

## 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.

## 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.

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).

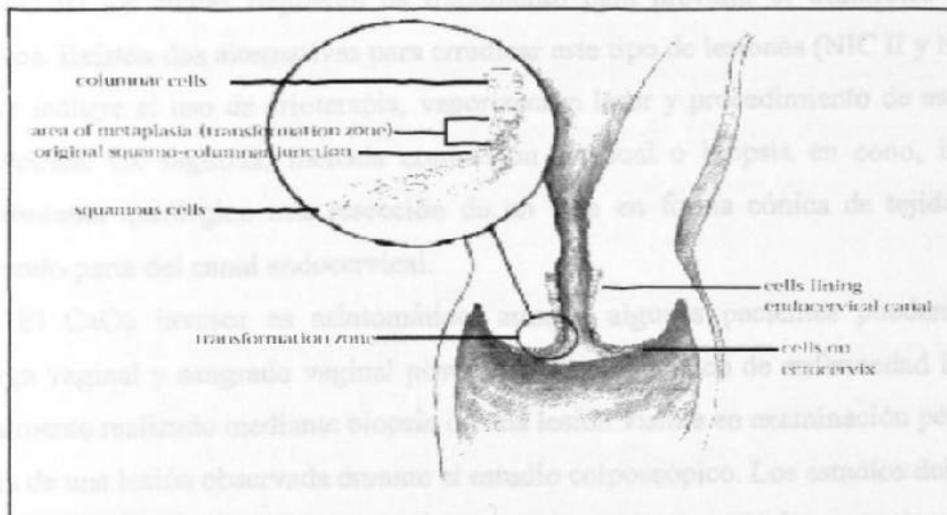


Fig. 1. Zona de transformación del Cáncer Cérvico-Uterino

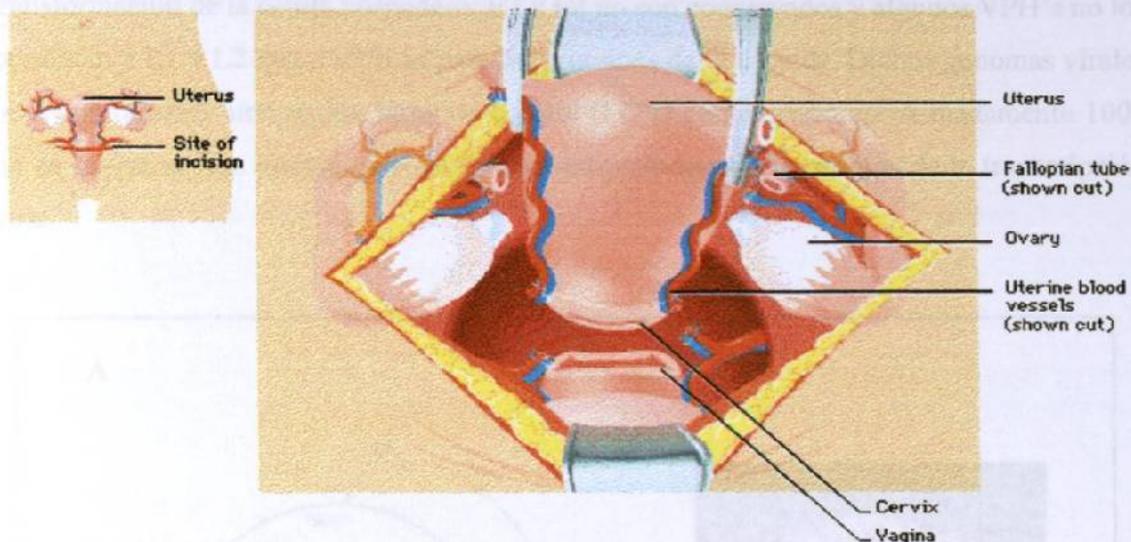
Generalmente la infección con el VPH es altamente prevalente en la población femenina y aproximadamente el 90% de los casos de CaCu contienen el genoma de este virus. La aparición del CaCu esta asociada a una amplio rango de edad; usualmente se presenta entre la quinta y sexta década teniendo una media 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.

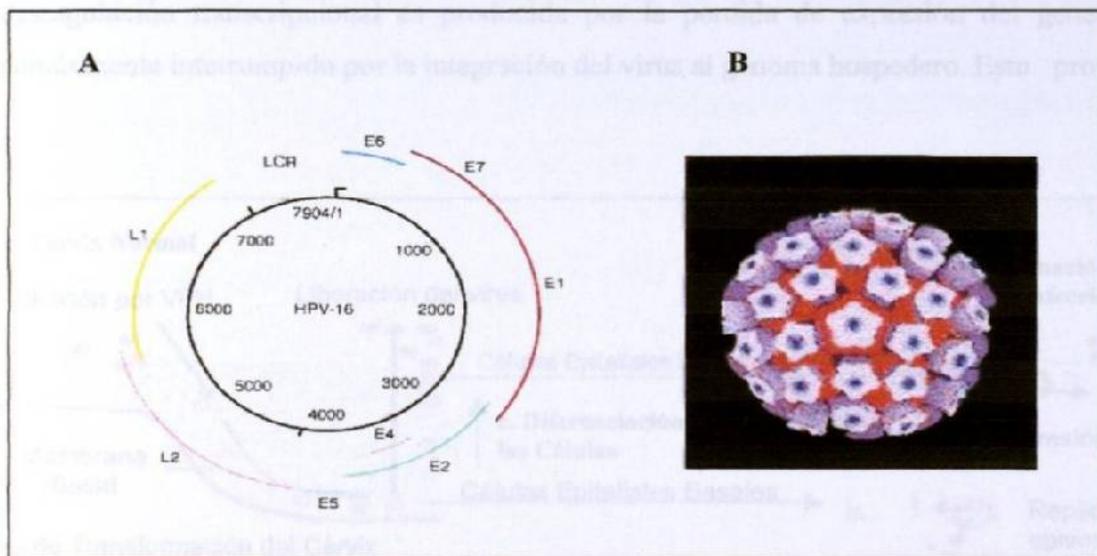


**Fig. 2. Histerectomía sencilla.** El cirujano abre la cavidad abdominal, corta a través de las trompas de Falopio, y corta el útero en su unión con el cérvix.

