7 del VPH-16 y la IL-12 murina en una BL grado alimenticio, lo cual representa un gran avance al desarrollo de una vacuna terapéutica de administración oral o nasal contra el CaCu usando sistemas de expresión seguros.

ABSTRACT

Human papillomavirus type 16 (HPV-16) is the major cause of cervical cancer (CuCa) onset. There is thus a need for the development of prophylactic and/or therapeutic HPV vaccines against this neoplasia. E7 viral oncoprotein is constitutively produced in cervical neoplasia and is considered as a suitable target for the development of therapeutic vaccines against CuCa. In this work, we developed an inducible system in the food-grade lactic acid bacterium (LAB) *Lactococcus lactis*, to target E7 production to the cytoplasm or to an extracellular location. Furthermore, after intranasal administration of these recombinant lactococci, a HPV-16 E7-specific immune response was induced. In addition, we constructed a recombinant *L. lactis* strain to secrete the Interleukin-12 (IL-12), a heterodimeric cytokine, that plays an important role in cellular immunity against several bacterial, viral and parasitic infections and that has been shown to be a good adjuvant when co-delivered with DNA vaccines. Our results shows, when mice were intranasally co-immunized with recombinant lactococci expressing E7 oncoprotein and that secreting IL-12 cytokine the E7-specific immune response increased significantly. This is the first report of E7 and IL-12 production in a food-grade LAB and represents one more step towards the development for therapeutic nasal and/or oral vaccine against CaCu using safe delivery systems.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.1. INTRODUCCION GENERAL

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) representa uno de los problemas más graves de salud pública a nivel mundial y, se considera como la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer alrededor del mundo. Sin embargo, en México se ha presentado como el cáncer más frecuente en la población femenina en la última década y es considerado como la primera causa de muerte por neoplasias en la mujer (Mohar *et al.*, 1997).

El virus del papiloma humano (VPH) ha sido implicado como el principal agente etiológico del CaCu (zur Hausen, 1996). En alrededor del 90% de biopsias de carcinomas cervicales se han detectado secuencias del VPH, principalmente de los tipos 16 y 18, razón por lo cual son denominados como de alto riesgo (Durst *et al.*, 1983; Boshart *et al.*, 1984; zur Hausen, 1985; McCance, 1986). Esto sugiere así, una fuerte relación entre el VPH y el desarrollo del CaCu. Sin embargo, aún y cuando la detección del VPH anogenital es muy común entre la mujer joven sexualmente activa, solamente una pequeña proporción de estas desarrolla una neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Este fenómeno se debe a que, según datos epidemiológicos existe una respuesta inmune protectora contra el desarrollo del CaCu una vez que se ha establecido la infección con el VPH y que aquellas mujeres que llegan a desarrollar NIC carecen de tal respuesta (Sillman *et al.*, 1984; Caussy *et al.*, 1990).

Dada la alta mortalidad y morbilidad causada por el CaCu asociado al VPH y el hecho de que la vacunación contra este virus ha mostrado prometedores resultados en modelos animales, se ha despertado un considerable interés en el desarrollo de una vacuna profiláctica y/o terapéutica para prevenir y combatir la infección con el VPH. No obstante, el desarrollo de tales vacunas se ha visto frenado por la falta de propagación del virus en cultivos *in vitro*, por la falta de modelos animales tipo humano y por la baja cantidad de viriones en lesiones clínicas lo cual dificulta el estudio y manipulación de este virus.

En modelos animales, la vacunación contra las proteínas de la cápside viral, L1 y/o L2 provee una eficiente protección contra la infección mediando la respuesta vía anticuerpos neutralizantes. La vacunación contra las proteínas virales no estructurales E1, E2, E6 ó E7 no previenen la infección, pero estimulan la regresión del tumor, garantizando el diseño de una vacuna terapéutica. Por otro lado, se ha comprobado que el potencial transformante del VPH depende esencialmente de la acción de dos de éstas proteínas no

estructurales (E6 y E7) (Mansur & Androphy, 1993), las cuales son producidas constitutivamente en lesiones cervicales malignas y premalignas e inactivan las funciones celulares de las proteínas p53 y pRb, respectivamente (Scheffner *et al.*, 1994). Por esta razón, la mayoría de los trabajos actuales sobre el desarrollo de vacunas terapéuticas contra el VPH esta basado en las proteínas E6 y E7.

Estudios previos han demostrado que el transcrito y proteína viral más abundante en lesiones cervicales asociadas al VPH es la proteína E7 (Smotkin & Wettstein, 1986), la cual tiene la capacidad de estimular linfocitos T citotóxicos (CTL) en ratones, los cuales median la regresión del tumor que expresa dicha proteína (Chen *et al.*, 1991). Por lo tanto, dadas las características inmunogénicas de la proteína E7 y tomando en cuenta que gran parte del éxito de una vacuna recae en una adecuada inducción de inmunidad celular específica de tumor (estimulación de CTL), la E7 representa un potencial antígeno tumoral candidato para el desarrollo de una vacuna contra la infección por VPH.

Diversos grupos de investigación han tratado de estimular al sistema inmunológico para que reconozca y ataque a las células cancerígenas expresando antígenos tumorales (E7, por ejemplo). Los nuevos sistemas que se han encontrado para este fin, son las llamadas vacunas para el cáncer; sin embargo, la efectividad de estas contra el CaCu ha sido muy limitada. Por esta razón se están analizando nuevas alternativas para generar vacunas eficientes. Un área que ha venido tomando fuerza en los últimos 10 años es el uso de bacterias vivas para tratar de despertar una respuesta inmune contra el VPH (Seedorf *et al.*, 1987; Sato *et al.*, 1989; Imai *et al.*, 1991; Pahel *et al.*, 1993; Londoño *et al.*, 1996); sin embargo no se han obtenido los resultados esperados y algunos de sistemas están basados bacterias patógenas atenuadas (por ejemplo, *Mycobacterium* spp. y *Salmonella* spp.) lo cual no deja de representar un potencial peligro para su uso en humanos.

Recientemente algunos grupos de investigación han comenzado a utilizar bacterias lácticas (BL) como vectores de expresión de proteínas heterólogas (Arnau *et al.*, 1997; Savijoki *et al.*, 1997; Le Loir *et al.*, 1998; de Vos *et al.*, 1999; Geoffroy *et al.*, 2000). Sin duda alguna la BL más estudiada a la fecha es: *Lactococcus lactis*, un organismo Gram-positivo que desempeña un papel importante en la producción de alimentos fermentados, razón por la cual es catalogado como un organismo grado alimenticio "generalmente seguro" (GRAS). Además, *L. lactis* es considerado como un potencial organismo para la

producción de proteínas de alto valor comercial y terapéutico dado que es capaz de secretar proteínas heterólogas al medio de cultivo y presenta una baja actividad proteolítica extracelular. Todas estas características hacen a esta bacteria un atractivo modelo para la expresión de proteínas heterólogas *in vivo* y para el desarrollo de una vacuna terapéutica de fácil administración (oral o nasal) y de bajos costos de producción.

En este trabajo escogimos el sistema inducible (NICE) para construir una cepa recombinante de *L. lactis* que exprese la oncoproteína E7 del VPH-16. Además, ya que es de particular interés dirigir la localización de la proteína heteróloga (de acuerdo al fin para el que se requiere) se desarrollaron dos sistemas para la producción de la proteína E7, uno para la acumulación de la proteína en citoplasma y otro para secretarla al medio de cultivo. Esta última forma presenta la ventaja de permitir un contacto directo entre la proteína y el sustrato (sistema inmunitario en mucosas, por ejemplo). Además, dado que el uso de adyuvantes ha mostrado ser efectivo en el desarrollo de vacunas cuando es co-expresado con un antígeno, se construyó una cepa recombinante de *L. lactis* capaz de secretar la Interleucina-12 (IL-12) murina en una forma biológicamente activa. Finalmente, analizamos la capacidad de las diferentes cepas construidas para inducir una respuesta inmune específica de antígeno en un modelo murino.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1 Cáncer cérvico-uterino

Del tracto genital femenino, el cáncer cérvico-uterino (CaCu) es considerado la principal causa de morbilidad y mortalidad en la mujer y la neoplasia más frecuente en la población femenina alrededor del mundo (Thoms *et al.*, 1995; Broker & Botchan, 1986; Shodell *et al.*, 1986). Principalmente se reconocen dos tipos histológicos de CaCu: el epidermoide, espinocelular o de células escamosas y el adenocarcinoma. El primero se origina en el epitelio plano estratificado que recubre el ectocérvix y el segundo en el epitelio cilíndrico que tapiza el canal endocervical; un tercer tipo se origina en la mucosa endometrial y constituye el adenocarcinoma del endometrio, sin embargo el 85-90% de los casos del CaCu es del tipo epidermoide y usualmente aparece en la unión entre el canal cervical y el ectocérvix. En esta área el epitelio columnar es reemplazado por el epitelio escamoso (Fig. 1).

Varios factores de riesgo han sido relacionados con el CaCu; algunos de los cuales son, las relaciones sexuales a temprana edad, el hábito de fumar, alimentación y productos químicos entre otros; sin embargo a ninguno se le ha podido asociar tan íntimamente como el de la presencia del virus del papiloma humano (VPH).

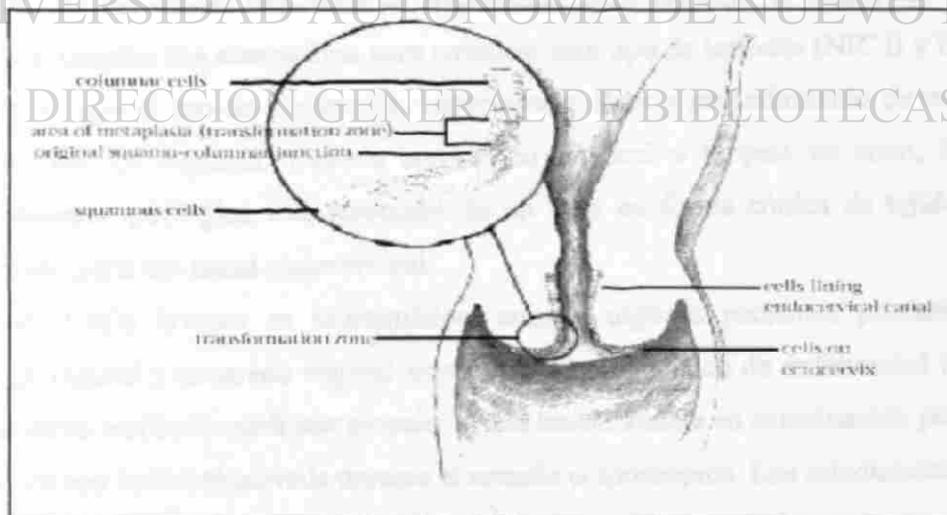


Fig. 1. Zona de transformación del Cáncer Cérvico-Uterino

Generalmente la infección con el VPH es altamente prevalente en la población femenina y aproximadamente el 90% de los casos de CaCu contienen el genoma de este virus. La aparición del CaCu esta asociada a una amplio rango de edad; usualmente se presenta entre la quinta y sexta década teniendo una media a los 54 años. En contraste, las lesiones intraepiteliales, las cuales son precursoras del cáncer invasor, ocurren frecuentemente en mujeres jóvenes, por abajo de los 40 años de edad. Estas lesiones precursoras son conocidas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC I, II y III) y se caracterizan por cambios displásicos confinados al epitelio cervical los cuales presentan diversos grados de maduración desordenada de este epitelio. Los tiempos en que se presentan estas alteraciones en el cérvix son consistentes con la noción de que la transformación de las células del epitelio escamoso requiere de un largo periodo de latencia, entre 10 y 20 años.

1.2.2 Tratamiento

La principal herramienta en la actualidad para combatir el CaCu, es la detección temprana mediante la prueba "Papanicolaou", con la cual se identifican lesiones cervicales premalignas o malignas que requieren posterior evaluación. Una vez diagnosticada la enfermedad, los pacientes con NIC I generalmente no requieren posterior tratamiento, dado que la mayoría de las lesiones se resuelven espontáneamente. No así los pacientes con NIC II y NIC III los cuales requieren de tratamiento para prevenir el desarrollo a estadios invasivos. Existen dos alternativas para erradicar este tipo de lesiones (NIC II y NIC III), la primera incluye el uso de crioterapia, vaporización láser y procedimiento de escisión con asa eléctrica. La segunda, llamada conización cervical o biopsia en cono, implica un procedimiento quirúrgico con resección de un área en forma cónica de tejido cervical, incluyendo parte del canal endocervical.

El CaCu invasor es asintomático, aunque algunas pacientes pueden presentar descarga vaginal y sangrado vaginal postcoital. El diagnóstico de enfermedad invasiva es normalmente realizado mediante biopsia de una lesión visible en examinación pélvica o por biopsia de una lesión observada durante el estudio colposcópico. Los estadios del CaCu son clasificados de acuerdo a criterios puramente clínicos y la mayoría de estas etapas es tratada con histerectomía sencilla, la cual involucra la eliminación del cuerpo uterino y del cérvix

(Fig. 2) ó histerectomía radical, la cual implica eliminar el órgano reproductor femenino completamente, con la ayuda de quimioterapia y/o radioterapia.

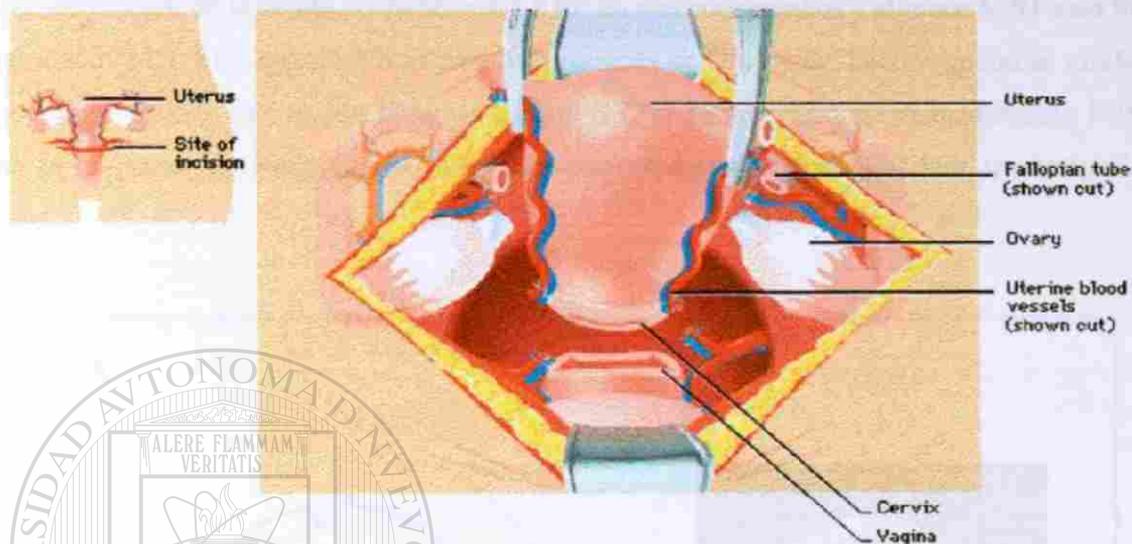


Fig. 2. Histerectomía sencilla. El cirujano abre la cavidad abdominal, corta a través de las trompas de Falopio, y corta el útero en su unión con el cervix.

1.2.3 Virus del papiloma humano

Los virus del papiloma humano (VPH) son pequeñas partículas de formas icosaédricas, de 52-55 nm de diámetro, que muestran un fuerte tropismo por las células epiteliales. Su genoma consiste de una molécula de ADN de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases (pb) (Fig. 3). A la fecha se conocen más de 70 tipos diferentes de VPH's presentando todos un tropismo por células epiteliales de diferentes partes del cuerpo, sin embargo se desconocen los posibles receptores. Unos 40 genotipos se han encontrado en áreas urogenitales, pero solo la mitad se han relacionado con procesos neoplásicos. Entre los más importantes están los genotipos 6 y 11, los cuales se han relacionado con la formación de verrugas y condilomas y que son considerados de riesgo moderado, y los tipos 16, 18, 33 y 35 los cuales están implicados con el desarrollo de cáncer cervical, y por lo que son considerado de alto riesgo. De estos diferentes genotipos, el VPH-16 es el más importante, ya que se le ha encontrado en más del 60% de los casos de CaCu, seguido por el VPH-18 (Galloway, 1994). Al menos a 12 se les ha determinado su secuencia

nucleotídica mostrando todos la misma organización genómica. Presentan dos tipos de marcos de lectura abiertos, tempranos y tardíos (E y L, respectivamente). La transcripción temprana de E1 y E2 regulan la replicación; E4, E5, E6 y E7 están implicados en la transformación de la célula hospedero; E3 y E8 no son conservados y algunos VPH's no los presentan y L1 y L2 que codifican para las proteínas de la cápside. Dichos genomas virales presentan además una región larga de control (LCR) conteniendo aproximadamente 1000 pb en la que se han identificado secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral.

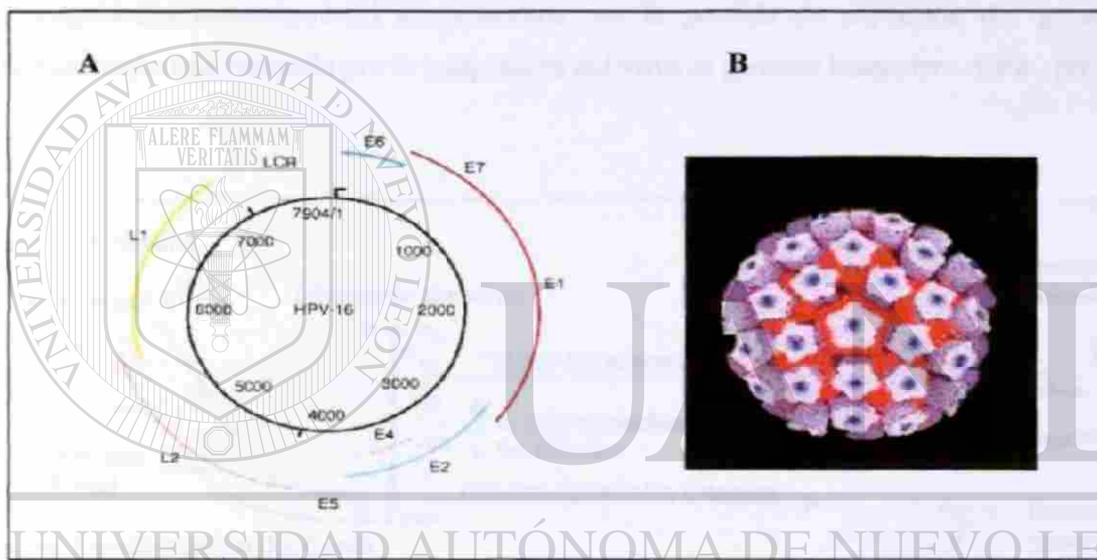


Fig. 3 Virus del Papiloma Humano. A. Representación esquemática de la organización genómica del VPH-16. B. Representación tridimensional del VPH.

1.2.4 Infección y transformación por el VPH

El VPH infecta las capas basales del epitelio (piel y mucosas) y tiene acceso a ellas por medio de heridas o escoriaciones, produciendo la transformación e inmortalización de sus células blanco. El ensamblaje de los nuevos viriones se lleva a cabo a medida que la célula migra hacia la superficie (Fig. 4c y 4d) es por ello que las partículas virales son encontradas solo en las capas más superficiales del epitelio. Básicamente pueden suceder tres cosas cuando el VPH infecta una célula: i) que el genoma viral permanezca en forma episomal sin integrarse al genoma del hospedero (Fig. 4b), ii) que induzca la proliferación de

epitelios escamosos a tumores benignos como son verrugas y papilomas ó iii) que el genoma del VPH se integre al de la célula, dando lugar a la síntesis de oncoproteínas y posterior transformación de las células (Fig. 4e y 4f).

En general en lesiones benignas el ADN del VPH es encontrado de forma episomal pero en tumores malignos se encuentra integrado al ADN de la célula hospedera (Boshart *et al.*, 1984; McCance, 1986). El proceso de transformación celular es complejo, en él están involucrados algunos genes de expresión temprana del virus. El primer evento que se ha observado para la transformación de las células es la desrepresión del promotor P97 del papilomavirus, el cual dirige la expresión de los oncogenes *E6* y *E7* (Jeon *et al.*, 1995). Esta desregulación transcripcional es producida por la pérdida de expresión del gene *E2*, comúnmente interrumpido por la integración del virus al genoma hospedero. Esto provoca

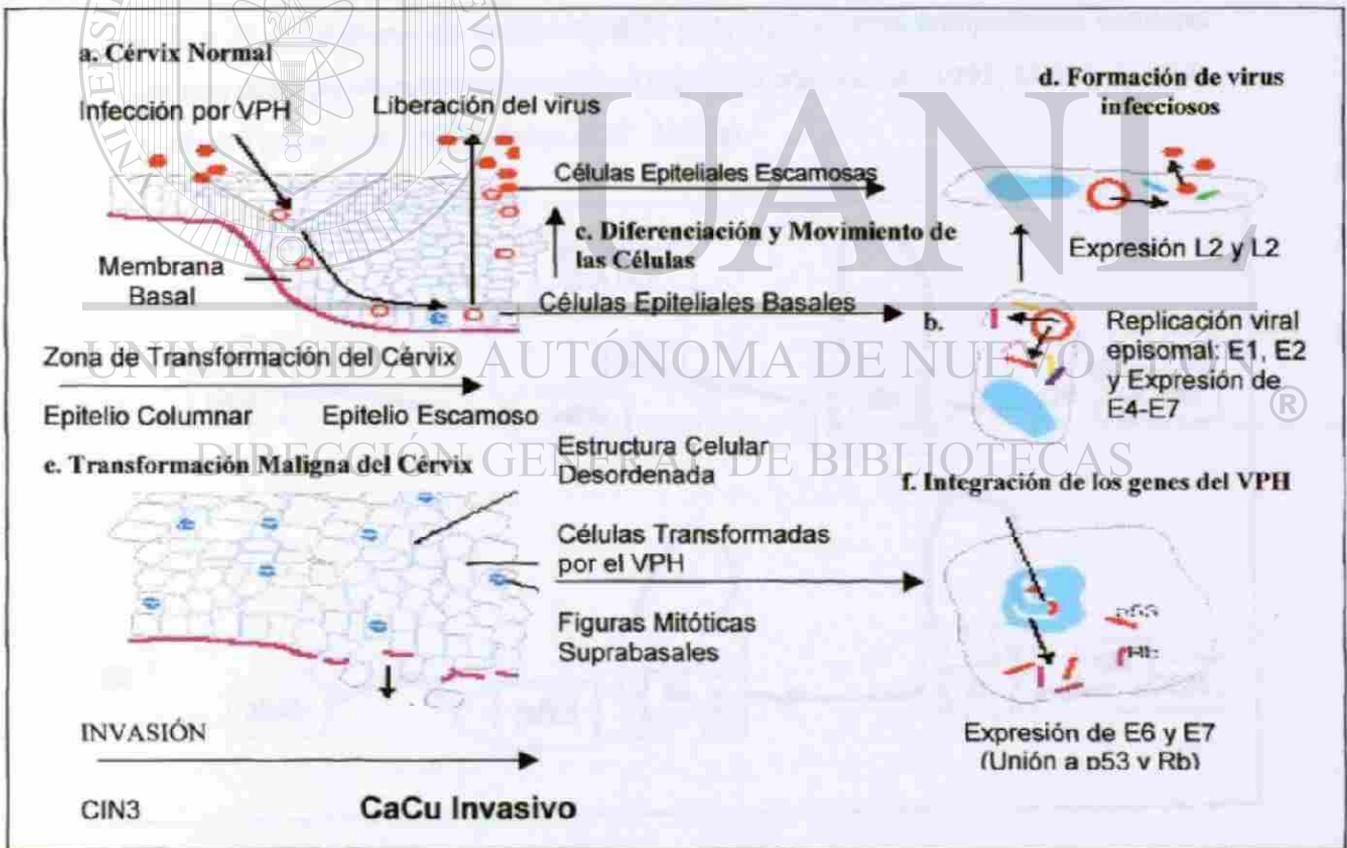


Fig. 4 Infección y replicación del VPH en células epiteliales cervicales.

la producción de una proteína E2 incompleta la cual falla en su función para regular el promotor P97 (Thierry & Yaniv, 1987).

1.2.5 Función de la oncoproteína E7

Se ha demostrado que los genes E6 y E7 del VPH-16 son expresados constitutivamente en carcinomas cervicales (Smotkin & Wettstein, 1986) y que son requeridos para el proceso de transformación. E6 y E7 causan la immortalización y transformación de queratinocitos humanos y de otro gran número de tipos de células *in vitro*, interactuando principalmente con las proteínas celulares p53 y pRB, respectivamente (Fig. 5) (Hawley *et al.*, 1989; Münger *et al.*, 1989). Sin embargo, el gene E7 por si solo es capaz de transformar líneas celulares de ratones *in vitro* y cooperar con el oncogene *ras* activado para transformar células epiteliales de riñón de rata (Storey *et al.*, 1988; Tanaka *et al.*, 1989). La habilidad de transformación de E7 además de su interacción con pRB, incluye también unión a las ciclinas A y E, inhibidores de ciclina CDK2, p21, p27 y otros componentes celulares causando una desregulación del ciclo celular (Fig. 6) (Zerfass *et al.*, 1995; McIntyre *et al.*, 1996; Zerfass-Thome *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1997a).

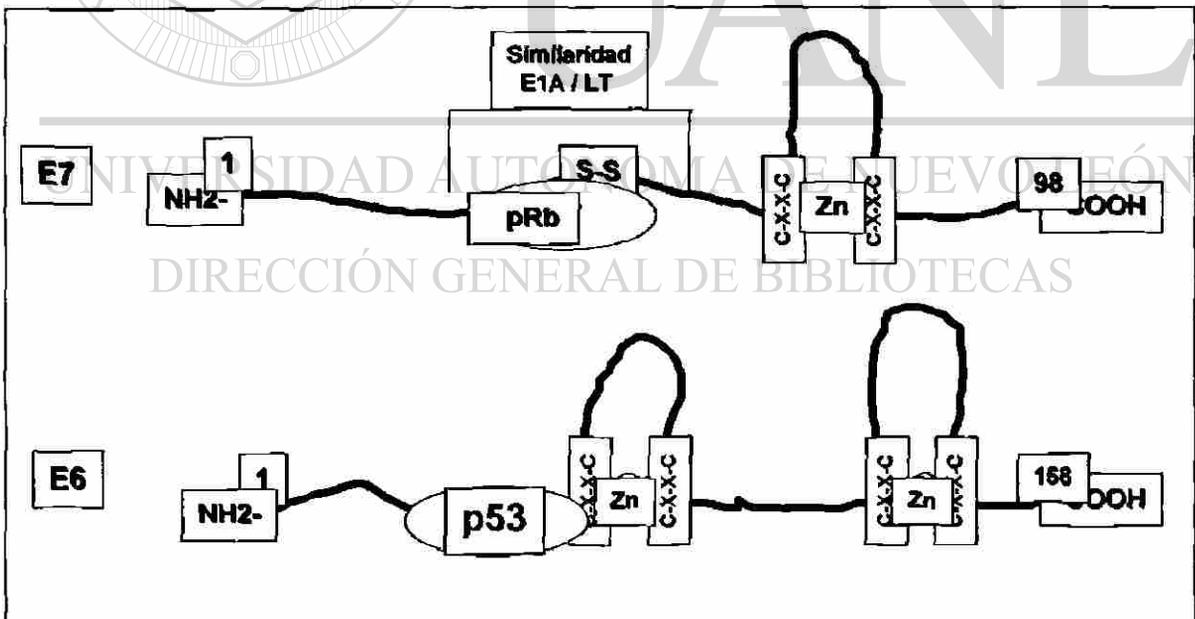


Fig. 5. Oncoproteínas E6 y E7. Representación de la interacción de las proteínas E6 y E7 del VPH-16 con p53 y pRb.

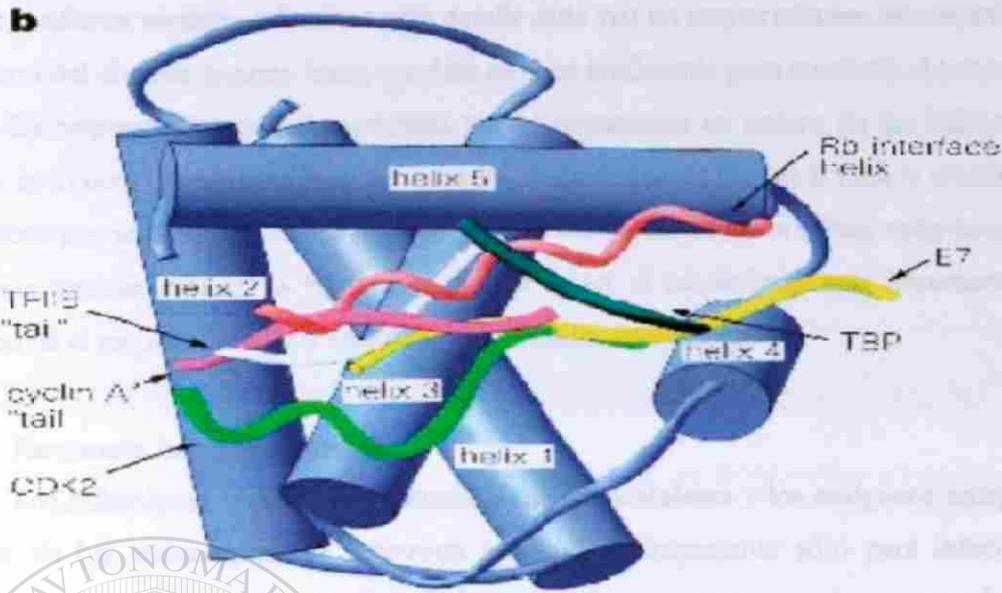


Fig. 6. Complejo pRb-E7, Ciclina A-CDK2 y TFIIIB-TBP.

La proteína E7 del VPH-16 es una fosfoproteína nuclear ácida sin actividad enzimática conocida (Smotkin & Wettstein, 1986). Esta compuesta de 98 aminoácidos (aa) con una $M_r = 11,000$ kilodaltones (kDa) según su composición de aa, sin embargo presenta un patrón electroforético $M_r = 19,000$ (Pahel *et al.*, 1993). E7 se une al Zn^{2+} a través de dos motivos conservados Cys-X-X-Cys presentes en su extremo carboxilo (Fig. 5) (Barbosa *et al.*, 1989; Rawls *et al.*, 1990). La fosforilación intracelular de E7 se realiza en una serina conservada y es mediada aparentemente por una Casein-Kinasa II (Firzlaff *et al.*, 1991).

1.2.6 Respuesta inmune contra el VPH

En las etapas previas al CaCu invasor (condilomas y NIC), el sistema inmunológico es capaz aún, de combatir y promover la regresión tumoral o mantener al tumor localizado. Por ejemplo, durante la regresión de las verrugas genitales se presentan infiltrados locales muy importantes de células mononucleares, incluyendo CTL, células asesinas naturales (NK) y macrófagos que invaden la epidermis y destruyen las células neoplásicas. Durante la evolución del tumor, las células tumorales adquieren nuevas modificaciones genéticas

que les confieren ventajas selectivas para evadir cada vez un mayor número de mecanismos de control del sistema inmune hasta que éste se hace ineficiente para combatir el tumor.

La respuesta inmune desarrollada por el organismo en contra de las infecciones virales, involucra la respuesta inmune humoral mediada por linfocitos B para la producción de anticuerpos específicos contra antígenos virales o celulares de la célula neoplásica y la respuesta inmune celular, la cual es considerada como el mecanismo más importante del huésped en el reconocimiento y destrucción de células neoplásicas.

Respuesta inmune humoral

Las infecciones virales son primariamente intracelulares y los antígenos escapan al alcance de los anticuerpos. La respuesta humoral es importante sólo para infecciones productivas, en las que las partículas virales salen al espacio extracelular por exocitosis o durante la lisis celular. En el espacio extracelular las partículas virales son atrapadas por linfocitos B con receptores (anticuerpos de membrana) específicos para algunos epitopes de las proteínas virales. Una vez en el receptor, el antígeno es internalizado por endocitosis y digerido en el lisosoma para producir pequeños péptidos que se unen a moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, HLA en humanos). Posteriormente, los péptidos son presentados en la superficie celular para ser reconocidos por linfocitos T cooperadores CD4+ (Th1 y Th2). Una vez activados, los linfocitos Th2 estimulan a los linfocitos B para producir anticuerpos neutralizantes contra las partículas virales (Berumen *et al.*, 1997).

En las infecciones no productivas, como serían los casos de los NIC de alto grado y el CaCu invasor, solamente se producen proteínas tempranas del virus y no proteínas tardías, por lo que las partículas virales no se presentan en el espacio extracelular, y no se esperaría una respuesta humoral contra los antígenos virales.

Respuesta inmune celular

En las etapas iniciales de la enfermedad la respuesta inmune es aún efectiva porque las células infectadas por el VPH expresan todavía las moléculas de clase I del HLA. Las HLA-I son proteínas de membrana involucradas en la presentación antigénica y juegan un papel importante en la respuesta inmune antitumoral. Estas moléculas exponen péptidos

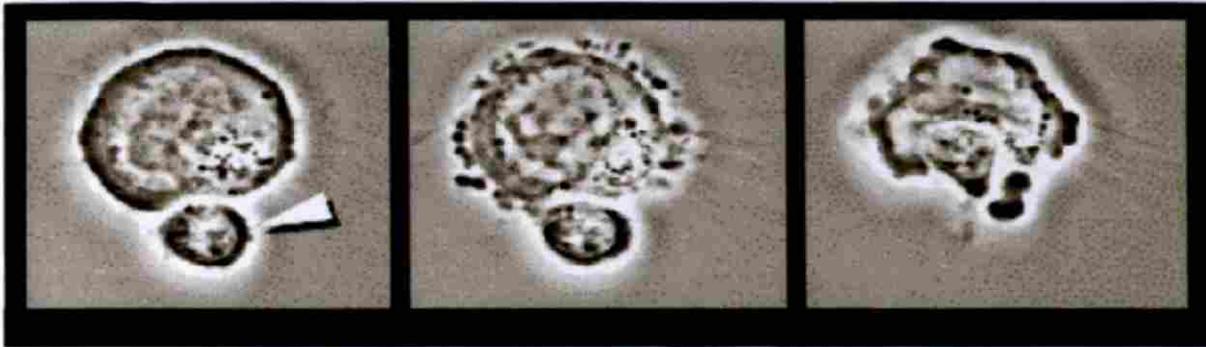
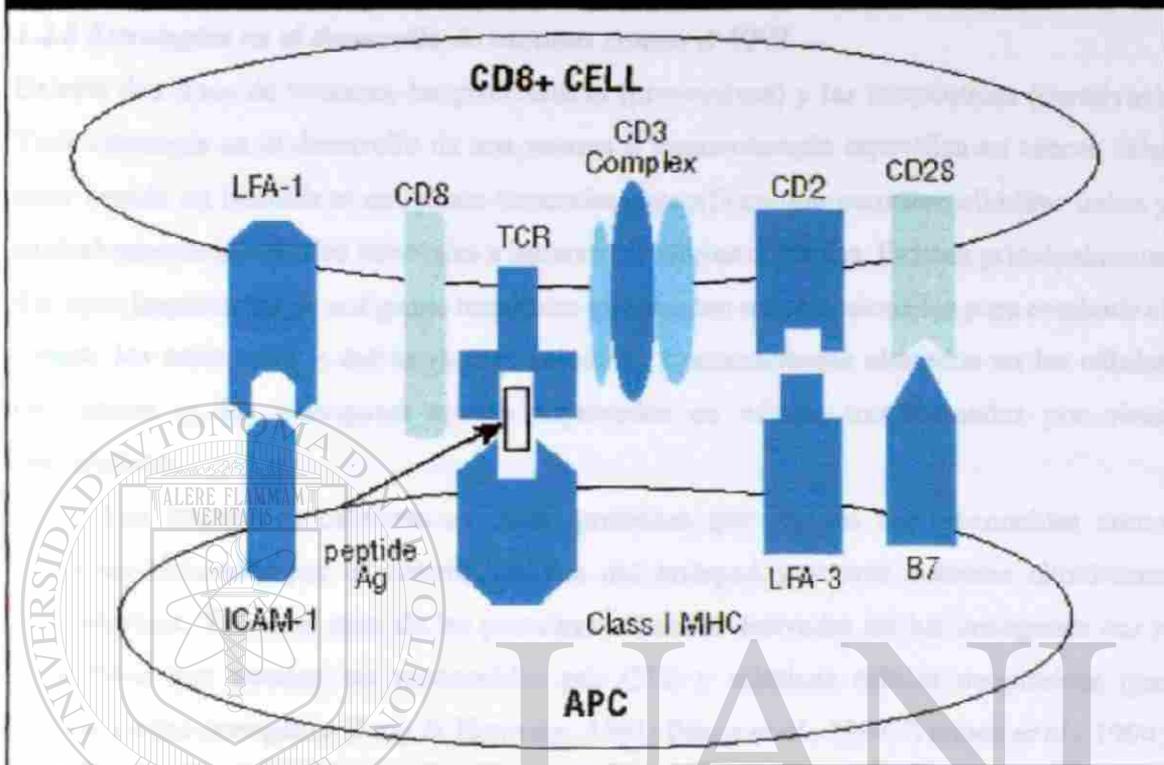


Fig. 7. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen moléculas de superficie en otras células que están marcadas para morir. Aquí, un CTL pequeño (flecha) está atacando y matando a una célula mucho más grande infectada por el virus de la influenza. (Mark T. Esser y Vivian Lam Braciale, University of Virginia Beirne B. Carter Center for Immunology Research).

virales en la superficie celular, permitiendo que las células infectadas sean reconocidas como blancos por los CTL CD8⁺ (Fig. 7). En los queratinocitos infectados las proteínas virales se encuentran en el citoplasma mezcladas con las proteínas celulares donde ambas son degradadas en los proteosomas, de modo que se producen pequeños oligopéptidos de 8 a 11 aminoácidos que posteriormente son transportados al retículo endoplasmático por las proteínas transportadoras TAP1 y TAP2. Ahí se unen a las moléculas HLA-I para ser transportados a la membrana celular y ser presentados a los CTL, los cuales reconocen el complejo HLA-péptido viral por medio del receptor de células T (TCR) específico para cada epitope (Fig. 8).

