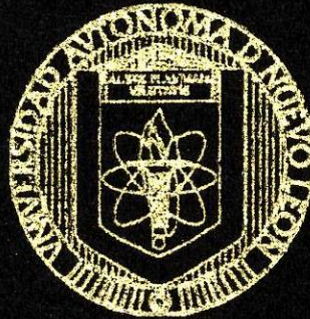


809

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
E INMUNOLOGÍA



"EXPRESION Y SECRECION DE UNA PROTEINA E7
MUTANTE DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO
TIPO 16 EN
Lactococcus lactis"

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL TITULO DE BIÓLOGO

PRESENTA:
DEYANIRA QUISTIAN MARTINEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
NOVIEMBRE DEL 2001

TL

RC280

.U8

Q8

c.1



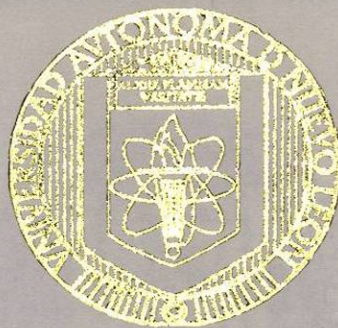
1080117197

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

E INMUNOLOGÍA



"EXPRESION Y SECRECION DE UNA PROTEINA E7
MUTANTE DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO
TIPO 16 EN
Lactococcus lactis"

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL TITULO DE BIOLOGO

PRESENTA:

DEYANIRA QUISTIAN MARTINEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

NOVIEMBRE DEL 2001

TL
RC280

.U8

Q8



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA**



**“EXPRESIÓN Y SECRECIÓN DE UNA PROTEÍNA E7 MUTANTE
DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16 EN
Lactococcus lactis”**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL TÍTULO DE BIÓLOGO**

Presenta

DEYANIRA QUISTIÁN MARTÍNEZ

San Nicolás de los Garza, N. L.

Noviembre del 2001.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

**“Expresión y Secreción de una Proteína E7 mutante del Virus del Papiloma
Papiloma Humano Tipo 16 en *Lactococcus lactis*”**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL TÍTULO DE BIÓLOGO**

PRESENTA

DEYANIRA QUISTIÁN MARTÍNEZ



Dr. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA
DIRECTOR



Dr. JUAN MANUEL ALCOCER GONZÁLEZ
ASESOR

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

“ Expresión y Secreción de una Proteína E7 mutante del Virus del Papiloma Humano Tipo 16 en *Lactococcus lactis*”

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL TÍTULO DE BIÓLOGO**

PRESENTA

DEYANIRA QUISTIÁN MARTÍNEZ

COMISIÓN DE TESIS

Dr. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA

PRESIDENTE



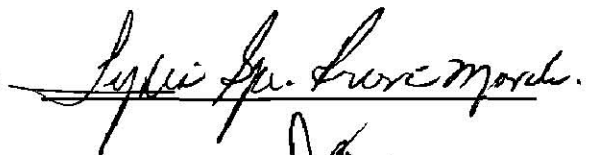
Dr. JUAN MANUEL ALCOCER GONZÁLEZ

SECRETARIO



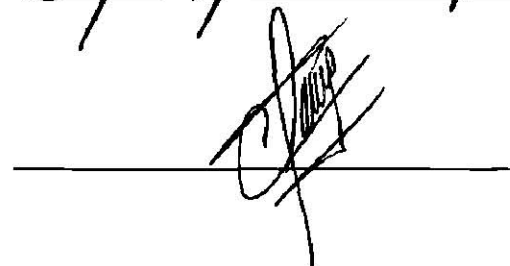
Dra. LYDIA GUADALUPE RIVERA MORALES

VOCAL



MC. EUGENIO ROMÁN CALDERÓN

SUPLENTE



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología perteneciente al Departamento de Microbiología y Virología, Unidad C de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enteramente a toda mi familia. A mis padres por la oportunidad, la confianza y la paciencia que me brindaron. A Eunice por estar conmigo siempre, Diana, Olivia, Mario, Ana, Gil, J León gracias.

A todos mis compañeros de generación que compartimos los mejores momentos durante la carrera, no hubiera sido igual sin todos ellos. A Virginia S. S. y J. Alberto V. L. gracias por su especial compañía.

A aquellos profesores que durante la carrera se ocuparon de nuestra formación y a aquellos que transmitieron y compartieron con nosotros el gusto y respeto por la Biología.