### 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

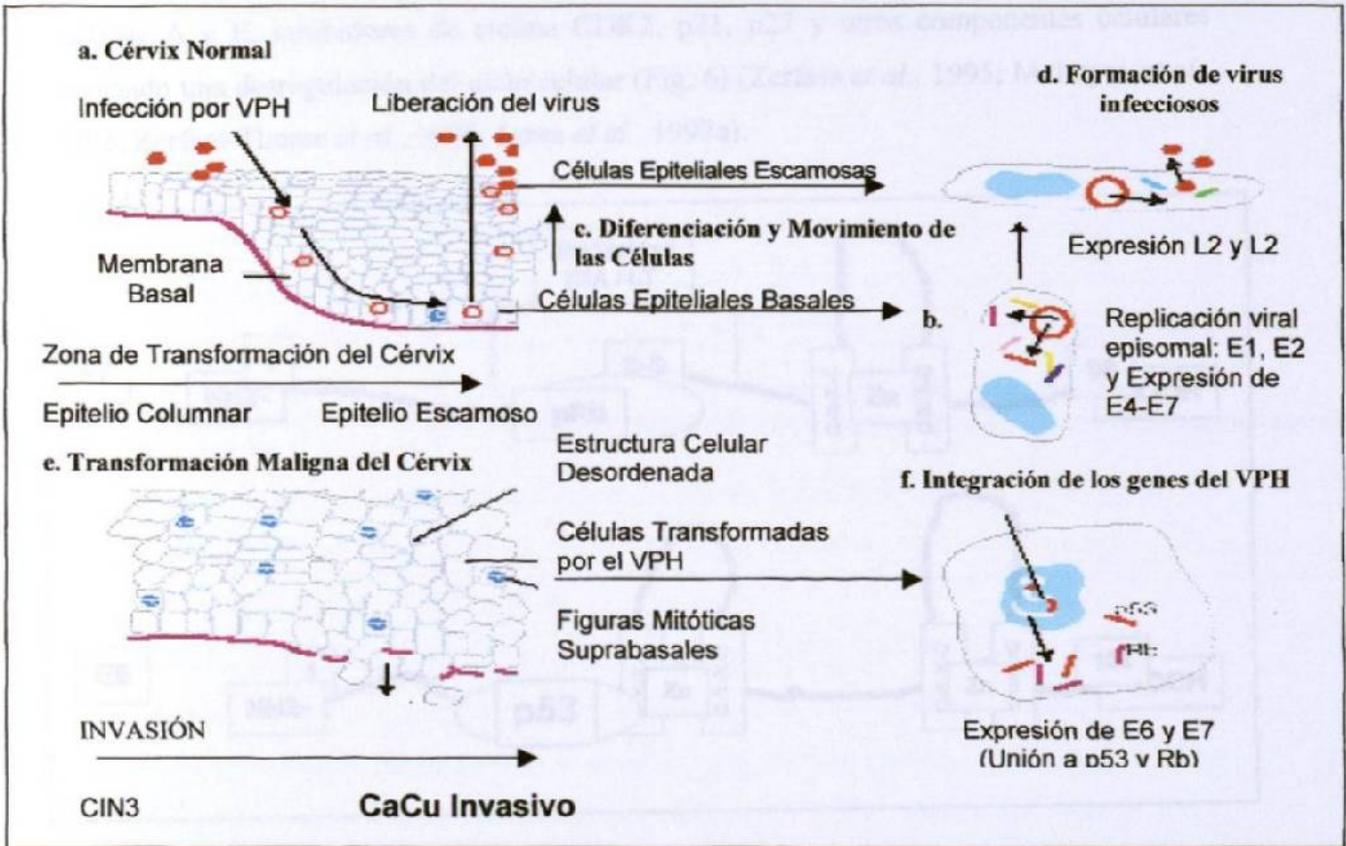
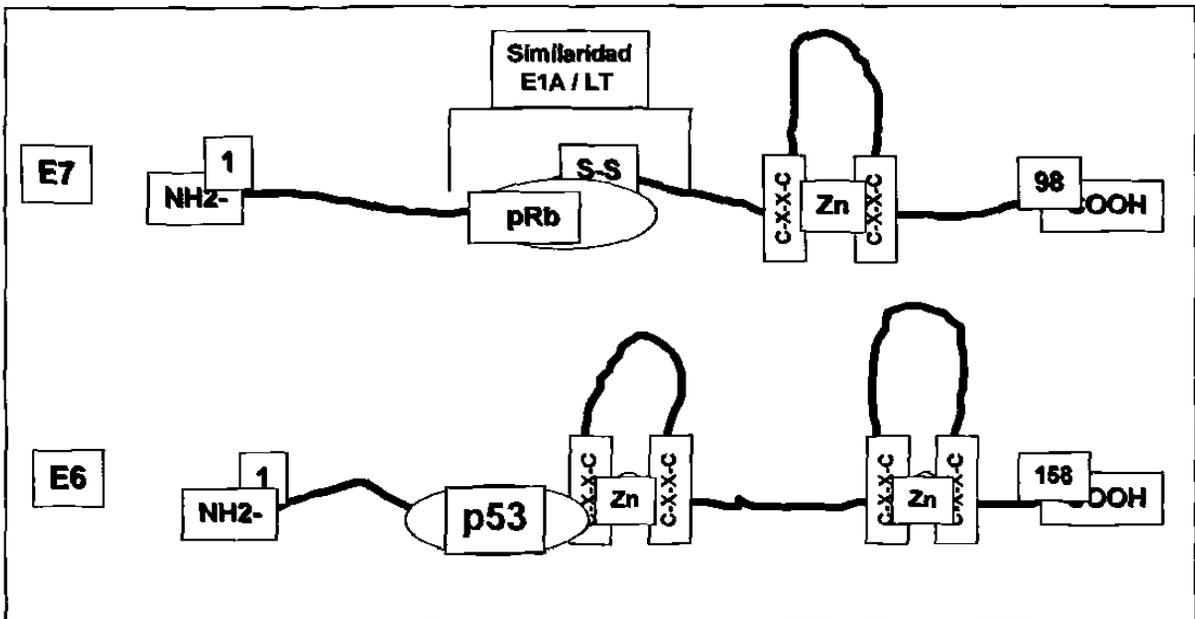