Una vez activados los CTL, proliferan, se diferencian y participan en la lisis de las células blanco por tres caminos diferentes: a) secretan perforinas y otras proteínas que perforan la membrana celular; b) liberan sustancias que inducen la muerte celular programada (apoptosis) y, c) liberan citocinas como INF- γ , el TNF y la leucorregulina que limitan la actividad viral dentro de las células y atraen macrófagos y otros fagocitos que pueden destruir a la célula. Así pues, adicional a la inmunidad específica mediada por los linfocitos T, otras poblaciones participan en la inmunidad celular. Sin embargo, toda la cascada de eventos inmunológicos esta regulada por moléculas solubles llamadas citocinas que principalmente son secretadas por los Th CD4⁺ (Alcocer, 1997).

Figura 8. Presentación de antígeno a la célula CD8+.



1.2.7 Papel de las citocinas en el CaCu

Estudios de la respuesta inmune celular sistémica en pacientes con CaCu indican una disminución en la producción de citocinas Th1 a nivel de sangre periférica (INF- γ e IL-2), mientras que la producción de Th2 es elevada (IL-4, IL-10 y TGF- β) (Hernández-Pando *et al.*, 1996). Hernández et al. (1996) demostraron que las células productoras de IL-10 en pacientes con CaCu son las células tumorales, sugiriendo que es el virus del VPH quien desregula la expresión de esta citocina en sus células blanco. El significado biológico de la expresión intratumoral de citocinas Th2 indica un estado de inmunosupresión local inducido por el virus como un mecanismo de escape de la respuesta inmune del huésped. Esto indica que la producción de citocinas Th1 que aumenta la inmunidad celular antitumoral esta inhibida o bloqueada en mujeres infectadas con VPH y que la progresión

de lesiones precursoras de CaCu puede estar asociada a un cambio en la producción de citocinas Th1 a Th2.

1.2.8 Estrategias en el desarrollo de vacunas contra el VPH

Existen dos tipos de vacunas, las profilácticas (preventivas) y las terapéuticas (curativas). Toda estrategia en el desarrollo de una vacuna o inmunoterapia específica en cáncer debe estar basada en identificar antígenos tumorales específicos que permitan eliminar única y exclusivamente las células tumorales e ignorar las células normales. Existen principalmente dos tipos importantes de antígenos tumorales que pueden ser seleccionados para combatir el cáncer, los oncogenes y antioncogenes celulares, frecuentemente alterados en las células neoplásicas y, los oncogenes virales expresados en células transformadas por virus oncogénicos.

Los oncogenes celulares expresan proteínas que pueden ser reconocidas como antígenos tumorales por el sistema inmune del huésped y activar sistemas citotóxicos antitumorales. Tal es el caso de las proteínas celulares derivadas de los oncogenes *ras* y *HER-2/neu* que pueden ser reconocidas por CTL y eliminar células neoplásicas que expresen estos oncogenes (Jung & Hermann, 1991; Peace *et al.*, 1994; Yanuck *et al.*, 1994; Labrecque *et al.*, 1993; Disis *et al.*, 1994a; Disis *et al.*, 1994b; Nijman *et al.*, 1994).

Por lo que respecta a los oncogenes virales, estos expresan proteínas exclusivamente en células infectadas y/o transformadas y por lo tanto son excelentes candidatos para el desarrollo de una vacuna o estrategia de inmunoterapia en neoplasias con una etiología viral asociada. Dado que los oncogenes *E6* y *E7* de VPH-16 son requeridos para el proceso de transformación y son altamente expresados en carcinomas cervicales, representan blancos potenciales para enfocar la respuesta inmune específica hacia estas proteínas oncogénicas y poder distinguir las células infectadas y/o transformadas de las normales. Las proteínas *E6* y *E7* de VPH-16 han sido reconocidas como antígenos tumorales altamente específicos dado que son capaces de inducir la generación de CTL CD8+ y estos a su vez pueden eliminar células tumorales expresando estos oncogenes (Chen *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992; Tarpey *et al.*, 1994; Felkamp *et al.*, 1995). La capacidad de activar células CTL y Th con péptidos sintéticos (correspondientes a fragmentos de proteínas virales; *E7*, por ejemplo) ha estimulado la posibilidad de desarrollar vacunas basadas en

esta proteína, además, la activación de los linfocitos T ofrece la ventaja de producir memoria de largo plazo y no requiere la persistencia del antígeno, características importantes en una vacuna (Lau *et al.*, 1994; Mullbacher, 1994).

Vacuna profiláctica contra el VPH

La infección natural de los papilomavirus ocurre en la superficie de la mucosa genital, la cual se caracteriza por ser un área de muy pobre inmunogenicidad para el huésped; esto es reflejado en parte por la falta de una infección productiva, las limitaciones de los queratinocitos para funcionar como células presentadores de antígeno y la co-evolución del virus (Tindle, 1996). Una estrategia de vacunación profiláctica debe superar estos problemas de inmunogenicidad y establecer una barrera inmunológica en el epitelio anogenital dirigida a las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside viral del VPH. Dos grandes dificultades para producir antígenos de la cápside viral que puedan servir para el desarrollo de una vacuna profiláctica radica esencialmente en que los viriones de VPH no pueden ser propagados fácilmente *in vitro* y que tampoco es fácil obtener cantidades razonables de viriones de las lesiones. Recientemente se han desarrollado estrategias para producir partículas tipo virales (VLP) libres de ADN, así también se han producido las proteínas L1 y L2 en levaduras y en otros tipos de células usando como vectores virus vaccinia, baculovirus y virus de semliki forest (Lee Cann *et al.*, 1995; Hofmann *et al.*, 1996; Heino *et al.*, 1995; Ghim *et al.*, 1996). Aunque parecen existir diferencias antigénicas entre este tipo de partículas virales y los viriones nativos, datos experimentales muestran que las VLP formadas por proteínas de cápside L1 y L2 de papilomavirus usadas como antígenos vacunales son efectivas en producir una inmunidad sistémica y en mucosas y confieren protección a las lesiones inducidas por papilomavirus infecciosos. En ciertos sistemas experimentales animales y humanos es necesario el uso de epitopes conformacionales en los antígenos para inducir una respuesta óptima de neutralización contra los papilomavirus, lo que apoya el uso de antígenos vacunales con conformaciones nativas. Desgraciadamente estos epitopes conformacionales son generalmente específicos del genotipo viral (VPH-11, 16 y 18, por ejemplo) lo que obviamente obstaculizará el desarrollo de una vacuna múltiple contra los diferentes genotipos de VPH asociados a

lesiones anogenitales de alto riesgo (Cristensen *et al.*, 1996; Breilburd *et al.*, 1995; Suzich *et al.*, 1995).

Vacuna terapéutica contra el VPH

La prevención de la infección es pues una estrategia difícil debido a las complicaciones discutidas en la sección anterior. Sin embargo, existe la posibilidad de desarrollar una vacuna terapéutica capaz de eliminar las células infectadas por el VPH o causar la regresión del tumor. Una vacuna terapéutica eficaz debe de inducir la activación de CTL específicos de epitopes derivados de proteínas virales procesadas intracelularmente y presentadas en el contexto de cualquiera de las moléculas de HLA-I del huésped. Las proteínas L1, L2 y E4 de VPH son expresadas principalmente en las células diferenciadas de la capa superior del epitelio infectado por VPH, dirigir pues la respuesta de los CTL a estas células sería de poco beneficio terapéutico, ya que son células terminales y no se dividen. Las proteínas blanco más adecuadas serían E1 y E2 las cuales son expresadas principalmente en las células epiteliales suprabasales, sin embargo estas proteínas son expresadas a muy bajos niveles (100-500 epitopes virales por molécula de clase I) por lo que el nivel de exposición sería insuficiente para convertir a estas células en blanco del ataque de los CTL. Como ya se menciono anteriormente la expresión de las proteínas E6 y E7 son necesarias para mantener a las células en un estado transformado y por lo cual son consideradas específicas de tumor y podrían representar blancos potenciales para dirigir una vacuna que controle los tumores inducidos por el VPH.

A la fecha se han desarrollado diferentes métodos para el desarrollo de una vacuna terapéutica eficaz contra el VPH, tal es el caso de la vacunación con péptidos sintéticos, las vacunas de DNA y las vacunas mediadas por bacterias vivas por citar algunas de ellas. Mediante el uso de péptidos sintéticos diferentes laboratorios han fallado en inducir CTL contra el E7 de VPH (Jochmus *et al.*, 1997), esto debido quizás, a que los péptidos utilizados en estos trabajos no se presentan o no son reconocidos de forma eficiente, como aquellos producidos a partir de la proteína endógena. También se ha demostrado previamente que existe una reacción cruzada entre CTL inducidos por péptidos sintéticos y células alogénicas (Staerz *et al.*, 1989), por tanto resulta un problema el uso de péptidos sintéticos como agentes inductores de la respuesta inmune en el desarrollo de vacunas contra el VPH.

La estimulación del sistema inmunológico de mamíferos por administración intramuscular de ADN plasmídico (vacunas de ADN) que codifica para antígenos heterólogos, representa una nueva forma de vacunación, que ha mostrado en repetidas ocasiones inducir una respuesta inmune celular y humoral (Ulmer *et al.*, 1993; Robinson, 1997; Donnelly *et al.*, 1998). Sin embargo, una de las principales limitaciones de las vacunas de ADN, es la falta de inducción de la respuesta inmunológica en mucosas. Las inmunoglobulinas isotipo A (IgA), las cuales son producidas en las superficies de las mucosas y en las secreciones de las glándulas exocrinas. A pesar de que las mucosas constituyen la primera línea de defensa del hospedero, siendo la IgA la más eficiente barrera inmunológica contra un gran número de patógenos mucosotrópicos (VPH por ejemplo), continúan siendo uno de los mayores puntos de entradas de virus y patógenos. Considerando que la inducción natural de una respuesta inmune hacia un patógeno comienza probablemente a nivel de mucosas, es lógico pensar que para que una vacuna induzca una respuesta similar, ésta debe de tener una ruta similar de expresión. Nuevas investigaciones se han enfocado a dirigir las vacunas de ADN directamente a sitios inductivos del sistema inmunológico de mucosas, tal es el caso de la inmunización vía vaginal directa, la oral y la nasal (Jones *et al.*, 1997b; Klavinskis *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997).

1.2.9 Uso de bacterias en el desarrollo de vacunas

Mientras que varios sistemas de expresión de antígenos no vivos han sido desarrollados a la fecha, vectores vivos pueden representar un mejor sistema de respuesta natural sin la necesidad de inmunizar en varias ocasiones para obtener mejores resultados. En la mayoría de los casos, estos vectores de expresión de antígenos son bacterias Gram negativas y virus. Esto es, debido quizás en parte al gran entendimiento que se tiene de estos organismos (en cuanto a manipulación genética se refiere). Sin embargo, dichos organismos generalmente son patógenos para el humano y aún y cuando hayan sido manipulados extensamente para reducir su patogenicidad, mantienen ciertas cualidades invasoras (Cadoz *et al.*, 1992; Tacket *et al.*, 1992; Tartaglia *et al.*, 1992). Para evitar correr riesgos con el uso de estos organismos, se han desarrollado sistemas con bacterias Gram positivas no patogénicas (Iwaki *et al.*, 1990; Hansson *et al.*, 1992; Pozzi *et al.*, 1992; Wells *et al.*, 1993; Piard *et al.*, 1997; Le Loir *et al.*, 1998). En algunos de estos sistemas el antígeno es expresado en el

citoplasma de la célula hospedera o secretado al medio de cultivo (Iwaki *et al.*, 1990; Wells *et al.*, 1993; Le Loir *et al.*, 1998;), mientras que otros han sido desarrollados para presentar el antígeno en la superficie celular (Hansson *et al.*, 1992; Nguyen *et al.*, 1993; Pozzi *et al.*, 1994; Medaglini *et al.*, 1995; Samuelson *et al.*, 1995; Gunneriusson *et al.*, 1996; Piard *et al.*, 1997). En 1998 Le Loir y colaboradores examinaron la capacidad de secreción de proteínas heterólogas en *Lactococcus lactis*. Varias propiedades de esta bacteria la hacen un atractivo modelo para la secreción de proteínas biológicamente activas, ya que no secreta proteasas ni alguna otra proteína en cantidades significativas, característica que además puede simplificar los análisis de las proteínas secretadas.

***Lactococcus lactis* como vector de expresión**

Lactococcus lactis es un organismo Gram positivo perteneciente al grupo de bacterias lácticas (BL). Generalmente *L. lactis* es clasificado como un microorganismo “generalmente seguro” (GRAS), no patógeno y no colonizante, el cual a comenzado a utilizarse como vehículo de expresión de proteínas heterólogas para inmunización vía mucosa. Además, es un organismo ampliamente conocido dado su largo historial en el uso para la producción de productos lácteos fermentados.

A la fecha numerosas proteínas heterólogas han sido producidas y secretadas exitosamente en *L. lactis* usando péptidos señales (SP) nativos ó sintéticos (Perez-Martinez *et al.*, 1992; Simonen & Palva, 1993; van Asseldonk *et al.*, 1993; Steidler *et al.*, 1995; Norton *et al.*, 1997; Savijoki *et al.*, 1997; Le Loir *et al.*, 1998). Otra bacteria Gram positiva muy relacionada a *L. lactis* en cuanto a funcionalidad, es *Streptococcus gordonii* con el cual comparte la capacidad de servir como vector para expresar antígenos para una inmunización de mucosas (Medaglini *et al.*, 1995). Sin embargo, a diferencia de *S. gordonii* la cual es una bacteria comensal, *L. lactis* carece de cualquier capacidad conocida para multiplicarse *in vivo* (Gruzza *et al.*, 1994). Estudios en animales y humanos voluntarios alimentados con lactococos vivos han mostrado que el paso de esta bacteria a través del tracto entérico es transitorio, sin evidencia de colonización (Gruzza *et al.*, 1994; Klijn *et al.*, 1995) y que a pesar de su falta de capacidad para colonizar, *L. lactis* es capaz de expresar antígenos heterólogos en forma inmunogénica al sistema inmune (Wells & Schofield, 1996; Steidler *et al.*, 1998). Además, otra ventaja que ofrece esta BL para el desarrollo de vacunas

es que su pared de peptidoglicanos es un adyuvante natural, lo cual puede ser de gran ayuda en cuanto a aumento de respuesta inmune se refiere. Todas estas características podrían favorecer la aceptación de *L. lactis* como un vector de inmunización en humanos.

Dado que *L. lactis* es un organismo no-comensal (es decir, no colonizante) es recomendable el uso de un sistema de expresión *in vitro* (inducible) que garantice que la proteína de interés sea producida antes de la aplicación (inmunización, por ejemplo). En 1996 de Ruyter y colaboradores desarrollaron un sistema de expresión génica controlada (NICE). Dicho sistema esta basado en el uso de una bacteriocina (nisina) como inductor de la transcripción de genes situados bajo el control del promotor nisina A (Fig. 9).

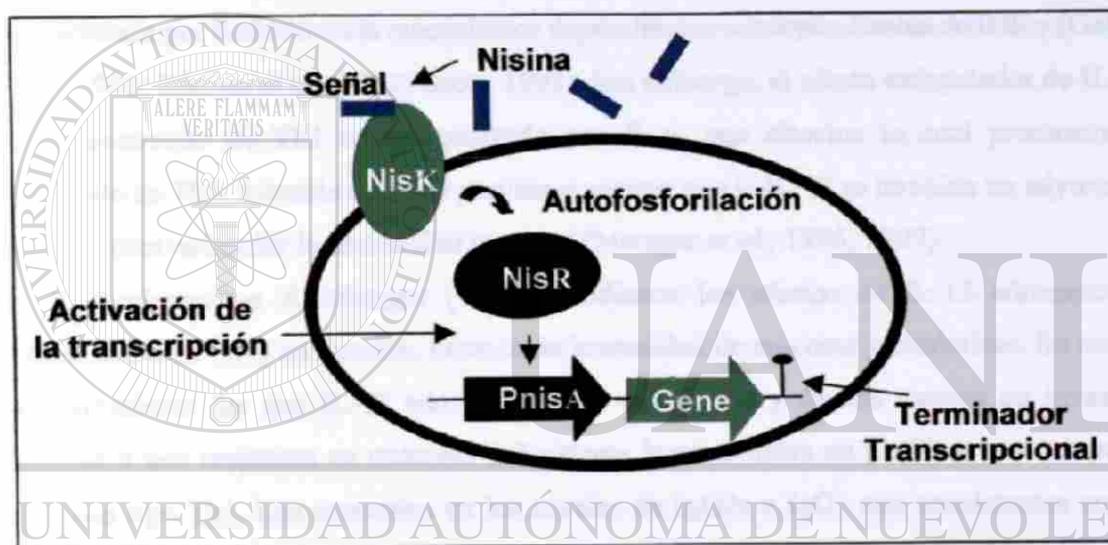


Fig. 9. Sistema de expresión inducible por la Nisina. Gracias a la presencia de un receptor (NisR) y de un traductor de señal (NisK) en la cepa NZ9000 (*L. lactis*) es posible inducir (de forma proporcional) la expresión de genes bajo el control del promotor P_{nisA}, por la adición de nisina (inductor) en el medio de cultivo.

1.2.10 Uso de adyuvantes para el desarrollo de vacunas

Ya que la mayoría de las vacunas administradas parenteralmente son únicamente efectivas parcialmente en inducir una inmunidad óptima en mucosas, existe un particular interés en desarrollar adyuvantes que aumenten la inmunidad en mucosas y que puedan ser administrados de una manera no tóxica y no invasiva.

Interleucina-12

La interleucina-12 (IL-12), previamente conocida como un factor estimulador de células NK y factor de maduración de CTL, fue originalmente aislada de células B transformadas con el virus Epstein-Barr. La IL-12 es un heterodímero compuesto de dos subunidades (p35 y p40) y es producida por células presentadoras de antígeno (APC), tales como macrófagos, células dendríticas y células de Langerhans. La producción de IL-12 es inhibida por las interleucinas IL-4 e IL-10. Las actividades biológicas de la IL-12 incluyen el aumento de CTL, activación y generación de células NK por linfocinas, aumento de citotoxicidad y proliferación celular de NK, proliferación de linfocitos T, inducción de la producción de INF- γ por células NK y linfocitos T e inhibición de la síntesis de IgE por IL-4 estimulada por linfocitos vía mecanismos dependientes e independientes de INF- γ (Gately *et al.*, 1992; Kiniwa *et al.*, 1992; Scott, 1993). Sin embargo, el efecto estimulador de IL-12 en el desarrollo de Th1 es antagonizado por IL-4, una citocina la cual promueve el desarrollo de Th2. Además estudios previos muestran que la IL-12 es también un adyuvante efectivo para estimular la inmunidad humoral (Metzger *et al.*, 1996, 1997).

Arulanandam & Metzger (1999) estudiaron los efectos de IL-12 administrada intranasalmente (*i.n.*) en función, tanto de la inmunidad de mucosas y sistémicas. Su mayor descubrimiento fue que IL-12 administrada de ésta forma y de una manera no invasiva, conduce a una respuesta en mucosas del sistema inmune hacia un perfil de anticuerpos y citocinas tipo Th1. Los aumentos en los niveles de IgG2a e IgG3 son consistentes con la habilidad de IL-12 para inducir INF- γ , el cual es un potente factor de encendido tanto para la respuesta IgG2a e IgG3. Los anticuerpos murinos del isotipo IgG2a son conocidos por ser eficientes en la opsonización y complemento de fijación, mecanismos claves para aumentar la inmunidad humoral. La IL-12 puede ser por lo tanto administrada *i.n.* de una manera no invasiva para influenciar la respuesta inmune humoral de una manera similar a la administración parenteral y servir como un adyuvante efectivo y seguro en el desarrollo de vacunas.

1.3. JUSTIFICACION DE LA TESIS

En la actualidad se considera que el CaCu es una de las neoplasias potencialmente curables. La posibilidad de detectar en forma temprana esta neoplasia hace factible reducir la mortalidad secundaria al padecimiento. Sin embargo, éste sigue siendo uno de los principales tumores en la mujer, y contribuye a un alto número de defunciones a escala mundial. Según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente se registran al menos 450,000 casos de los cuales cerca del 45% fallece. Mientras en países desarrollados la incidencia y la mortalidad debidas a este padecimiento han decrecido de manera significativa en este siglo, en los países pobres o en vías de desarrollo no se ha observado esta descendencia y, en particular, los países de América Latina se han caracterizado por notificar las mayores tasas de incidencia en todo el orbe. Tan solo en México, esta ha sido la neoplasia más frecuente en la población femenina en la última década y ocupa el primer lugar de muertes por cánceres en la mujer. Por lo tanto es de gran prioridad que se tomen nuevas medidas para prevenir la infección o modular la enfermedad. Así pues, el objetivo de esta tesis es: **“Desarrollar una vacuna probiótica con la bacteria grado alimenticio y no patógena *Lactococcus lactis* para combatir el CaCu”**.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.4 REFERENCIAS

Alcocer González JM. (1997). Expresión de citocinas Th1 y Th2 en cáncer cervical avanzado y su relación a la presencia y expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH-16; Tesis Doctoral. FCB, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. pp. 33-39.

Arnau J, Hjert-Hansen E, & Israelsen H. (1997). Heterologous gene expression of bovine plasmin in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 48:331-338.

Arulanandam BP, & Metzger DW. (1999). Modulation of mucosal and systemic immunity by intranasal interleukin 12 delivery. *Vaccine*. 17:252-260.

Barbosa MS, Lowy DR, & Schiller JT. (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *Journal of Virology*. 63:1404-1407.

Berumen J, Miranda EI, Zafra G, Casas L, Segura E, Ordonez RM, Aguirre J, Martinez M, Rosas A, Ibarra V, Pedraza L, Saad A, Marroquin A, Gutierrez M, Martinez A, & Gariglio P. (1997). Molecular epidemiology of high-incidence cancers in Mexico. *Gaceta Médica Mexicana*. 1:35-41.

Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, & zur Hausen H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO Journal*. 3:1151-1157.

Breltburd F, Kirubauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trindinh-Deamarquel C, Orth G, Schiller JT, & Lowy DR. (1995). Immunization with virus-like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRVP) can protect against experimental CRVP infection. *Journal of Virology*. 69:3959-3963.

Broker TR, & Botchan M. (1986). Papillomaviruses: Retrospectives and prospectives. *Cancer Cell*. 4:17-35.

Cadoz M, Strady A, Meignier B, Taylor J, Tartaglia J, Paoletti, & Plotkin S. (1992). Immunization with canarypox virus rabies glycoprotein. *Lancet*. 339:1429-1431.

Caussy D, Goedert JJ, Palefsky J, Gonzales J, Rabkin CS, DiGioia RA, Sanchez WC, Grossman RJ, Colclough G, Wiktor SZ, Kramer A, Biggar RJ, & Blatner WA. (1990). Interaction of human immunodeficiency and papilloma viruses: association with anal epithelial abnormality in homosexual men. *International Journal of Cancer*. 46:214-219.

Chen L, Thomas EK, Hu S-L, Hellström L, & Hellström KE. (1991). Human Papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 88:110-114.

Chen L, Mizuno MT, Singhal MC, Hu S-L, Galloway DA, Hellström I & Hellström KE. (1992). Induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a syngeneic tumor expressing the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *Journal of Immunology*. 148:2617-2621.

Cristensen ND, Raad CA, Cladel NM, Han R, & Kreider JW. (1996). Immunization with virus like particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbits papillomavirus. *Journal of Virology*. 70:960-965.

Disis ML, Calenoff E, McLaughlin G, Murphy AE, Chen W, Groner B, Jeschke M, Lydon N, McGlynn, Livingston RB, Moe R, & Cheever MA. (1994a). Existent T cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Research*. 54:16-20.

Disis ML, Smith JW, Murphy AE, Chen W, & Cheever M. (1994b). In vitro generation of human cytolytic T-cells specific for peptides derived from the HER-2/neu protooncogene protein. *Cancer Research*. 54:1071-1076.

Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, & zur Hausen H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of National Academic of Sciences, USA*. 80:3812-3815.

Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, & Livi MA. (1998). DNA vaccines. *Annual Review of Immunology*. 15:617-648.

Felkamp MCW, Vreugdenhil GR, Vierboom MPM, Ras E, van de Burg SH, Schegget J, Melief CJM, & Kast WM. (1995). Cytotoxic T lymphocytes raised against a subdominant epitope offered as a synthetic peptide eradicate human papillomavirus type 16-induced tumors. *European Journal of Immunology*. 25:2638-2642.

Firzlaff JM, Luscher B, & Eisenman RN. (1991). Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proceedings of National Academic of Sciences, USA*. 88:5187-5191.

- Galloway DA. (1994). Human papillomavirus vaccines: a warty problem. *Infectious Agents and Disease*. 3:187-193.
- Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, & Chizzonite R. (1992). Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunology*. 143:127-42.
- Geoffroy MC, Guyard C, Quataunens B, Pavan S, Lange M, & Mercenier A. (2000). Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:383-391.
- Ghim SJ, Young R, & Jenson AB. (1996). Antigenicity of bovine papillomavirus type 1 (BPV-1) virus-like particles compared with that of intact BPV-1 virions. *Journal of General Virology*. 77:183-188.
- Gruza M, Fons M, Ouriet MF, Duval-Iflah Y, & Ducluzeau R. (1994). Study of gene transfer in vitro and in the digestive tract of gnotobiotic mice from *Lactococcus lactis* strains to various strains belonging to human intestinal flora. *Microbiology Releases*. 2:183-189.
- Gunneriusson E, Samuelson P, Uhlen M, Nygren P, & Stahl S. (1996). Surface display of a functional single-chain Fv antibody to staphylococci. *Journal of Bacteriology*. 178:1341-1346.
- Hansson M, Stahl S, Nguyen TN, Bachi T, Robert A, Binz H, Sjolander A, & Uhlen M. (1992). Expression of recombinant proteins on the surface of the coagulase-negative bacterium *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Bacteriology*. 174:4239-4245.
- Heino P, Dillner J & Schwartz S. (1995). Human papillomavirus type 16 capsid protein produced from recombinant semliki forest virus assemble into virus-like particles. *Virology*. 214:349-359.
- Hernandez-Pando R, Orozco E, Sampieri A, Pavon L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer JM, Madrid MV. (1996). Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 89:26-33.
- Hofmann KJ, Neeper MP, Markus HZ, Braun DR, Muller M & Jansen KU. (1996). Sequence conservation within the major capsid protein of human papillomavirus (VPH) type 18 and formation of HPV-18 virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Virology*. 77:465-468.

- Imai Y, Matsushima Y, Sugimura T, & Terada M. (1991). Purification and characterization of human papillomavirus type 16 E7 protein with preferential binding capacity to the underphosphorylated form of retinoblastoma gene product. *Journal of Virology*. 65:4966-4972.
- Iwaki M, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Sugita-Konishi Y, Aibara K, & Koga T. (1990). Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutants* surface protein antigen gene. *Infection and Immunity*. 28:2929-2934.
- Jean S, Allen-Hoffmann L, & Lambert PF. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *Journal of Virology*. 69:2989-2997.
- Jochmus I, Wolfram O, Altman A, Buck G, Hofman B, Schneider A, Gissmann L, & Rammensee H-G. (1997). Specificity of human cytotoxic induced by a human papillomavirus type 16 E7-derived peptides. *Journal of General Virology*. 78:1689-1695.
- Jones DL, Thompson DA, & Munger K. (1997a). Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to VPH type 16 E7-induced apoptosis. *Virology*. 239:97-107.
- Jones DH, Corris S, McDonald S, Clegg JCS & Farrar GH. (1997b). Poly (DL-lactide-co-glycolide) encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody response to encoded protein after oral administration. *Vaccine*. 15:814-817.
- Jung S, & Schluesener HJ. (1991). Human T lymphocytes recognize a peptide of single point-mutated, oncogenic *ras* proteins. *Journal of Experimental Medicine*. 73:273-276.
- Kiwiwa M, Gately M, Gubler U, Chizzonite R, Fargeas C & Delespesse G. (1992). Recombinant interleukin-12 suppresses the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4 stimulated human lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 90:262-266.
- Klavinskis LS, Gao L; Baranfield C, Lebeuer T, & parker S. (1997). Mucosal immunization with DNA-liposome complexes. *Vaccine*. 15:818-820.
- Klijun N, Weerkamp AH, & Vos WM. (1995). Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:2771-2774.
- Labrecque S, Naor N, Thomson D, & Matishewski G. (1993). Analysis of the anti-p53 antibody response in cancer patients. *Cancer Research*. 53:3468-3471.

- Lau LL, Jamieson BD, Somasundaram T, & Ahmed R. (1994). Cytotoxic T cells memory without antigen. *Nature*. 369:648-652.
- Lee Cann P, Touze A, Enogat N, Leboulleux D, Mongin C, Legrand MC, Calvet C, Afoutou JM, & Couragef P. (1995). Detection of antibodies against human papillomavirus (VPH) type 16 virions by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VPH 16 L1 capsid produced by recombinant baculovirus. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:1380-1382.
- Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, & Langella P. (1998). A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 180:1895-1903.
- Londoño LP, Chatfield S, Tindle RW, Herd K, Gao XM, Frazer I, & Dougan G. (1996). Immunization of mice using *Salmonella typhimurium* expressing human papillomavirus type 16 E7 epitopes inserted into hepatitis B virus core antigen. *Vaccine*. 14:545-552.
- Mansur CP, & Androphy EJ. (1993). Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. *Biochemical and Biophysical Acta*. 1155:323-345.
- McCance DJ. (1986). Human papillomaviruses and cancer. *Biochemical et Biophysical Acta*. 823:195-205.
- McIntyre MC, Ruech MN, & Laimins LA. (1996). Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology*. 215:73-82.
- Medaglini D, Pozzi G, King TP, & Fischetti VA. (1995). Mucosal and systemic immune responses to a recombinant protein expressed on the surface of the oral commensal bacterium *Streptococcus gordonii* after oral colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 92:6868-6872.
- Metzger DW, Buchanan JM, Collins JT, Lester TL, Murray KS, Van V, Cleave H, Vogel LA, & Dunnick WA. (1996). Enhancement of humoral immunity by interleukin-12. *Annals of New York Academic Sciences*. 795:100-115.
- Metzger DW, McNutt RM, Collins JT, Buchanan JM, Van V, Cleave H, & Dunnick WA. (1997). Interleukin-12 acts as an adjuvant for humoral immunity through interferon-

gamma -dependent and -independent mechanisms. *European Journal of Immunology*. 27:1958-1965.

Mobar A, Frías-Mendivil M, Suchil-Bernal L, Mora-Macias T, & de la Garza J. (1997). Descriptive epidemiology of cancer at the Instituto Nacional de Cancerología of México. *Salud Pública, México*. 39:253-258.

Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, & Schlegel R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of Virology*. 63:4417-4423.

Mullbacher A. (1994). The long-term maintenance of cytotoxic T-cell memory does not require persistence of antigen. *Journal of Experimental Medicine*. 179:317-321.

Nguyen TN, Hansson M, Stahl S, Bachi T, Robert A, Domzig W, Binz H, & Uhlen M. (1993). Cell-surface display of heterologous epitopes on *Staphylococcus xylosum* as a potential delivery system for oral vaccination. *Gene*. 128:89-94.

Nijman HW, van der Burg SH, Vierboom MPM, Houbiers JGA, Kast WM, & Melief CJM. (1994). p53 a potential target for tumor-directed T cell. *Immunology Letters*. 40:171-178.

Norton PM, Wells JM, Brown HW, Macpherson AM, & Le Page RW. (1997). Protection against tetanus toxin in mice nasally immunized with recombinant *Lactococcus lactis* expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine*. 15:616-619.

Pabel G, Aulabaugh A, Short SA, Barnes JA, Painter GR, Ray P, & Phelps WC. (1993). Structural and functional characterization of the HPV16 E7 protein expressed in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 268:26018-26025.

Peace DJ, Smith JW, Chen W, You SG, Cosand WL, Blake J, & Cheever M. (1994). Lysis of *ras* oncogene-transformed cells by specific cytotoxic T lymphocytes elicited by primary immunization with mutated *ras* peptide. *Journal of Experimental Medicine*. 179:473-479.

Perez-Martinez G, Kok J, Venema G, van Dijk JM, Smith H, & Bron S. (1992). Protein export elements from *Lactococcus lactis*. *Molecular and General Genetics*. 234:401-411.

Piard JC, Jimenez-Diaz R, Ehrlich SD, Fischetti VA, & Gruss A. (1997). The M6 protein of *Streptococcus pyogenes* and its potential as a tool to anchor biologically active

molecules at the surface of lactic acid bacteria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. p. 545-550.

Pozzi G, Contorni M, Oggioni MR, Manganelli R, Tommasino M, Cavallieri F, & Fischetti VA. (1992). Delivery and expression of a heterologous antigen on the surface of streptococci. *Infection and Immunity*. 60:1902-1907.

Pozzi G, Oggioni MR, Manganelli R, Medaglini D, Fischetti VA, Fenoglio D, Valle MT, Kunkl A, & Manca F. (1994). Human T-helper cell recognition of an immunodominant epitope of HIV-1 gp120 expressed on the surface of *Streptococcus gordonii*. *Vaccine*. 12:1071-1077.

Rawls JA, Pusztai R, & Green M. (1990). Chemical synthesis of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein: autonomous protein domains for induction of cellular DNA synthesis and for trans activation. *Journal of Virology*. 64:6121-6129.