Al Dr. Roberto Montes de Oca, por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo y por su disposición para enseñar e interés en la formación de los estudiantes; agradezco también su confianza que siempre mostró. A los integrantes del Comité de Tesis por su apoyo y participación.

A mis compañeros de Laboratorio Areli HD, Arnulfo VO, Analí G, Humberto RR, Araceli GG por la compañía y ayuda que me brindaron. Al Biol. Luis BH. y Q.B.P. Naima CP. por el tiempo y la ayuda dedicados para la realización de este trabajo. A todos mis compañeros en general por la disposición para cooperar en cualquier aspecto en la realización de este trabajo, Gracias.

ÍNDICE

	PÁGINA
AREA DE TRABAJO	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	
1. Aspecto General del Cáncer Cervical	3
2. Asociación de Papilomavirus con Cáncer Cervical	3
3. Infección y Proceso de Transformación por HPV	4
4. Organización Genómica	7
4.1 Proteínas Tempranas	9
4.2 Proteínas Tardías	11
5. E7 del HPV-16	11
5.1 Interacción con pRB	13
5.2 Fosforilación	14
5.3 Unión al Zinc	14
6. Respuesta inmune en Infecciones por HPV y Cáncer Cervical	17
6.1 Respuesta Inmune Humoral	17
6.2 Respuesta Inmune Celular	18
6.3 Respuesta Inmune Efectiva contra Células Infectadas por el HPV	18
6.4 Respuesta Inmune Ineficiente contra Células Infectadas por el HPV	19
7. Expresión de la Proteína E7 del HPV-16	19
8. Expresión de Proteínas Heterólogas en Bacterias	20
8.1 Expresión en Bacterias Gram Positivas	21

	PAGINA
8.2 Mecanismos de Secreción de Proteínas en Bacterias Gram Positivas	23
8.3 Bacterias Ácido Lácticas	24
8.4 Expresión de Proteínas Heterólogas en <i>Lactococcus lactis</i> .	25
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
MATERIAL Y EQUIPO	31
METODOLOGÍA	
1. Construcción del Vector de Expresión.	33
1.1 Amplificación el gen E7 mutante	33
1.2. Clonación en pGEM-T Easy Vector	34
1.3 Caracterización y Purificación el gen E7 mutante	35
1.4 Subclonación en el vector de secreción	37
2. Transformación del vector de Secreción en <i>Lactococcus lactis</i>	38
3. Detección de la secreción de la proteína por <i>Lactococcus lactis</i>	39
3.1 Preparación de Extractos Proteínicos	39
3.2 Western Blot.	40
RESULTADOS	42
DISCUSIONES	56
CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAGINA
1. Microscopía Electrónica del Virus del Papiloma Humano.	4
2. Maduración de las Partículas Virales del HPV.	6
3. Interacción de Proteínas Virales con Factores Celulares.	7
4. Genoma Linear Simplificado del HPV-16.	8
5. Estructura Esquemática de la Proteína E7.	13
6. Secuencia de Aminoácidos de la Proteína E7 del HPV-16.	16
7. Amplificación del Gen E7m del HPV-16.	42
8. Patrón de Restricción del Gen E7m del HPV-16.	43
9. Análisis de Restricción de clonas pGE7mS.	45
10. Caracterización de Construcción pGE7mS.	46
11. Mapa de Restricción del Vector de Expresión pVE5524.	47
12. Caracterización de la Construcción pVE5524-E7mS	48
13 Construcción del vector pVE5524-E7mS	49
14. Caracterización de la construcción pVE5524-E7mS	50
15. SDS-PAGE de extractos de Proteínas	52
16. Detección de E7m en Extractos de Proteínas, tinción Nitrato de Plata	53
17. Detección de E7m en Extractos de proteínas, tinción Azul de Coomassie	54
18. Detección de E7 mutante en ensayo Western Blot	55

ÍNDICE DE TABLAS

1. Ejemplos de la Expresión de Proteínas Heterólogas en Bacterias Gram Positivas	23
2. Programa de Amplificación de la Secuencia de E7m.	33
3. Reactivos de PCR.	34