Fig. 4 Infección y replicación del VPH en células epiteliales cervicales.

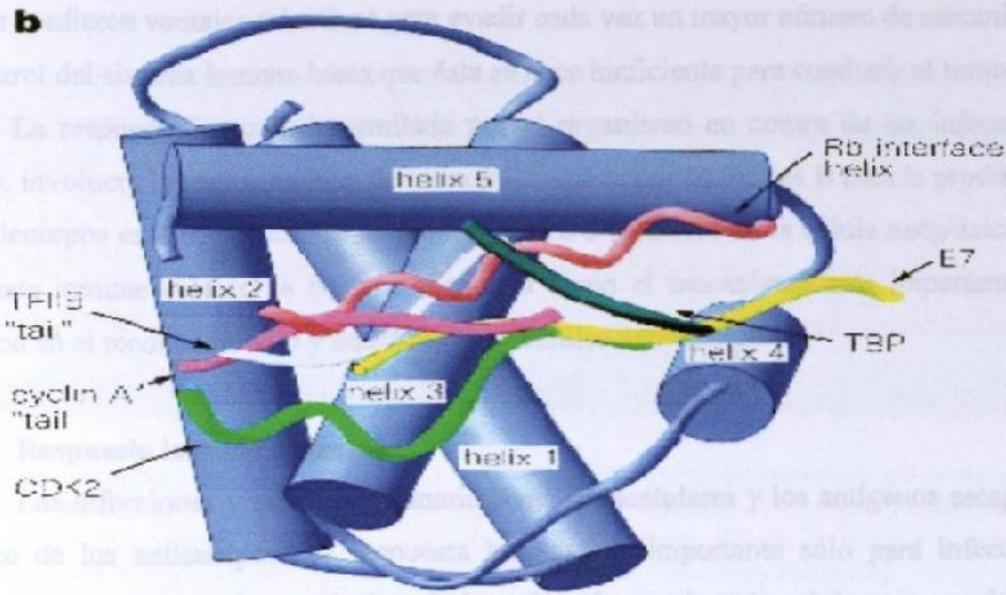
la producción de una proteína E2 incompleta la cual falla en su función para regular el promotor P97 (Thierry & Yaniv, 1987).

**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 (Fitzlaff *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.