Robinson HL. (1997). Nucleic acid vaccines: an overview. *Vaccine*. 15:785-787.

Samuelson P, Hansson M, Ahlberg N, Andreoni C, Gotz F, Bachi T, Nguyen TN, Binz H, Uhlen M, & Stahl S. (1995). Cell surface display of recombinant proteins on *Staphylococcus carnosus*. *Journal of Bacteriology*. 177:1470-1476.

de Ruyter PG, Kuipers OP, & de Vos WM. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:3662-3667.

Sato H, Watanabe S, Furano A, & Yoshiike K. (1989). Human papillomavirus type 16 E7 protein expressed in *Escherichia coli* and monkey COS-1 cells: immunofluorescence detection of the nuclear E7 protein. *Virology*. 170:311-315.

Savijoki K, Kahala M, & Palva A. (1997). High-level heterologous protein production in *Lactococcus* and *Lactobacillus* using a new secretion system based on the *Lactobacillus brevis* S-layer signals. *Gene*. 186:255-262.

Seedorf K, Oltersdorf T, Krämer G, & Röwenkan W. (1987). Identification of early proteins of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) and type 18 (HPV-18) in cervical carcinoma cells. *EMBO Journal*. 6:139-144.

Sillman F, Stanek A, Sedlis A, Rosenthal J, Lanks KW, Buchhagen D, Nicastri A, & Boyce J. (1984). The relationship between human papillomavirus and lower genital

- intraepithelial neoplasia in immunosuppressed women. *American Journal of Obstetrician Gynecology*. 150:300-308.
- Simonen M, & Palva L (1993). Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiology Reviews*. 57:109-137.
- Scott P. (1993). IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science*. 260:496-507.
- Scheffner M, Romanczuk B, Münger K, Huibregtse JM, Mietz JA, & Howley PM. (1994). Functions of human papillomavirus proteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 186:83-99.
- Shodell ML (1986). En: Banbury Report 21: Viral etiology of cervical cancer. Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor, New York, IX*. pp. 45-47.
- Smotkin D, & Wettstein FO. (1986). Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proceedings of National of Academic Sciences, USA*. 83:4680-4684.
- Staerz U, Zepp F, Schmid R, Hill M, & Rothbard J. (1989). Recruitment of alloreactive cytotoxic T lymphocytes by an antigenic peptide. *European Journal of Immunology*. 19:2191-2196.
- Steidler L, Wells JM, Raeymaekers A, Vandekerckhove J, Fiers W, & Remaut E. (1995). Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:1627-1629.
- Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remaut E, Le Page RWF, & Wells JM. (1998). Mucosal delivery of murine Interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infection and Immunology*. 66:3183-3189.
- Storey A, Pim D, Murray A, Osborn K, Banks L, & Crawford L. (1988). Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO Journal*. 7:1815-1820.
- Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, Withe WL, Tamura JK, Bell JA, Newsome JA, Jensen AB, & Schlegel R. (1995). Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proceedings of National of Academic Sciences, USA*. 92:11553-11557.

- Tackett CO, Hone DM, Curtiss R III, Kelly SM, Losousky G, Guers L, Harris AM, Edelman R, & Levine MM. (1992). Comparison of the safety and immunogenicity of δ -*aroC* δ -*aroD* and δ -*cya* δ -*crp* *Salmonella typhi* strains in adult volunteers. *Infection and Immunity*. 60:536-541.
- Tanaka A, Noda T, Yajima H, Hatanaka M, & Ito Y. (1989). Identification of a transforming gene of human papillomavirus type 16. *Journal of Virology*. 63:1465-1469.
- Tarpey I, Stacey S, Hickling J, Birley DL, Renton A, McIndoe A, & Davies DH. (1994). Human cytotoxic T lymphocytes stimulated by endogenously processed human papillomavirus type 11 E7 recognize a peptide containing a HLA-A2 (A-0201) motif. *Immunology*. 81:222-227.
- Tartaglia J, Perkus ME, Taylor J, Norton EK, Adonnet J, Cox WI, Davis SW, Van der Hoeven J, Meignier B, & Riviere M. (1992). NYVAC: a highly attenuated of Vaccinia virus. *Virology*. 188:217-232.
- Thierry F, & Yaniv M. (1987). The BPV-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV-18 regulatory region. *EMBO Journal*. 6:3391-3397.
- Thoms WW, Unger ER, Johnson PR, Spann CO, Hunter SH, Smith R, Horowitz IR, Icenogle JP, Vernon SD, & Reeves WC. (1995). Cervical cancer survival in a high risk urban population. *Cancer*. 6:2518-2523.
- Tindle RW. (1996). Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Current Opinion in Immunology*. 8:643-650.
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dworki VJ, Gromkowski SH, Ramdall Deck R, Dewitt CM, Friedman A, Hawe LA, Leander KR, Martinez D, Perry HC, Silver JW, Montgomery DL, & Liu MA. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding viral protection. *Science*. 259:1745-1749.
- van Asseldonk M, de Vos WM, & Simons G. (1993). Functional analysis of the *Lactococcus lactis* usp45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous alpha-amylase. *Molecular and General Genetics*. 240:428-434.
- de Vos WM. (1999). Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 2:289-295.

Wang B, Dang K, Agadjanyan MG, Srikantan V, Li F, Ugen KE, Boyer J, Merva M, Williams WV, & Weiner DB. (1997). Mucosal immunization with a DNA vaccine induces immune responses against HIV-1 at a mucosal site. *Vaccine*. 15:821-825.

Wells JM, Wilson PW, Norton PM, Gasson MJ, & Le Page RWF. (1993). *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Molecular Microbiology*. 8:1155-1162.

Wells JM, & Schofield KM. (1996). Cloning and expression vectors for lactococci. *NATO Ast Ser*. 98:37-63.

Yasuck M, Carbone DP, Pendleton CD, Tsukui T, Winter SF, Minna JD, & Berzofsky JA. (1994). A mutant p53 tumor suppressor protein is a target for peptide induced CD8+ cytotoxic T-cells. *Cancer Research*. 53:3257-3261.

Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, & Jansen-Durr P. (1995). Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *Journal of Virology*. 69:6389-6399.

Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, & Jansen-Durr P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*. 13:2323-2330.

zur Hausen, H. (1985). Genital papillomavirus infections. *Progress in Medical Virology*. 32:15-21.

zur Hausen H. (1996). Papillomavirus infections- a major cause of human cancers. *Biochemical and Biophysical Acta*. 1288:F55-F78.

2.1 Producción de la proteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 en *Lactococcus lactis*

RESUMEN

En esta parte del trabajo se expresó la proteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16), una de las principales oncoproteínas virales implicadas en el desarrollo del cáncer cérvico-uterino (CaCu) en la bacteria láctica y grado alimenticio *Lactococcus lactis*. Dicha expresión se llevó a cabo bajo un sistema inducible y la producción de E7 se dirigió en dos localizaciones diferentes: en citoplasma (forma intracelular) y en medio de cultivo (forma de secreción). Los resultados obtenidos muestran que la cantidad de E7 producida es tres veces mayor en la forma de secreción que en la intracelular. Además, en cultivos procesados en fase estacionaria, la cantidad de E7 en citoplasma se ve drásticamente reducida, mientras que la secretada incrementa. Esto sugiere una proteólisis intracelular dependiente de la fase de crecimiento y en la cual, de acuerdo a los resultados obtenidos no están involucradas la proteasa ClpP ni la chaperona DnaK. Este estudio proporciona nuevas herramientas para la producción del antígeno E7 *in vivo*. Además este trabajo puede servir como base para el desarrollo de nuevos sistemas de monitoreo de proteínas virales recombinantes y, para el desarrollo de una nueva vacuna oral y/o nasal contra el CaCu.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2 INTRODUCCION

La infección con el virus del papiloma humano, especialmente el tipo 16 (VPH-16) es el principal factor para el desarrollo del cáncer cérvico-uterino (CaCu) (zur Hausen, 1991). Además, se ha demostrado que los genes *E6* y *E7* son constitutivamente expresados en carcinomas cervicales y que, son requeridos para el proceso de transformación, razón por la cual representan blancos potenciales para el desarrollo de una vacuna contra el CaCu (Smotkin & Wettstein, 1986, Baker *et al.*, 1987). La proteína E7 es capaz de interactuar con varios componentes celulares, tales como el oncogen *ras* activado, la proteína supresora de tumor retinoblastoma (pRB), los inhibidores ciclina/CDk p21 y p27 y las ciclinas A y E, causando una desregulación del ciclo celular, y conduciendo así, al proceso de transformación (Storey *et al.*, 1988; Dyson *et al.*, 1989; Tanaka *et al.*, 1989; Zerfass *et al.*, 1995; McIntyre *et al.*, 1996, Zerfass-Thome *et al.*, 1996, Jones *et al.*, 1997).

E7 es una fosfoproteína nuclear de 98 aminoácidos sin actividad enzimática reportada a la fecha (Smotkin & Wettstein, 1986). En células eucariotes la vida media de la proteína E7 es muy corta (30 a 40 min.) y su degradación implica la vía ubiquitin-proteosoma (Reinstein *et al.*, 2000).

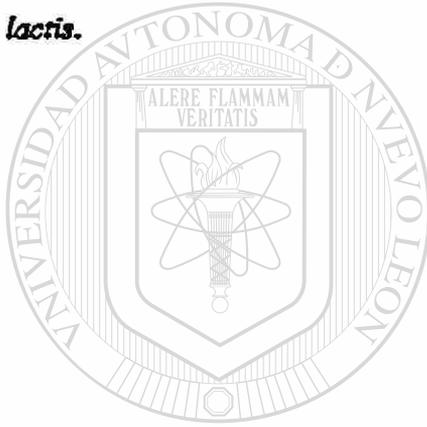
La producción de la proteína E7 se ha desarrollado tanto en sistemas eucariotes como en procariotes. En células de mamíferos transformadas, la expresión del gene *E7* generalmente resulta solo en la detección del ARN mensajero (Bedell *et al.*, 1987, Kanda *et al.*, 1988) lo cual sugiere que la proteína puede ser degradada después de la traducción. En levaduras, la producción de E7 nativa ha sido reportada tanto en una forma fosforilada, de localización nuclear y biológicamente activa en *Schizosaccharomyces pombe* (Tommasino *et al.*, 1990) así como de forma secretada en *Saccharomyces cerevisiae* (Carter *et al.*, 1991). En procariotes, la producción de E7 fue primero reportada en *Escherichia coli* fusionada a otras proteínas (Seedorf *et al.*, 1987, Sato *et al.*, 1989, Barbosa *et al.*, 1989) y posteriormente en su forma nativa (Imai *et al.*, 1991; Pahel *et al.*, 1993).

Desde principios de los 90's varios trabajos se han enfocado en el uso de bacterias como sistemas de expresión de E7 para tratar de despertar una respuesta inmune contra el VPH-16. Así, Lodoño y colaboradores (1996) atenuaron una cepa de la bacteria Gram negativa *Salmonella typhimurium* para producir epitopes de E7 y, Jabbar *et al.* (2000),

desarrollaron una cepa recombinante de BCG para producir la proteína E7 nativa. Sin embargo estudios inmunológicos con estas bacterias mostraron una baja respuesta inmune en ratones, por lo que es poco probable el éxito de esta cepas como un simple componente para el desarrollo de una vacuna. Así también, Pozzi et al. (1992), utilizaron la bacteria Gram positiva *Streptococcus gordonii*, un organismo “catalogada generalmente como seguro” (GRAS) para presentar la proteína E7 en la superficie celular en fusión con señales de exportación. Trabajos posteriores con esta cepa recombinante demostraron que es capaz de despertar una respuesta inmune en ratones y monos (Oggioni et al., 1995; Medaglini et al., 1997). Sin embargo, a pesar de que estos resultados fueron obtenidos en un organismo GRAS, *S. gordonii* es considerado una bacteria comensal y no grado alimenticio. En algunos casos, para evitar inmunotolerancia es preferible una presentación transitoria del antígeno al sistema inmune por una bacteria no comensal que una presentación permanente por una bacteria comensal. Finalmente todos los resultados obtenidos hasta la fecha no proveen ninguna fuente para la producción de la proteína E7 nativa en grandes cantidades ya sea para su purificación y/o para propósitos de inmunización usando bacterias grado alimenticio. En este contexto, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para la producción de la proteína E7 nativa.

La bacteria láctica (BL) *Lactococcus lactis*, ha sido extensamente estudiada y manipulada para la producción de proteínas heterólogas (Arнау et al., 1997; Savijoki et al., 1997; Le Loir et al., 1998; Steidler et al., 1998; de Vos, 1999; Langella & Le Loir, 1999; Gaeng et al., 2000; Geoffroy et al., 2000; Enouf et al., 2001; Chatel et al., 2001). El uso de *L. lactis* para producir y secretar proteínas presenta varias ventajas comparado a las bacterias normalmente usadas para este fin (por ejemplo: *E. coli* y cepas atenuadas de *Salmonella* y *Mycobacterium*): i) *L. lactis* es un organismo no patógeno ampliamente usado en la industria alimenticia, así, al ser una bacteria de ingesta rutinaria, no representa peligro alguno al usarse como vector para expresión de antígenos en humanos, ii) *L. lactis* permite rutas de vacunación (vaginal, nasal u oral) que hacen a este modelo de fácil administración y de bajos costos de producción, y iii) *L. lactis* es un organismo no comensal y su paso por el tracto digestivo es transitorio; lo cual representa una ventaja para evitar cualquier tipo de respuesta de tolerancia al antígeno expresado.

En este trabajo escogimos el sistema NICE (Expresión Controlada por Nisina, de Ruyter *et al.*, 1996, Kuipers *et al.*, 1998) para la expresión inducible del gene *E7* en *L. lactis*. Dado que la inmunogenicidad de una proteína expresada en una bacteria puede depender de su localización, analizamos la producción de E7 tanto en citoplasma como en el medio de cultivo. La localización extracelular permite un contacto directo entre el antígeno y la superficie (mucosas, por ejemplo). Los resultados obtenidos muestran que la oncoproteína E7 del VPH-16 puede ser producida en su forma nativa bajo condiciones estrictas de crecimiento cuando es expresada en el citoplasma de *L. lactis*, ya que en fase estacionaria sufre proteólisis independiente de la proteasa ClpP y la chaperona DnaK, y que la forma de secreción representa un eficiente método de rescatarla de proteólisis en *L. lactis*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2 MATERIAL Y METODOS

2.2.1 Cepas, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos. Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo son listados en la Tabla 1. *Lactococcus lactis* fue crecido en medio M17 (DIFCO, Terzaghi & Sandine, 1975) suplementado con 1% de glucosa (GM17) o infusión cerebro corazón (BHI, DIFCO) a 30°C sin agitación. *Escherichia coli* se creció en medio Luria-Bertani (LB, Sambrook *et al.*, 1989) a 37°C con agitación vigorosa. Los plásmidos fueron mantenidos por la adición de los siguientes antibióticos (concentración en microgramos por mililitro, µg/mL): para *L. lactis*, cloranfenicol (10), y para *E. coli*, ampicilina (100) o cloranfenicol (10).

2.2.2 Manipulaciones del ADN. Para el aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli* se uso el método de Birnboim & Doly (1979) y el descrito por Langella *et al.* (1993) para *L. lactis* con las siguientes modificaciones: se centrifugaron 2 mL de un cultivo de toda la noche por 5 min., 14000 r.p.m., 4°C, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 200 µL de buffer TES-Lys (25% Sacarosa, 1 mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mg/mL Lisozima). Una vez resuspendido muy bien el botón se incubó la muestra por 30 min. a 37°C. Posteriormente se adicionaron 200 µL de solución lisis (0.2 M NaOH, 1% SDS) y después de mezclar ligeramente, se adicionaron 200 µL de acetato de sodio 3 M (pH 4.8). Se mezcló bien por vórtex y se centrifugó 15 min. a 14,000 r.p.m., 4°C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo de microcentrifuga nuevo y se adicionó 1 volumen de PCI (Fenol:Cloroformo: Alcohol-Isoamílico, 25:24:1), se dio vórtex y se centrifugó por 15 min. a 14000 r.p.m., 4 C. Se pasó inmediatamente el sobrenadante a un vial nuevo y se adicionó 1 µL de Glucógeno (MBI Fermentas, grado biología molecular), 1/10 de acetato de sodio 3 M (pH 7.0) y 1 volumen de isopropanol absoluto, se mezcló muy bien por vórtex y se centrifugó 15 min. a 14,000 r.p.m., 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el botón (ADN) con 1 mL de etanol 70%, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µL de buffer TE (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA pH 7.5, 20 µg/mL RNasa).

2.2.3 Enzimas. Todas las enzimas de restricción (New England) y modificación, (Stratagene y MBI Fermentas) fueron utilizadas de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Para la purificación del ADN se usó el kit Gene-Clean (BIO101) o tubos de microcentrifuga con filtros de acetato de celulosa de 0.22 µm (Spin-X, Costar).

Tabla 1: Cepas y plásmidos usados.

Cepa	Genotipo		Referencia
<i>E. coli</i> TG1	<i>supE, hsd, Δ5, thi, Δ(lac-proAB), F'(traD36 proAB-lacZAM15)</i>		Gibson, 1984.
<i>L. lactis</i> MG1363	Cepa silvestre. Sin plásmidos		Gasson, 1983.
<i>L. lactis</i> MG1363 <i>clpP</i>	* <i>Ery^r</i> , gene <i>clpP</i> interrumpido por recombinación simple. Sin plásmidos		Frees & Ingmer, 1999.
<i>L. lactis</i> MG1363 <i>dnaK</i>	<i>Ery^r</i> , gene <i>DnaK</i> interrumpido por recombinación simple. Sin plásmidos		Koch <i>et al.</i> , 1998.
<i>L. lactis</i> NZ9000	MG1363 (genes <i>nisRK</i> en cromosoma). Sin plásmidos		Kuipers <i>et al.</i> , 1998.
<i>L. lactis</i> NZ9000 <i>clpP</i>	<i>Strep^r</i> , <i>Rif^r</i> , <i>Ery^r</i> , Transconjugante MG1363 portando los genes <i>nisRK</i> y el gene <i>clpP</i> interrumpido. Sin plásmidos		Este trabajo
<i>L. lactis</i> NZ9000 <i>dnaK</i>	<i>Strep^r</i> , <i>Rif^r</i> , <i>Ery^r</i> , Transconjugante MG1363 portando los genes <i>nisRK</i> y el gene <i>DnaK</i> interrumpido. Sin plásmidos		Este trabajo
Plásmidos	Replicón	Características del plásmido y cassettes	Referencia
pBS-SK-II+	ColE1	<i>Ap^r</i>	Stratagene
pGEM-T	ColE1	<i>Ap^r</i>	Promega
pGEM:E7	ColE1	<i>Ap^r</i> ; fragmento de PCR que codifica para E7	Este trabajo
pBS:E7:TrpA	ColE1	<i>Ap^r</i> ; fragmento de PCR que codifica para E7	Este trabajo
pCYT:Nuc	pWV01	<i>Cm^r</i> ; cassette de expresión de Nuc bajo el control del promotor <i>P_{nisA}</i>	L. Ribeiro ^(a)
pSEC:Nuc	pWV01	<i>Cm^r</i> ; cassette de expresión del precursor <i>SP_{Usp45}:Nuc</i> bajo el control del promotor <i>P_{nisA}</i>	L. Ribeiro ^(a)
pCYT:E7	pWV01	<i>Cm^r</i> ; cassette de expresión de la proteína E7 nativa bajo el control del promotor <i>P_{nisA}</i>	Este trabajo
pSEC:E7	pWV01	<i>Cm^r</i> ; cassette de expresión del precursor <i>SP_{Usp45}:E7</i> bajo el control del promotor <i>P_{nisA}</i>	Este trabajo

^a Genes de resistencia a: *Ery^r*, eritromicina; *Strep^r*, estreptomicina; *Rif^r*, rifampicina; *Ap^r*, ampicilina; *Cm^r*, cloranfenicol.

^(a): URLGA, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas Cedex, Francia.

Para la migración y análisis del ADN, se usaron geles de agarosa 1% TBE-BET (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA, 0.2 μg/mL Bromuro de Etidio). Los marcadores de peso molecular usados fueron, 1 kb, 123 pb, 100 pb y ADN Supercoiled de GIBCO (BRL), GeneRuler de MBI (Fermentas) y SmartLadder de Eurogenetec.

2.2.4 Amplificación por PCR del gene E7 y fusión del terminador transcripcional *trpA*.

Las reacciones de PCR fueron hechas en un aparato Perkin-Elmer Cetus (Norwalk, Conn.)

usando una Vent ADN Polimerasa (Promega) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Para la amplificación del gene *E7* se usaron los siguientes oligonucleótidos (oligos), *E7VPH1* (5'-GATGCATCACAACATGGAGATACACCTACATTGCAT-3') para la cadena codificante y *E7VPH2* (5'-GGAGCTGTTATGGTTTCTGAGAACAGATGG-3') para la complementaria. Como templado para el PCR se utilizó el plásmido pCDNA3-E7 (gentilmente donado por V Bermúdez, Laboratorio de Inmunología y Virología, FCB, UANL, México). El producto de PCR obtenido se clonó en el vector pGEM-T (Promega) resultando en pGEM:E7. Posteriormente se fusionó un terminador transcripcional (*trpA*) al extremo 3' del gene *E7* por la inserción de un fragmento *Sall/ApaI* aislado del plásmido pGEM:E7 en el vector pVE8001 (Poquet, *et al.*, 1998). Este plásmido final (pBS:E7:TrpA) fue usado para las siguientes construcciones (Tabla 1).

2.2.5 Construcción de vectores para la expresión de E7 en *Lactococcus lactis*. Se construyeron dos cassettes (forma citoplasmática y de secreción) para expresar la proteína *E7* en *L. lactis*. Para esto se aisló el cassette *E7:trpA* del vector pBS:E7:TrpA con las enzimas *EcoRV/NsiI* y se clonó en los vectores pCYT:Nuc y pSEC:Nuc (Tabla 1) digeridos con las mismas enzimas resultando en pCYT:E7 y pSEC:E7.

2.2.6 Caracterización. Todas las construcciones y fusiones a nivel de ADN, fueron caracterizadas primero por enzimas de restricción y posteriormente por secuenciación de ambas cadenas. La secuenciación se realizó con el kit: "Dye-terminator sequencing" usando un aparato Perkin Elmer Cetus (Norwalk, Conn).

2.2.7 Transformación. A menos que se indique lo contrario todas las construcciones plasmídicas fueron primero establecidas en *E. coli* y después transferidas a *L. lactis*. Para la transformación de *E. coli* se utilizó la técnica previamente descrita por Sambrook *et al.* (1989). Para *L. lactis* se siguió el protocolo de Holo & Ness (1995) con algunas modificaciones. Primero se prepararon células electrocompetentes según se describe a continuación: se reactivó la cepa NZ9000 de *L. lactis* (de Ruyter *et al.*, 1996) en 5 mL de medio GM17SG (GM17, 0.5 M Sacarosa, 2% Glicina) incubando toda la noche a 30°C sin agitación, y se tomaron 4 mL de este cultivo para inocular 200 mL del mismo medio. Se incubó a 30°C sin agitación hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica₆₀₀ (DO)₆₀₀ = 0.5-0.8. Se pasó inmediatamente a hielo y se incubó por 15 min. Se centrifugó el cultivo 8 min. a 7,000 r.p.m., 4°C y se lavó el botón dos veces con 100 mL de buffer de lavado (0.5M

Sacarosa, 10% Glicerol). Se realizó un tercer lavado, solo que ahora con 20 mL del buffer. El botón obtenido de este último lavado se resuspendió en 1 mL de PEG 3000 (Polyethylen-Glycol 3000) y 10% Glicerol y finalmente se hicieron alicuotas de 100 μ L en tubos de 1.5 mL congelando inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenando a -80°C .

Para la transformación se mezclaron 100 μ L de células electrocompetentes con 1 μ L de ADN plasmídico (10 μ L en el caso de los productos resultantes de las ligaciones), se transfirieron a cuvetas de electroporación (2 mm) previamente enfriadas y se expusieron a un pulso eléctrico (Gene-Pulser, BIORAD Laboratories), 25 μ F, 200 Ω , 2.4kV. Inmediatamente después de la descarga eléctrica, se adicionaron 900 μ L de medio GM17S (GM17, 0.5 M Sacarosa) y se incubó por 1 hr. para expresión. Finalmente se tomo la mezcla para sembrar en placas GM17A (GM17, 1% agar), más el antibiótico según el caso. Se seleccionaron las colonias transformantes después de 48 hrs. de incubación a 30°C .

2.2.8 Extracción de proteínas. Debido a la fragilidad de E7, se desarrollo un protocolo (modificación de Le Loir *et al.*, 1998) para la extracción de proteínas de *L. lactis*, incluyendo inhibidores de proteasas y procedimientos suaves de precipitación. Los extractos proteicos fueron preparados a partir de 2 mL de cultivos inducidos. El botón celular y sobrenadante fueron procesados por separado. Primero se centrifugo por 5 min. 2 mL de cultivo a 14000 r.p.m. 4°C . Después se filtro el sobrenadante (0.22 μ m MILLEX-GV, Millipore) y se separaron 1.4 mL en un vial nuevo, se adicionó 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 100%, 1 mM PMSF (Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluoride) y 10 mM DTT (Dithiothreitol), y se incubo 10 min. en hielo. Se centrifugo 10 min. a 14000 r.p.m., 4°C , se retiro el sobrenadante y se resuspendió el botón en $\frac{1}{2}$ volumen de 50 mM NaOH y $\frac{1}{2}$ volumen de DTT-LB (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% Azul de Bromofenol, 10% Glicerol) según la DO. Para la fracción celular, el pellet obtenido de la centrifugación de los 2 mL de cultivo se resuspendió en $\frac{2}{6}$ (según DO) de buffer TES-Lys, 1 mM PMSF, 10 mM DTT, se incubó por 15 min. a 37°C y después se agregó $\frac{1}{6}$ de una solución de SDS (20%) y se dio vórtex vigorosamente. Finalmente se adicionaron $\frac{3}{6}$ de DTT-LB. Ambas muestras (sobrenadante y fracción celular) fueron incubadas 3 min. a 98°C antes de ser analizadas en gel de poliacrilamida.

2.2.9 Western Blot. Las proteínas fueron separadas por SDS-Page 12% (Laemmli, 1970). Después de la migración el gel se incubo por 15 min. en una solución de transferencia (50

mM Tris pH 7.0, 380 mM Glicina, 0.01% SDS, 20% Metanol) y a continuación se transfirió por espacio de 1 hr. a una membrana de PVDF (*NEN*, Life Science Products) previamente lavada con metanol absoluto y agua destilada. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se incubó ésta por 1 hr. en una solución de bloqueo TBS-T (20 mM Tris pH 7.5, 5.5 mM NaCl, 5% Tween-20, 10% leche en polvo), se lavó una vez con TBS-T y se incubó 1 hr. con el primer anticuerpo (anti-E7: HPV-16-E7, TVG710Y, ED17, N-21 ó C-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) usando TBS-T (2% leche en polvo) para su dilución. Después se hizo un lavado con TBS-T y se incubó por 1 hr. con el segundo anticuerpo (proteína G, *HRP*, BIORAD). Finalmente se hicieron 3 lavados con TBS-T y se reveló la membrana con el Kit ECL (Enhanced ChemiLuminescence, DuPont *NEN*) y exposición en un film autoradiográfico.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Caracterización y clonación del gene E7. La amplificación del gene *E7* por PCR fue diseñada para contener un sitio *NsiI* en su extremo 5' el cual servirá más adelante para propósitos de fusión.

El producto de PCR obtenido a partir del plásmido pCDNA3-E7 (Fig. 1a), se subclonó en el vector pGEM-T (ver material y métodos) y se aisló posteriormente por digestión con *SalI/ApaI*. Este fragmento (gene *E7*: 313 pares de bases, pb, Fig. 1a) fue digerido con la enzima *PvuII*. Dado que este sitio se encuentra en la posición 121 de la secuencia nucleotídica, del gene *E7*, se obtuvieron dos bandas, una de 191 y otra de 120 pb (Fig. 1b) corroborando que este fragmento de ADN contiene este sitio y genera los productos esperados.

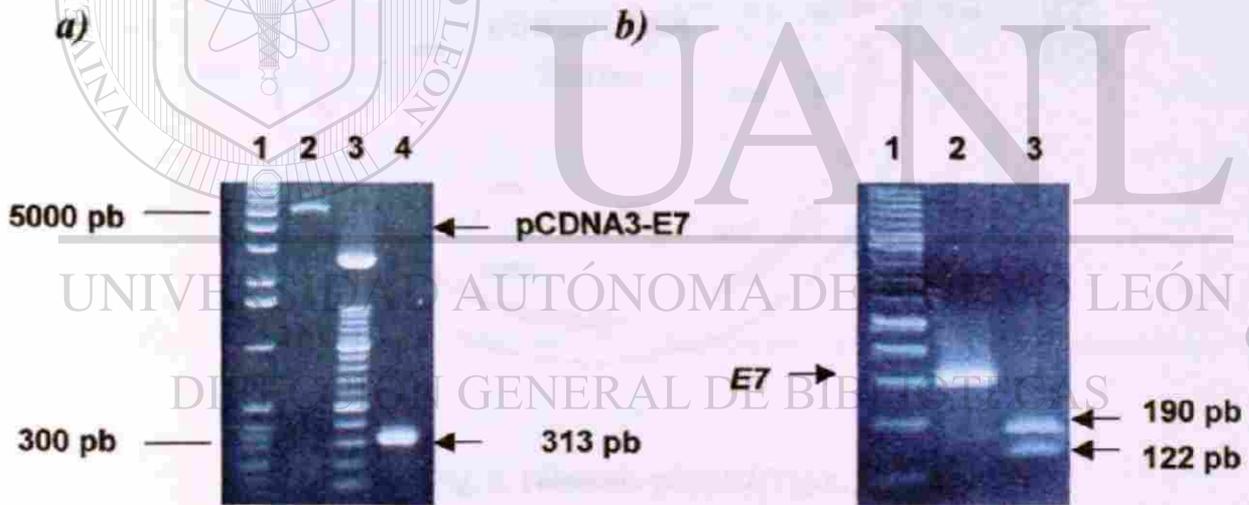


Fig. 1. Amplificación y caracterización del gene E7. a) Vector pCDNA3-E7 y producto de PCR de *E7*; carril 1, marcador de peso molecular 1 kb; carril 2, pCDNA3-E7 linealizado con *EcoRI*; carril 3, marcador de peso molecular 100 pb; carril 4, gene *E7* obtenido a partir del PCR. b) Caracterización del producto de PCR; carril 1, marcador 100 pb, carril 2, producto PCR (gene *E7*); carril 3, digestión de *E7* con *PvuII*. Las bandas esperadas son señaladas con flechas.

Una vez caracterizado el producto de PCR por digestión, se clonó en el vector pVE8001 (pBS:E7:TrpA, Fig. 2), en el cual el gene queda fusionado a un terminador transcripcional *trpA* (Tabla 1). Para determinar el éxito de la fusión y que no hay ninguna mutación en el gene *E7* se obtuvo la secuencia del vector con los oligos universales Forward y Reverse, (Invitrogen) (Fig. 3).

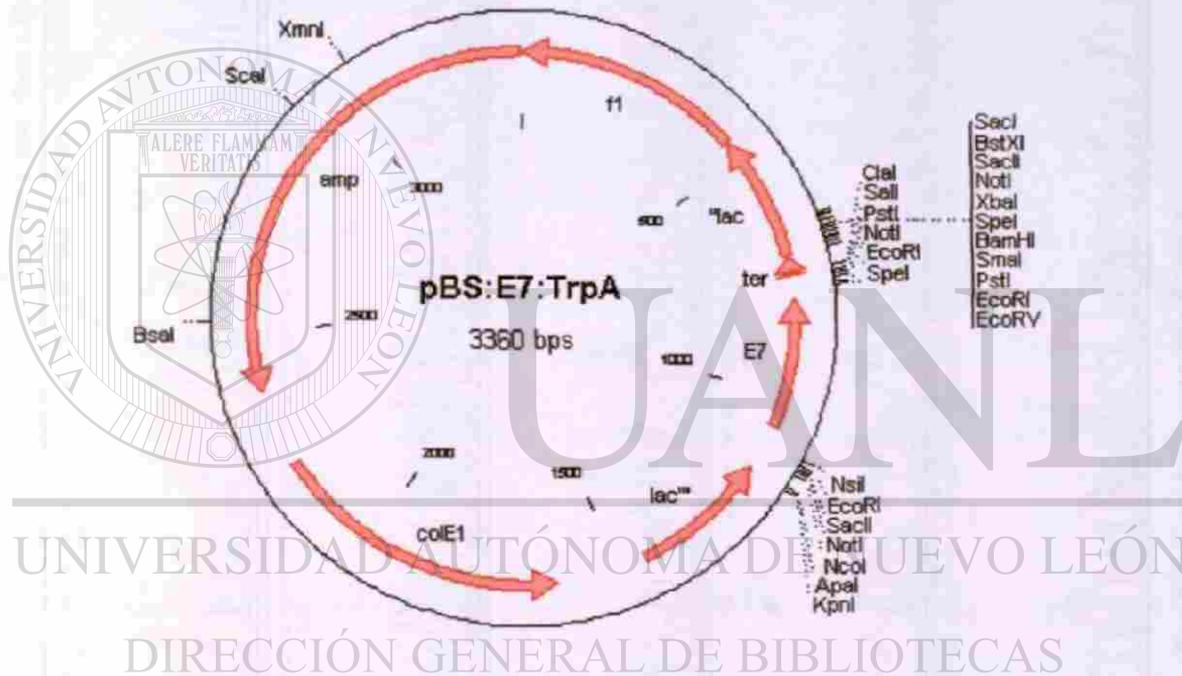


Fig. 2. Plásmido pBS:E7:TrpA.

2.3.2 Construcción de cassettes para la expresión de E7 en *L. lactis*. Se hicieron diferentes fusiones génicas para la expresión de la proteína E7 en *L. lactis*. (Fig. 4). En pSEC:E7 el gene *E7* esta fusionado en marco de lectura con un fragmento de ADN que contiene el sitio de unión al ribosoma (RBS) y el péptido señal (SP) de la *usp45* (SP_{Usp45}), un gene que codifica para la Usp45, la principal proteína secretada por *L. lactis* (van Asseldonk *et al.*, 1990). En pCYT:E7 no existe el fragmento que codifica para el SP_{Usp45} .

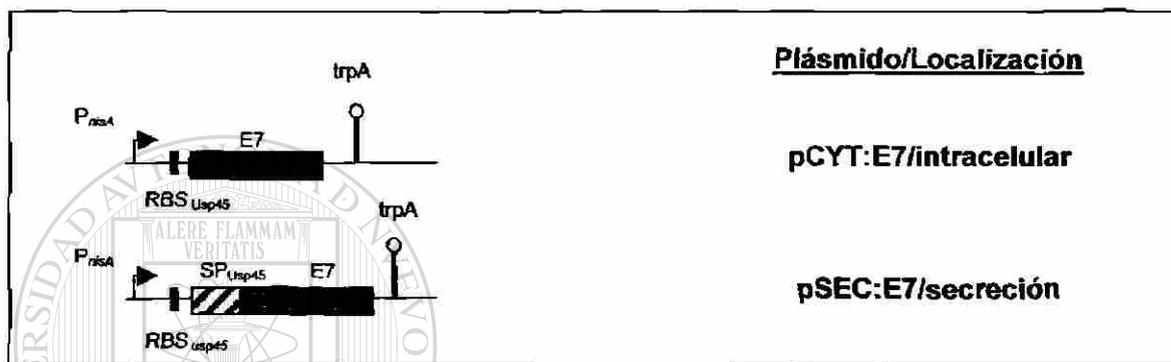


Fig. 4. Cassettes de expresión para la producción de E7 en *L. lactis*. Diseños esquemáticos de las fusiones génicas de E7 bajo el control del promotor P_{nisA} colocadas en los plásmidos indicados. Símbolos: ▶, promotor lactococal inducible por nisina (P_{nisA}); ■, sitio de unión al ribosoma del gene *usp45*; ■, región codificante para E7; ▨, péptido señal del gene *usp45*; T, terminador transcripcional.