LISTA DE ABREVIATURAS

a	Aminoácido
amp	Ampicilina
<i>ApaI</i>	Endonucleasa de restricción de <i>Acetobacterpasterianus</i>
°C	Grados Celsius
CaCl	Cloruro de Calcio
Cys	Cisteína
CR	Región Conservada
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP'S	Desoxinucleótidos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilen Diamino Tetra acético
erit	Eritromicina
E7m	E7 mutante
HRP	Peroxidasa de Rábano
hrs	Horas
IPTG	Isopropil BD-Tiogalactopiranosido
KCl	Cloruro de Potasio
Kb	Kilobases
kDa	Kilo Daltons
LAB	Bacterias Ácido Lácticas
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	mililitros
mg	miligramos
mM	milimolar
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio

ng	nanogramos
OD	Densidad Óptica
ON	Toda la Noche
ORF	Marco de Lectura Abierto
pH	potencial de Hidrógeno
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-Sulfonilo
pRb1	Proteína del Retinoblastoma
PVDF	Membrana de Polivinilideno difluoro
RNAsaA	Ribonucleasa A
rpm	Revoluciones por minuto
<i>SaII</i>	Enzima de restricción de <i>Streptomyces albus</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Gel de Poliacrilamida SDS desnaturalizante
Ser	Serina
<i>SpeI</i>	Enzima de restricción de <i>Sphaerotilus species</i>
TCA	Acido Tricloroacético
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
vol	Volúmen
µl	Microlitros
X	número de veces concentrado
XGAL	5-bromo 4-cloro 3-indolil BD galactosa

INTRODUCCIÓN

El cáncer es uno de los problemas más frecuente y grave que afecta, en alguna de sus formas, a millones de personas en el mundo. El cáncer es caracterizado por un proceso de crecimiento ~~celular~~ descontrolado de células transformadas, en que los factores de regulación de la división y reparación celular frecuentemente se encuentran inactivados. En la actualidad, el cáncer cervical y el cáncer de mama se encuentran entre los cánceres que con mayor frecuencia afecta a la población femenina en el mundo.

El cáncer cervical desarrolla lesiones en el epitelio cervical que pueden tornarse malignas. Las terapias de tratamiento del cáncer cervical, como la quimioterapia, presentan una efectividad limitada para el tratamiento de lesiones recurrentes o avanzadas. Sin embargo la detección oportuna previene el desarrollo de lesiones avanzadas, por lo que la realización de campañas para la detección en las etapas iniciales representa un punto estratégico de erradicación. Aún así, el cáncer cervical representa la principal causa de muerte de la población femenina en México.

El desarrollo de vacunas profilácticas o terapéuticas contra el Papilomavirus Humano (HPV), principal factor que se encuentra involucrado en el desarrollo de cáncer cervical, constituye el enfoque principal para el estímulo del sistema inmune contra células cancerosas del epitelio cervical. Una vacuna profiláctica puede prevenir la infección por HPV y generar una respuesta del sistema inmunitario en el sitio y en el tiempo de la infección e impedir su establecimiento; por el contrario, la vacunación terapéutica puede eliminar la infección en lesiones malignas y benignas, y para su desarrollo es necesario la identificación de blancos tumorales para dirigir una respuesta inmune específica.

Dentro de las diferentes estrategias para el desarrollo de vacunas, el uso de bacterias vivas que expresan las proteínas antigénicas, es una estrategia reciente que ha sido utilizada para el tratamiento de diversas enfermedades. Este sistema ofrece ventajas de vacunación ya que representan un vehículo de entrega seguro y de fácil administración. Particularmente, las bacterias ácido lácticas, de amplio uso en la industria alimenticia, representan un sistema ideal para el desarrollo de un sistema de entrega de antígenos con fines de inmunización. Entre estas *Lactococcus lactis* que es una bacteria no colonizante y

no patógena, representan una nueva alternativa en la búsqueda de vacunas contra el cáncer cervical.

Las oncoproteínas E6 y E7 de los papilomavirus de alto riesgo son expresados de forma constitutiva en células de los tumores cervicales y su expresión es requerida para mantener a las células en estado transformado, por lo tanto las proteínas E6 y E7 se comportan como antígenos específicos de tumores, representado blancos para el desarrollo de vacunas contra el cáncer cervical. El presente trabajo forma parte de un proyecto global en el que se busca la inducción de una respuesta inmune contra el HPV mediada en la expresión de la proteína E7 del HPV-16 en la bacteria láctica *Lactococcus lactis*.