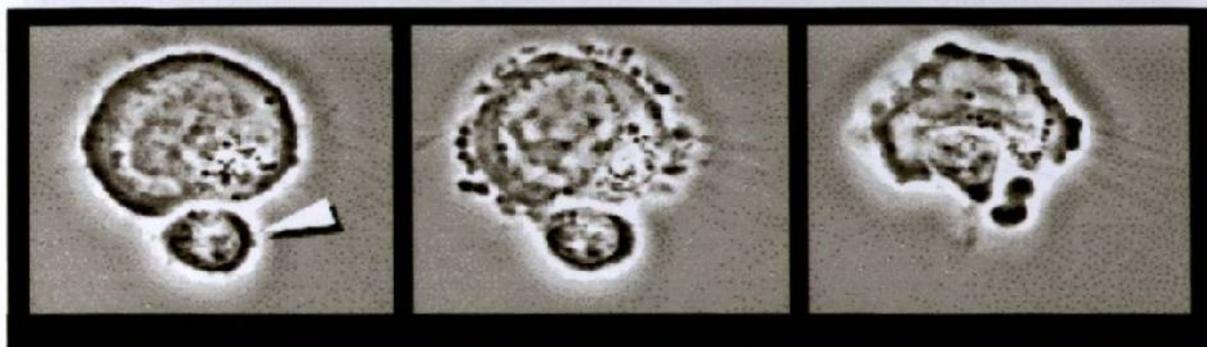
### **Respuesta inmune humoral**

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

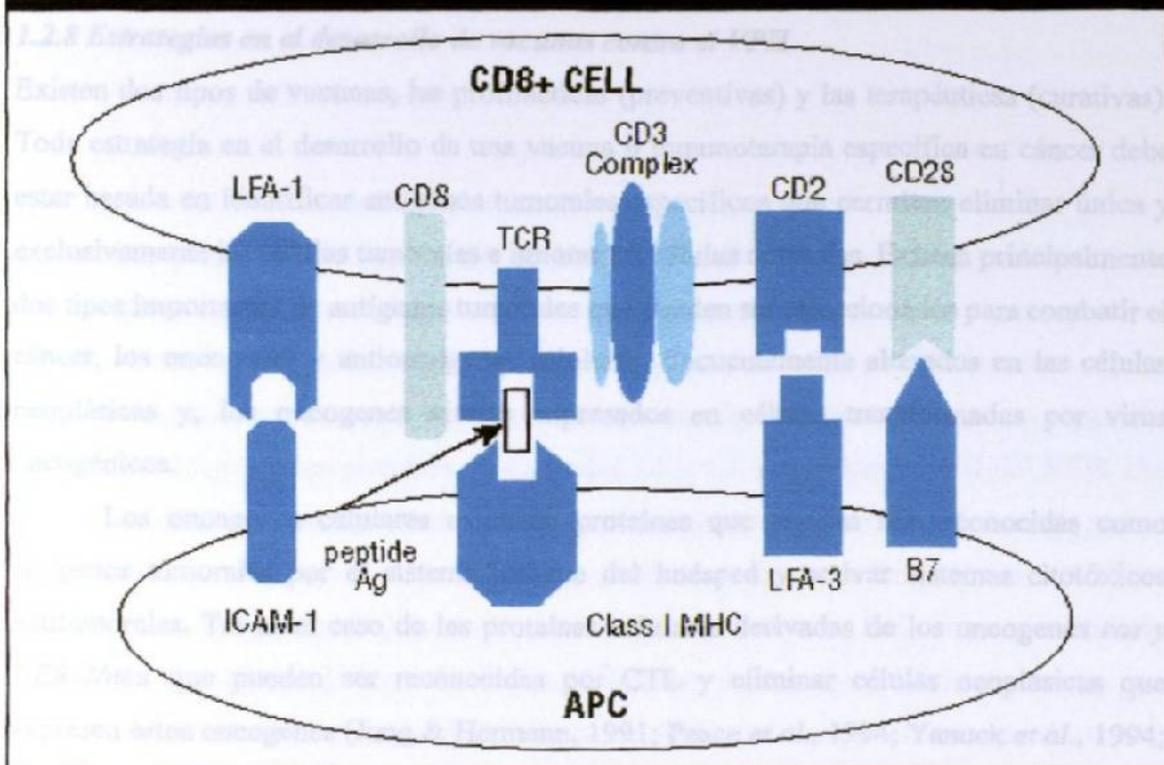


**Fig. 7. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen moléculas de superficie en otras células que están marcadas para morir.** Aquí, un CTL pequeño (flecha) está atacando y matando a una célula mucho más grande infectada por el virus de la influenza. (Mark T. Esser y Vivian Lam Braciale, University 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<sup>+</sup> (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 epítopo (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- $\gamma$ , 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<sup>+</sup> (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- $\gamma$  e IL-2), mientras que la producción de Th2 es elevada (IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ ) (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; Breitburd *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; Fiard *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.

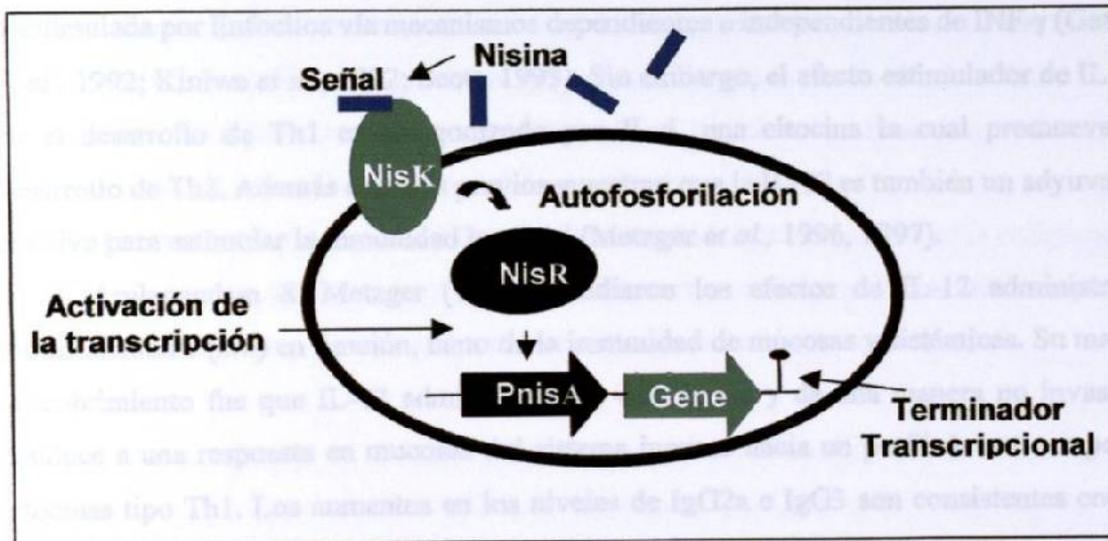
### *Lactococcus lactis* como vector de expresión

*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- $\gamma$  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- $\gamma$  (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- $\gamma$ , 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”**.