En ambas construcciones, la expresión de *E7* esta controlada por el promotor inducible P_{nisA} (de Ruyter *et al.*, 1996). Estos plásmidos fueron establecidos por electroporación (Fig. 5) en la cepa NZ9000 de *L. lactis*, la cual porta los genes *nisR* y *nisK* necesarios para la regulación del promotor nisina (de Ruyter *et al.*, 1996, Kuipers *et al.*, 1998), resultando en NZCYT:E7 y NZSEC:E7.

2.3.3 Producción de E7 en *L. lactis*. Se analizó la capacidad de *L. lactis* para producir la proteína E7 en dos localizaciones celulares diferentes (intracelular y medio de cultivo). Para dicho análisis se utilizaron las cepas NZCYT:E7 y NZSEC:E7. Las muestras de cultivos inducidos y no inducidos fueron analizadas inicialmente a una $DO < 1$ (fase exponencial, Fig. 6a). Después de la inducción el análisis por Western blot de la cepa NZCYT:E7 utilizando anticuerpos anti-E7 revela una clara banda en la fracción celular del

a)

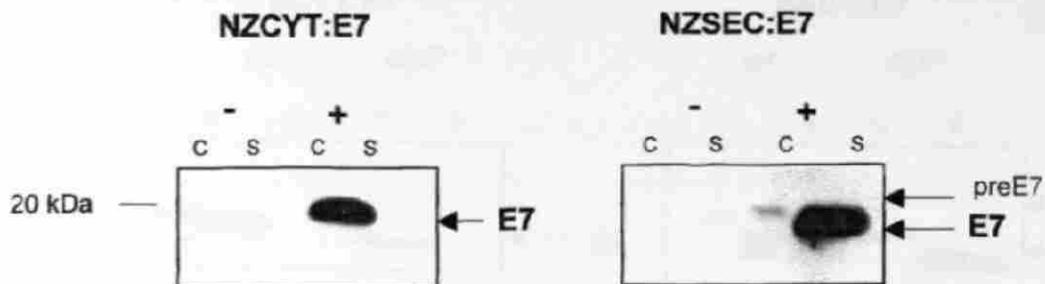
b)



Fig. 5. Transformación de la cepa NZ9000 de *L. lactis*. Se transformó por electroporación la cepa NZ9000 de *L. lactis* con los diferentes plásmidos construidos y se plaqueó en GM17A (más el antibiótico de interés, cloranfenicol en este caso). Después de 48 hrs. de incubación a 30°C se eligieron las colonias recombinantes. **a)** Cepa NZ9000 sin plásmido, al no tener gene de resistencia al antibiótico no hay crecimiento. **b)** Cepa NZ9000 transformada con el plásmido, el cual le confiere resistencia al antibiótico utilizado.

tamaño esperado para la E7 nativa (19 kDa, Pahel *et al.*, 1993), mientras que no se detecta señal en el sobrenadante (Fig. 6a). Análisis similares de la cepa NZSEC:E7 revelan dos bandas: i) una banda en la fracción celular y que corresponde al precursor SP_{usp45}-E7 (preE7, 21 kDa aproximadamente) y ii) otra en el sobrenadante que corresponde a la E7 madura secretada (Fig. 6a). Calculamos que el porcentaje de producción de la E7 secretada es tres veces mayor que el de la forma de citoplasma y la eficiencia de secreción (porcentaje de E7 detectada en el sobrenadante) es alta ~95%. En ausencia de nisina no se detecta señal de la E7, confirmando el control del sistema NICE. Sorprendentemente, análisis de muestras proteicas extraídas los mismos cultivos en fase estacionaria ($OD_{600} > 1$) revela una marcada diferencia en la producción de E7: la cantidad de E7 de forma citoplasmática disminuye visiblemente, mientras que la forma de secreción incrementa (Fig. 6b). Estos resultados sugieren que una degradación intracelular en fase estacionaria y que la proteína secretada puede escapar al ser exportada fuera de la célula.

a) Fase exponencial



b) Fase estacionaria



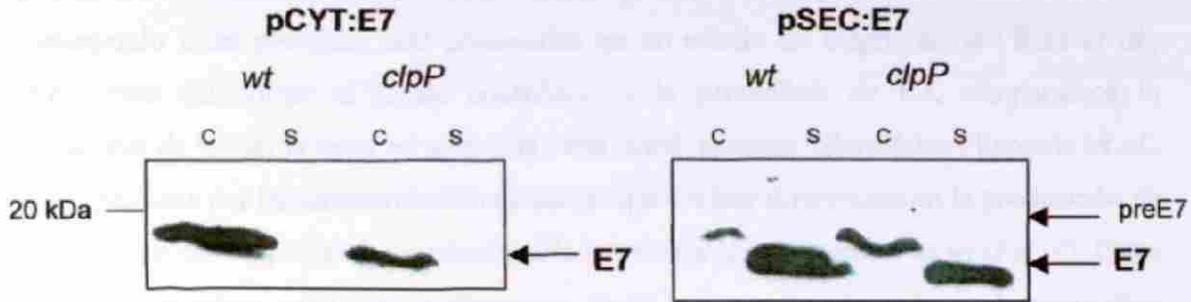
Fig. 6. Producción de E7 en *L. lactis*. Se analizó por Western blot la producción y secreción de E7 de cultivos inducidos en fase exponencial (DO~0.5-0.6) ó estacionaria (DO~1.5). La cepa NZCYT:E7 codifica para la E7 nativa (forma citoplasmática) y la cepa NZSEC:E7 codifica para el precursor, preE7. a) Fase exponencial: Cultivos no-inducidos (-) e inducidos (+) de las cepas indicadas. b) Fase estacionaria. Las flechas indican las posiciones de la E7 madura y del precursor. Hay solamente una ligera diferencia en la migración entre el precursor (preE7, fracción celular) y la forma madura (E7, sobrenadante). C, fracción celular; S, sobrenadante. Las posiciones y tamaños del marcador de peso molecular son mostrados a la izquierda.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.3.4 La proteasa ClpP no esta involucrada en la degradación de E7 en *L. lactis*.

Nuestros resultados sugieren que la proteína E7 puede ser blanco de una proteolisis intracelular en *L. lactis*. El complejo ClpP (una proteína dependiente de ATP) es la principal proteasa citoplasmática en *L. lactis* (Frees & Ingmer, 1999). Para determinar si ClpP esta involucrado en la degradación de E7, introdujimos los plásmidos pCYT:E7 y pSEC:E7 en una cepa NZ9000 de *L. lactis* con una mutación en el gene *clpP* (NZ9000 *clpP*, Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002). La figura 7 muestra los análisis de la producción de E7 en esta cepa mutante comparada con la cepa silvestre NZ9000 (*wr*). Las condiciones de los cultivos y

a) Fase exponencial



b) Fase estacionaria

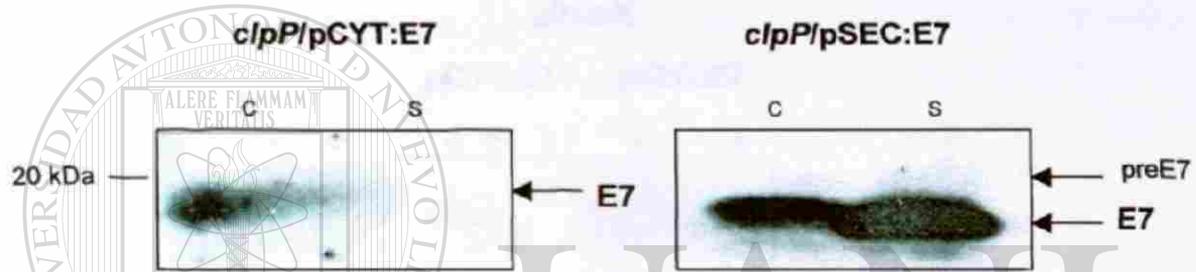


Fig. 7. ClpP no está involucrada en la degradación intracelular de E7 en *L. lactis*. Análisis por Western blot muestran que la cepa mutante de *L. lactis* para la proteasa ClpP no puede rescatar la producción de E7 en citoplasma. a) Muestras de cultivos inducidos de la cepa *wt* ó *clpP* conteniendo los plásmidos pCYT:E7 ó pSEC:E7 tomadas en fase exponencial. b) Muestras de cultivos inducidos de la cepa *clpP* tomadas en fase estacionaria. C, fracción celular; S, sobrenadante. Las posiciones y tamaños del marcador de peso molecular son mostrados a la izquierda.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

extracción de proteínas se hicieron tal y como se describió para la cepa *wt*. En cultivos procesados en fase exponencial, no se observa diferencia significativa en los patrones de E7 entre la cepa *wt* y la *clpP* en ambas formas (citoplasma y secreción, Fig. 7a). Desafortunadamente, la degradación de la forma E7 de citoplasma observada en la *wt* y el rescate de la forma de secreción en fase estacionaria se observa de igual manera en la *clpP*, sugiriendo que la proteólisis intracelular de E7 es independiente del complejo ClpP (Fig. 7b).

2.3.5 La chaperona DnaK no está involucrada en la presentación de E7 para su proteólisis. Los resultados obtenidos muestran que la forma citoplasmática y de secreción

de E7 son bien sintetizados en *L. lactis*, aunque la primera sufre proteólisis intracelular. En algunos casos, chaperonas, tales como DnaK promueven la proteólisis indirectamente, manteniendo a las proteínas mal procesadas en un estado de disgregación (Wild *et al.*, 1996). Para determinar si DnaK contribuye a la proteólisis de E7, comparamos la producción de E7 en la cepa *wt* y en una cepa *dnaK* mutante (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002). Análisis por inmunorevelación muestran que no hay diferencias en la producción de E7, ya sea en fase exponencial o estacionaria entre esta cepa mutante y la *wt* (Fig. 8). Estos resultados muestran pues que la chaperona DnaK no esta involucrada en la proteólisis celular de E7 en *L. lactis*.

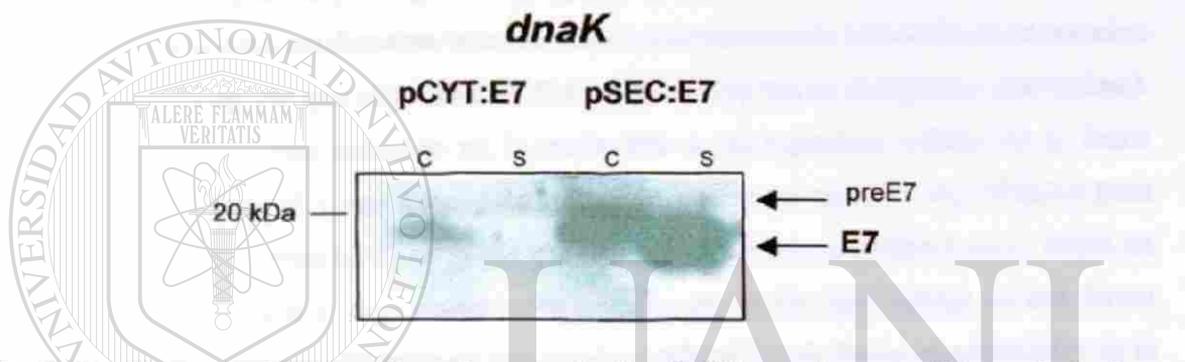


Fig. 8. DnaK no esta involucrada en la presentación de E7 para la proteólisis en *L. lactis*. Muestras de cultivos inducidos de la cepa *dnaK* conteniendo los plásmidos pCYT:E7 ó pSEC:E7 tomadas en fase exponencial. Análisis por inmunorevelación muestran que la cepa mutante de *L. lactis* para la chaperona DnaK no previenen o al menos disminuyen la degradación de E7 en el citoplasma. C, fracción celular; S, sobrenadante. Las posiciones y tamaños del marcador de peso molecular son mostrados a la izquierda.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.4 DISCUSION

2.4.1 Producción de E7 en *L. lactis*. *Lactococcus lactis* es una bacteria Gram positiva grado alimenticio, no comensal y no invasiva que no produce exoproteínas detectables (cepa libre de plásmidos, que no secreta proteasas), por lo tanto un buen candidato para la secreción de proteínas heterólogas para diferentes aplicaciones: desde producción en fermentador de proteínas de alto valor comercial hasta el uso de este organismo como un vector para el desarrollo de vacunas vivas. En ese contexto desarrollamos y estandarizamos un sistema para la producción y localización de la oncoproteína E7 del VPH-16 en *L. lactis*.

Aunque el porcentaje de producción y localización de una proteína heteróloga son críticos, también debe confirmarse la estabilidad y procesamiento adecuado de la proteína de interés para asegurar que adquiera su actividad nativa (ya sea un antígeno o una enzima). Algunos trabajos se han enfocado en la proteólisis en la superficie celular de *L. lactis* (Poquet *et al.*, 2000). En este trabajo demostramos que la proteína E7 del VPH-16 (una proteína extremadamente lábil) se puede producir de una manera eficiente en *L. lactis* en una forma de secreción y, bajo condiciones estrictas de crecimiento celular en una forma citoplasmática. Además, observamos una mayor producción (de forma reproducible) de la proteína secretada que la de citoplasma. Este efecto ha sido observado anteriormente en la producción de diferentes proteínas heterólogas en *L. lactis*, tales como la nucleasa Staphylococcal (Nuc, Langella & Le Loir, 1999), el antígeno inmunodominante L7/L12 de *Brucella abortus* (Ribeiro *et al.*, 2002), la β -lactoglobulina bovina (BLG, Chatel *et al.*, 2001) o la proteína no estructural NSP4 del rotavirus bovino (Enouf *et al.*, 2001). Así, en *L. lactis* la secreción parece ser la mejor estrategia para producir altos niveles de proteínas heterólogas, ya que este fenómeno se observa en proteínas eucariotes (BLG), procariotes (L7/L12 y Nuc) y virales (NSP4 y E7). Por último la eficiencia de secreción de la E7 nativa observada en este trabajo es alta, ~95% lo cual es prometedor para la producción y purificación a grandes escalas de esta proteína, ya que a la fecha solo una proteína heteróloga, Nuc (usada frecuentemente como proteína modelo, Le Loir *et al.*, 1994) ha sido exportada en *L. lactis* a los niveles observados para E7.

2.4.2 La estabilidad de E7 en el citoplasma depende de la fase de crecimiento del cultivo celular. Para determinar porque se obtiene una mayor producción de E7 con la

forma de secreción que con la forma citoplasmática, analizamos su producción en fase de crecimiento celular estacionaria. Sorprendentemente en estos experimentos se observó una degradación casi total de E7 en el citoplasma de *L. lactis* (Fig. 6b) sugiriendo que esta proteína sufre proteólisis intracelular. Para tratar de estabilizar la producción de E7, tratamos de expresar esta proteína en dos cepas mutantes de *L. lactis* (ClpP y DnaK); sin embargo, análisis por Western blot mostraron que no hay diferencia entre estas cepas y la *wt* de *L. lactis*. Estos resultados sugieren que la degradación de E7 es independiente del complejo ClpP y la chaperona DnaK.

2.4.3 Secreción de E7 nativa y perspectivas. Dado que el uso de péptidos sintéticos no puede sustituir a la proteína completa. El sistema desarrollado en este estudio para producir la oncoproteína E7 del VPH-16 es interesante para el desarrollo de una nueva vacuna terapéutica contra el CaCu. Se ha demostrado que la presentación de epitopes de E7 a anticuerpos anti-E7 humanos es más eficiente cuando se utiliza una proteína E7 completa y nativa (Nindl *et al.*, 1996). La forma secretada de E7 podría representar ventajas para purificación y posteriores estudios físicos y químicos de esta proteína, ya que *L. lactis* secreta pocas proteínas y ninguna proteasa. Puesto que es necesario el desarrollo de nuevos vectores bacterianos seguros para la expresión de antígenos *in vivo*, nuestro sistema de producción de E7 puede tener interesantes aplicaciones en ensayos de inmunización en modelos animales. Esto abriría nuevas perspectivas para el desarrollo de una vacuna viva usando *L. lactis* contra el CaCu. Dado que la proteína E7 es extremadamente lábil, trabajos posteriores podrían usar esta proteína para estudios de proteólisis en *L. lactis*. Recientemente hemos comenzado a aplicar el sistema aquí reportado para analizar otras cepas mutantes (*htrA* de *L. lactis* por ejemplo, Poquet *et al.*, 2000) para un mejor entendimiento de la relación entre la secreción heteróloga y la proteólisis en *L. lactis*.

2.5 REFERENCIAS

- Arnao J, Hjerl-Hansen E, & Israelsen H. (1997). Heterologous gene expression of bovine plasmin in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 48:331-338.
- Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, & Howley PM. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *Journal of Virology*. 61:962-971.
- Barbosa MS, Lowy DR, & Schiller JT. (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *Journal of Virology*. 63:1404-1407.
- Bedell MA, Jones KH, & Laimins LA. (1987). The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and rat-1 cells. *Journal of Virology*. 61:3635-3640.
- Birnboim HC, & Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7:1513-1523.
- Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Miyoshi A, Gruss S, Támez-Guerra R, Montes de Oca-Luna R, & Le Loir Y. (2002). Expression of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:917-922.
- Carter JJ, Yaegashi N, Jenison SA, & Galloway DA. (1991). Expression of human papillomavirus proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology*. 182:513-521.
- Chatel JM, Langella P, Adel-Patient K, Commissaire J, Wal JM, & Corthier G. (2001). Induction of mucosal immune response after intranasal and oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine Beta-lactoglobulin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8:545-551.
- Dyson N, Howley PM, Mûnger K, & Harlow E. (1989). The human papilloma virus-16 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 243:934-937.
- Enouf V, Langella P, Commissaire J, Cohen J, & Corthier G. (2001). Bovine rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:1423-1428.
- Frees D, & Ingner H. (1999). ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*. 31:79-87.

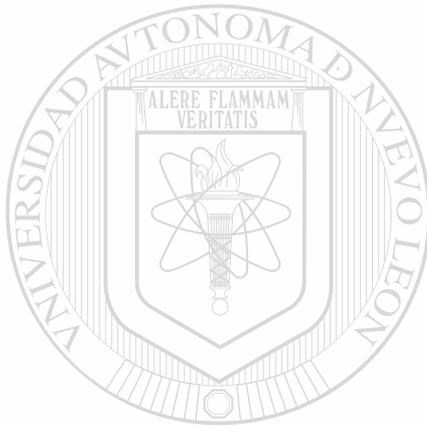
- Gaeng S, Scherer S, Neve H, & Loessner MJ. (2000). Gene cloning and expression of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:2951-2958.
- Gasson MJ. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic acid streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology*. 154:1-9.
- Geoffroy MC, Guyard C, Quatannens B, Pavan S, Lange M, & Mercenier A. (2000). Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:383-391.
- Gibson TJ. (1984). PhD thesis. University of Cambridge, Cambridge, England.
- Holo H, & Nes IF. (1995). Transformation of *Lactococcus* by electroporation. *Methods in Molecular Biology*. 47:195-199.
- Imai Y, Matsushima Y, Sugimura T, & Terada M. (1991). Purification and characterization of human papillomavirus type 16 E7 protein with preferential binding capacity to the underphosphorylated form of retinoblastoma gene product. *Journal of Virology*. 65:4966-4972.
- Jabbar IA, Fernando GJ, Saunders N, Aldovini A, Young R, Malcolm K, & Frazer IH. (2000). Immune responses induced by BCG recombinant for human papillomavirus L1 and E7 proteins. *Vaccine*. 22:2444-2453.
- Jones DL, Thompson DA, & Munger K. (1997). Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contributes to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology*. 239:97-107.
- Kanda T, Furuno A, & Yoshilike K. (1988). Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. *Journal of Virology*. 62:610-613.
- Koch B, Kilstrup M, Vogensen FK, & Hammer K. (1998). Induced levels of heat shock proteins in a *DnaK* mutant of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 180:3873-3881.
- Kuipers OP, de Ruyter PG, Kleerebezen M, & de Vos WM. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 64:15-21.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Langella P, Le Loir Y, Ehrlich SD, & Gruss A. (1993). Efficient plasmid mobilization by pIP501 in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Bacteriology*. 175:5806-5813.

- Langella P, & Le Loir Y. (1999). Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. 32:191-198.
- Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, & Langella SD. (1994). Direct screening of recombinants in Gram-positive bacteria using the secreted staphylococcal nuclease as a reporter. *Journal of Bacteriology*. 176:5135-5139.
- Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, & Langella P. (1998). A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 180:1895-1903.
- Lodoño LP, Chatfield S, Tindle RW, Herd K, Gao XM, Frazer I, & Dougan G. (1996). Immunization of mice using *Salmonella typhimurium* expressing human papillomavirus type 16 E7 epitopes inserted into hepatitis B virus core antigen. *Vaccine*. 14:545-552.
- McIntyre MC, Ruesch MN, & Laimins LA. (1996). Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology*. 215:73-82.
- Medagliani D, Rush CM, Sestini P, & Pozzi G. (1997). Commensal bacteria as vector for mucosal vaccines against sexually transmitted diseases: vaginal colonization with recombinant streptococci induces local and systemic antibodies in mice. *Vaccine*. 15:1330-1337.
- Nindl I, Gissman L, Fisher SG, Benitez L, Berumen J, & Müller M. (1996). The E7 protein of human papillomavirus (HPV) type 16 expressed by recombinant vaccinia virus can be used for detection of antibodies in sera from cervical cancer patients. *Journal Virology Methods*. 62:81-85.
- Oggioni MR, Manganelli R, Contorni M, Tommasino M, & Pozzi G. (1995). Immunization of mice by oral colonization with live recombinant commensal streptococci. *Vaccine*. 13:775-779.
- Pahel G, Aufabaugh A, Short SA, Barnes JA, Painter GR, Ray R, & Phelps WC. (1993). Structural and functional characterization of the HPV-16 E7 protein expressed in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 34:26018-26025.
- Poquet I, Ehrlich SD, & Gruss A. (1998). An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 7:1904-1912.

- Poquet I, Saint V, Seznee E, Simoes N, Bolotin A, & Gruss A. (2000). HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Molecular Microbiology*. 35:1042-1051.
- Pozzi G, Contorni M, Oggioni MR, Manganelli R, Tommasino M, Cavalieri F, & Fischetti VA. (1992). Delivery and expression of a heterologous antigen on the surface of streptococci. *Infection and Immunity*. 60:1902-1907.
- Reinstein E, Scheffner M, Oren M, Ciechanover A, & Schwartz A. (2000). Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene*. 19:5944-5950.
- Ribeiro LA, Azevedo V, Le Loir Y, Oliveira SC, Dieye Y, Piard JC, Gruss A, & Langella P. (2002). Efficient targeting of the *Brucella abortus* immunodominant antigen L7/L12 by *Lactococcus lactis*: a first step towards new live vaccines against brucellosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:910-916.
- de Ruyter PG, Kuipers OP, & de Vos WM. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:3662-3667.
- Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sato H, Watanabe S, Furuno A, & Yoshiike K. (1989). Human papillomavirus type 16 E7 protein expressed in *Escherichia coli* and monkey COS-1 cells: immunofluorescence detection of the nuclear E7 protein. *Virology*. 170:311-315.
- Savijoki K, Kahala M, & Palva A. (1997). High-level heterologous protein production in *Lactococcus* and *Lactobacillus* using a new secretion system based on the *Lactobacillus brevis* S-layer signals. *Gene*. 186:255-262.
- Seedorf K, Oltersdorf T, Krämer G, & Röwenkan W. (1987). Identification of early proteins of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) and type 18 (HPV-18) in cervical carcinoma cells. *EMBO Journal*. 6:139-144.
- Smotkin D, & Wettstein FO. (1986). Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 83:4680-4684.

- Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remaut E, Le Page RW, & Wells JM. (1998). Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infection and Immunity*. 66:3183-3189.
- Storey A, Pim D, Murray A, Osborn K, Banks L, & Crawford L. (1988). Comparison of the *in vitro* transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO Journal*. 7:1815-1820.
- Tanaka A, Noda T, Yajima H, Hatanaka M, & Y Ito. (1989). Identification of a transforming gene of human papillomavirus type 16. *Journal of Virology*. 63:1465-1469.
- Terzaghi BE, & Sandine WE. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*. 29:807-813.
- Tommasiolo M, Contorni M, Scariato V, Bugnoli M, Maundrell K, & Cavalieri F. (1990). Synthesis, phosphorylation, and nuclear localization of human papillomavirus E7 protein in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene*. 93:265-270.
- van Asseldonk M, Rutten G, Oteman M, Siezen RJ, de Vos WM, & Simons G. (1990). Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of *usp45*, a gene encoding a highly secreted protein from *Lactococcus lactis* MG1363. *Gene*. 95:155-160.
- de Vos WM. (1999). Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 2:289-295.
- Wild J, Rossmeyers P, Walter WA, & Gross CA. (1996). Involvement of the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone team in protein secretion in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 178:3608-3613.
- Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, & Jansen-Durr P. (1995). Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *Journal of Virology*. 69:6389-6399.
- Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, & Jansen-Durr P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*. 13:2323-2330.

zur Hausen H. (1991). Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*. 184:9-13.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



3.1 Estabilización en la producción de E7 en *Lactococcus lactis*

RESUMEN

En el capítulo anterior demostramos que la proteína E7 del VPH-16 puede ser producida en *Lactococcus lactis*, sin embargo la forma de citoplasma es muy inestable y es degradada en fase estacionaria por una proteasa diferente a ClpP. En este capítulo describiremos como la producción de la proteína E7 puede ser estabilizada e incluso mejorada por medio de una fusión a una proteína altamente estable, la nucleasa Staphylococcal (Nuc) a su extremos amino (N-) o carboxilo (C-). Así también se probó un propéptido sintético (LEISSTCDA) el cual esta reportado para aumentar la eficiencia de secreción de proteína heterólogas en *L. lactis*. Nuestros resultados sugieren que la fusión de una proteína estable como Nuc y de un propéptido sintético a la proteína E7 tienen efectos positivos en su estabilidad en *L. lactis*. Curiosamente la eficiencia de secreción de E7 observada en el capítulo anterior (~95%) en vez de verse mejorada disminuyó de forma drástica, no así la de la proteína híbrida Nuc-E7, la cual se mejoró en un 10% (5% versus 15%). Este trabajo representa un útil sistema para la expresión y estabilización de otras proteínas frágiles de interés médico (como E7) en *L. lactis*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2 INTRODUCCION

Las bacterias lácticas (BL) son un diverso grupo de bacterias usadas en la industria alimenticia desde tiempos inmemorables que incluye miembros de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. En los últimos años muchos laboratorios se han enfocado en la producción de proteínas heterólogas en estos organismos GRAS (generalmente seguros) para fines comerciales (Robinson *et al.*, 1997; Langella & Le Loir, 1999; Drouault *et al.*, 2000; Gaeng *et al.*, 2000; Steidler *et al.*, 2000; Chatel *et al.*, 2001; Enouf *et al.*, 2001; Gil *et al.*, 2001). A la fecha, la mejor BL caracterizada es *Lactococcus lactis* para la cual se han desarrollado eficientes herramientas genéticas y más aún, se conoce su genoma completo (Bolotin *et al.*, 1999). *Lactococcus lactis* como describimos en el capítulo anterior es una bacteria grado alimenticio, no patógena y no colonizante que representa un buen organismo para la producción de proteínas heterólogas. Una de las propiedades que hace a *L. lactis* un buen candidato para producir proteínas es que, esta bacteria es ampliamente utilizada en la industria alimenticia (especialmente en productos lácteos), característica que puede ser explotada para producir enzimas, metabolitos y antígenos de interés médico en productos como yogurt, quesos, etc. Además algunos laboratorios han comenzado recientemente a usar a *L. lactis* como una vacuna viva (para revisión consultar Mielcarek *et al.*, 2001). Finalmente *L. lactis* puede ser fácilmente manipulada en el laboratorio.

Hoy en día, existe un verdadero interés en la sobreproducción de proteínas heterólogas en *L. lactis*. Para dicho propósito se han desarrollado varias estrategias usando sistemas de expresión génica inducibles y constitutivos (van Rooijen, 1992; Wells *et al.*, 1993; van Asseldonk, 1994). En 1996 de Ruyter y colaboradores desarrollaron el sistema NICE (ver capítulo 1 y 2). En dicho sistema se hace uso un bacteriocina grado alimenticio (la nisina) como inductor de genes localizados bajo el control transcripcional del promotor A del operon de la nisina (P_{nisA}). Nosotros elegimos este sistema para expresar la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16, capítulo 2). Los resultados obtenidos mostraron que la E7 es una proteína muy lábil que se degrada en el citoplasma de *L. lactis* y que la proteasa ClpP y la chaperona DnaK no están involucradas

en dicha degradación. Por lo tanto creemos que la proteína E7 puede representar un buen modelo para ensayos de estabilización de proteínas heterólogas en *L. lactis*.

Existen varios reportes sobre el uso de la nucleasa Staphylococcal (Nuc) en *L. lactis* como proteína reportera, la cual es de gran ayuda, ya que facilita detectar la localización de la proteína de interés (citoplasma, anclada o secretada, Piard *et al.*, 1997; Le Loir *et al.*, 1998; Poquet *et al.*, 1998) con una simple prueba colorimétrica (Shortle, 1983; Le Loir *et al.*, 1994). Dicha proteína también ha demostrado proteger a proteínas frágiles (Ribeiro *et al.*, 2002). Por lo tanto en esta parte del trabajo nos enfocamos en realizar fusiones génicas entre la proteína E7 del VPH-16 y la Nuc, para determinar si esta proteína compacta y resistente, puede proteger a la E7 de proteólisis en *L. lactis*. Además, para mejorar la producción de E7 en *L. lactis*, se analizaron y modificaron una serie de parámetros como: i) cinética en función a la cantidad de nisina usada para una buena inducción en *L. lactis* y ii) aumentar la eficiencia de secreción (ES) de la proteína de interés mediante la fusión de un pro péptido sintético, LEISSTCDA (LEISS). Los resultados obtenidos muestran que la producción de E7 en citoplasma puede ser rescatada cuando la Nuc se fusiona a su extremo N- ó C-. Sin embargo, la ES es muy baja, alrededor de 5%. Así también, se determinó que el pro péptido sintético LEISS puede mejorar la ES de una proteína híbrida Nuc-E7 (5% versus 15%) pero no la de la proteína E7 nativa, la cual se ve drásticamente disminuida (95% a un 5%, aproximadamente). Por otro lado se observó que la producción de proteínas bajo el sistema NICE y la ES es dependiente de la concentración de nisina usada. Este trabajo provee herramientas para la producción y estabilización del antígeno E7 por medio de la fusión a una proteína altamente estable (Nuc) y puede servir como base para la producción y estabilización de otras proteínas frágiles en *L. lactis*.

3.3 MATERIAL Y METODOS

3.3.1 Cepas, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos. Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo son listados en la Tabla 1. *Lactococcus lactis* fue crecido en medio GM17 ó BHI a 30°C sin agitación. *Escherichia coli* se creció en medio LB 37°C con agitación vigorosa. Los plásmidos fueron mantenidos por la adición de los siguientes antibióticos (concentración en microgramos por mililitro, µg/mL): para *L. lactis*, cloranfenicol (10), y para *E. coli*, ampicilina (100) o cloranfenicol (10).

Tabla 1: Cepas y plásmidos usados.

Cepa	Genotipo		Referencia
<i>E. coli</i> TG1	<i>supE, hsd, Δ5, thi, Δ(lac-proAB), F'(traD36 proAB-lacZAM15)</i>		Gibson, 1984.
<i>L. lactis</i> MG1363	Cepa silvestre. Sin plásmidos		Gasson, 1983.
<i>L. lactis</i> NZ9000	MG1363 (genes <i>nisRK</i> en cromosoma). Sin plásmidos		Kuipers <i>et al.</i> , 1998.
Plásmidos	Replicón	Características del plásmido y cassettes	Referencia
pBS-E7:TrpA	ColE1	Ap ^r ; fragmento de PCR que codifica para E7	Capítulo 2
pCYT:Nuc	pWV01	Cm ^r ; cassette de expresión de Nuc madura bajo el control del promotor P _{msd}	L. Ribeiro ^(a)
pSEC:Nuc	pWV01	Cm ^r ; cassette de expresión del precursor SP _{Usp45} :Nuc bajo el control del promotor P _{msd}	L. Ribeiro ^(a)
pCYT:E7	pWV01	Cm ^r ; cassette de expresión de la proteína E7 nativa bajo el control del promotor P _{msd}	Capítulo 2
pSEC:E7	pWV01	Cm ^r ; cassette de expresión del precursor SP _{Usp45} :E7 bajo el control del promotor P _{msd}	Capítulo 2
pCYT:Nuc-E7	pWV01	Cm ^r ; cassette de expresión de la fusión Nuc:E7 bajo el control del promotor P _{msd}	Este trabajo
pSEC:Nuc-E7	pWV01	Cm ^r ; cassette de expresión del precursor de la fusión SP _{Usp45} :Nuc:E7 bajo el control del promotor P _{msd}	Este trabajo
pCR-TOPO	ColE1	Ap ^r	Invitrogen
pCR:NsiI:E7	ColE1	Ap ^r ; fragmento de PCR que codifica para E7 con sitios NsiI en sus extremos	Este trabajo
pLEISS:Nuc	pWV01	Cm ^r ; cassette de expresión del precursor SP _{Usp45} :leiss:nuc bajo el control del promotor P _{msd}	L. Ribeiro ^(a)
pLEISS:E7	pWV01	Cm ^r ; cassette de expresión del precursor de la fusión SP _{Usp45} :leiss:E7 bajo el control del promotor P _{msd}	Este trabajo
pLEISS:Nuc-E7	pWV01	Cm ^r ; cassette de expresión del precursor de la fusión SP _{Usp45} :leiss:Nuc:E7 bajo el control del promotor P _{msd}	Este trabajo
pLEISS:E7-Nuc	pWV01	Cm ^r ; cassette de expresión del precursor de la fusión SP _{Usp45} :leiss:E7:nuc bajo el control del promotor P _{msd}	Este trabajo

^a Genes de resistencia a: Ap^r, ampicilina; Cm^r, cloranfenicol.

^(a): URLGA, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas Cedex, Francia.

3.3.2 Manipulaciones del ADN. Para el aislamiento de ADN plasmídico y las manipulaciones en general del ADN se usaron los métodos descritos en el capítulo anterior. El PCR (Perkin Elmer Cetus apparatus, Norwalk, Conn.) se llevó a cabo con la enzima Vent ADN Polimerasa (Promega) y las secuencias fueron confirmadas por caracterización con enzimas de restricción y usando el kit de secuenciación Dye-terminator (ABI PRISM® BigDye™ Terminators, Appl. Biosystems).

3.3.3 Fusión del propéptido sintético LEISSTCDA a E7. Para obtener la fusión de E7 con un propéptido que aumente la ES en *L. lactis* (*leiss:E7*), donde *leiss* codifica para el propéptido sintético LEISSTCDA; se purificó un cassette *E7:trpA* del vector pBS:E7:TrpA digerido con las enzimas *NsiI/EcoRV* y se clonó en el vector pLEISS:Nuc digerido con *EcoRI-Klenow/NsiI* (eliminando la nucleasa) resultando en pLEISS:E7. Este vector se introdujo en la cepa NZ9000 (ver capítulo 2) resultando en: NZLEISS:E7.