ANTECEDENTES

1. ASPECTO GENERAL DEL CÁNCER CERVICAL

El cáncer cervical constituye una de las enfermedades neoplásicas con mayor frecuencia en la población femenina constituyendo un problema en salud pública, ^{en}constituyendo la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en mujeres en el mundo. Varias causas se relacionan con el desarrollo de cáncer, pero desde hace tiempo, estudios epidemiológicos han relacionado el Papilomavirus Humano como uno de los principales agentes causales (Man, 1998). Algunos tipos de HPV poseen la capacidad de actuar en la transformación maligna de las células mientras que otros no, ciertos tipos de HPV comparten algunas características acerca de su influencia sobre las células infectadas. En la infección con una cepa de alto riesgo se requiere ciertos eventos genéticos adicionales para que ocurra la progresión a una lesión invasiva; estos eventos están relacionados con la inactivación de antioncogenes celulares por el virus, de esta forma se han identificado varios tipos de HPV relacionados con transformaciones malignas relacionado a Cáncer cervical.

2. ASOCIACIÓN ENTRE PAPILOMAVIRUS Y CÁNCER CERVICAL.

Los Papilomavirus pertenecen a una gran familia de virus de doble cadena de DNA que infectan células epiteliales de superficies cutáneas y mucosas de un diverso grupo de animales (Figura 1). Hasta la fecha se han detectado alrededor de 75 distintos tipos de HPV que han sido aislados de biopsias de tejidos humanos. Alrededor de 25 de esos HPV's son sexualmente transmitidos y causan enfermedades en el tracto genital femenino y masculino. El DNA del HPV ha sido encontrado en mas del 94 % de los casos de cáncer cervical estudiados, con los tipos HPV-16 y HPV-18 más comúnmente detectados (Man, 1998; Muñoz and Bosch, 1997; zur Hausen, 1991).

En México, en 90% de los carcinomas cervicales se detecta algún tipo viral: el HPV-16 se le encuentra en 50% de los casos; el HPV-18, en el 15%; los tipos HPV-31, 33 y 35 en su conjunto, en el 12%; y otros tipos virales en el porcentaje restante (Berúmen and Villegas, 1997).

Se reconocen dos grupos principales de HPV según el tipo de lesiones que desarrollan: virus de bajo riesgo, los cuales desarrollan lesiones benignas, y los de alto riesgo, los cuales prevalecen en lesiones malignas. El HPV-6 y HPV-11, por ejemplo, se encuentran asociados con enfermedades de bajo riesgo como verrugas genitales. En contraste, los HPV de alto riesgo como HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 y HPV-45, se encuentran asociados con lesiones intra epiteliales de alto grado y cáncer invasor (Man, 1998).

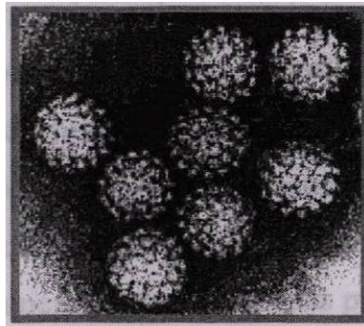


FIGURA 1. Microscopía del Virus del Papiloma Humano. Virus deDNA de 55 nm de diámetro. Perteneciente a la familia Papovaviride de cápside icosaedrica, no envuelto.

3. INFECCIÓN Y PROCESO DE TRANSFORMACIÓN POR HPV.

Los HPV son exclusivamente epiteliotrópicos, y el ciclo de infección se encuentra íntimamente relacionado al ciclo de diferenciación del epitelio que es infectado (Duggan-Keen et al., 1998; Tzyy-Choou, 1994). Se cree que el virus entra al organismo a través de pequeños cortes o abrasiones de la piel o mucosas; el virus debe llegar a la capa basal del

epitelio. Dependiendo de una variedad de factores, la infección puede permanecer latente o volverse productiva. La infección latente se define como el mantenimiento de una infección viral sin la producción del virus infeccioso. En la infección productiva, la replicación del DNA viral ocurre de manera independiente al DNA cromosomal, y lleva a cabo la producción de viriones. Este proceso ocurre especialmente en las células superficiales, estimulado por los factores transcripcionales específicos de diferenciación celular y en relación con la maduración epitelial y a su vez con la producción de queratina, terminando con la producción de proteínas de la cápside y el ensamble de nuevas partículas virales (Figura 2) (Herrera and Restrepo, 2000).