## 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.
- Arnaau J, Hjerf-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, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trindinh-Deamarquel C, Orth G, Schiller JT, & Lowly 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 I, & 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, & Liu 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, Quataannens 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.
- Gruzza 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, Orozcoe H, 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.
- Jeon 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; Barnfield 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, Mougín C, Legrand MC, Calvet C, Afoutou JM, & Couraagef 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, 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.
- 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.
- Mohar 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.
- Pahel 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, Cavalieri 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, Ahlborg 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, 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.
- 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 H, Münger K, Huibregste JM, Mietz JA, & Howley PM. (1994). Functions of human papillomavirus proteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 186:83-99.
- Shodell M. (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 WI, Tamura JK, Bell JA, Newsome JA, Jenson AB, & Schiegel 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.

- Tacket CO, Hone DM, Curtiss R III, Kelly SM, Losonsky G, Guers L, Harris AM, Edelman R, & Levine MM. (1992). Comparison of the safety and immunogenicity of  $\delta$ -*aroC*  $\delta$ -*aroD* and  $\delta$ -*cya*  $\delta$ -*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, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Ramdall Deck R, Dewitt CM, Friedman A, Hawe LA, Leander KR, Martinez D, Perry HC, Shilver 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 WML (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 Asl 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.

## 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 estas 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 (Arnau 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*.

## 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-lacZΔM15)</i>                                                                                                                    |                                                                                                                                                | Gibson, 1984.                 |
| <i>L. lactis</i> MG1363                | Cepa silvestre. Sin plásmidos                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                | Gasson, 1983.                 |
| <i>L. lactis</i> MG1363<br><i>clpP</i> | * <i>Ery<sup>r</sup></i> , gene <i>clpP</i> interrumpido por recombinación simple. Sin plásmidos                                                                                      |                                                                                                                                                | Frees & Ingmer, 1999.         |
| <i>L. lactis</i> MG1363<br><i>dnaK</i> | <i>Ery<sup>r</sup></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<br><i>clpP</i> | <i>Strep<sup>r</sup></i> , <i>Rif<sup>r</sup></i> , <i>Ery<sup>r</sup></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<br><i>dnaK</i> | <i>Strep<sup>r</sup></i> , <i>Rif<sup>r</sup></i> , <i>Ery<sup>r</sup></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<sup>r</sup></i>                                                                                                                          | Stratagene                    |
| pGEM-T                                 | ColE1                                                                                                                                                                                 | <i>Ap<sup>r</sup></i>                                                                                                                          | Promega                       |
| pGEM:E7                                | ColE1                                                                                                                                                                                 | <i>Ap<sup>r</sup></i> ; fragmento de PCR que codifica para E7                                                                                  | Este trabajo                  |
| pBS:E7:TrpA                            | ColE1                                                                                                                                                                                 | <i>Ap<sup>r</sup></i> ; fragmento de PCR que codifica para E7                                                                                  | Este trabajo                  |
| pCYT:Nuc                               | pWV01                                                                                                                                                                                 | <i>Cm<sup>r</sup></i> ; cassette de expresión de Nuc bajo el control del promotor <i>P<sub>nisA</sub></i>                                      | L. Ribeiro <sup>(a)</sup>     |
| pSEC:Nuc                               | pWV01                                                                                                                                                                                 | <i>Cm<sup>r</sup></i> ; cassette de expresión del precursor <i>SP<sub>Usp45</sub>:Nuc</i> bajo el control del promotor <i>P<sub>nisA</sub></i> | L. Ribeiro <sup>(a)</sup>     |
| pCYT:E7                                | pWV01                                                                                                                                                                                 | <i>Cm<sup>r</sup></i> ; cassette de expresión de la proteína E7 nativa bajo el control del promotor <i>P<sub>nisA</sub></i>                    | Este trabajo                  |
| pSEC:E7                                | pWV01                                                                                                                                                                                 | <i>Cm<sup>r</sup></i> ; cassette de expresión del precursor <i>SP<sub>Usp45</sub>:E7</i> bajo el control del promotor <i>P<sub>nisA</sub></i>  | Este trabajo                  |

\*Genes de resistencia a: *Ery<sup>r</sup>*, eritromicina; *Strep<sup>r</sup>*, estreptomina; *Rif<sup>r</sup>*, rifampicina; *Ap<sup>r</sup>*, ampicilina; *Cm<sup>r</sup>*, cloranfenicol.

<sup>(a)</sup>: 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 óptica<sub>600</sub> (DO)<sub>600</sub> = 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  $\mu$ L en tubos de 1.5 mL congelando inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenando a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para la transformación se mezclaron 100  $\mu$ L de células electrocompetentes con 1  $\mu$ L de ADN plasmídico (10  $\mu$ 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 $\mu$ F, 200 $\Omega$ , 2.4kV. Inmediatamente después de la descarga eléctrica, se adicionaron 900  $\mu$ 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  $30^{\circ}\text{C}$ .

**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.  $4^{\circ}\text{C}$ . Después se filtro el sobrenadante (0.22  $\mu$ m MILLEX-GV, Millipore) y se separaron 1.4 mL en un vial nuevo, se adicionó 100  $\mu$ 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.,  $4^{\circ}\text{C}$ , 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  $37^{\circ}\text{C}$  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  $98^{\circ}\text{C}$  antes de ser analizadas en gel de poliacrilamida.