3.3.4 Fusión de la nucleasa Sthapylococcal (Nuc) al extremo N- de E7. Para analizar el efecto de la fusión de Nuc al extremo amino (N-) de la proteína E7 (Nuc-E7) tanto en la forma citoplasmática como en la de secreción, se purificó un cassette *nuc* con sitios *NsiI* a ambos extremos del vector pBS:NsiI:nuc (gentilmente donado por S. Nouaille, URLGA, INRA, Jouy en Josas, Francia) y se clonó en los vectores pSEC:E7 y pCYT:E7 digeridos con *NsiI* para darnos pCYT:Nuc:E7 y pSEC:Nuc:E7 (Tabla 1). Estos plásmidos se establecieron en la cepa NZ9000 y se nombraron: NZCYT:Nuc-E7 y NZSEC:Nuc-E7.

3.3.5 Fusión del propéptido sintético LEISSTCDA a la proteína híbrida Nuc-E7. Para analizar el efecto del propéptido LEISSTCDA fusionado a una proteína híbrida Nuc-E7, aislamos un cassette *nuc* (tal y como se acaba de describir) y se clonó en el vector pLEISS:E7 digerido con *NsiI*. El plásmido se nombro pLEISS:Nuc-E7 y se introdujo en la cepa NZ9000 (NZLEISS:Nuc-E7).

3.3.6 Fusión de la nucleasa al extremo N- ó C- de E7. En esta sección nos enfocamos en observar el efecto de la nucleasa fusionada al extremo carboxilo (C-) de E7 (E7-Nuc). Por cuestiones de factibilidad en las clonaciones se eligió la forma LEISS:E7 para comparar la fusión de Nuc a ambos extremos y se construyeron dos cassettes: $SP_{sup}:leiss:nuc-E7$ y $SP_{sup}:leiss:E7-nuc$. Para la construcción $SP_{sup}:leiss:nuc-E7$ se obtuvo el cassette *nuc* como se describió anteriormente (pBS:NsiI:nuc digerido con *NsiI*) y se clonó en el vector pLEISS:E7 digerido con la misma enzima para obtener pLEISS:Nuc-E7. Por otro lado para

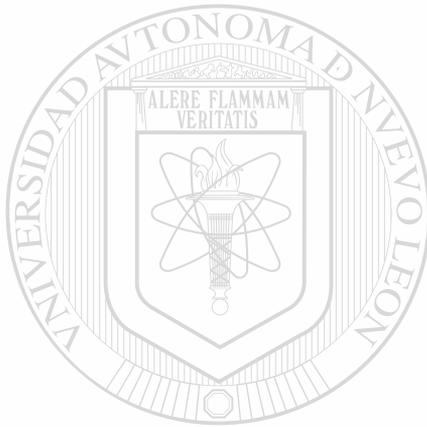
la construcción del cassette $SP_{109-leiss}:E7-nuc$, primero se amplificó el gene *E7* por PCR con un par de oligos diseñados para adicionar sitios *NsiI* a ambos lados (5' y 3') del gene *E7*. La secuencia de los oligos usados fue: 5'*NsiI*-*E7* (5'-GATGCATCACAAACATGGAGATACACCTACATTGCAT-3') para la cadena complementaria y 3'*NsiI*-*E7* (5'-GGATGCATGTGGTTTCTGAGAACAGAT-3') para la complementaria. El producto de PCR fue clonado en el vector pCR-TOPO, resultando en pCR:*NsiI*:*E7* (Tabla 1). Después se aisló el gene *E7* de este vector con *NsiI* y se clonó en el vector pLEISS:*Nuc* digerido con la misma enzima resultando en pLEISS:*E7*-*Nuc*. Estos dos vectores se introdujeron en la cepa NZ9000: NZLEISS:*Nuc*-*E7* y NZLEISS:*E7*-*Nuc*.

3.3.7 Condiciones para la inducción con la nisina basándose en su concentración. Para la inducción del promotor nisina, se tomó una dilución 1:250 de un cultivo ON de la cepa de interés, se inoculó en medio nuevo y se dejó crecer hasta una $DO=0.4-0.6$, una vez alcanzada esta densidad se indujo con las siguientes concentraciones de nisina (en nanogramos por mililitro, ng/mL): 0, 0.05, 0.1, 1, 5, 10 y 15. Una vez determinada la concentración óptima para nuestro sistema, se utilizó ésta para todos los ensayos de inducción.

3.3.8 Prueba de la nucleasa. Para la detección de la actividad nucleolítica de la nucleasa Staphylococcal (*Nuc*) en *L. lactis*, se utilizó el protocolo desarrollado por Le Loir y colaboradores (1994, modificación hecha después de Lachica *et al.*, 1971). Primero se cultivaron toda la noche las cepas de *L. lactis* manipuladas para producir la proteína de fusión *Nuc*-*E7* (tanto en la forma citoplasmática como la de secreción). Una vez crecidas, se hizo una dilución 1:250 en medio de cultivo nuevo, se crecieron hasta una $OD=0.5-0.6$ y se indujeron con 10 ng/mL de nisina por 1 hr. Después de la inducción se hicieron diluciones y se plaquearon los cultivos sobre medio sólido (BHI en lugar de GM17) más el antibiótico requerido y se incubó toda la noche. Una vez que las colonias estuvieron bien formadas se vertió una capa de TBD-Agar (0.05 M Tris pH 9.0, 1% NaCl, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.3% ADN de Esperma de Salmón, 0.01% Azul de Toluídina O, 1% Agar). La actividad nucleolítica se visualizó generalmente después de 2-3 hrs. de incubación a 37°C por la aparición de un halo rosa alrededor de la colonia (fenotipo *Nuc*+).

3.3.9 Preparación de muestras proteicas e inmunodetección. La extracción de las proteínas de los cultivos de los lactococos recombinantes, SDS-Page e inmunorevelación

con anti-Nuc (dilución 1:250, gentilmente donado por Miller ó 1:250 para anti-E7) fueron llevados a cabo tal y como se describió en el capítulo anterior.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.4 RESULTADOS

3.4.1 El propéptido sintético LEISSTCDA no mejora la ES de la proteína E7 nativa en *L. lactis*. En el capítulo anterior observamos que la proteína E7 del VPH-16 puede ser producida y secretada eficientemente en *L. lactis*; sin embargo, aunque la ES fue muy alta (~95%) no fue total. En este capítulo nos enfocamos en modificar las cargas en el extremo N- de la proteína E7 para ver si se puede alcanzar un 100% en la ES. Para este propósito se construyó el vector pLEISS:E7 (Fig. 1), donde el gene *E7* esta fusionado en marco de lectura (ORF) con un fragmento de ADN que contiene el RBS y el SP de la *usp45* (capítulo 2), más un propéptido sintético, LEISSTCDA (LEISS) el cual ha demostrado en trabajos

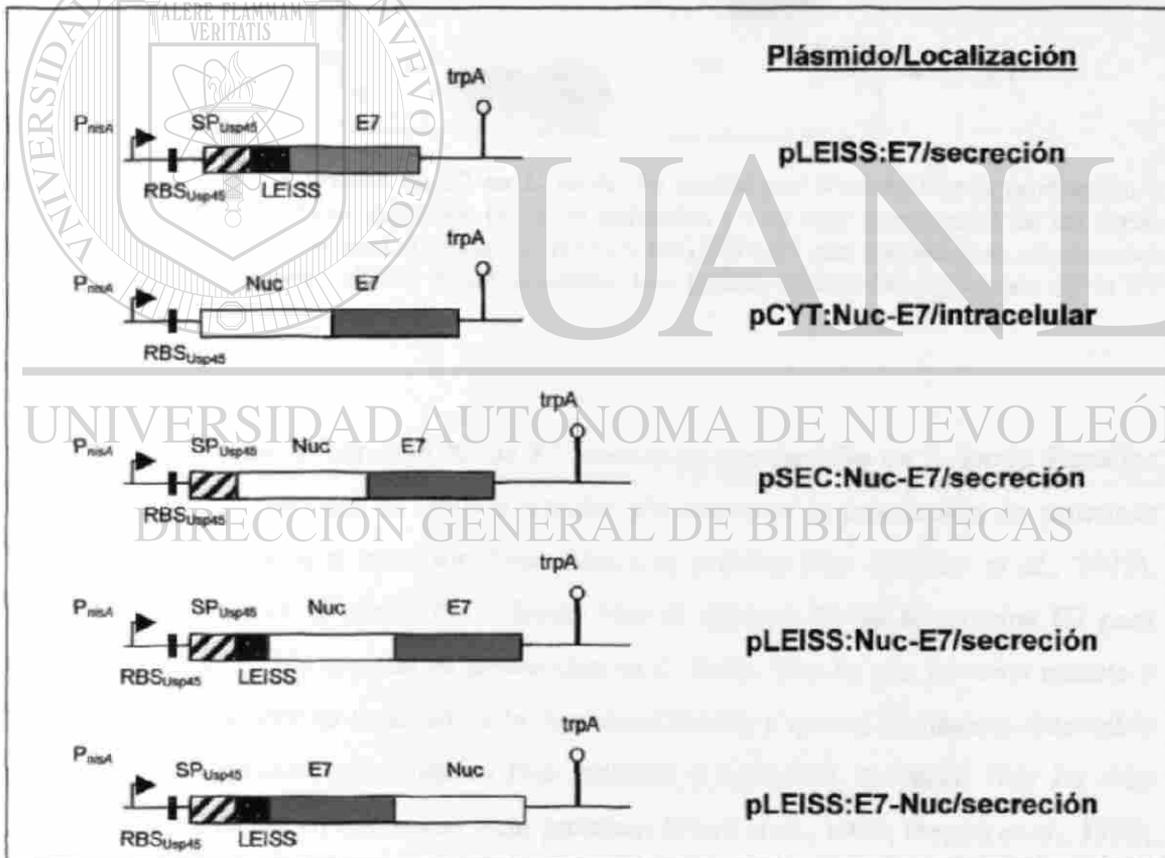


Fig. 1. Cassettes de expresión para la producción de E7 en *L. lactis*. Diseños esquemáticos de las fusiones génicas de E7 bajo el control del promotor P_{nisA} colocadas en los plásmidos indicados. Símbolos: \blacktriangleright , promotor lactococcal inducible por nisina (P_{nisA}); \blacksquare , sitio de unión al ribosoma del gene *usp45*; \blacksquare , región codificante para E7; \square con diagonal, péptido señal del gene *usp45*; \square , región codificante para NucB; \blacksquare , región codificante para LEISS; \Uparrow , terminador transcripcional.

previos aumentar la ES de proteínas heterólogas en *L. lactis* (Le Loir *et al.*, 1998; Langella & Le Loir, 1999; Ribeiro *et al.*, 2002). Para comparar la ES de la proteína E7 entre la cepa NZSEC:E7 y la NZLEISS:E7, se obtuvieron muestras proteicas de cultivos inducidos con 10 ng/mL (ver más adelante) de nisina y se analizaron por Western blot revelando con anti-E7 (Fig. 2). Los resultados obtenidos muestran que la ES de la proteína E7 más el propéptido sintético al contrario de lo que se esperaba es drásticamente reducida (~95% a tan solo un ~5%, Fig. 2).

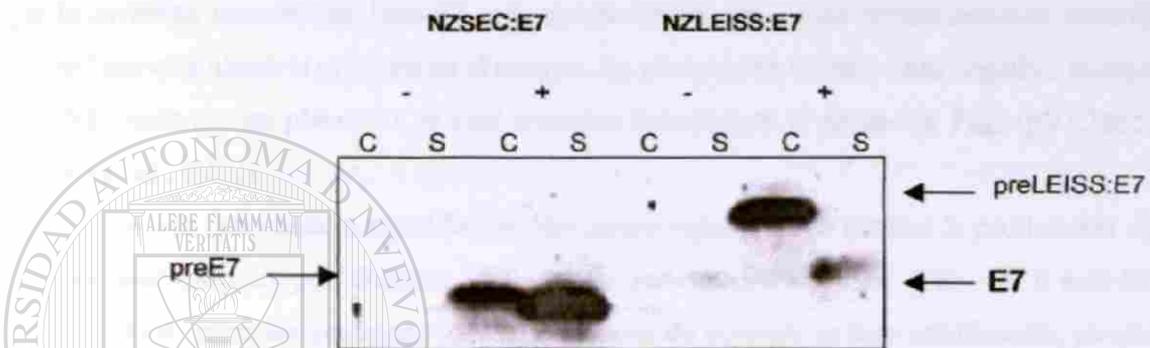


Fig. 2. Producción y secreción de E7 en *L. lactis*. Se analizó por Western blot la producción y secreción de E7 de cultivos inducidos (+) y no inducidos (-) en fase exponencial de las cepas NZSEC:E7 la cual codifica para el precursor, preE7 y NZLEISS:E7 que codifica para el precursor preLEISS:E7. C, fracción celular; S, sobrenadante. Las flechas indican las posiciones de la E7 madura y de los precursores.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

3.4.2 La fusión Nuc al extremo N- de E7 rescata su producción en *L. lactis*.

Estudios recientes han mostrado que es posible rescatar y/o aumentar la producción de proteínas heterólogas en *L. lactis* si estas son fusionadas a la proteína Nuc (Ribeiro *et al.*, 2002). Nosotros examinamos el efecto de la fusión Nuc al extremo N- de la proteína E7 para determinar si es posible rescatar su producción en *L. lactis*. Nuc es una proteína estable y bien caracterizada, que es resistente a la desnaturalización y que es fácilmente detectable por una simple prueba colorimétrica (ver material y métodos). Además, Nuc ha sido utilizada exitosamente en fusión con otras proteínas (Piard *et al.*, 1997; Poquet *et al.*, 1998; Langella & Le Loir, 1999). Así, para analizar el efecto de la fusión de Nuc a E7, se construyeron los plásmidos pCYT:Nuc-E7 y pSEC:Nuc-E7. Ambos plásmidos fueron establecidos en la cepa NZ9000 de *L. lactis* y la producción de la proteína fue analizada por medio de la prueba de la nucleasa (ver material y métodos). El azul de toluidina es un

colorante metacromático que presenta mayor afinidad por el ADN que por el agar presentando un color azul intenso cuando esta asociado al primero (Michaelis & Granick, 1945). Así pues, la hidrólisis del ADN por una actividad nucleolítica provoca que el complejo ADN-Toluidina se libere cambiando de azul intenso a un color rosa. Cultivos inducidos de la cepa NZSEC:Nuc-E7 presentaron un claro fenotipo Nuc+ (Fig. 3), tal y como se esperaba si la proteína híbrida Nuc-E7 esta siendo secretada. La cepa NZCYT:Nuc-E7 presentó un ligero desarrollo de color rosa (Nuc+/-, Fig. 3), sugiriendo que la proteína intracelular Nuc-E7 esta siendo producida y que probablemente ocurrió alguna lisis que liberó la proteína en el ensayo. En esta prueba se usó como negativo la cepa NZ9000 portando un plásmido, el cual contiene únicamente el promotor P_{nisA} (pVE3655, Ribeiro et al., 2002).

Una vez detectada la actividad de Nuc sobre cajas Petri se analizó la producción de las proteínas híbridas por Western blot usando anticuerpos anti-Nuc (Fig. 4a) ó anti-E7 (Fig. 4b). Los extractos proteicos fueron obtenidos de cultivos en fase estacionaria, ya que

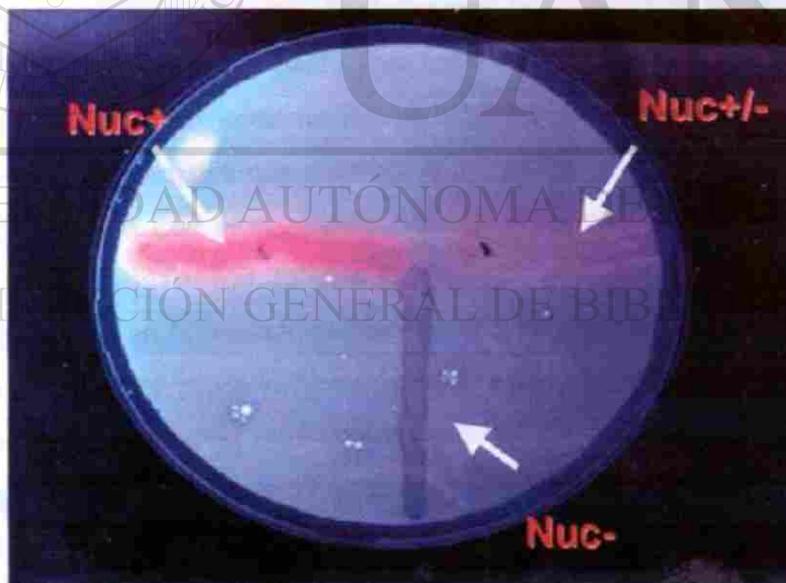


Fig. 3. Actividad de la nucleasa en clones de *L. lactis* expresando la proteína híbrida Nuc-E7. Análisis de la actividad enzimática de la nucleasa en caja Petri demuestran que la forma de secreción de la proteína Nuc-E7 da una clara señal (halo rosa, Nuc+). La forma de citoplasma Nuc-E7 da una débil señal (Nuc+/-) debido quizá a lisis de algunas colonias al momento del ensayo. Como negativo se usó una cepa de *L. lactis* transformada con un plásmido que contiene únicamente el promotor P_{nisA} con la cual no se observa señal (Nuc-).

en ésta es donde se observa degradación de la E7 nativa en citoplasma (capítulo anterior).

Análisis por Western blot con anti-Nuc de la cepa NZCYT:Nuc-E7 después de la inducción, revela dos bandas en la fracción celular y ninguna señal en el sobrenadante (Fig. 4a). La banda superior migra de acuerdo a lo esperado para la fusión Nuc-E7 (40 kDa aproximadamente). La otra banda corresponde probablemente a un polipéptido resultante de una degradación intracelular de la proteína híbrida. Inmunodetección de extractos proteicos de la cepa NZSEC:Nuc-E7 revelan tres bandas en la fracción celular (Fig. 4a). La banda mayor corresponde al precursor SP_{usp} :Nuc-E7, las otras dos migran a la misma altura que las formas intracelulares observadas en la cepa NZCYT:Nuc-E7 y que corresponden a la forma madura Nuc-E7 y al producto de proteólisis. En la inmunodetección del sobrenadante de esta cepa se observan dos bandas mayores, las cuales corresponden a la forma madura Nuc-E7 secretada y la otra al producto de la degradación observado en citoplasma; así también, se detectan polipéptidos de tamaños más pequeños, los cuales pueden ser productos de proteólisis de la proteína Nuc-E7 en el sobrenadante (Fig. 4a). No obstante, en este caso a diferencia de la proteína E7 nativa la ES es baja (~5%) lo cual se ha observado frecuentemente en sistemas diseñados para la secreción de proteínas heterólogas (Bolhuis *et al.*, 1999; Dieye *et al.*, 2001). Para tratar de aumentar ES de la proteína híbrida Nuc-E7 decidimos probar otra construcción, pLEISS:Nuc-E7 (Fig. 1) en la cual al SP se le fusionó un propéptido sintético que aumenta la secreción de proteínas heterólogas en *L. lactis*, LEISSTCDA (Le Loir *et al.*, 1998). Análisis por Western blot de la cepa con esta construcción (NZLEISS:Nuc-E7), revelan al igual que para la cepa NZSEC:Nuc-E7, tres bandas principalmente en la fracción celular. En este caso la banda mayor migra más alto debido a que el precursor posee la fusión *leiss*, SP_{usp} :Leiss:Nuc-E7; las otras dos bandas corresponden a la forma Nuc-E7 madura y al producto de degradación. Adicionalmente, se observan un gran número de bandas pequeñas resultado de degradaciones secundarias (Fig. 4a). En el sobrenadante, tal y como se esperaba observamos de manera repetible una mayor ES de la proteína Nuc-E7 (~15%), aunque también aumenta el porcentaje de degradación. Curiosamente, los extractos de proteínas de las tres cepas sin inducir, revelan ligeras señales de producción de las proteínas híbridas (Fig. 4a). Esto puede ser debido a una actividad basal del P_{nicA} .

(a) anti-Nuc



(b) anti-E7

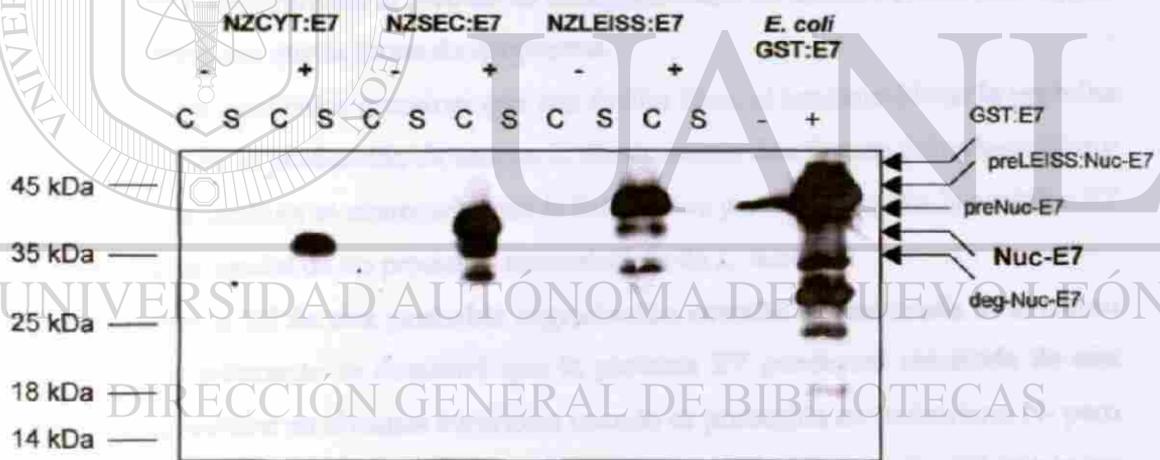


Fig. 4. La producción de Nuc-E7 es estable en *L. lactis*. Se analizó la producción de Nuc-E7 por Western blot con anticuerpos anti-Nuc (a) ó anti-E7 (b). Los cultivos de las cepas: NZCYT:Nuc-E7 (codifica para Nuc-E7); NZSEC:Nuc-E7 (codifica para preNuc-E7) y NZLEISS:Nuc-E7 (codifica para preLEISS:Nuc-E7) fueron procesados en fase estacionaria Como negativo se uso una cepa que porta únicamente el plásmido con el promotor P_{nucA} (Neg.); y como positivo se uso una proteína purificada Nuc (SIGMA) para la inmunodetección con anti-Nuc y una proteína de fusión GST:E7 (*E. coli* GST:E7) inducible con IPTG (Isopropyl B-D-thiogalactopyranoside) para la inmunodetección con anti-E7. Cultivos no-inducidos (-) e inducidos (+) de las cepas indicadas. Las flechas indican las posiciones de las formas preLEISS:Nuc-E7, preNuc-E7, y Nuc-E7, así como también el producto de degradación (deg-Nuc:E7) y los controles, Nuc y GST:E7. C, fracción celular; S, sobrenadante; Las posiciones y tamaños del marcador de peso molecular son mostrados a la izquierda.

Como control negativo de los cultivos inducidos se usó nuevamente la cepa NZ9000(pVE3655) en la cual no se observa ninguna señal. Como control positivo se usó una proteína Nuc purificada (SIGMA) (Fig. 4a). Finalmente se realizó una inmunodetección usando un anticuerpo anti-E7 sobre el mismo Western blot (previa deshibridación) de la figura 4a (Fig. 4b). El perfil de proteínas detectados es similar al observado con el anticuerpo anti-Nuc, la única diferencia observada es que las pequeñas bandas producto de la degradación no son detectadas o son detectadas en menor cantidad con este anticuerpo, sugiriendo que la degradación ocurre en la parte E7. Aquí se usó como control una proteína de fusión GST:E7 obtenida a partir de una cepa de *E. coli*. Sin embargo, a pesar de que las tres construcciones, pCYT:Nuc-E7, pSEC:Nuc-E7, pLEISS:Nuc-E7 tienen el mismo diseño, la cantidad de proteína Nuc-E7 detectada en la cepa NZSEC:Nuc-E7 y NZLEISS:Nuc-E7 es significativamente más alta (dos a tres veces, respectivamente) que la de la cepa NZCYT:Nuc-E7. Los altos niveles de las proteínas de secreción sugieren que entrando al proceso de transporte fuera de la célula, éstas son sujetas a una menor proteólisis que la forma de citoplasma.

Todos estos resultados muestran que una fusión Nuc, al extremo N- de la proteína E7 puede estabilizar la producción de esta en *L. lactis* en sus dos formas (citoplasmática y de secreción). Así también se comprueba que la fusión Nuc puede proteger a la proteína E7 al menos de forma parcial de las proteasas intracelulares de *L. lactis*.

3.4.3 Nuc protege a E7 de una probable degradación cuando es fusionada al extremo N- ó al C-. Recientemente se demostró que la proteína E7 puede ser rescatada de una degradación intracelular en sistemas eucariotes cuando es protegida en su extremo N- pero no el C- (Reinstein *et al.*, 2000). En este contexto, para probar si la proteína E7 puede ser rescatada de la degradación intracelular en *L. lactis* cuando es fusionada a Nuc por su extremo C-, nos enfocamos en la forma de secreción LEISS:Nuc-E7. Para dicho propósito se construyó un plásmido adicional, pLEISS:E7-Nuc y se estableció en la cepa NZ9000 para generar, NZLEISS:E7-Nuc. La producción de esta construcción se comparó con la de la cepa NZLEISS:Nuc-E7 por Western blot con anticuerpos anti-Nuc y anti-E7 (Fig. 5). En la inmunodetección con el anticuerpo anti-Nuc (Fig. 5a) de la fracción celular de la cepa NZLEISS:Nuc-E7 se puede observar una banda mayor que corresponde a la esperada para el precursor LEISS:Nuc-E7 (pre). También se detectan varias bandas de menor peso

molecular, y que, corresponden a productos de degradación. A pesar de que la migración se hizo bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se observan varias bandas de alto peso molecular (arriba de la forma precursora). Estas bandas pueden ser debido a agregados que no fueron completamente disociados debido al protocolo de extracción de proteínas suave que se utilizó (ver material y métodos, capítulo 2). En la fracción celular de la misma muestra pero revelada con un anticuerpo anti-E7 (Fig. 5b), el perfil de proteínas es diferente y es menor que el de la revelación anti-Nuc. En el sobrenadante de la cepa NZ:LEISS:Nuc-E7, la inmunodetección con anti-Nuc revela una banda mayor del tamaño esperado para la proteína LEISS:Nuc-E7, también se pueden observar otras pequeñas bandas, producto de degradación (Fig. 5a). La inmunodetección con anti-E7 presenta un perfil similar (Fig. 5b).

En la cepa NZLEISS:E7-Nuc el anticuerpo anti-Nuc revela dos bandas mayores en la fracción celular (Fig. 5a), las cuales corresponden a la forma precursora y madura. Curiosamente estos productos presentan un peso molecular ligeramente más pequeño que las formas LEISS:Nuc-E7. Estas extrañas propiedades en la migración de E7 se han observado anteriormente Reinstein y colaboradores (2000), sobre todo cuando la E7 es protegida por su extremo C-. También se observan algunas bandas de alto peso molecular al igual que las formas LEISS:Nuc.E7, y que corresponden probablemente a productos de agregación. De forma interesante, se observa un dramático patrón diferente en las bandas de bajo peso molecular, que aquel observado en las formas LEISS:Nuc-E7, con un menor número de productos degradados y de diferente peso molecular.

Estos resultados muestran que efectivamente la fusión de la proteína E7 con Nuc a ambos extremos, N- ó C- puede efectivamente rescatar a ésta de una degradación.

3.4.4 Parámetros para la inducción con la nisina. Dado que los niveles de inducción P_{nisA} varían de acuerdo a la cantidad de nisina usada (de Ruyter *et al.*, 1996), se realizó una cinética en función de la cantidad de nisina necesaria para la inducción y así determinar las mejores condiciones para la producción de E7 y Nuc-E7 bajo el control del promotor nisina. Para dicho propósito se escogió la cepa NZSEC:Nuc-E7 y se probaron las diferentes concentraciones de nisina (ver material y métodos) 1 hr. Los resultados de la cinética (Fig. 6) muestran que es posible producir proteínas bajo el promotor nisina a niveles tan bajos de concentración como 0.05-0.1 ng/mL de nisina. Sin embargo ya que la cepa analizada este ensayo, es para producir una proteína secretada al medio de cultivo, Nuc-E7, los mejores

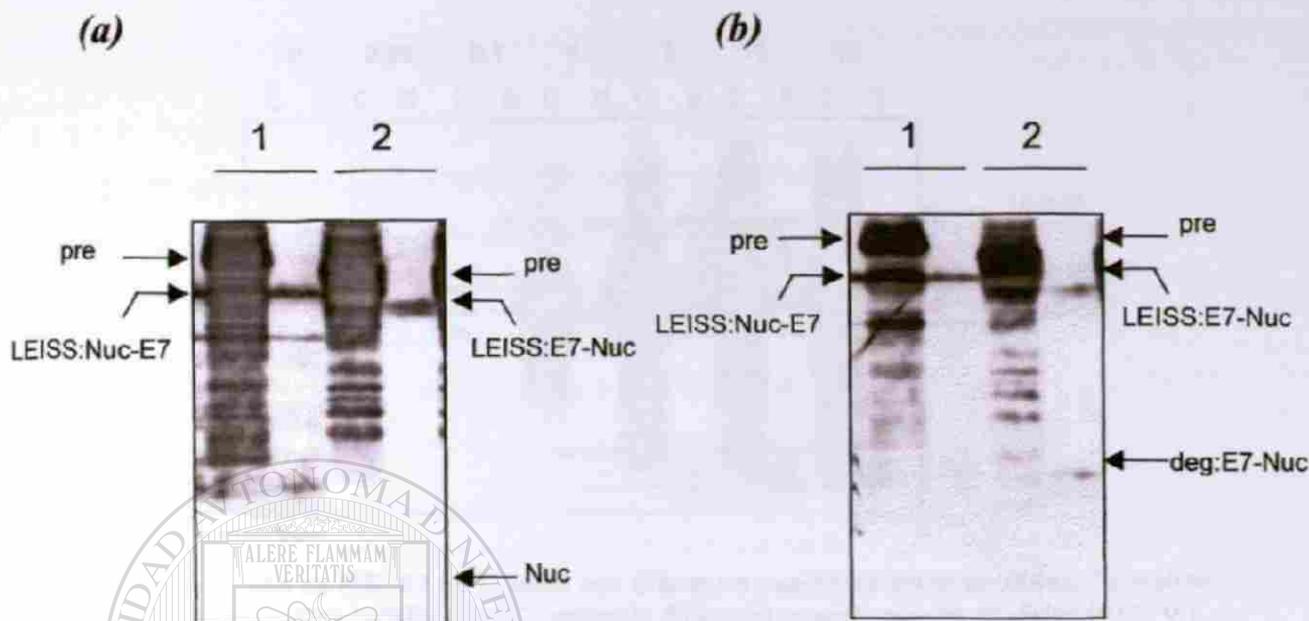


Fig. 5. La fusión Nuc al extremo N- ó C- de E7 rescata su producción en *L. lactis*. Se analizó por Western blot la producción de LEISS:Nuc-E7 y LEISS:E7-Nuc de cultivos inducidos de las cepas que portan los plásmidos pLEISS:Nuc-E7 (carril 1) ó pLEISS:E7-Nuc (carril 2). **(a)** Inmunorevelación con anticuerpos anti-Nuc. **(b)** Inmunorevelación con anticuerpos anti-E7. Las flechas indican las posiciones de los precursores (pre), la forma madura LEISS:Nuc-E7, LEISS:E7-Nuc, el control Nuc (SIGMA) y el producto de una posible degradación de la proteína híbrida conteniendo la parte E7 (deg:E7-Nuc). Las demás bandas en el sobrenadante y fracción celular corresponden a productos que contienen la parte Nuc (a) ó E7 (b) y que son el resultado de proteólisis secundarias. C, fracción celular; S, sobrenadante.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

niveles de secreción se alcanzan a 10 ng/mL. Después de esta concentración (15 ng/mL, por ejemplo) comienza a haber lisis de las células, ya que se puede observar en el sobrenadante la forma precursora de la proteína, preNuc-E7. Así pues, determinamos que para la producción de E7 en *L. lactis*, la cantidad de nisina necesaria para una óptima inducción es de 10 ng/mL. Curiosamente en este ensayo de Western blot la proteína usp45 (usp45, fracción de sobrenadante) reaccionó con los anticuerpos anti-Nuc.

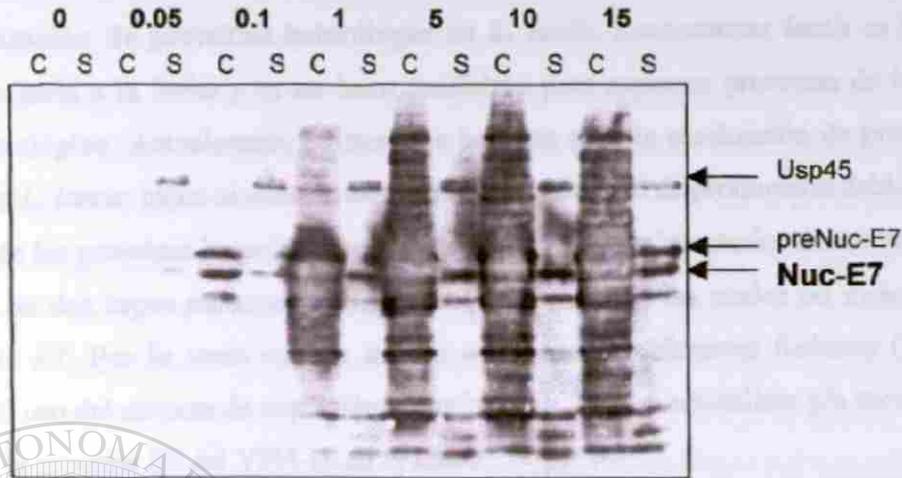
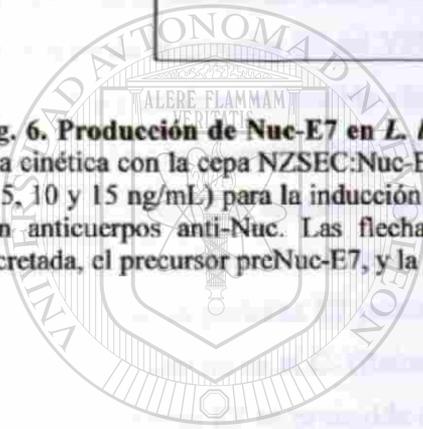


Fig. 6. Producción de Nuc-E7 en *L. lactis* con diferentes concentraciones de nisina. Se realizó una cinética con la cepa NZSEC:Nuc-E7 probando diferentes concentraciones de nisina (0.05, 0.1, 1, 5, 10 y 15 ng/mL) para la inducción del promotor P_{nisA}. El resultado se analizó por Western blot con anticuerpos anti-Nuc. Las flechas indican las posiciones de la proteína madura Nuc-E7 secretada, el precursor preNuc-E7, y la proteína Usp45. C, fracción celular; S, sobrenadante.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

3.5 DISCUSION

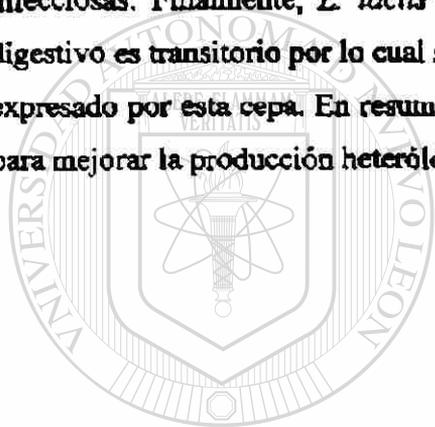
3.5.1 Estabilización de proteínas heterólogas en *L. lactis*. *Lactococcus lactis* es la BL mejor caracterizada a la fecha y es un buen candidato para expresar proteínas de interés médico ó tecnológico. Actualmente, existen dos barreras para la producción de proteínas heterólogas en *L. lactis*: bajos niveles de expresión y baja calidad de producción debido a la degradación de las proteínas heterólogas expresadas. En el capítulo anterior describimos la construcción de dos cepas mutantes de *L. lactis* (*clpP* y *dnaK*) las cuales no mejoran la producción de E7. Por lo tanto en este trabajo combinamos diferentes fusiones (Nuc y LEISS) con el uso del sistema de expresión inducible, NICE, para estabilizar y/o mejorar la expresión de la proteína E7 del VPH-16 en *L. lactis*.