El ciclo de vida del HPV comienza en la capa basal del epitelio; las partículas componentes de la cápside viral, interactúan con moléculas de superficie de las células blanco y participan en la entrada del DNA viral al interior de la célula (Duggan-Keen et al., 1998). En esta capa del epitelio, ocurre el estado no productivo del ciclo viral del HPV, estableciéndose el virus de manera episomal en una bajo número de copias (Flores et al., 2000). En la infección primaria por el HPV las proteínas tempranas E1, E2 y E5 pueden ser detectadas, tales proteínas se encuentran relacionadas con el mantenimiento del estado episomal del virus, entre otras funciones (Duggan-Keen et al., 1998). En la capa suprabasal del epitelio en una infección avanzada, el virus se encuentra en mayor número de copias por célula; y son expresadas de manera predominante las proteínas E6 y E7. Estas proteínas se encuentran involucradas en la regulación de la proliferación celular, interfiriendo con los mecanismos de control del ciclo celular de hospedero al activar la síntesis de DNA. Cuando la replicación virus ocurre de manera episomal, se lleva a cabo la replicación del DNA y ensamblaje del virus con la expresión de las proteínas de la cápside L1 y L2, en las capas superiores del epitelio (Duggan-Keen et al., 1998; Farthing and Vousden, 1994).

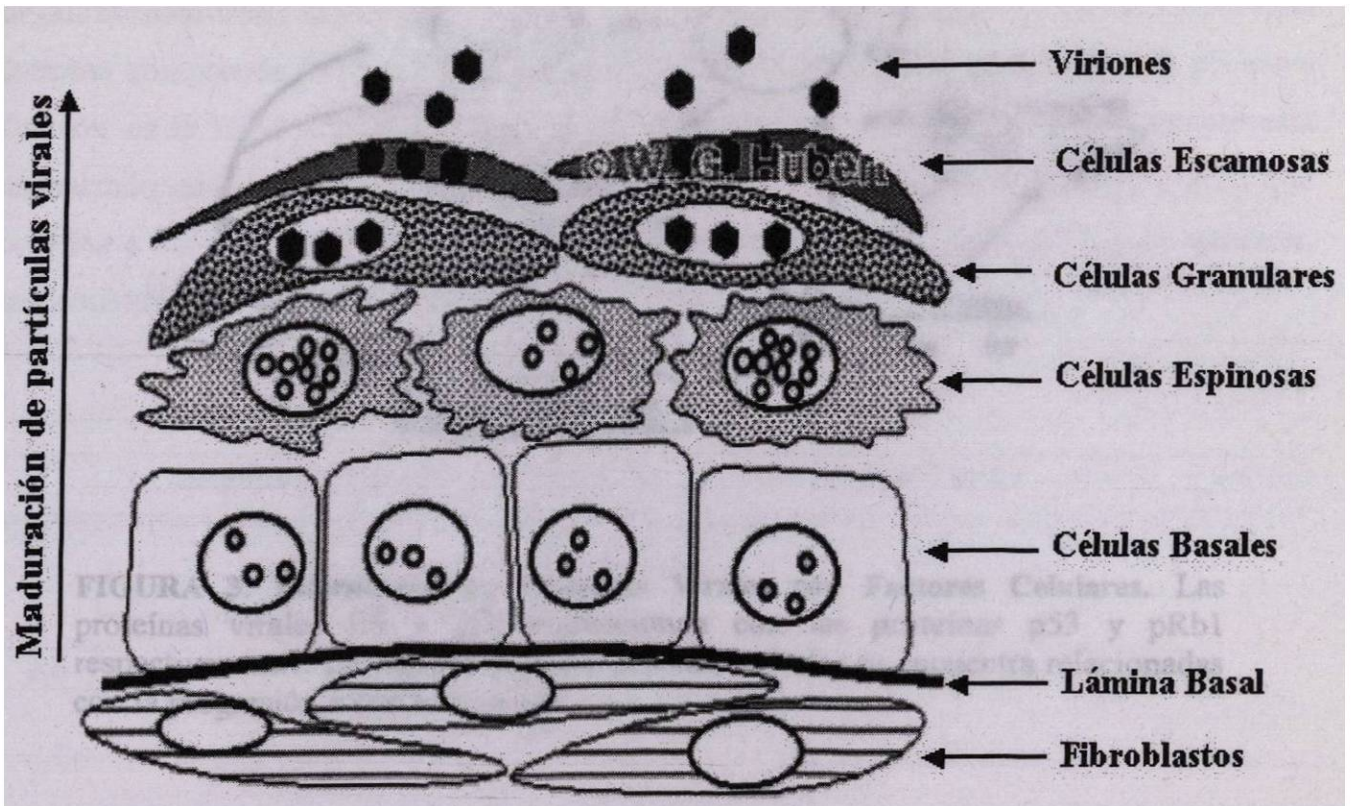


FIG 2. Maduración de las Partículas Virales del HPV. La maduración de las partículas virales se encuentra estrechamente relacionada al grado de diferenciación de las células del epitelio.