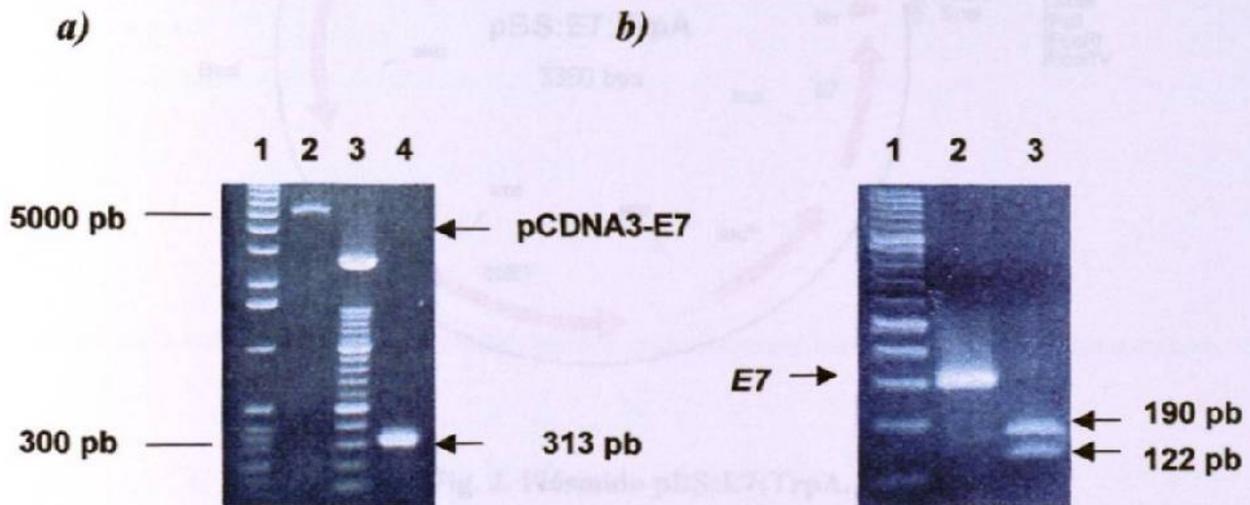
**2.2.9 Western Blot.** Las proteínas fueron separadas por SDS-Page 12% (Laemmli, 1970). Después de la migración el gel se incubo por 15 min. en una solución de transferencia (50

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.

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 linearizado 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).

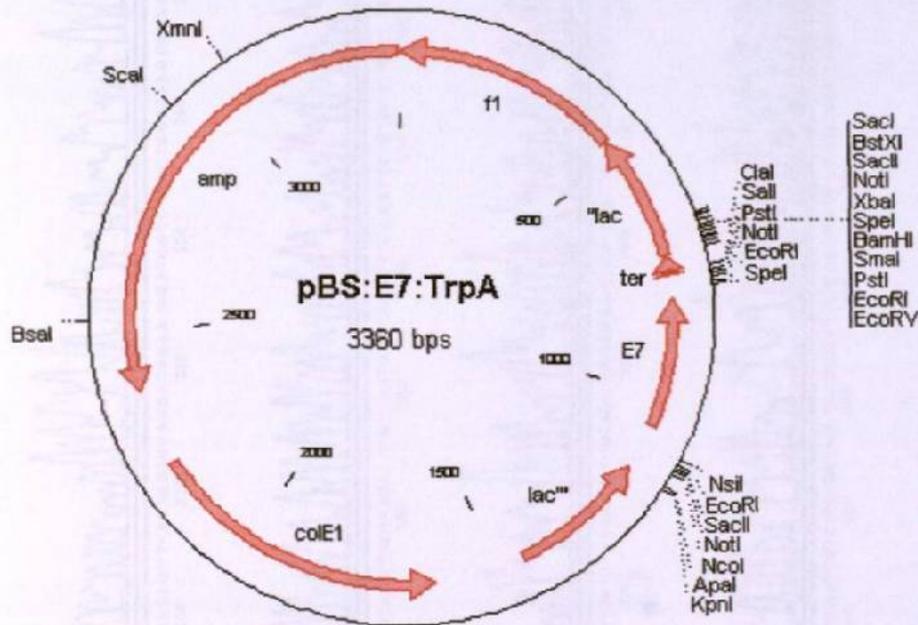
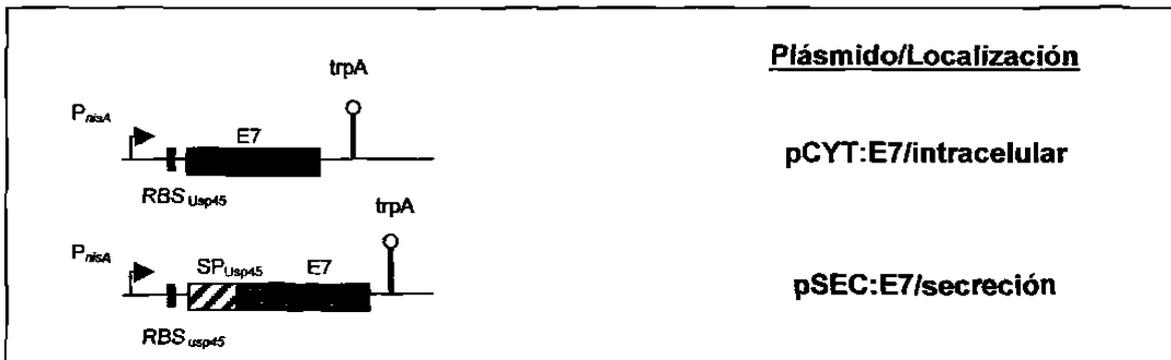


Fig. 2. Plásmido pBS:E7:TrpA.