Para analizar el posible efecto protector de una proteína compacta y resistente, la nucleasa Staphylococcal (Nuc), fusionamos dicha proteína al extremo N- de E7. Los resultados obtenidos muestran que efectivamente esta proteína híbrida (Nuc-E7) es más estable aún en fase estacionaria (Fig. 4). Trabajos previos en sistemas eucariotes han mostrado que la proteína E7 puede ser protegido de proteólisis cuando es protegido en su extremo N- pero no en el C- (Reinstein *et al.*, 2000). Aquí, nosotros demostramos que en *L. lactis* la proteína E7 es protegida de una degradación intracelular cuando es protegida por cualquiera de sus dos extremos (Fig. 5). También se demostró que fusionando un péptido sintético (LEISS) a la proteína Nuc-E7 podemos mejorar la ES. Curiosamente esta misma fusión LEISS a la proteína E7 nativa, disminuye drásticamente su ES (95% a un 5%), esto debido quizás a las propiedades intrínsecas de E7.

Estos resultados nos llevan a la conclusión que las cargas del extremo N- de la proteína heteróloga a expresar en *L. lactis* (en este caso E7) influyen de manera directa (ya sea negativa o positivamente) con el proceso de translocación. Por otro lado el uso de un sistema de expresión génica inducible es ampliamente recomendable, ya que permite la expresión de proteínas que pueden ser tóxicas a la bacteria cuando se expresan a altos niveles (Wells *et al.*, 1995).

3.5.2 Perspectivas en el uso de *L. lactis* para la producción de proteínas heterólogas. El uso de *L. lactis* para expresar y exportar proteínas presenta varias ventajas que la hacen un modelo atractivo para la producción de proteínas heterólogas: 1) algunas cepas no secretan

proteasas u otras proteínas a altos niveles, característica que puede simplificar el análisis de las proteínas producidas; 2) algunas BL son actualmente usadas en procesos industriales (de Vos *et al.*, 1993) lo cual puede facilitar su aceptación como vectores de producción heteróloga; 3) su status GRAS representa una importante ventaja para su potencial uso como un vector vivo en el desarrollo de nuevas vacunas, y su ruta de administración (oral, nasal o vaginal), la hace un organismo de fácil manipulación y sin la necesidad de personal entrenado para su aplicación, además de un bajo costo de producción y 4) algunas cepas poseen actividad antitumoral (Kohwi *et al.*, 1978; Kelkar *et al.*, 1988) y sus propiedades adyuvantes la hacen un buen candidato para propósitos de vacunación contra enfermedades infecciosas. Finalmente, *L. lactis* es una bacteria no comensal y su paso por el tracto digestivo es transitorio por lo cual se puede evitar cualquier tipo de intolerancia al antígeno expresado por esta cepa. En resumen en esta sección se muestra las ventajas y alternativas para mejorar la producción heteróloga en *L. lactis*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.6 REFERENCIAS

- Bolhuis A, Tjalsma H, Smith HE, de Jong A, Meima R, Venema G, Bron S, & van Dijk JM. (1999). Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:2934-2941.
- Bolotin A, Mauger S, Malarme K, Ehrlich SD, & Sorokin A. (1999). Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76:27-76.
- Chatel JM, Langella P, Adel-Patient K, Commissaire J, Wal JM, & Corthier G. (2001). Induction of mucosal immune response after intranasal and oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine Beta-lactoglobulin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8:545-551.
- Dieye Y, Usai S, Clier F, Gruss A, & Piard JC. (2001). Optimizing protein targeting in lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. 183:4157-4166.
- Drouault S, Corthier G, Ehrlich SD, & Renault P. (2000). Expression of the *Staphylococcus hyicus* lipase in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:588-598.
- Enouf V, Langella P, Commissaire J, Cohen J, & Corthier G. (2001). Bovine Rotavirus Non-Structural Protein 4 (NSP4) Produced by *Lactococcus lactis* Is Antigenic and Immunogenic. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:1423-1428.
- Gaeng S, Scherer S, Neve H, & Loessner MJ. (2000). Gene cloning and expression of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2951-2958.
- Gasson MJ. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic acid streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology*. 154:1-9.
- Gibson TJ. (1984). PhD thesis. University of Cambridge, Cambridge, England.
- Gil MT, Perez-Arellano I, Buess J, & Perez-Martinez G. (2001). Secretion of the rotavirus VP8* protein in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*. 203:269-274.
- Kelkar SM, Shenoy MA, & Kaklij GS. (1988). Antitumor activity of lactic acid bacteria on a solid fibrosarcoma, sarcoma-180 and Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Letters*. 42:73-77.

- Kohwi Y, Imai K, Tamura Z, & Hashimoto Y. (1978). Antitumor effect of *Bifidobacterium infantis* in mice. *Cann* 69:613-618.
- Kuipers OP, de Ruyter PG, Kleerebezen M, & de Vos WM. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 64:15-21.
- Lachica RV, Genigeorgis C, & Hoepfich PD. (1971). Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Applied Microbiology*. 21:585-587.
- Langella P, & Le Loir Y. (1999). Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. 32:191-198.
- Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, & Langella P. (1994). Direct screening of recombinants in Gram-positive bacteria using the secreted staphylococcal nuclease as a reporter. *Journal of Bacteriology*. 176:5135-5139.
- Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, & Langella P. (1998). A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriol*. 180:1895-1903.
- Michaelis L, & Granick S. (1945). Metachromasy of basic dyestuffs. *Journal of American Chemical Society*. 67:1212-1219.
- Mielcarek N, Alonso S, & Loch C. (2001). Nasal vaccination using live bacterial vectors. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 51:55-69.
- Piard JC, Hautefort I, Fischetti VA, Ehrlich SD, Fons M, & Gruss A. (1997). Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. 179:3068-3072.
- Poquet I, Ehrlich SD, & Gruss A. (1998). An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 7:1904-1912.
- Reinstein E, Scheffner M, Oren M, Ciechanover A, & Schwartz A. (2000). Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene*. 19:5944-5950.
- Ribeiro LA, Azevedo V, Le Loir Y, Oliveira SC, Dieye Y, Piard JC, Gruss A, & Langella P. (2002). Efficient targeting of the *Brucella abortus* immunodominant antigen L7/L12 by *Lactococcus lactis*: a first step towards new live vaccines against brucellosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:910-916.

- Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM, Wells JM, & Le Page RW. (1997). Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nature Biotechnology*. 15:653-657.
- de Ruyter PG, Kaipers OP, & de Vos WM. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:3662-3667.
- Shortle D. (1983). A genetic system analysis of staphylococcal nuclease. *Gene*. 22:181-189.
- Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, & Remaut E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*. 289:1352-1355.
- van Asseldonk M, Rutten G, Oteman M, Siezen RJ, de Vos WM, & Simons G. (1990). Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of *usp45*, a gene encoding a highly secreted protein from *Lactococcus lactis* MG1363. *Gene*. 95:155-160.
- van Rooijen RJ, Gasson MJ, & de Vos WM. (1992). Characterization of the *Lactococcus lactis* lactose operon promoter: contribution of flanking sequences and LacR repressor to promoter activity. *Journal of Bacteriology*. 174:2273-2280.
- de Vos WM, Huis in't Veld JHJ, & Poolman B. (1993). Special issue. The fourth symposium on Lactic acid bacteria -Genetics, Metabolism and Application. *FEMS Microbiology Reviews*. 12:1-272.
- Wells JM, Wilson FW, Norton PM, & Le Page RW. (1993). A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:3954-3959.
- Wells JM, Norton PM, & Le Page RW. (1995). Progress in the Development of Mucosal Vaccines Based on *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal*. 40:225-230.

4.1 Producción de la Interleucina-12 murina en *Lactococcus lactis*

RESUMEN

La Interleucina-12 (IL-12) es una citocina heterodimérica que juega un papel importante en la inmunidad celular contra muchos agentes microbianos y que ha sido usada exitosamente en inmunoterapia contra el cáncer. La IL-12 también ha mostrado ser buen adyuvante cuando es co-expresado con vacunas de ADN. Por lo tanto esta citocina es un potencial candidato para su uso terapéutico en el tratamiento del cáncer y en el diseño de vacunas contra enfermedades infecciosas. Desafortunadamente, todas las terapias actuales con la IL-12 son sistemáticas, y han sido muy limitadas debido a su alta toxicidad. En este trabajo diseñamos una cepa recombinante de *Lactococcus lactis*, para una expresión inducible y secreción de la IL-12 murina. Para determinar la actividad biológica de la IL-12 producida por dicha bacteria se analizó la capacidad de inducir interferón- γ (IFN- γ) en células de bazo de ratón *in vitro*. Además, la administración intranasal (*i.n.*) en ratones con la cepa recombinante de *L. lactis* productora de IL-12 resulta en un aumento en la producción de IFN- γ . Este trabajo muestra y apoya por primera vez la aplicación de una bacteria láctica y grado alimenticio como un nuevo vector para la expresión *i.n.* segura de la IL-12.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2 INTRODUCCION

La interleucina 12 (IL-12), una citocina multifuncional, fue conocida originalmente como factor de maduración de linfocitos T citotóxicos (CTL) y un factor de estimulación de células asesinas naturales (NK) (Kobayashi *et al.*, 1989; Chan *et al.*, 1991; Gubler *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1991). La IL-12 es una glucoproteína heterodimérica de 70 kDa (IL-12p70) constituida por dos subunidades (p35 y p40) unidas por puentes disulfuro que tiene numerosos efectos en las células T y NK, resultando en un aumento de actividad citotóxica e inducción de interferón- γ (IFN- γ). La subunidad p40 es importante para la unión a receptores celulares y la p35 es responsable para la especificidad entre especies (Chizzonite *et al.*, 1990; Schoenhaut *et al.*, 1992). En modelos animales la IL-12 ofrece protección contra varias infecciones bacterianas (Hultgren *et al.*, 2001). Esta citocina también ha demostrado bloquear la angiogenesis (nueva formación de vasos sanguíneos) y sus efectos inmunomoduladores son benéficos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Voest *et al.*, 1995; Okada *et al.*, 1997; Jacobson *et al.*, 2000). Dada las propiedades estimuladoras de la IL-12, existe un continuo interés en el uso de esta citocina como un adyuvante en el desarrollo de nuevas vacunas (Arulanandam *et al.*, 1999). Además varios grupos de investigación han demostrado que la IL-12 estimula una respuesta de anticuerpos IgG en suero (Metzger *et al.*, 1996, 1997; Arulanandam & Metzger, 1999).

Aunque la administración local de IL-12 tiene un efecto antitumoral *in vivo* causando la regresión de tumores bien establecidos y reduce la metástasis en modelos animales (Brunda *et al.*, 1993; Nastala *et al.*, 1994; Rakhmilevich *et al.*, 1996), la terapia sistémica con IL-12 ha mostrado una marcada citotoxicidad (Sarmiento *et al.*, 1994; Lui *et al.*, 2001) y dos pacientes han muerto en ensayos clínicos (Cohen, 1995). Adicionalmente el tratamiento intratumoral de ratones con un virus vaccinia que expresa la IL-12 induce una significativa inhibición del crecimiento tumoral pero con claros signos de toxicidad (Chen *et al.*, 2001). Es pues de gran interés desarrollar nuevas formas de expresión de la IL-12 a niveles controlados de administración local.

Las superficies en mucosas representan la primera defensa contra microorganismos patogénicos, por lo tanto es interesante el desarrollo de nuevos vectores para expresar la IL-12 por una ruta en mucosas. Mientras que el tratamiento sistémico con la IL-12 ha

como sistémica. No obstante, las actuales estrategias para expresar la IL-12 por mucosas son muy limitadas debido a una falta de vectores que puedan ser administrados de manera segura al humano. El uso de bacterias vivas como vectores para la expresión de proteínas heterólogas ha recibido especial interés en el desarrollo de vacunas en la última década. Sin embargo la mayoría de estos vectores bacterianos actualmente en uso son derivados de microorganismos patógenos e invasivos (por ejemplo, *Escherichia coli* y cepas atenuadas de *Mycobacterium* y *Salmonella*).

Las bacterias lácticas (BL) son organismos Gram positivos y no patógenos, considerados buenos candidatos para el desarrollo de vacunas vivas orales. *Lactococcus lactis*, es la BL modelo y dado que ha sido extensamente manipulada para la producción de proteínas heterólogas (Le Loir *et al.*, 1998; Steidler *et al.*, 1998; Langella & Le Loir, 1999; Enouf *et al.*, 2001; Chatel *et al.*, 2001, Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2002), incluyendo algunos antígenos de origen bacteriano o viral (Enouf *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2002), es de particular interés el desarrollo de vacunas orales o nasales usando este organismo GRAS. *Lactococcus lactis* no sobrevive en el tracto digestivo de modelos animales y humanos. Esto puede representar una ventaja comparado al uso de bacterias comensales ya que reduce el riesgo de cualquier tolerancia al antígeno expresado. Tanto la inmunidad en mucosas como la tolerancia son cruciales para mantener la integridad del organismo. Por un lado la mucosa es la mayor puerta de entrada de patógenos, los cuales deben de ser combatidos; por el otro, el sistema digestivo contiene una enorme cantidad de antígenos presentes en los alimentos los cuales deben de ser tolerados. La inmunidad en mucosas hacia los patógenos previene las infecciones mientras que la tolerancia en mucosas a los antígenos presentes en los alimentos previene la hipersensibilidad. Entre las numerosas funciones de la regulación de la respuesta inmune, se ha demostrado que la IL-12 previene la tolerancia en mucosas (Chen *et al.*, 2000; Claessen *et al.*, 1996, Van Parijs *et al.*, 1997). Varias bacterias Gram positivas, incluyendo algunas especies de BL han sido reportadas como potentes inductores de la IL-12 (Miettinen *et al.*, 1998; Hesse *et al.*, 1999, Hesse *et al.*, 2000). Tomando en cuenta todas estas características, resulta de gran interés la construcción de una cepa de *L. lactis* productora de la IL-12. Dicha cepa puede servir como un potente adyuvante en el desarrollo de vacunas vivas o en el tratamiento de tumores.

La IL-12 ha sido producida en sistemas eucariotes y expresada por vectores retrovirales y técnicas de pistolas génicas (Rakhmievich, *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001; Lui *et al.*, 2001; Mazzolini *et al.*, 2001). La producción de la IL-12 requiere el ensamblaje de dos subunidades mediante la formación de puentes disulfuro. En contraste a las bacterias Gram negativas, la formación de puentes disulfuro en las bacterias Gram positivas ha sido pobremente documentado. Solamente unas pocas proteínas extracitoplasmáticas con puentes disulfuro han sido identificadas en *Bacillus subtilis* incluyendo proteínas involucradas en la "toma" de ADN por células competentes (Chung *et al.*, 1998), y una bacteriocina lantibiótica (Paik *et al.*, 1998). Además, se ha reportado la formación de puentes disulfuro en *B. subtilis* en la producción de proteínas heterólogas tales como la TEM β -lactamasa (Bolhuis *et al.*, 1999a) y la PhoA *Escherichia coli* (Payne & Jackson, 1991). De igual forma se ha logrado de forma exitosa la producción de algunas bacteriocinas con puentes disulfuro en BL sugiriendo la habilidad de estos organismos para catalizar la formación de dichos enlaces en proteínas extracelulares (Fleury *et al.*, 1996). Finalmente, no existen reportes de secreción de proteínas heterólogas con puentes disulfuros en *L. lactis*. Este trabajo demuestra la capacidad de *L. lactis* para producir y secretar dos formas de IL-12 biológicamente activas, una citocina compleja compuesta de dos subunidades unidas por puentes disulfuro: una forma dimérica (expresión de p35 y p40, IL-12p70) y una forma monomérica (ambas subunidades fusionadas por un péptido flexible, scIL-12). La cepa recombinante reportada en este trabajo puede representar un excelente vector para co-expresar antígenos de interés médico y marcar un nuevo paso en el desarrollo de vacunas vivas de administración oral o nasal.

4.3 MATERIAL Y METODOS

4.3.1 Cepas, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos. Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo son listados en la Tabla 1. *Lactococcus lactis* y *Escherichia coli* se crecieron de acuerdo a lo descrito en el capítulo 2. Los plásmidos fueron mantenidos por la adición de los siguientes antibióticos (concentración en microgramos por mililitro, $\mu\text{g}/\text{mL}$): para *L. lactis*, cloranfenicol (5) y para *E. coli* (10) o ampicilina (100).

Tabla 1: Cepas y plásmidos usados.

Cepa	Genotipo		Referencia
<i>E. coli</i> TG1	<i>supE, hsd, ΔS, thi, Δ(lac-proAB), F'(traD36 proAB-lacZAM15)</i>		Gibson, 1984.
<i>L. lactis</i> MG1363	Cepa silvestre. Sin plásmidos		Gasson, 1983.
<i>L. lactis</i> NZ9000	MG1363 (genes <i>nisRK</i> en cromosoma). Sin plásmidos		Kuipers et al., 1998.
Plásmidos	Replicón	Características del plásmido y cassettes	Referencia
pBS-SK-II+	ColE1	Ap ^r	Stratagene
pWRG3169	ColE1	Ap ^r , derivado de pBS con secuencias codificantes para las subunidades p35 y p40.	Rakhtmilevich et al., 1996
pCR-TOPO	ColE1	Ap ^r	Invitrogen
pCR-TOPO: Δ p35exon1	ori pUC	Ap ^r , fragmento de PCR que codifica para el primer exón de la subunidad p35 sin su péptido señal.	Este trabajo
pCR-TOPO:p35exon2	ori pUC	Ap ^r fragmento de PCR que codifica para el segundo exón de la subunidad p35	Este trabajo
pCR-TOPO: Δ p35	ori pUC	Ap ^r , cassette de expresión de la subunidad p35 sin intrón	Este trabajo
pBS: Δ p40:trpA	ColE1	Ap ^r , fragmento de PCR que codifica para la subunidad p40 sin su péptido señal.	Este trabajo
pBS:SP _{Exp4}	ColE1	Ap ^r , fragmento de PCR codificante para el péptido señal SP _{Exp4}	Este trabajo
pBS:SP _{Exp4} :p40:trpA	ColE1	Ap ^r , cassette de expresión de la subunidad p40: SP _{Exp4} :p40:trpA bajo el control del promotor P _{nat}	Este trabajo
pSEC:E7	pWV01	Cm ^r ; cassette de expresión del precursor SP _{Exp4} :E7 bajo el control del promotor P _{nat}	Capítulo 2
pSEC:p35	pWV01	Cm ^r ; cassette de expresión de la subunidad p35: SP _{Exp4} :p35 bajo el control del promotor P _{nat}	Este trabajo
pSEC:p35-p40	pWV01	Cm ^r ; cassette de expresión de las subunidades p35 y p40 de la IL-12 bajo el control del promotor P _{nat}	Este trabajo
pCR:TOPO:scIL12	ori pUC	Ap ^r ; fragmento de PCR que codifica para la IL-12 de fusión: scIL-12.	Este trabajo
pSEC:scIL-12	pWV01	Cm ^r ; cassette de expresión de la scIL-12 bajo el control del promotor P _{nat}	Este trabajo

*Genes de resistencia a: Ap^r, ampicilina; Cm^r, cloranfenicol.

4.3.2 Manipulaciones de ADN y métodos usados. Todos los métodos usados en este capítulo (asilamiento de ADN, transformación, PCR, Western blot, etc.) se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 2. La concentración de la IL-12 secretada al medio de cultivo se midió usando un kit de ELISA que reconoce únicamente el heterodímero de la IL-12 (IL-12p70) (R&D Systems).

4.3.3 Mutagénesis dirigida para eliminar el intrón de la subunidad p35. Se aislaron por PCR las subunidades p35 y p40 del vector pWRG1369 el cual ha sido descrito anteriormente como funcional en un sistema eucariote (gentilmente donado por A. Rakhmievich, Tabla 1, Rakhmievich *et al.*, 1996). Análisis de la secuencia de la subunidad p35 revelaron un intrón (ver mas adelante). Aunque este intrón puede ser bien procesado en sistemas eucariotes, este no es el caso para nuestro sistema procariote, ya que en dichos organismos no ocurre splicing del ARN. Para eliminar dicho intrón se realizó una mutagénesis dirigida por PCR sobre la subunidad p35. Primero, se amplificaron por PCR los dos exones de la subunidad p35, se subclonaron en el vector pCR-TOPO (Invitrogen) y se ligaron para generar una subunidad p35 sin intrón y sin su péptido señal (SP, Δ p35). El primer exón fue amplificado con los oligos: 5'-p35 (5'-GATGCATCAGAGAGGGTCATTCCAGTCTCTGGA-3') para la cadena codificante y 5'-p35-start (5'-GGGGATCCTCTTGTTGTGGAAGAAGTCTCTCT-3') para la cadena complementaria (Fig. 4). Para el segundo exón se usaron los oligos: 3'-p35-stop (5'-GGGGATCCTGCCTGCCCCACAG AAGACG-3') para la cadena codificante y 3'-p35 (5'-GGAATTCTCAGGCGGAGCTCA GATAGCCA-3') para la cadena complementaria. Los oligos fueron diseñados de tal manera que se introdujera un sitio *Bam*HI sin modificar la secuencia de aminoácidos. Los dos exones fueron clonados en el vector pCR-TOPO resultando en pCR-TOPO: Δ p35exon1 y pCR-TOPO:p35exon2, respectivamente. Se aisló el fragmento codificante para p35exon2 con las enzimas *Bam*HI/*Xba*I-Klenow del vector CR-TOPO:p35exon2 y se ligó en el vector pCR-TOPO: Δ p35exon1 digerido con *Bam*HI/*Sma*I resultando en pCR-TOPO: Δ p35.

4.3.4 Construcción de una cepa recombinante de *L. lactis* que expresa las subunidades p35 y p40 de la IL-12. Se amplificó por PCR un fragmento de ADN que codifica para la región madura de la subunidad p40 (desprovista de su SP, Δ p40) del plásmido pWRG3169 (Rakhmievich *et al.*, 1996) y se subclonó en el vector pVE8001 (Poquet *et al.*, 1998) digerido con *Hinc*II. El vector resultante (pBS: Δ p40:trpA) tiene un terminado

transcripcional (*trpA*) que ha sido usado exitosamente para expresar proteínas heterólogas en *L. lactis* (Poquet *et al.*, 1998; Capítulo 2 y 3). La secuencia de los oligos usados fue: 5'-p40 (5'-GATGCATCAGAGATGTGGGAGCTGGAGAAAGAC-3') para la cadena codificante y 3'-p40 (5'-GGAGCTCCTAGGATCGGACCCTGCAGGGAA-3') para la complementaria. Posteriormente se realizó una serie de construcciones para fusionar dos SP procariotes en las subunidades p35 y p40. Primero se amplificó por PCR un fragmento de ADN del vector pFUN:Exp4 (Poquet *et al.*, 1998); dicho fragmento contiene el sitio de unión al ribosoma (RBS) y el SP de una probable proteína de secreción en *L. lactis* Exp4 (SP_{Exp4}, Poquet *et al.*, 1998). Las secuencias de los oligos usados fue: 5'-Exp4 (5'-GGGTACCTTAAGGAGATATAAAAATGAA-3') para la cadena codificante y 3'-Exp4 (5'-GATGCATCAGCAAATACAACGGC-3') para la complementaria. Este producto de PCR se clonó en el vector pVE8001 digerido con *HincII*, resultando en pBS:SP_{Exp4}. Posteriormente, se aisló el cassette $\Delta p40:trpA$ del vector pBS: $\Delta p40:trpA$ con las enzimas *NsiI/KpnI* y se clonó en el plásmido pBS:SP_{Exp4} digerido con las mismas enzimas, obteniendo pBS:SP_{Exp4}:p40:trpA. Para la fusión del SP a la subunidad p35, se aisló el cassette $\Delta p35$ del vector pBS: $\Delta p35$ con las enzimas *NsiI/EcoRI* y se clonó en el vector pSEC:E7 (capítulo 2) digerido con las mismas enzimas, para generar pSEC:p35. En este plásmido el gene *p35* está fusionado al RBS y el SP_{Usp45} de la Usp45; además, la expresión de esta subunidad está bajo el control del promotor inducible P_{msd}. Finalmente para la fusión de ambas subunidades en el mismo vector, se obtuvo el cassette SP_{Exp4}:p40:trpA del vector pBS:p40:trpA digiriendo con las enzimas *KpnI/BamHI*-Klenow y se clonó en el vector pSEC:p35 digerido con *KpnI/SmaI* resultando así en el plásmido pSEC:p35-p40 (Fig. 5). Este vector, que permite la expresión de las subunidades p35 y p40 a través de un solo transcrito fue introducido en la cepa NZ9000 de *L. lactis*. Esta cepa se nombró NZSEC:p35-p40.

4.3.5 Construcción del cassette de expresión de la IL-12 de fusión. Para la construcción del cassette de expresión de la IL-12 de fusión, se amplificó por PCR el gene *scIL-12* usando como template el vector pCDNA3:IL12 (gentilmente donado por P. Melby). Los oligos usados fueron: 5'-IL12 (5'-GATGCATCAGAGATGTGGGAGCTGGAGAAAGAC-3') para la cadena codificante y 3'-IL12 (5'-GGAATTCTCAGGCGGAGCTCAGATAGCCCA-3') para la complementaria. El producto de PCR obtenido se subclonó en el vector

pCR:TOPO (Invitrogen) resultando en pCR:TOPO:IL12 (Tabla 1). Posteriormente, se aisló el gene *scIL-12* de este vector con las enzimas *NsiI/NotI* y se clonó en el vector pSEC:E7 digerido con las mismas enzimas, resultando en pSEC:IL12 (Fig. 5). Este plásmido se introdujo en la cepa NZ9000 de *L. lactis* para generar la cepa NZSEC:scIL-12

4.3.6 Animales. Los ratones C57BL/6 se adquirieron en los laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME) y fueron mantenidos en el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la UANL, México. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a los protocolos aprobados por el comité institucional de estudios animales.

4.3.7 Ensayos de inducción *in vitro* de IFN- γ . Se obtuvieron células de bazo de 4 ratones (6-8 semanas de edad), y se separaron las células mononucleares por un gradiente de densidad en Ficoll-Histopaque (SIGMA). Se sembró un total de 2×10^6 células/mL en medio AIM-V (GIBCO) en placas de 24 pozos, 37°C 5% CO₂. Estas células se incubaron con 1 ng de IL-12 recombinante (R&D Systems) o el número de *L. lactis* recombinantes para dar la misma concentración que la del control. Después de 48 hrs. de incubación se cosecharon los sobrenadantes y se midió la presencia de IFN- γ en el medio por ELISA (R&D Systems). Todas las muestras se prepararon por triplicado.

4.3.8 Administración intranasal de los lactococos que expresan la IL-12. A grupos de tres ratones, se les administró intranasalmente (*i.n.*) los lactococos recombinantes que expresan la IL-12, la cepa silvestre (*wr*) ó PBS estéril (buffer de fosfato salino). Para esto los ratones fueron parcialmente anestesiados intraperitonealmente con una mezcla de Xilacina y Ketamina (Cheminova de México, S.A. de C.V.). Un total de 1×10^9 CFU (unidades formadoras de colonia) se resuspendieron en 10 μ L de PBS estéril y se administraron 5 μ L en cada nostrilo del ratón con una micropipeta a los días 1, 14 y 28.

4.3.9 Ensayo de inducción de IFN- γ . Se obtuvieron los bazos de los animales tratados *i.n.* con *L. lactis* ó PBS al día 35, y se aislaron las células mononucleares tal y como se describió para el ensayo de inducción *in vitro*. Se reestimularon las células de bazo con 50 μ L de Phytohemagglutinin (PHA, M Form, GIBCO). Después de 24 hrs. de incubación se recupero el sobrenadante de las células reestimuladas y se midió la presencia de IFN- γ .

4.3.10 Estadísticas. Los resultados son expresados como la media \pm una desviación estándar.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Las subunidades p35 y p40 son secretadas y procesadas correctamente por *L. lactis*. En este trabajo se desarrollo un cassette bistrónico para expresar la IL-12, en el cual un RBS interno une ambas subunidades (p35 y p40) y bajo el control del promotor inducible P_{msA} . Para obtener los genes p35 y p40 de la IL-12 murina, usamos un vector descrito anteriormente en un sistema eucariote (pWRG3169, Fig. 1; Rakhmievich *et al.*, 1996). Sin embargo, en los productos de PCR mostrados en la figura 2 (700 pb, la subunidad p35 y 960 pb la p40), la subunidad p35 presenta un tamaño mayor que el esperado de acuerdo a la secuencia de nucleótidos publicada en la base de datos *GenBank* (600 pb, No Acceso. M86672).

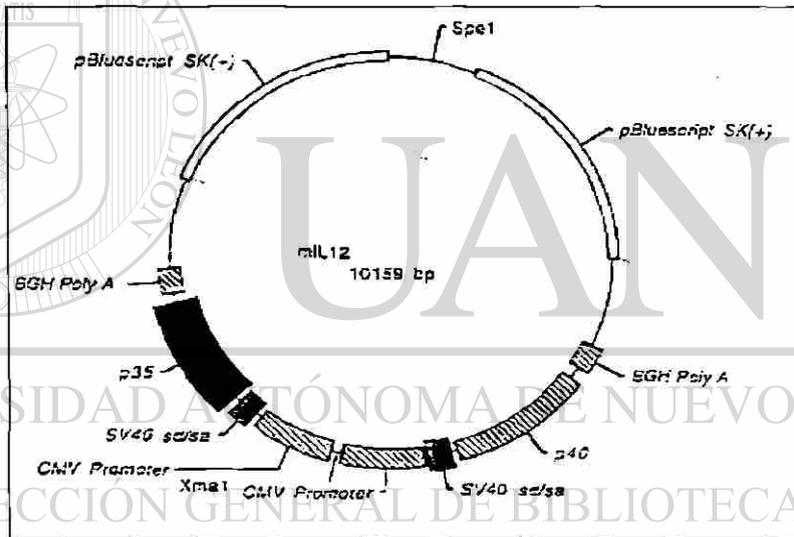


Fig. 1. Plásmido pWRG3169.

Esto se observó en varios experimentos en geles de agarosa y de acrilamida (mayor resolución) y fue consistente aún y cuando el plásmido usado como molde para el PCR (pWRG3169) fue enviado dos veces por el Dr. A. Rakhmievich. Por lo tanto se optó por secuenciar este producto de PCR. El resultado de esta secuenciación es que las ~70 pb de más, encontradas en el PCR, corresponden a un intrón (Fig. 3), el cual es seguramente procesado en células de mamíferos, pero no en células procariotes (*L. lactis*). Para eliminar este intrón se procedió a hacer una mutagénesis dirigida por PCR (ver material y métodos,

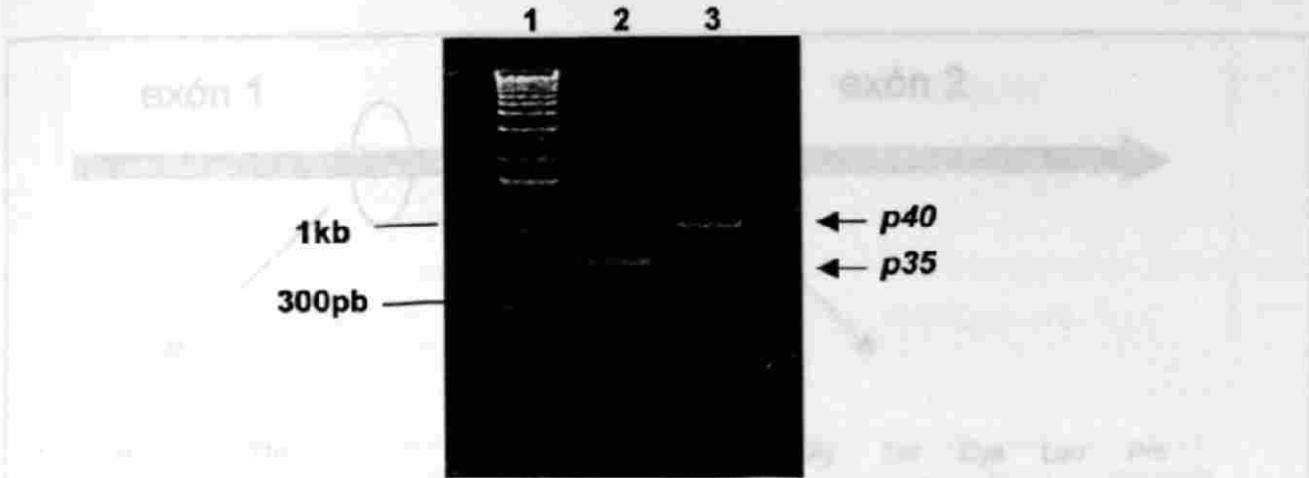


Fig. 2. Amplificación de los genes *p35* y *p40*. Carril 1, marcador de peso molecular 1 kb; carril 2; gene *p35*; carril 3, gene *p40*. Las bandas esperadas son señaladas con flechas.

Fig. 4), el resultado final es una subunidad *p35* con un nuevo sitio, *Bam*HI, el cual no modifica la secuencia de aminoácidos. Una vez eliminado el intrón de la subunidad *p35*, se continuó con la construcción del cassette pSEC:*p35*-*p40*, tal y como se describe en material y métodos. Este vector final tiene el terminador transcripcional, *trpA*, fusionado al extremo 3' del gene *p40* (Fig. 5). Esta construcción fue establecida en la cepa NZ9000 de *L. lactis* y se analizó su capacidad para secretar las subunidades *p35* y *p40* (Fig. 6a).

```
GATGCATCAGAGAGGGTCAATTCAGTCTCTGGACCTGCCAGGTGTCTTAGCCAGTCCCGA
AACCTGCTGAAGACCACAGATGACATGGTGAAGACGGCCAGAGAAAACTGAAACATTAT
TCCTGCACTGCTGAAGACATCGATCATGAAGACATCACACGGGACCAAACCAGCACATTG
AAGACCTGTTTACCACTGGAACACACAAGAACGAGAGTTGCCTGGCTACTAGAGAGACT
TCTTCCACAACAGTAAGTAGGCACTCTAAGGGTTCCTTCCCCATGACGGATTTCATAACAC
TGATGCCTGGTCATTCTTTCTCTAGAGAGGGAGCTGCCTGCCCCACAGAAGACGTCTTT
GATGATGACCCTGTGCCTTGGTAGCATCTATGAGGACTTGAAGATGTACCAGACAGAGTT
CCAGGCCATCAACGCAGCACTTCAGAATCACAAACCATCAGCAGATCATTCTAGACAAGGG
CATGCTGGTGGCCATCGATGAGCTGATGCAGTCTCTGAATCATAATGGCGAGACTCTGCG
CCAGAAACCTCCTGTGGGAGAAGCAGACCCTTACAGAGTAAAATGAAGCTCTGCATCCT
GCTTCACGCCTTCAGCACCCGCGTCGTGACCATCAACAGGGTGATGGGCTATCTGAGCTC
CGCCTGAGAATTCC
```

Fig. 3. Secuenciación del producto de PCR de la subunidad *p35*. Se secuenció el producto de PCR de la subunidad *p35* obtenido del vector pWRG3169. Como observamos en la secuencia, existe un fragmento adicional de 73 nucleótidos (negritas) el cual analizando las secuencias consenso del procesamiento de ARN en eucariotes, indican que se trata de un intrón.