**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<sub>Usp45</sub>), 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<sub>Usp45</sub>.



**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:  $\blacktriangleright$ , promotor lactococal inducible por nisina ( $P_{nisA}$ );  $\blacksquare$ , sitio de unión al ribosoma del gene *usp45*;  $\blacksquare$ , región codificante para E7;  $\square$  con líneas diagonales, péptido señal del gene *usp45*;  $\Uparrow$ , 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) *exponencial*

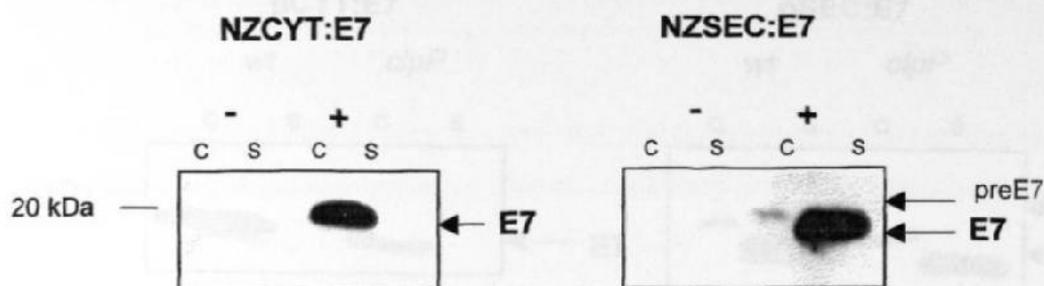
b)



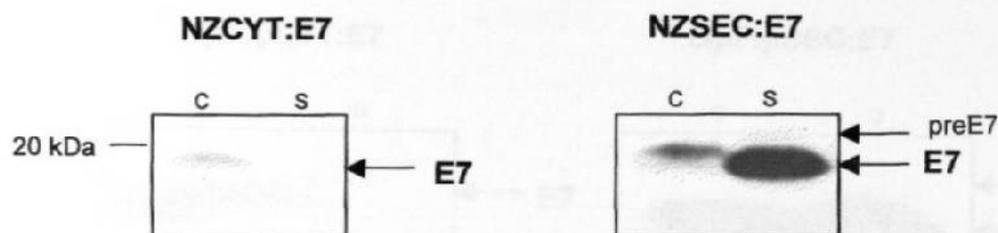
**Fig. 5. Transformación de la cepa NZ9000 de *L. lactis*.** Se transformó por electroporación la cepa NZ9000 de *L. lactis* con los diferentes plásmidos construidos y se plaqueó en GM17A (más el antibiótico de interés, cloranfenicol en este caso). Después de 48 hrs. de incubación a 30°C se eligieron 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<sub>Usp45</sub>-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

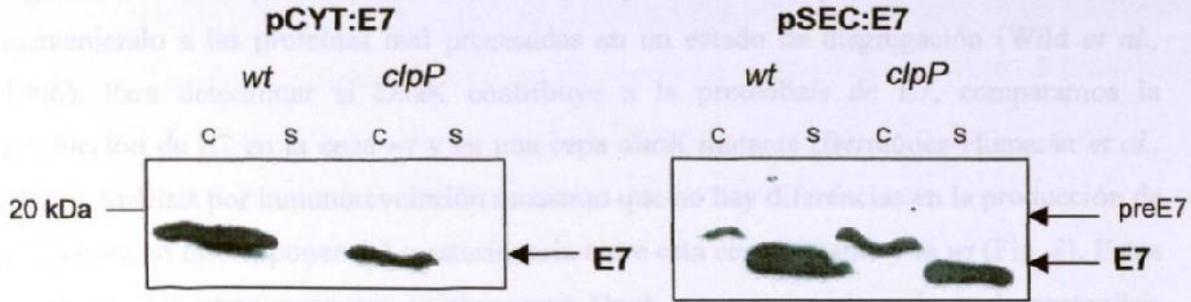


**Fig. 6. Producción de E7 en *L. lactis*.** Se analizó por Western blot la producción y secreción de E7 de cultivos inducidos en fase exponencial (DO~0.5-0.6) ó estacionaria (DO~1.5). La cepa NZCYT:E7 codifica para la E7 nativa (forma citoplasmática) y la cepa NZSEC:E7 codifica para el precursor, preE7. **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.

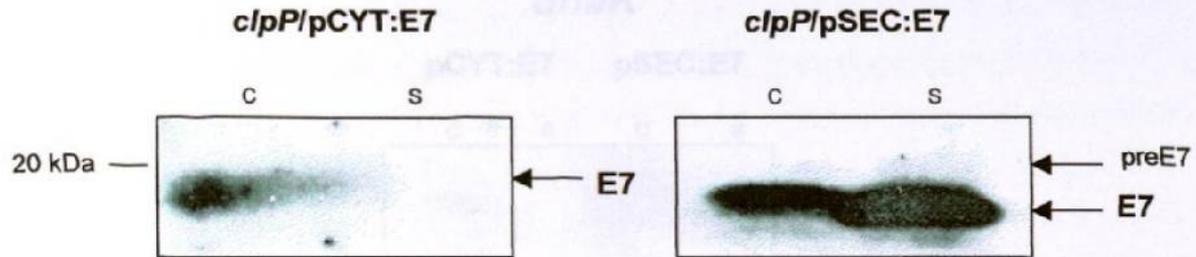
### 2.3.4 La proteasa ClpP no está involucrada en la degradación de E7 en *L. lactis*.

Nuestros resultados sugieren que la proteína E7 puede ser blanco de una proteólisis 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 está 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 (*wt*). Las condiciones de los cultivos y

a) Fase exponencial



b) Fase estacionaria

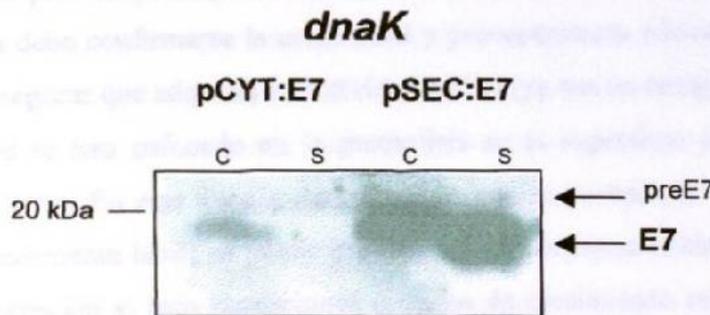


**Fig. 7. ClpP no está involucrada en la degradación intracelular de E7 en *L. lactis*.** Análisis por Western blot muestran que la cepa mutante de *L. lactis* para la proteasa ClpP no puede rescatar la producción de E7 en citoplasma. a) Muestras de cultivos inducidos de la cepa *wt* ó *clpP* conteniendo 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.

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.

## 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  $\beta$ -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), procaríotes (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

- Arnau 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, & Ingmer 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 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology*. 239:97-107.
- Kanda T, Furuno A, & Yoshiike 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.
- Medaglini 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, Aulabaugh 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, 2<sup>nd</sup> 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, & Röwenkau 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, Scarlato 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, Rossmeyssl 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.

### 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*.

### 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 <sup>r</sup> ; fragmento de PCR que codifica para E7                                                                                             | Capítulo 2                    |
| pCYT:Nuc                | pWV01                                                              | Cm <sup>r</sup> ; cassette de expresión de Nuc madura bajo el control del promotor P <sub>nucA</sub>                                                | L. Ribeiro <sup>(a)</sup>     |
| pSEC:Nuc                | pWV01                                                              | Cm <sup>r</sup> ; cassette de expresión del precursor SP <sub>Usp45</sub> :Nuc bajo el control del promotor P <sub>nucA</sub>                       | L. Ribeiro <sup>(a)</sup>     |
| pCYT:E7                 | pWV01                                                              | Cm <sup>r</sup> ; cassette de expresión de la proteína E7 nativa bajo el control del promotor P <sub>nucA</sub>                                     | Capítulo 2                    |
| pSEC:E7                 | pWV01                                                              | Cm <sup>r</sup> ; cassette de expresión del precursor SP <sub>Usp45</sub> :E7 bajo el control del promotor P <sub>nucA</sub>                        | Capítulo 2                    |
| pCYT:Nuc-E7             | pWV01                                                              | Cm <sup>r</sup> ; cassette de expresión de la fusión Nuc:E7 bajo el control del promotor P <sub>nucA</sub>                                          | Este trabajo                  |
| pSEC:Nuc-E7             | pWV01                                                              | Cm <sup>r</sup> ; cassette de expresión del precursor de la fusión SP <sub>Usp45</sub> :Nuc:E7 bajo el control del promotor P <sub>nucA</sub>       | Este trabajo                  |
| pCR-TOPO                | ColE1                                                              | Ap <sup>r</sup>                                                                                                                                     | Invitrogen                    |
| pCR:NsiI:E7             | ColE1                                                              | Ap <sup>r</sup> ; fragmento de PCR que codifica para E7 con sitios NsiI en sus extremos                                                             | Este trabajo                  |
| pLEISS:Nuc              | pWV01                                                              | Cm <sup>r</sup> ; cassette de expresión del precursor SP <sub>Usp45</sub> :leiss:nuc bajo el control del promotor P <sub>nucA</sub>                 | L. Ribeiro <sup>(a)</sup>     |
| pLEISS:E7               | pWV01                                                              | Cm <sup>r</sup> ; cassette de expresión del precursor de la fusión SP <sub>Usp45</sub> :leiss:E7 bajo el control del promotor P <sub>nucA</sub>     | Este trabajo                  |
| pLEISS:Nuc-E7           | pWV01                                                              | Cm <sup>r</sup> ; cassette de expresión del precursor de la fusión SP <sub>Usp45</sub> :leiss:Nuc:E7 bajo el control del promotor P <sub>nucA</sub> | Este trabajo                  |
| pLEISS:E7-Nuc           | pWV01                                                              | Cm <sup>r</sup> ; cassette de expresión del precursor de la fusión SP <sub>Usp45</sub> :leiss:E7:nuc bajo el control del promotor P <sub>nucA</sub> | Este trabajo                  |

<sup>a</sup>Genes de resistencia a: Ap<sup>r</sup>, ampicilina; Cm<sup>r</sup>, cloranfenicol.

<sup>(a)</sup>: 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<sub>usp</sub>:leiss:nuc-E7* y *SP<sub>usp</sub>:leiss:E7-nuc*. Para la construcción *SP<sub>usp</sub>: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<sub>isp-leiss</sub>: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<sub>2</sub>, 0.3% ADN de Esperma de Salmón, 0.01% Azul de Toluidina 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