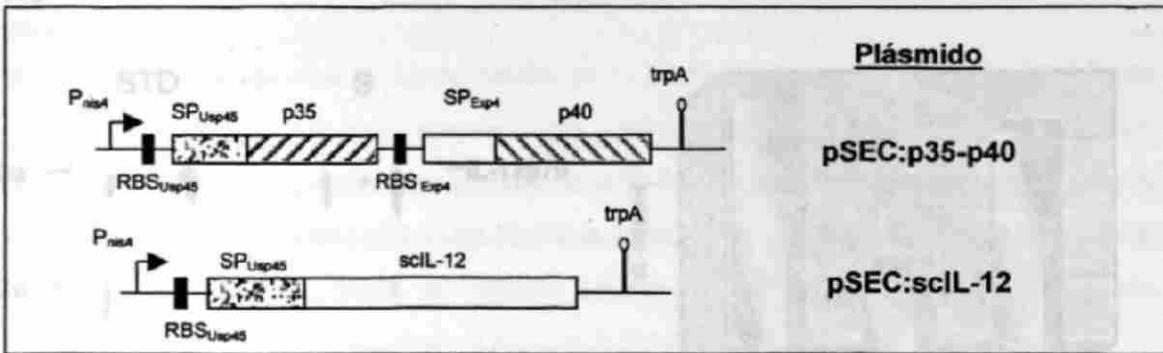


Fig. 5. Cassettes de expresión para la producción de p35, p40 e IL-12 de fusión en *L. lactis*. Diseños esquemáticos de las fusiones génicas de p35, p40 e IL-12 bajo el control del promotor P_{nisA} colocadas en los plásmidos indicados. Símbolos: \blacktriangleright , promotor lactococal inducible por nisina (P_{nisA}); \blacksquare , RBS del gene *usp45*; \square con líneas, péptido señal del gene *usp45*; \square con líneas, región codificante para p35; \blacksquare , RBS del gene *Exp4*; \square con líneas, péptido señal del gene *usp45*; \square con líneas, región codificante para p40; \square , región codificante la IL-12 de fusión; \Uparrow , terminador transcripcional.

Para determinar la capacidad de *L. lactis* para generar la forma heterodimérica (subunidad p35 unida a la p40, IL-12p70) en el medio de cultivo, preparamos muestras proteicas de cultivos inducidos de la cepa NZSEC:p35-p40 y las analizamos por Western blot después

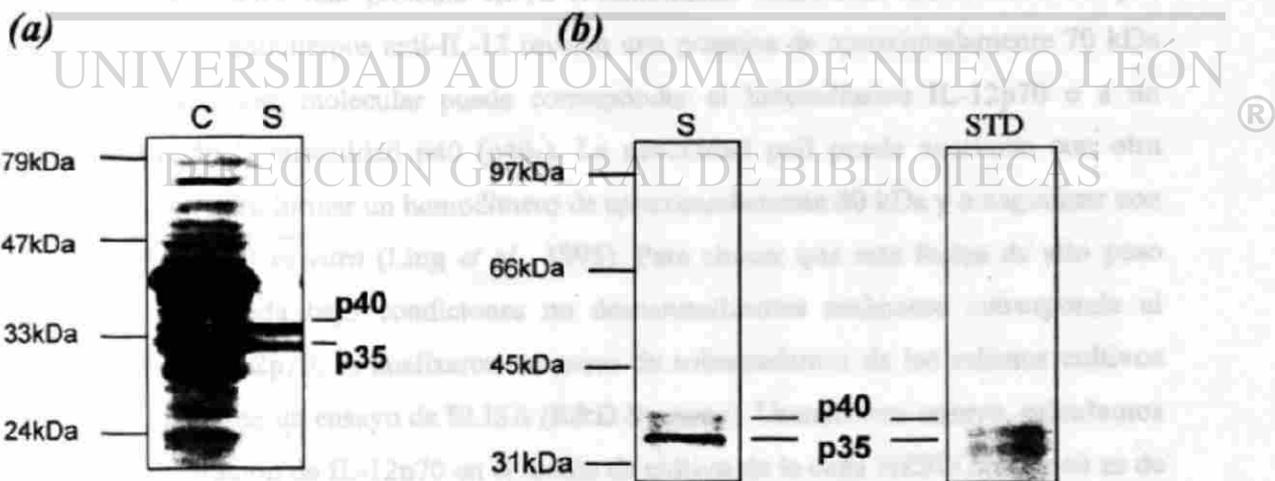


Fig. 6. Análisis de la producción de IL-12 por *L. lactis*. Se analizó por Western blot la producción de las subunidades p35 y p40 de la IL-12 de cultivos inducidos del lactococos recombinante. (a) C, fracción celular de la cepa NZSEC:p35-p40 expresando las subunidades p35 y p40 (IL-12p70); S, muestras de sobrenadante. (b) Muestras de sobrenadante de la cepa NZSEC:p35-p40 (S) comparadas contra una IL-12 comercial (STD, R&D Systems). Las posiciones del marcador de peso molecular son indicadas a la izquierda.

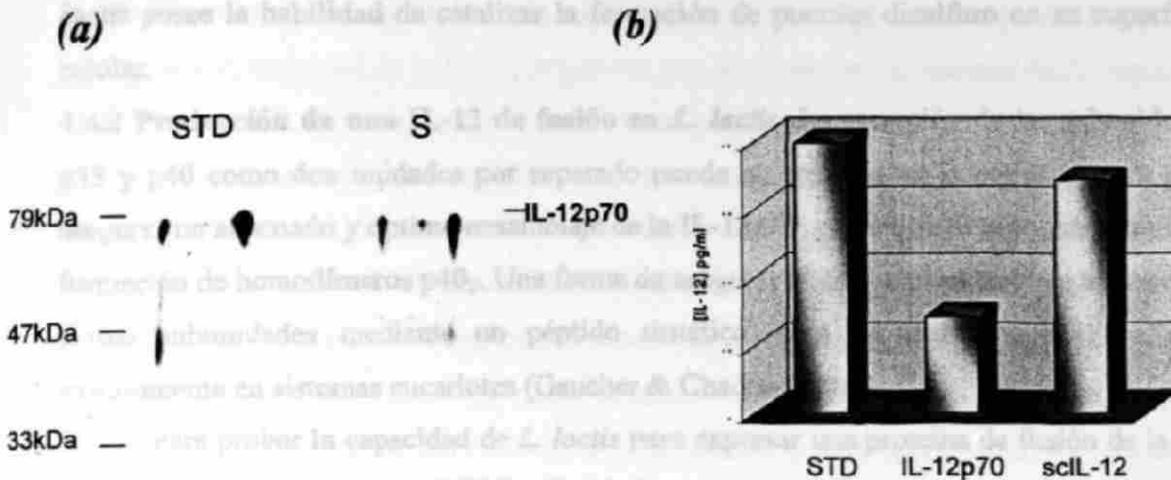


Fig. 7. Análisis de la producción de IL-12p70 producida por *L. lactis* por gel de acrilamida bajo condiciones no desnaturalizantes y por ELISA. (a) Gel de acrilamida bajo condiciones no desnaturalizantes y Western blot de la IL-12p70. STD, IL-12 recombinante usada como control (R&D Systems); S, muestra de sobrenadante de cultivos inducidos de la cepa NZSEC:p35-p40. **(b)** Cuantificación de la IL-12p70 producida por *L. lactis* por ELISA. STD, 80 pg del control (IL-12 recombinante R&D Systems); IL-12p70, muestras de cultivos inducidos de la cepa NZSEC:p35-p40; y scIL-12, muestras de cultivos inducidos de la cepa NZSEC:scIL-12.

de migrar las muestras en un gel de acrilimida bajo condiciones no desnaturalizantes y comparándola contra una proteína IL-12 recombinante comercial. Los resultados por Western usando anticuerpos anti-IL-12 revelan una proteína de aproximadamente 70 kDa (Fig. 7a). Este peso molecular puede corresponder al heterodímero IL-12p70 o a un homodímero de la subunidad p40 ($p40_2$). La subunidad p40 puede asociarse con otra subunidad p40 para formar un homodímero de aproximadamente 80 kDa y antagonizar con la forma IL-12p70 *in vitro* (Ling *et al.*, 1995). Para checar que esta forma de alto peso molecular observada bajo condiciones no desnaturalizantes realmente corresponde al heterodímero IL-12p70, se analizaron muestras de sobrenadantes de los mismos cultivos inducidos mediante un ensayo de ELISA (R&D Systems). Usando este ensayo, calculamos que la concentración de IL-12p70 en el medio de cultivo de la cepa NZSEC:p35-p40 es de 25 pg/ml (Fig. 7b). Como control, se incluyó una IL-12 recombinante (80pg/mL) incluida en el kit. Estos resultados muestran que: i) *L. lactis* es capaz de secretar las subunidades p35 y p40 de la IL-12 y ii) que al menos parte de estas subunidades son adecuadamente ensambladas para formar la forma activa de esta citocina, IL-12p70. Esto sugiere que *L.*

lactis posee la habilidad de catalizar la formación de puentes disulfuro en su superficie celular.

4.4.2 Producción de una IL-12 de fusión en *L. lactis*. La secreción de las subunidades p35 y p40 como dos unidades por separado puede no representar la mejor manera para asegurar un adecuado y óptimo ensamblaje de la IL-12p70, ya que esta estrategia permite la formación de homodímeros p40₂. Una forma de asegurar el correcto ensamblaje es fusionar ambas subunidades mediante un péptido sintético. Esta estrategia ha sido probada exitosamente en sistemas eucariotes (Gaucher & Chadee, 2001).

Para probar la capacidad de *L. lactis* para expresar una proteína de fusión de la IL-12 (scIL-12) se usó la cepa NZSEC:scIL-12. Para esto, se prepararon muestras proteicas de cultivos inducidos de dicha cepa y se compararon por Western blot contra muestras de la cepa NZSEC:p35-p40. Los análisis por inmunorevelación usando anticuerpos anti-IL-12, revelan una clara banda del tamaño esperado para la scIL-12 (70 kDa, Fig. 8). La cantidad de scIL-12 secretada al medio de cultivo se estimó del mismo modo que para el de las subunidades p35 y p40 y se comparó la producción de ambas formas, además de incluir como control la IL-12 recombinante (STD, Fig. 7b). La cantidad de scIL-12 se estimó dos veces mayor que el de la IL-12p70 (65 pg/mL versus 25 pg/mL; Fig. 7b). Estos resultados muestran que *L. lactis* secreta eficientemente la scIL-12, la cual es procesada en una conformación activa comparable al de la proteína nativa.

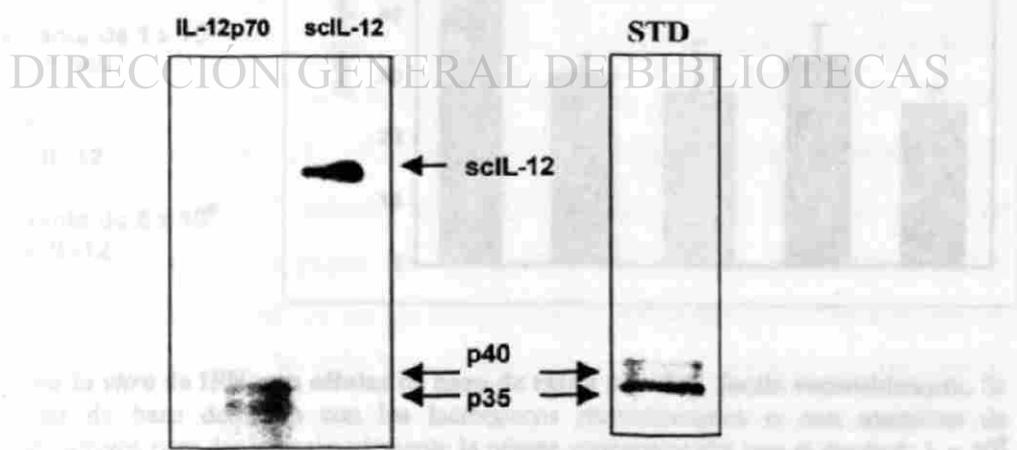


Fig. 8. Producción de la scIL-12 por *L. lactis*. Se analizaron por Western blot muestras de sobrenadante de cultivos inducidos de la cepa NZSEC:scIL-12 (scIL-12) y se compararon con muestras de cultivos de la cepa NZSEC:p35-p40 (IL-12p70) y con el control (STD).

4.4.3 Caracterización funcional (bioactividad) de la IL-12 producida por *L. lactis*. Para determinar la actividad de la IL-12 producida por las cepas recombinantes de *L. lactis* (IL-12p70 y scIL-12), se midió la capacidad de estas proteínas para inducir producción de IFN- γ tal y como se describió en material y métodos. Las células de bazo se cultivaron con 50 pg/mL de una IL-12 recombinante comercial (rIL-12), además se calculó la cantidad de sobrenadante o cultivo celular necesario para obtener iguales cantidades de IL-12 y se adicionaron a las células de bazo para el ensayo de inducción de IFN- γ . Después de 48 hrs de incubación se obtuvo el sobrenadante de las células de bazo y se midió la concentración de IFN- γ por ELISA (Fig. 9). Estos resultados revelan que 50 pg de la rIL-12 inducen la producción de 60 pg/mL de IFN- γ mientras que la scIL-12 producida por 5×10^8 CFU de la cepa NZSEC:scIL-12 ó el contenido del sobrenadante correspondiente inducen la producción de 33 pg/ml y 26 pg/mL, respectivamente. La cepa NZSEC:p35-p40 productora de la forma IL-12p70 muestra resultados similares: 30 pg/mL para 1×10^9 CFU y 28 pg/mL para su sobrenadante (Fig. 9). Como control negativo se incubaron células de bazo con la

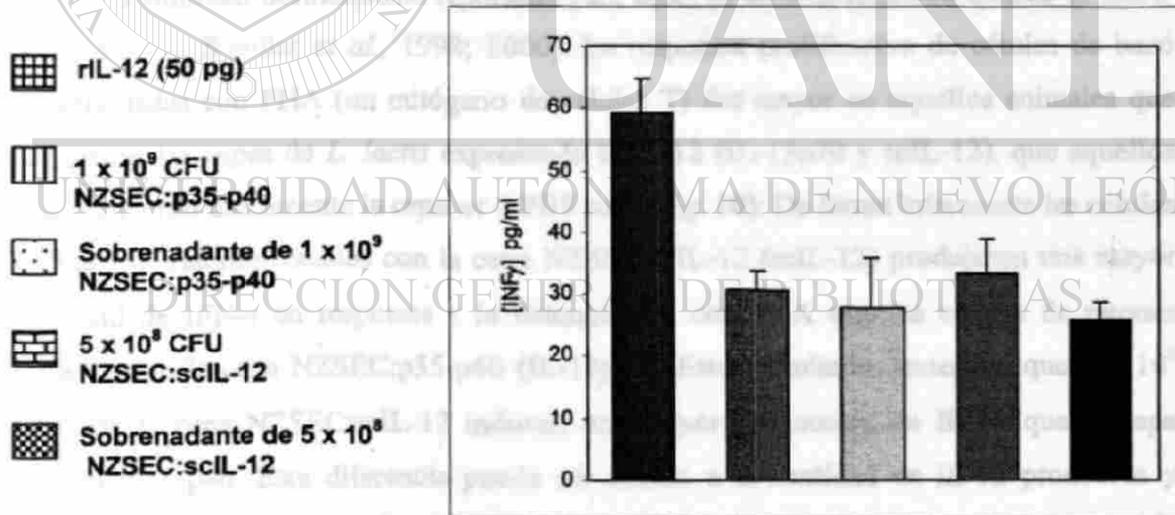


Fig. 9. Inducción *in vitro* de IFN- γ en células de bazo de ratón por el *L. lactis* recombinante. Se incubaron células de bazo de ratón con los lactococcos recombinantes o con muestras de sobrenadante de cultivos para dar aproximadamente la misma concentración que el control: 1×10^9 para la cepa NZSEC:p35-p40 y 5×10^8 para NZSEC:IL-12. La concentración de IFN- γ fue de 60 pg/ml para el control (rIL-12), 30 y 28 pg/mL para las células de la cepa NZSEC:p35-p40 y su sobrenadante respectivamente y 33 pg/mL y 26 pg/mL para la cepa NZSEC:IL-12. Los valores están registrados como la media \pm SE de tres diferentes experimentos.

cepa *wt* de *L. lactis* o con PBS solo. Como se esperaba, en estas muestras no se detectó inducción de IFN- γ (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren que la scIL-12 y la IL-12p70 tienen actividad específica similares ya que la inducción usando cantidades iguales de cada una resulta en cantidades iguales de IFN- γ . Sin embargo hay que resaltar que la cantidad usada de la cepa NZSEC:p35-p40 para obtener los mismos efectos que la cepa NZSEC:scIL-12 fue dos veces mayor (1×10^9 CFU *versus* 5×10^8 CFU). Esto puede representar un problema para propósitos de vacunación, ya que debería administrarse un gran número de células para obtener una buena respuesta.

4.4.4 Administración intranasal con *L. lactis* recombinante induce la producción de IFN- γ en células de bazo *in vivo*. Se midió la actividad biológica de la proteína IL-12 producida por *L. lactis in vivo* después de la administración *in* de cultivos inducidos de las cepas recombinantes tal y como se describió en material y métodos.

Dado que el objetivo final de este trabajo es el de construir una cepa para uso en terapia, administramos 5×10^8 CFU de cada cepa (NZSEC:p35-p40 ó NZSEC:scIL-12), que es la cantidad normalmente reportada para ensayos de inmunización usando *L. lactis* como vector (Steidler *et al.*, 1998; 2000). La respuesta proliferativa de células de bazo reestimuladas con PHA (un mitógeno de células T) fue mayor en aquellos animales que recibieron las cepas de *L. lactis* expresando la IL-12 (IL-12p70 y scIL-12), que aquellos que recibieron únicamente la cepa *wt* ó PBS solo (Fig. 10). De forma interesante las células de bazo de ratones tratados con la cepa NZSEC:scIL-12 (scIL-12) produjeron una mayor cantidad de IFN- γ en respuesta a la estimulación con PHA que las células de ratones tratados con la cepa NZSEC:p35-p40 (IL-12p70). Estos resultados muestran que 5×10^8 CFU de la cepa NZSEC:scIL-12 inducen una mayor producción de IFN- γ que la cepa NZSEC:p35-p40. Esta diferencia puede ser debido a la cantidad de IL-12 producida y observada en las muestras de cultivo de los lactococos recombinantes en los ensayos de inmunodetección y ELISA (Fig. 7b y 8). Las células de bazo de los ratones que recibieron la cepa *wt* produjeron muy bajas cantidades de IFN- γ , y aquellos que recibieron PBS solo no presentaron evidencia de producción de IFN- γ (datos no mostrados).

-  PBS
-  *L. lactis* (wt)
-  NZSEC:p35-p40
-  NZSEC:scIL-12

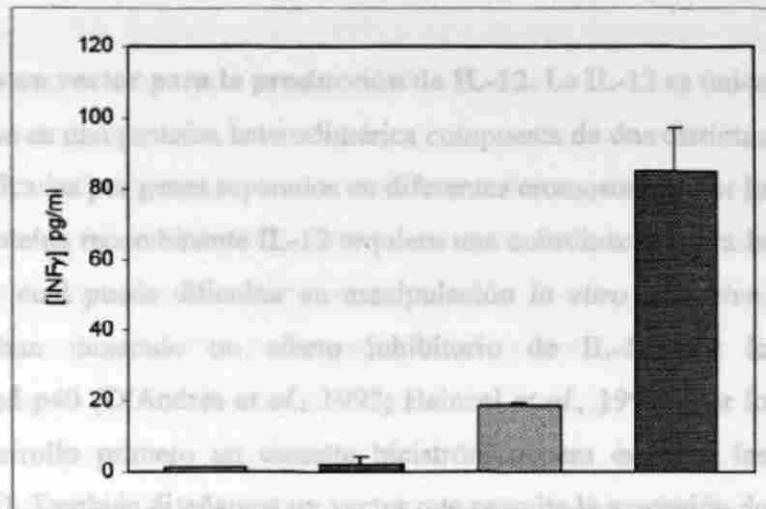


Fig. 10. Producción de IFN- γ de células de bazo de ratones tratados con *L. lactis* recombinantes. Los niveles de IFN- γ fueron analizados después de sacrificar a los ratones inmunizados con 5×10^8 CFU de *L. lactis* recombinantes (día 35). Note que ambas cepas fueron administradas a la misma concentración. Los resultados muestran una mayor producción de IFN- γ en los ratones que recibieron la cepa NZSEC:IL-12 que aquellos que recibieron la NZSEC:p35-p40. Los ratones que recibieron la cepa wt muestran un bajo incremento de IFN- γ y los que fueron inmunizados con PBS no muestran evidencia en la inducción de IFN- γ . Los valores fueron registrados como la media \pm SE de n =tres ratones/grupo tratado.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



4.5 DISCUSION

4.5.1 *Lactococcus lactis* como un vector para la producción de IL-12. La IL-12 es única entre las interleucinas dado que es una proteína heterodimérica compuesta de dos distintas subunidades (p35 y p40) codificadas por genes separados en diferentes cromosomas. Por lo tanto la producción de una proteína recombinante IL-12 requiere una coordinación para la expresión de ambos genes lo cual puede dificultar su manipulación *in vitro* e *in vivo*. Además, estudios previos han mostrado un efecto inhibitorio de IL-12 por la sobreexpresión de la subunidad p40 (D'Andrea *et al.*, 1992; Heinzel *et al.*, 1994). Por lo tanto en este trabajo se desarrollo primero un cassette bicistrónico para expresar las subunidades p35 y p40 (Fig. 5). También diseñamos un vector que permite la expresión de una IL-12 de fusión (Fig. 5). Este cassette garantiza la estequiometría de la IL-12, ya que ambas subunidades (p35 y p40) se encuentran unidas covalentemente por un péptido sintético; además, presenta la ventaja de ser de fácil manipulación y la capacidad para co-expresar otro gene con dicha citocina. A pesar de que ambas construcciones tienen un diseño similar y que las inducciones fueron iguales, los datos obtenidos por ELISA muestran que los niveles de producción de la scIL-12 son de forma significativa mayores que los de las dos subunidades (p35 y p40). Se ha reportado que la subunidad p40 es capaz de formar homodímeros (p40)₂ (Ling *et al.*, 1995). Este fenómeno puede explicar que la cantidades de IL-12 activa, sean menor cuando se co-expresan las subunidades p35 y p40 por separado. Ya que un exceso en la producción de p40 tiene efectos inhibitorios sobre los efectos biológicos del heterodímero IL-12 (IL-12p70, Ling *et al.*, 1995), es preferible el uso de la IL-12 de fusión (scIL-12) para aplicaciones *in vivo*.

A la fecha, la mayoría de los reportes en la producción de IL-12 han sido en sistemas eucariotes (Gaucher & Chadee, 2001; Takehara *et al.*, 2000; Kokuho *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 1998). Recientemente Steidler *et al.* (2000) demostraron que *L. lactis* es capaz de producir y secretar en forma biológicamente activa la IL-10, una interleucina monomérica. En contraste, en este trabajo, nosotros demostramos por primera vez que *L. lactis* es capaz de producir, secretar y ensamblar la IL-12, una proteína dimérica, que requiere la formación de puentes disulfuro para un apropiado ensamblaje. La formación de puentes disulfuro representa un cuello de botella en la producción de proteínas heterólogas

en sistemas procariotes, específicamente en organismos Gram positivos, ya que no poseen espacio periplásmico (Qiu *et al.*, 1998; Bolhuis *et al.*, 1999b). Este trabajo demuestra que *L. lactis* puede ser usado como un vector para la producción de proteínas que posean puentes disulfuro. Sería interesante analizar la producción en *L. lactis* de otras proteínas heterólogas que contengan puentes disulfuro, tales como el activador del plasminógeno, el cual contiene 17 puentes disulfuro (Qiu *et al.*, 1998). Estudios previos demuestran que es difícil la producción de este activador en una conformación correcta en *E. coli*, y que dicha producción puede optimizarse por la co-expresión de una cisteína oxidoreductasa en el periplasma de la bacteria (Qiu *et al.*, 1998). El creciente conocimiento del genoma de *L. lactis* (Bolotin *et al.*, 2001) y la posterior caracterización de la maquinaria de secreción podría en un futuro no muy lejano permitir la construcción de cepas recombinantes de *L. lactis* con capacidad para realizar modificaciones post-traduccionales, incluyendo la formación de puentes disulfuro.

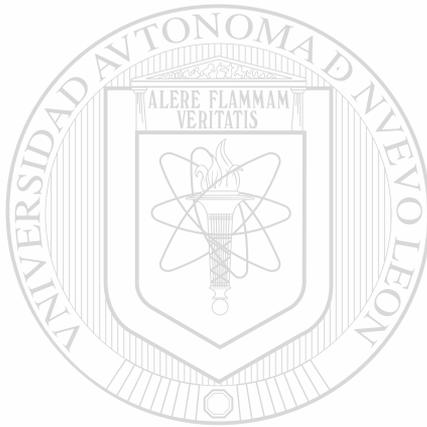
4.5.2 *Lactococcus lactis* como vector de expresión de IL-12 para el desarrollo de una vacuna y para terapia antitumoral. Dado que un gran número de vacunas son poco inmunogénicas, es de particular interés el uso de adyuvantes para el diseño de nuevas vacunas contra enfermedades infecciosas. La toxina del cólera (CT) y la enterotoxina de *E. coli* (LT) son dos potentes adyuvantes, sin embargo causan serias diarreas en humanos e inducen una respuesta Th2 que pueden pronunciar la patología más que erradicarla (Graham *et al.*, 1991, 1993). La IL-12 ha demostrado ser útil cuando es co-expresada con un antígeno en el desarrollo de vacunas (Boyaka & McGhee, 2001). La IL-12 previene el desarrollo de tolerancia a un antígeno dado (Chen *et al.*, 2001). Esta última característica es de gran interés para el desarrollo de vacunas vivas, ya que la persistencia del antígeno en la mucosa puede despertar una respuesta no deseada de tolerancia. La producción de la IL-12 por *L. lactis* ofrece diferentes ventajas: i) *L. lactis* no persiste en el organismo en modelos animales, y ii) la IL-12 aumenta la respuesta inmune hacia al antígeno de interés y previene la tolerancia. Estas características hacen a las cepas recombinantes de *L. lactis* descritas en este trabajo, de gran interés para usarse como adyuvantes en el desarrollo de vacunas vivas o para experimentos de inmunomodulación en estudios de alérgenos en los alimentos.

Steidler *et al.* (2000) mostraron que la IL-10 puede ser expresada de forma eficiente en ratones mediante la administración oral una cepa recombinante de *L. lactis*. La

concentración de interleucina necesaria para obtener una respuesta inmune se calculó: 10 veces menor que aquella administrada de forma sistemática. La administración local de citocinas por la bacteria grado alimenticio *L. lactis* parece por lo tanto ser más efectiva que la administración sistemática. Esto es de gran interés en nuestro caso, ya que la IL-12 administrada sistemáticamente ha presentado efectos negativos. Así, nuestras cepas recombinantes representan excelentes vectores para la expresión a nivel mucosas de la IL-12 en tratamientos donde es preferible la administración local que la sistemática.

La IL-12 posee también un potente efecto antitumoral y puede representar un atractivo agente en la inmunoterapia contra el cáncer. Sin embargo, a pesar del éxito que ha tenido la IL-12 en la terapia contra el cáncer, modelos clínico experimentales (donde esta citocina es administrada de forma sistemática) han mostrado una alta toxicidad, relacionada a una elevada producción de IFN- γ . El IFN- γ tiene una variedad de efectos inmunoregulatorios, entre los cuales se incluye la inducción de la diferenciación celular Th1 y activación de células NK (Boehm *et al.*, 1997). No obstante, aunque una respuesta inflamatoria mediada por citocinas, puede ser protectora, una producción elevada de estas citocinas (IFN- γ , por ejemplo) puede resultar en un efecto tóxico (Cowdery *et al.*, 1996). Por esto y ya que la inducción de IFN- γ por la IL-12 representa la más clara función biológica de esta citocina, en este trabajo se determinó si la IL-12 producida por *L. lactis* induce IFN- γ con o sin efectos co-laterales. Los resultados obtenidos muestran que la administración *i.n.* de *L. lactis* que expresa la IL-12 induce la producción de bajos niveles de IFN- γ sin aparente toxicidad. Además nuestra cepa recombinante de *L. lactis* carece de cualquier capacidad para multiplicarse *in vivo*, lo cual aunado al hecho de que el sistema de expresión de IL-12 es inducible (por la nisina), garantiza que la cantidad de citocina administrada es única y la respuesta inmune dependerá de la capacidad de *L. lactis* para expresar la proteína a través de su paso por las mucosas. Segundo, la ruta de administración *i.n.* puede despertar una respuesta de anticuerpos local en la entrada de la mayoría de los patógenos. Tercero, varios antígenos expresados en *L. lactis* son poco inmunogénicos (Lee *et al.*, 2001; L. Ribeiro *et al.*, comunicación personal, y nuestras observaciones). Por lo tanto el uso de las cepas recombinantes de *L. lactis* productoras de IL-12 co-expresando antígenos, podría ser de particular interés en el desarrollo de vacunas. Cuarto, *L. lactis*, al igual que otras BL grado alimenticio, tienen la ventaja de ser administradas fácilmente (*i.n.*

u oral), bajos costos de producción y preservación a largo tiempo, lo cual hace que este vector pueda ser fácilmente distribuido para su aplicación en todo el mundo (sobre todo en países en vías de desarrollo). Finalmente el mayor aporte de este trabajo es que las cepas aquí reportadas son capaces de producir y expresar a nivel mucosa después de una administración *i.n.* la IL-12. El uso de *L. lactis* expresando IL-12 en terapia puede representar una mejor alternativa que el uso de la terapia sistémica manteniendo bajos niveles de producción de IFN- γ .



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.6 REFERENCIAS

- Arulanandam BP, O'Toole M, & Metzger DW. (1999). Intranasal interleukin-12 is a powerful adjuvant for protective mucosal immunity. *Journal of Infectious Diseases*. 180:940-994.
- Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Miyoshi A, Gruss S, Támara-Guerra R, Montes de Oca-Luna R, & Le Loir Y. (2002). Expression of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:917-922.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, & Howard JC. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annual Review in Immunology*. 15:749-795.
- Bolhuis A, Venema G, Quax WJ, Bron S, van Dijk JM. (1999a). Functional analysis of paralogous thiol-disulfide oxidoreductases in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*. 274:24531-24538.
- Bolhuis A, Tjalsma H, Smith HE, de Jong A, Meima R, Venema G, Bron S, & van Dijk JM. (1999b). Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Applied Environmental Microbiology*. 65:2934-41.
- Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarme K, Weissenbach J, Ehrlich SD, & Sorokin A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research*. 11:731-753.
- Boyska PN, & McGhee JR. (2001). Cytokines as adjuvants for the induction of mucosal immunity. *Advances Drug, Deliv. Rev.* 51:71-79.
- Brunda M, Luistro L, Warrier R, Wright R, Hubbard B, Murphy M, Wolf S, & Gately MK. (1993). Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *Journal of Experimental Medicine*. 178:1223-1230.
- Chan SH, Perussia B, Grupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SG, Young D, Clark SC, & Trinchieri G. (1991). Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *Journal of Experimental Medicine*. 173:869-879.
- Chen B, Timiryasova TM, Gridley DS, Andres ML, Dutta-Roy R, & Fodor L (2001). Evaluation of cytokine toxicity induced by vaccinia virus-mediated il-2 and il-12 antitumor immunotherapy. *Cytokine*. 15:305-134.

- Chatel JM, Langella P, Adel-Patient K, Commissaire J, Wal JM, & Corthier G. (2001). Induction of Mucosal Immune Response after Intranasal or Oral Inoculation of Mice with *Lactococcus lactis* Producing Bovine Beta-Lactoglobulin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8:545-551.
- Chizzonite R, Truitt T, Podlaski FJ, Wolitzky AG, Quinn PM, Nunes P, Stern AS, & Gately MK. (1991). IL-12: monoclonal antibodies specific for the 40-kDa subunit block receptor binding and biologic activity on activated human lymphoblasts. *Journal of Immunology*. 147:1548-1556.
- Chung YS, Breidt F, & Dubnau D. (1998). Cell surface localization and processing of the ComG proteins, required for DNA binding during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 29:905-913.
- Claessen AM, von Blomberg BM, De Groot J, Wolvers DA, Kraal G, & Scheper R. (1996). Reversal of mucosal tolerance by subcutaneous administration of interleukin-12 at the site of attempted sensitization. *Journal of Immunology*. 88:363-367.
- Cowdery JS, Chace JH, Yi AK, & Krieg AM. (1996). Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *Journal of Immunology*. 156:4570-4575.
- Cohen J. (1995). IL-12 deaths: explanation and a puzzle. *Science*. 270:908.
- D'Andrea A, Rengaraju M, Vallante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, Chan SH, Kobayashi M, Young D, Nick-barg E, Chizzonite R, Wolf SF, & Trinchieri G. (1992). Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Experimental Medicine*. 176:1387.
- Dieye Y, Usai S, Clier F, Gruss A, & Piard JC. (2001). Optimizing protein targeting in lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. 183:4157-4166.
- Enouf V, Langella P, Commissaire J, Cohen J, & Corthier G. (2001). Bovine Rotavirus Nonstructural Protein 4 Produced by *Lactococcus lactis* Is Antigenic and Immunogenic. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:1423-1428.
- Fleury Y, Dayem MA, Montagne JJ, Chaboisseau E, Le Caer JP, Nicolas P, & Delfour A. (1996). Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Biological Chemistry*. 271:14421-14429.

- Gasson MJ. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic acid streptococci after protoplast-induced curing *Journal of Bacteriology*. 154:1-9.
- Gaucher D, & Chadee K. (2001). Molecular cloning of gerbil interleukin 12 and its expression as a bioactive single-chain protein. *Cytokine*. 14:177-183.
- Gibson TJ. (1984). PhD thesis. University of Cambridge, Cambridge, England.
- Graham BS, Bunton LA, Wright PF, & Karzon DT. (1991). Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 88:1026-1033.
- Graham BS, Henderson GS, Tang YW, Lu X, Neuzil KM, & Colley DG. (1993). Priming immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus. *Journal of Immunology*. 151:2032-2040.
- Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, Dwyer CM, McComas W, Motyka R, Mabavi N, Wolitzky AG, Quinn PM, Familletti PC, & Gately MK. (1991). Coexpression of Two Distinct Genes is Required to Generate Secreted Bioactive Cytotoxic Lymphocyte Maturation Factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 88:4143-4147.
- Heinzel FP, Rerko DM, Ling P, Hakimi J, & Schoenhautl DS. (1994). Interleukin 12 is produced in vivo during endotoxemia and stimulates synthesis of gamma interferon. *Infection and Immunity*. 62:4244.
- Hessle C, Hanson LA, & Wold AE. (1999). Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clinical and Experimental Immunology*. 116:276-282.
- Hessle C, Andersson B, & Wold AE. (2000). Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infection and Immunity*. 68:3581-3586.
- Hultgren OH, Stenson M, & Tarkowski A. (2001). Role of IL-12 in *Staphylococcus aureus*-triggered arthritis and sepsis. *Arthritis Research*. 3:41-47.
- Jacobson MA, Hardy D, Connick E, Watson J, & DeBruin M. (2000). Phase 1 trial of a single dose of recombinant human interleukin-12 in human immunodeficiency virus-infected patients with 100-500 CD4 cells/microl. *Journal of Infection Diseases*. 182:1070-1076.

- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chang S, Koudon R, Sherman F, Perussia B, & Trinchieri G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes *Journal of Experimental Medicine* 170:827-845.
- Kokuho T, Watanabe S, Yokomizo Y, & Inumaru S. (1999). Production of biologically active, heterodimeric porcine interleukin-12 using a monocistronic baculoviral expression system. *Veterinary and Immunological Immunopathology*. 72:289-302.
- Kuipers OP, de Ruyter PG, Kleerebezen M, & de Vos WM. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 64:15-21.
- Langella P, & Le Loir Y. (1999). Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. 32:191-198.
- Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, & Langella P. (1998). A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 180:1895-1903.
- Lee M H, Roussel Y, Wilks M, & Tabaqchali S. (2001). Expression of Helicobacter pylori urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against H. pylori infection in mice. *Vaccine*. 19:3927-3935.
- Ling P, Gately MK, Gubler U, Stern AS, Lin P, Hollfelder K, Su C, Y-C, E. Pan, & Hakimi J. (1995). Human IL-12 p40 Homodimer Binds to the IL-12 Receptor but Does Not Mediate Biologic Activity. *Journal of Immunology*. 154:116-127.
- Lui VW, Falo LD, & Huang L. (2001). Systemic production of IL-12 by naked DNA mediated gene transfer: toxicity and attenuation of transgene expression in vivo. *Journal of Medical Genetics*. 3:384-393.
- Mazzolini G, Narvaiza I, Perez-Diez A, Rodriguez-Calvillo M, Qian C, Sangro B, Ruiz J, Prieto J, Melero L. (2001). Genetic heterogeneity in the toxicity to systemic adenoviral gene transfer of interleukin-12. *Gene Therapy*. 8:259-267.
- Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J, Pirhonen J, Varkila K, Kurimoto M, & Julkunen I. (1998). Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity*. 66:6058-6062.

Nastala C, Edington H, McKinney T, Fahara H, Nalesnik M, Brunda M, Gately MK, Wolf S, Schreiber R, Storkus W, & Lotze M. (1994). Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *Journal of Immunology*. 153:1697-1703.

Okada E, Sasaki S, Ishii N, Aoki I, Yasuda T, Nishioka K, Fukushima J, Miyazaki J, Wahren B, & Okuda K. (1997). Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens. *Journal of Immunology*. 159:3638-3636.

Paik SH, Chakicherla A, & Hansen JN. (1998). Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological Chemistry*. 273:23134-23142.

Payne MS, & Jackson EN. (1991). Use of alkaline phosphatase fusions to study protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 173:2278-2282.

Piard JC, Jimenez-Diaz R, Ehrlich SD, Fischetti VA, & Gruss A. (1997). The M6 protein of *Streptococcus pyogenes* and its potential as a tool to anchor biologically active molecules at the surface of lactic acid bacteria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. p.545-550.

Poquet I, Ehrlich SD, & Gruss A. (1998). An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 7:1904-12.

Qiu J, Swartz JR, & Georgiou G. (1998). Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:4891-4896.

Rakhmievich AL, Turner J, Ford MJ, McCabe D, Sun WH, Sondel PM, Grota K, & Yang N-Y. (1996). Gene gun-mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established and metastatic murine tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 93:6291-6296.

Ribeiro LA, Azevedo V, Le Loir Y, Oliveira SC, Dieye Y, Piard JC, Gruss A, & Langella P. (2002). Efficient targeting of the *Brucella abortus* immunodominant antigen

L7/L12 by *Lactococcus lactis*: a first step towards new live vaccines against brucellosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:910-916.

Shen H, Li C, Liu M, Zhang Z, & Shen Q. (1998). Expression of human interleukin 12 (hIL-12) in insect cells. *Chinese Journal of Biotechnology*. 14:205-212.

Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remaut E, Le Page RW, & Wells JM. (1998). Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infection and Immunity*. 66:3183-3189.

Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, & Remaut E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*. 289:1352-1355.

Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, Familletti PC, Gately MK, & Gubler U. (1992). Cloning and expression of murine IL-12. *Journal of Immunology*. 148:3433-3440.

Takehara K, Nagata T, Kikuma R, Takanashi T, Yoshiya S, Yamaga A, Yokomizo Y, & Nakamura M. (2000). Expression of a bioactive bovine interleukin-12 using baculovirus. *Veterinary and Immunological Immunopathology*. 77:15-25

Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G, D'Amata RJ, & Folkman J. (1995). Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *Journal of the National Cancer Institute*. 19:581-586.

Van Parijs L, Perez VL, Biuckians A, Maki RG, London CA, Abbas AK. (1997). Role of interleukin 12 and costimulators in T cell anergy in vivo. *J. Exp. Med*. 186:1119-1128.

Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young E, Dieig M, Lowe L, Dzialo R, Fitz L, Ferenz C, Hewick RM, Kelleher K, Herrmann SH, Clark SC, Azzoni L, Chan H, Trinchieri G, & Perussia B. (1991). Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *Journal of Immunology*. 146:3047-3081.

5.1 Inducción de una respuesta inmune contra la proteína E7 del VPH-16 mediante su expresión en *Lactococcus lactis* y la de la IL-12 murina

RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) representa uno de los problemas más graves de salud pública a nivel mundial. El virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16) es el principal agente etiológico del CaCu y algunas de las estrategias que se han desarrollado en los últimos años para combatirlo es el desarrollo de vacunas contra este virus. Desgraciadamente muchas de estas estrategias resultan poco confiables ó recomendables en pacientes inmunosuprimidos o en infantes debido a su patogenicidad. Como se menciona al principio de este trabajo el objetivo final de nuestro estudio es el inducir inmunidad específica contra la proteína E7 del VPH-16. Para esto se llevo a cabo la construcción de cepas recombinantes de *Lactococcus lactis* que expresan la proteína E7 en diferentes localizaciones celulares (citoplasma y secretada) y bajo diferentes condiciones de crecimiento celular. Además se analizó el efecto estabilizador de una proteína de fusión Nuc-E7. Por otro lado con el propósito de incrementar la respuesta inmune contra E7 construimos una cepa de *L. lactis* capaz de secretar dos tipos de IL-12 murina (fuerte estimulador del sistema inmune) de forma biológicamente activa: IL-12 dimerica (subunidades p35 y p40, IL-12p70) y una IL-12 monomérica (ambas subunidades fusionadas, scIL-12). En esta parte final de nuestro estudio se analizó la capacidad de las diferentes cepas construidas para despertar una respuesta inmune específica de antígeno (E7). Los resultados obtenidos después de la administración intranasal en ratones muestran que la cepa más inmunogénica es aquella que expresa la proteína de fusión Nuc-E7 en forma secretada. Además cuando esta proteína es co-expresada con la scIL-12, aumenta de forma significativa la respuesta inmune. Estos resultados muestran el gran potencial de nuestro sistema como un modelo seguro de vacuna contra el VPH y otras neoplasias relacionadas.

5.2 INTRODUCCION

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) representa uno de los problemas más graves de salud pública a nivel mundial. En México es la principal causa de muerte por neoplasias en las mujeres de 25 años y más y en 1997 se registraron 4,534 defunciones. Esto significa que mueren en el país 1 mujer cada 2 horas a causa de esta enfermedad (Mohar *et al.*, 1997). En los últimos años se han encontrado fuertes evidencias de que el principal factor causante del CaCu es la infección por el virus del papiloma humano tipo-16 (VPH-16). Bishop *et al.* (1995) calcula que es muy probable que el número de casos de CaCu aumente significativamente en los próximos años, esto debido a que conforme aumenta la edad de la población y aumenta el número de mujeres infectadas por el VPH o se encuentran inmunosuprimidas por la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), también aumentarían los casos de mujeres con CaCu. El VIH aumenta la susceptibilidad al CaCu y sus lesiones precancerosas.

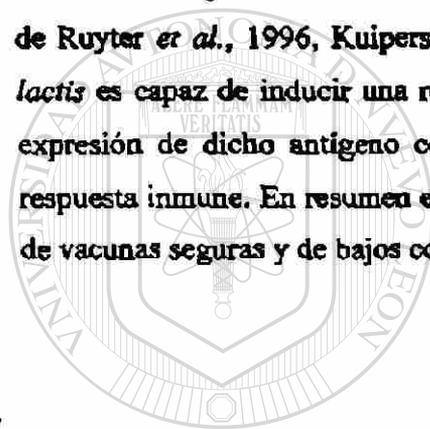
Estudios previos han demostrado que el transcrito y proteína viral más abundante en lesiones cervicales asociadas al VPH-16 es la proteína E7, por lo que representa un potencial candidato para el desarrollo de una vacuna contra el CaCu asociado a la infección por el VPH.

Las tradicionales vacunas administradas de forma intramuscular o vía subcutánea (inyectables), están principalmente involucradas en la inducción de una respuesta inmune sistémica (anticuerpos en suero sanguíneo y células T). Mientras que estas vacunas pueden ser apropiadas para enfermedades causadas por agentes infecciosos que penetran al cuerpo por punción o daño en la piel (tétanos por ejemplo), es bien conocido que cerca del 90% de los patógenos infectan de manera natural al huésped por vía mucosa, ya sea oral, nasal o genital. Desgraciadamente las vacunas inyectables no son capaces de despertar inmunidad en mucosas. Por lo tanto es necesario el desarrollo de nuevas vacunas que puedan ser administradas por vía mucosa, las cuales además de resultar más efectivas en la prevención o limitación de infecciones vía mucosa ofrecen varias ventajas sobre las inyectables: i) fácil administración, ii) reducción de efectos colaterales, iii) evita el uso de jeringas, iv) abre la posibilidad para ilimitadas inmunizaciones sin la necesidad de personal entrenado. Todas

estas ventajas pueden reducir considerablemente los costos y seguridad en las campañas de vacunación sobre todo en los países en vías de desarrollo.

A pesar de las importantes ventajas de la inmunización a través de la mucosa, el éxito de esta ha sido muy limitado debido a la degradación de los antígenos usados, limitada adsorción e interacción con factores en la mucosa del huésped no específicos, y el uso de sistemas de expresión inadecuados. Recientes investigaciones han resultado en el desarrollo de prometedoras vacunas basadas en sistemas de expresión de antígenos por vía mucosa. Dichos sistemas incluyen patógenos atenuados expresando algún antígeno de interés médico y micropartículas inertes sintetizadas químicamente y precargadas con el antígeno de interés. El uso de bacterias o virus atenuados tienen la desventaja que son organismos que han sido modificados para convertirlos en sistemas no patogénicos, y que improbablemente garantizan la seguridad del sistema, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Las micropartículas inertes (polímeros biodegradables por ejemplo) son precargados con la proteína de interés durante el proceso de elaboración, por ende el antígeno debe ser previamente aislado y purificado antes de la formación de la micropartícula, lo cual es muy laborioso y costoso. Sistemas de expresión no patogénicos, como las bacterias lácticas (BL) pueden representar una alternativa segura y de bajo costo. Las BL son un grupo de microorganismos bien conocido debido a que sus fermentaciones constituyen una de las formas más antiguas de conservación de productos de la industria alimenticia (yogurt, quesos, mantequilla, crema, etc) y de la agricultura (sidra, vino, cerveza, etc). La BL mejor estudiada y caracterizada a la fecha es sin duda *Lactococcus lactis*, una bacteria gram-positiva no patógena y no colonizante que ha sido ampliamente manipulada para expresar proteínas heterólogas (Dieye *et al.*, 2001; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002; Miyoshi *et al.*, 2002). Dado que *L. lactis* no coloniza las mucosas, es necesario cargar a la bacteria con el antígeno de interés antes de la inmunización mediante un sistema de expresión génica inducible. En este aspecto *L. lactis* actuaría similar a las micropartículas inertes, la diferencia es que aquí no hay necesidad de aislamiento y purificación del antígeno, ya que este sería producido por la bacteria. Como todos los sistemas no replicativos, la inmunización con *L. lactis* requiere de el uso de adyuvantes para inducir una buena respuesta inmune. La Interleucina-12 (IL-12) es una molécula estimuladora del sistema inmunitario (adyuvante) que ha demostrado prometedores

resultados en la terapia génica contra el cáncer. En este contexto el objetivo de este trabajo es el de inducir una respuesta inmune contra la proteína E7 del VPH-16 mediante su expresión en la bacteria no patógena y comestible *L. lactis*. Dado que la inmunogenicidad de una proteína expresada en una bacteria puede depender de su localización, así como de su conformación se analizaron las diferentes cepas construidas en el capítulo 2 y 3 las cuales incluyen cepas expresando la E7 en citoplasma, secretada al medio de cultivo y fusionada a una proteína resistente y compacta, la Nuc. Además para aumentar la respuesta inmune específica de antígeno se construyó una cepa capaz de secretar de forma biológicamente activa la IL-12 (capítulo 4). La expresión de todas las construcciones se llevo a cabo bajo el control del sistema inducible NICE (Expresión Controlada por Nisina, de Ruyter *et al.*, 1996, Kuipers *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos muestran que *L. lactis* es capaz de inducir una respuesta inmune específica de antígeno (E7) y que la co-expresión de dicho antígeno con un fuerte adyuvante como lo es la IL-12, mejora la respuesta inmune. En resumen este trabajo abre las puertas a una nueva línea de desarrollo de vacunas seguras y de bajos costos usando bacterias comestibles y no patógenas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.3 MATERIAL Y METODOS

5.3.1 Cepas y métodos usados. Las cepas utilizados en este trabajo fueron: NZCYT:E7, NZSEC:E7, NZCYT:Nuc-E7, NZSEC:Nuc-E7, NZSEC:scIL-12 (capítulo 2, 3 y 4) y NZ9000 de *L. lactis* (de Ruyter *et al.*, 1997).

5.3.2 Preparación de células para ensayos *in vitro* y/o inmunizaciones. Se cultivaron las diferentes cepas recombinantes en 20 ml de GM17 hasta una $DO_{600}=0.5$, se adicionó nisina (SIGMA) a una concentración de 10 ng/ml y se dejó incubar hasta una $DO_{600}=1$. Se centrifugó para recuperar la pastilla, y se hicieron 3 lavados con PBS. Finalmente las células se resuspendieron en 200 μ L de PBS.

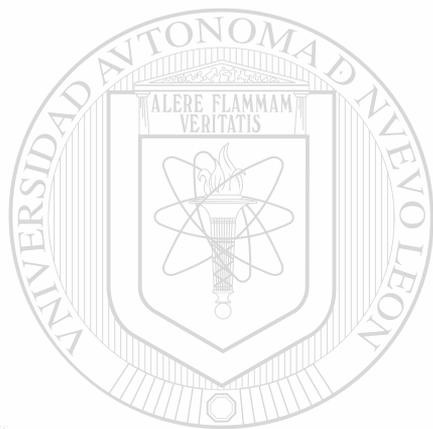
5.3.3 Inmunización. Grupos de 5 ratones C57BL/6J hembras (5-8 semanas de edad) fueron parcialmente anestesiados con Xilacina vía intramuscular. Se tomaron 20 μ L de las bacterias recombinantes de *L. lactis* (5×10^8 colonias formadoras de unidad, CFU) y se aplicaron por vía *i.n.* a los días 1, 14 y 28. Como control se inmunizaron ratones con una cepa silvestre de *L. lactis* (*wt*, NZ9000).

5.3.4 Obtención de células de bazo. Siete días después de la última inmunización (día 35) los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Bajo condiciones de total esterilidad se obtuvo el bazo, se le agregó 1 mL de medio de cultivo AIM-V (GIBCO) y se maceró perfectamente. Posteriormente las células fueron transferidas cuidadosamente a un tubo estéril de 15 mL con 1 mL de HISTOPAQUE (SIGMA), y se centrifugó a 2500 rpm, 25 min. para separar las células mononucleares mediante un gradiente de densidad. Se recuperó la fase blanca (células mononucleares) y se transfirió a un tubo estéril de 1.5 mL y se realizaron 2 lavados con 500 μ L de medio AIM-V. Finalmente se resuspendieron en 500 μ L del mismo medio y se hizo un conteo de las células con azul tripano (SIGMA).

5.3.5 Inducción de IFN- γ e IL-2 en células de bazo por las cepas recombinantes de *Lactococcus lactis*. Se analizó la capacidad de diferentes cepas recombinantes de *L. lactis* para inducir la producción de IFN- γ e IL-2, después de una administración *i.n.* Para esto, se cultivaron 2×10^6 células de bazo en cajas de 24 pozos (2 mL por pozo), agregando a cada pozo 50 μ L de PBS estéril ó 2 μ g de un péptido sintético de E7 (RAHYNIVTF, resuspendido en 50 μ L de PBS). El volumen se llevó a 2 mL con medio AIM-V y se incubó 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Después de 24 hrs se tomó 1.5 mL del cultivo y se

centrifugó a 5000 rpm por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo. La detección de INF- γ e IL-2 se realizó mediante ELISA (R&D System).

5.3.6 Estadísticas. Los resultados obtenidos de los ensayos de ELISA son expresados como la media \pm una desviación estándar.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

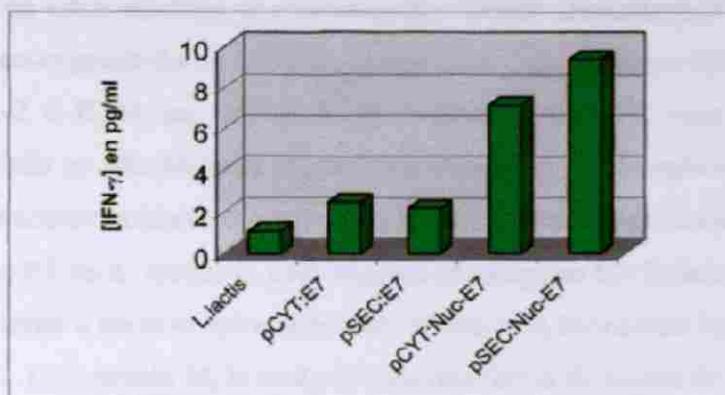
5.4 RESULTADOS

5.4.1 La proteína híbrida Nuc-E7 en forma de secreción es más inmunogénica que una E7 nativa. Para determinar cual de las cepas de *Lactococcus lactis* expresando la oncoproteína E7 del VPH-16 en diferentes localizaciones celulares y fusionada a una proteína compacta y altamente estable, la nucleasa Staphylococcal (Nuc), analizamos el efecto de la administración local (intranasal, *i.n.*) de los diferentes lactococos recombinantes construidos a lo largo de todo este estudio. Para esto, se inmunizaron a diferentes tiempos, grupos de 5 ratones con las cepas de *L. lactis* expresando E7 (ver material y métodos) y se sacrificaron para detectar la producción de citocinas relacionada con la respuesta inmune celular: IFN- γ e IL-2. El IFN- γ es una potente citocina producida principalmente por linfocitos T (LT) activados por mitógenos y NK y la IL-2 es una citocina pleiotrópica producida por LT activados por mitógenos y por antígenos. Además, elegimos determinar los niveles de estas dos citocinas, ya que como se mencionó en el capítulo 1 (pag. 18), estudios en pacientes con CaCu presentan una disminución en la producción de citocinas Th1 (i.e., IFN- γ e IL-2).

Los resultados obtenidos del análisis de citocinas de dichas inmunizaciones son mostrados en la figura 1. De forma sorprendente los resultados revelan una inducción significativamente mayor en la producción de INF- γ , en aquellos ratones que fueron inmunizados con las cepas de *L. lactis* expresando la oncoproteína E7 fusionada a la Nuc, que aquellos inmunizados con la E7 nativa (Fig. 1a). Estos resultados pueden ser debido a dos causas: (1) la cantidad de antígeno producido en la forma de fusión es mayor que la forma nativa (~15 mg/mL versus ~5 mg/mL, capítulo 2) ó (2) la proteína Nuc puede coadyuvar con el antígeno E7 y despertar una mayor respuesta inmune. De las dos formas de proteínas Nuc-E7: expresada en citoplasma y secretada al medio de cultivo, esta última fue la más inmunogénica (Fig. 1a). Además, se llevaron a cabo ensayos con ratones inmunizados solo con PBS solo, en los cuales no se detectó inducción de estas citocinas o la producción de éstas fue parecida a la del control (*L. lactis*, datos no mostrados).

Análisis de inducción de IL-2 en ratones inmunizados con los lactococos recombinantes muestran el mismo patrón que el observado para la producción de IFN- γ

(a)



(b)

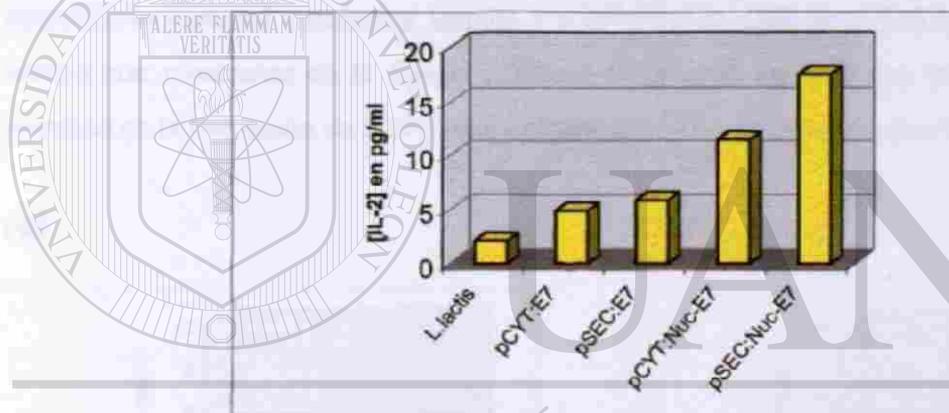


Fig. 1. Inducción de IFN- γ e IL-2 por *Lactococcus lactis* expresando E7 en diferentes localizaciones celulares y fusionada a Nuc. Células de bazo de ratones inmunizados con la cepa silvestre de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) y con las diferentes cepas recombinantes expresando la E7 nativa en citoplasma (NZCYT:E7) ó secretada (NZSEC:E7) y la proteína híbrida Nuc-E7 en citoplasma (NZCYT:Nuc-E7) ó secretada (NZSEC:Nuc-E7), se estimularon *in vitro* con un péptido sintético de E7 (RAHYNIVIF) y se detectaron citocinas implicadas en la respuesta inmune celular: IFN- γ (a) e IL-2 (b).

(Fig. 1b), confirmando que la proteína de secreción Nuc-E7 producida por la cepa NZSEC:Nuc-E7 al medio de cultivo representa el mejor candidato para despertar una respuesta inmune contra el antígeno E7 del VPH-16.

5.4.2 La co-administración de *L. lactis* expresando la proteína Nuc-E7 y la scIL-12 aumenta considerablemente la producción de IFN- γ e IL-2. En trabajos previos Steidler

et al. (1998) demostraron que *L. lactis* es capaz de expresar citocinas biológicamente activas. Además en estos estudios se encontró que cuando inmunizaban ratones con una cepa de *L. lactis* co-expresando un antígeno (fragmento C de la toxina del cólera, TTFC) y una citocina (IL-2 e IL-6) los títulos de anticuerpos anti-TTFC eran sustancialmente mayores que cuando se administraba únicamente una cepa expresando el TTFC. En este contexto nosotros nos enfocamos en administrar de forma simultánea (co-administración) la cepa NZSEC:Nuc-E7 de *L. lactis*, la cual expresa el antígeno E7 fusionado a la proteína Nuc, y que de acuerdo a los resultados obtenidos arriba es la forma más inmunogénica y, la cepa NZSEC:scIL-12 (capítulo 4), la cual produce una forma de fusión de la citocina IL-12 (scIL-12), una potente molécula estimuladora del sistema inmune.

Los ensayos de inmunización y análisis de citocinas se hicieron tal y como se describió en material y métodos, usando 5×10^8 CFU de cada cepa. Los resultados de este ensayo son mostrados en la figura 2. Como se observa en la figura 2a existe un claro aumento en la inducción de IFN- γ en los ratones que fueron inmunizados con las dos cepas

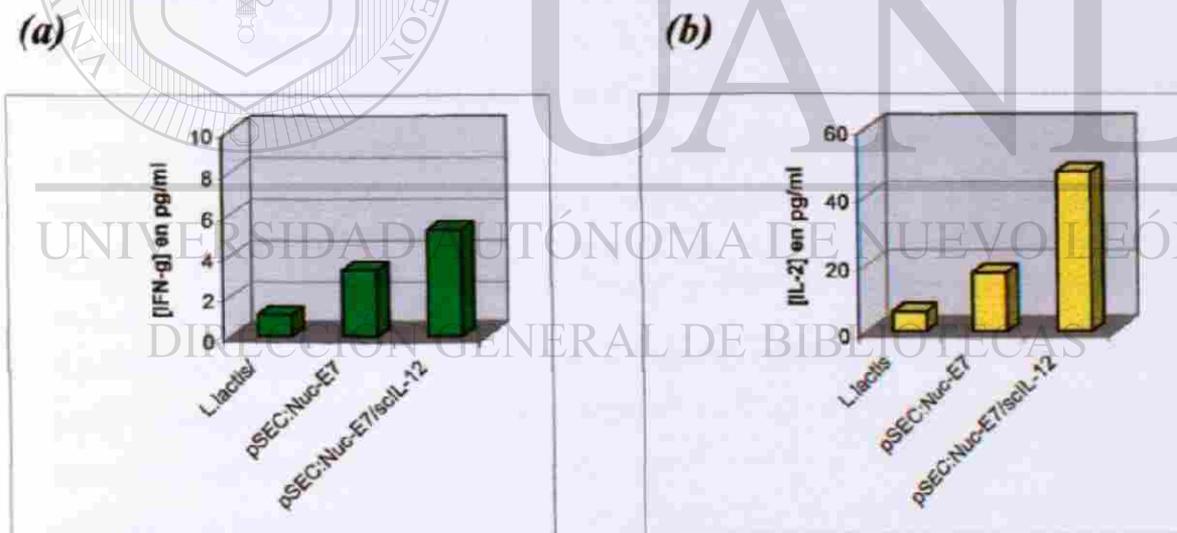
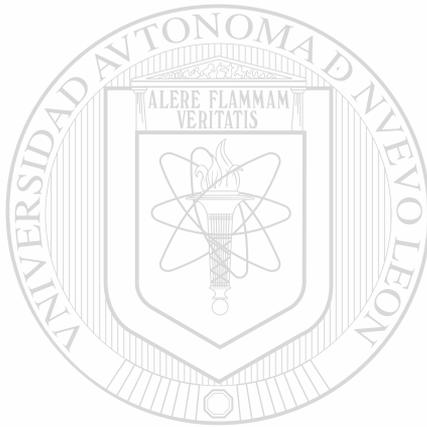


Fig. 2. Inducción de INF- γ e IL-2 por *Lactococcus lactis* co-expresando Nuc-E7 e IL-12. Células de bazo de ratones inmunizados con la cepa silvestre de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), con la cepa recombinante expresando Nuc-E7 (NZSEC:Nuc-E7) y con las cepas NZSEC:Nuc-E7 y la cepa secretando la scIL-12 (NZSEC:scIL-12) de forma simultánea, se estimularon *in vitro* con un péptido sintético de E7 (RAHYNIVTF) y se detectaron citocinas implicadas en la respuesta inmune celular: IFN- γ (a) e IL-2 (b).

de *L. lactis* expresando Nuc-E7 e IL-12 en comparación de aquellos ratones que solo recibieron la cepa productora de Nuc-E7. Estos mismos resultados se repitieron en la medición de la IL-2 (Fig. 2b).

Estos resultados demuestran claramente que la IL-12 producida por *L. lactis* ejerce un significativo efecto adyuvante cuando ex co-administrado con un antígeno tumoral (E7).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



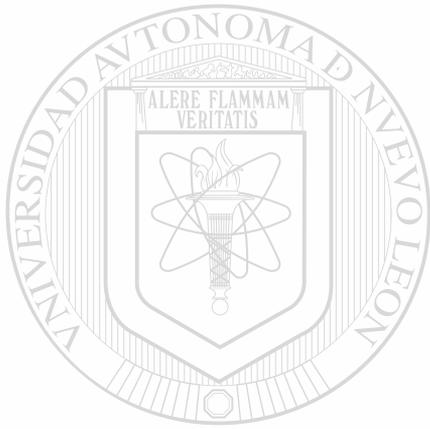
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.5 DISCUSION

5.5.1 *Lactococcus lactis* como un vector para presentar antígenos y citocinas a través de superficies de mucosa al sistema inmune. La expresión de proteína heterólogas en *L. lactis* parece ser una buena vía de producción de proteínas de interés terapéutico, ya que de acuerdo a nuestros resultados tanto el antígeno E7 nativo, como uno fusionado a una proteína altamente estable, Nuc-E7, expresados por *L. lactis* son capaces de inducir la producción de IFN- γ e IL-2. Estas citocinas, producidas por subpoblaciones de LT, son importantes moduladores de la respuesta inmune, induciendo la producción de otras citocinas que activan la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MCH) clase I y II y promoviendo la expansión clonal de LT específicos de antígeno entre muchos otros de sus efectos pleiotrópicos. El hecho de encontrar en este trabajo la inducción de IFN- γ e IL-2 específica de antígeno en células de bazo de ratones nos indica que la proteína E7 esta siendo producida en una forma inmunogénica. Estudios previos (Wells *et al.*, 1995) han demostrado que *L. lactis* es capaz de presentar al sistema inmune la TTFC en una forma inmunogénica. No obstante dichos estudios solo reportan la producción de anticuerpos. Por otro lado el hecho de encontrar una inducción de citocinas en las células de bazo superficie y administrado *i.n.* es capaz de inducir una respuesta sistémica. A la fecha y a nuestro conocimiento es la primera vez que se reporta la inducción de una respuesta inmune celular (o al menos relacionada con esta) en *L. lactis*.

5.5.2 *Lactococcus lactis* como un vector vivo para el desarrollo de una nueva vacuna para combatir el cáncer cérvico-uterino (CaCu). Previamente un grupo de investigadores obtuvieron una respuesta inmune contra la proteína E7 mediante su expresión en la superficie de *Streptococcus gordonii* (Pozzi *et al.*, 1992); sin embargo en este trabajo tal respuesta se obtuvo en combinación con el adyuvante de Freund completo. En este trabajo nosotros obtuvimos una respuesta inmune específica de antígeno con la sola administración de *L. lactis* expresando E7. Además *S. gordonii* es un organismo comensal (microorganismo persistente que puede inducir inmunotolerancia) y GRAS pero no grado alimenticio. En contraste *L. lactis* es una bacteria totalmente inocua y no persistente que puede servir para el desarrollo de vacunas vivas, sin el riesgo de

colonización y por tanto disminuir las probabilidades de inducir inmunotolerancia. Además, *L. lactis* es un buen candidato para propósitos de vacunación ya que su ruta de administración (intranasal, oral o vaginal) lo hace de fácil administración y de bajo costo de producción. En resumen este trabajo demuestra el potencial de una BL grado alimenticio, no patogénica y no invasiva, para ser considerada como un vector para el desarrollo de una nueva vacuna viva para combatir enfermedades infecciosas, el CaCu en particular.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.6 REFERENCIAS

- Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Miyoshi A, Gruss S, Tómez-Guerra R, Montes de Oca-Luna R, & Le Loir Y. (2002). Expression of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:917-922.
- Bishop A, Wells E, Sherris J, Tsu V, & Crook B. (1995). Cervical cancer: evolving prevention strategies for developing countries. *Reproductive Health Matters*. 6:60-71.
- Dieye Y, Usai S, Clier F, Gruss A, & Piard JC. (2001). Optimizing protein targeting in lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. 183:4157-4166.
- Kuipers OP, de Ruyter PG, Kleerebezen M, & de Vos WM. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 64:15-21.
- Mohar A, Frías-Mendivil M, Suchil-Bernal L, Mora-Macías T, & de la Garza J. (1997). Descriptive epidemiology of cancer at the Instituto Nacional de Cancerología of México. *Salud Pública, México*. 39:253-258.
- Miyoshi, A, Poquet L, Azevedo V, Commissaire J, Le Loir Y, Bermúdez-Humarán LG, Oliveira S, Domakova E, Gruss A, & Langella P. (2002). Controlled production of stable heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. (En impresión).
- Pozzi G, Contorni M, Oggioni MR, Manganelli R, Tommasino M, Cavallieri F, & Fischetti VA. (1992). Delivery and expression of a heterologous antigen on the surface of streptococci. *Infection and Immunity*. 60:1902-1907.
- de Ruyter PG, Kuipers OP, & de Vos WM. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:3662-3667.
- Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remant E, Le Page RW, & Wells JM. (1998). Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infection and Immunity*. 66:3183-3189.
- Wells JM, Norton PM, & Le Page RWF. (1995). Progress in the Development of Mucosal Vaccines Based on *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy Journal*. 5:1071-1079.

CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra la capacidad de *Lactococcus lactis*, una bacteria Gram positiva, para producir la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16). Además, se analizaron diferentes localizaciones celulares para la expresión de dicha proteína, encontrando que la secreción al medio de cultivo representa la mejor vía para su producción, ya que en citoplasma la proteína E7 sufre proteólisis dependiente de la fase de crecimiento del cultivo. Esto es de gran interés ya que aún y cuando se analizó la producción de la E7 en cepas de *L. lactis* mutantes para las principales proteasas y chaperonas identificadas a la fecha, no fue posible rescatarla de la degradación. Esto sugiere que existe una nueva proteasa intracelular no identificada en *L. lactis* y que es activada en fase estacionaria del cultivo celular, y, que la proteína E7 representa un buen modelo para monitorear e identificar dicha proteasa.

Paralelo a la producción de E7 en cepas silvestres y mutantes de *L. lactis*, se analizó la capacidad de protección de una proteína altamente estable y compacta, la nucleasa Staphylococal (Nuc), fusionada a ambos extremos de la proteína E7. Los resultados muestran que dicha fusión resulta verdaderamente en un rescate de la proteína E7 en el citoplasma de *L. lactis*, además de que mejora el nivel de producción. Estos resultados muestran que la fusión de Nuc a E7 por sus dos extremos es capaz de rescatar a dicha proteína de degradación, en contraste a los resultados obtenidos con una fusión Myc y en un sistema eucariote, en el cual solo se rescata a la proteína E7 cuando es protegida por su extremo amino (N-). Por lo tanto la proteína Nuc puede servir para producir proteínas extremadamente frágiles en *L. lactis*.

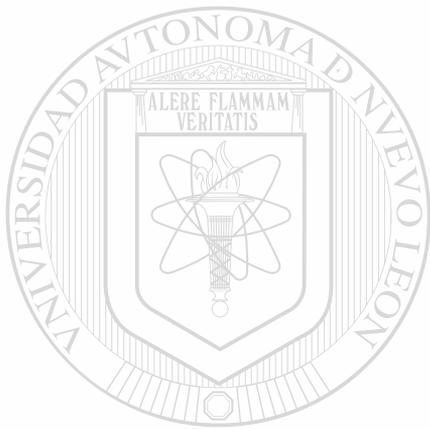
En este trabajo se reporta también por primera vez, la producción de una citocina heterodimérica, la Interleucina-12 (IL-12), en una forma biológicamente activa. Esto es de gran trascendencia ya que dicha proteína esta compuesta por dos subunidades (p35 y p40) unidas por puentes disulfuro, lo cual revela que *L. lactis* es capaz de catalizar la formación de puentes disulfuro en proteínas heterólogas, característica

poco documentada en bacterias Gram positivas. Además, se logró la expresión de una proteína IL-12 de fusión (scIL-12) con funciones biológicas similares e incluso mayores a las de la IL-12 expresada mediante sus dos subunidades (IL-12p70). Esta proteína garantiza una expresión equilibrada de ambas subunidades y facilita su manipulación *in vitro*.

Finalmente este estudio demuestra el gran potencial de *L. lactis*, para despertar una respuesta inmune específica del antígeno E7 del VPH-16 vía mucosa. *Lactococcus lactis*, es una bacteria no patógena y no colonizante considerada como un organismo grado alimenticio. Estas características facilitan la aceptación de este microorganismo para su uso en humanos, además de que su vía de inoculación (oral o nasal) y su capacidad para almacenarse por largos periodos de tiempo (sin la necesidad de refrigeración), permite que pueda ser fácilmente administrado y su personal entrenado, lo cual es recomendable para su distribución y uso en países en vías de desarrollo. En resumen este trabajo representa un gran paso en el desarrollo de nuevas vacunas vivas y seguras para tratar el cáncer cérvico (CaCu) y combatir así, una de las neoplasias más frecuentes y malignas en la mujer mexicana.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