La progresión a carcinogénesis de las lesiones infectadas con HPV16 y HPV-18, se asocia con la integración del genoma viral al DNA de la célula huésped (Francis et al., 2000). En HPV asociados a la transformación maligna, el DNA viral puede encontrarse integrado en alrededor del 50% de los casos. Esta integración usualmente ocurre de manera que resulta en la pérdida de la expresión de los genes virales E1 y E2 y una selección para la continua expresión de E6 y E7 (Tzy-Choou, 1994). E2 interactúa con la región de control LCR regulando la expresión de las proteínas transformantes. Así la integración del genoma del HPV y la consecuente pérdida de la expresión de E2 puede ser un paso importante en el proceso de la carcinogénesis que resulta en la expresión constante de los genes virales E6 y E7 (Figura 3).

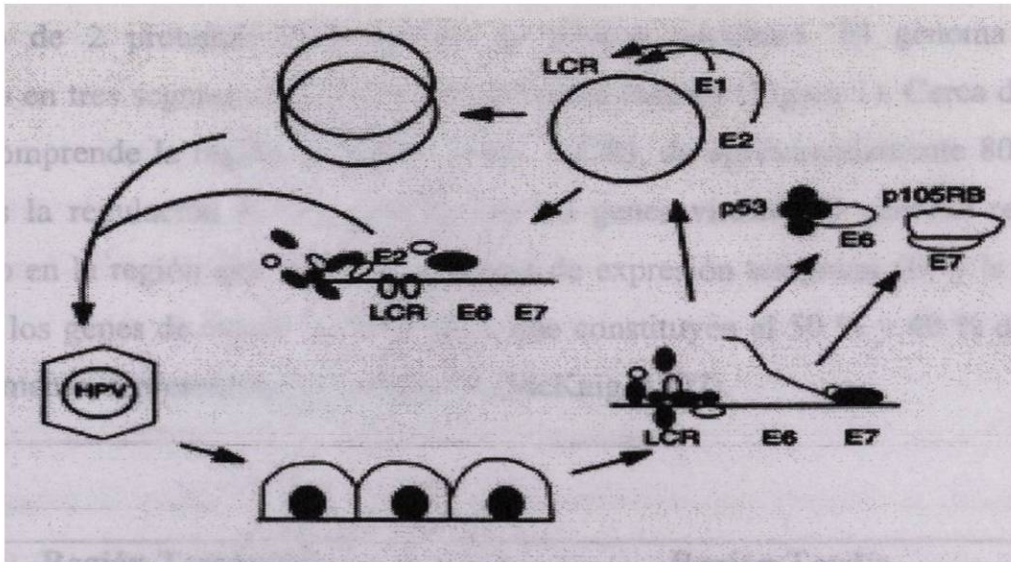


FIGURA 3. Interacción de Proteínas Virales con Factores Celulares. Las proteínas virales E6 y E7 interactúan con las proteínas p53 y pRb1 respectivamente. La expresión de las proteínas virales se encuentra relacionadas con la progresión a carcinogenesis.

Los cambios morfológicos ocasionados por la infección del HPV en células epiteliales, producen un reemplazo del epitelio escamoso, por una serie de anomalías histopatológicas conocidas como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) o lesiones intraepiteliales escamosas (LIS). Además se originan anomalías citológicas de las células epiteliales, proliferación aberrante, alargamiento de núcleos, disminución de la relación núcleo citoplasma y disposición de la cromatina en los márgenes del núcleo (Berry and Palefsky, 1998).

4. ORGANIZACIÓN GENÓMICA

Los papilomavirus son virus de DNA pequeños, de cerca de 55nm de diámetro. Las partículas virales contienen DNA circular de doble cadena, de cerca de 8,000 pb de longitud, el cual se encuentra en complejo con histonas celulares y empaquetado por una proteína protectora. Se encuentra encapsulados en viriones icosaédricos con 72 capsómeros

compuesto de 2 proteínas estructurales, no poseen envoltura. El genoma viral está organizado en tres segmentos generales de diferente tamaño (Figura 1). Cerca del 10% del genoma comprende la región larga de control (LCR), de aproximadamente 800 pb, cuya función es la regulación de la expresión de los genes virales. El genoma restante está organizado en la región que codifica los genes de expresión temprana (E) y la región que codifica a los genes de expresión tardía (L), que constituyen el 50 % y 40 % del genoma, respectivamente, representado en la figura 4 (McKaig, 1997).

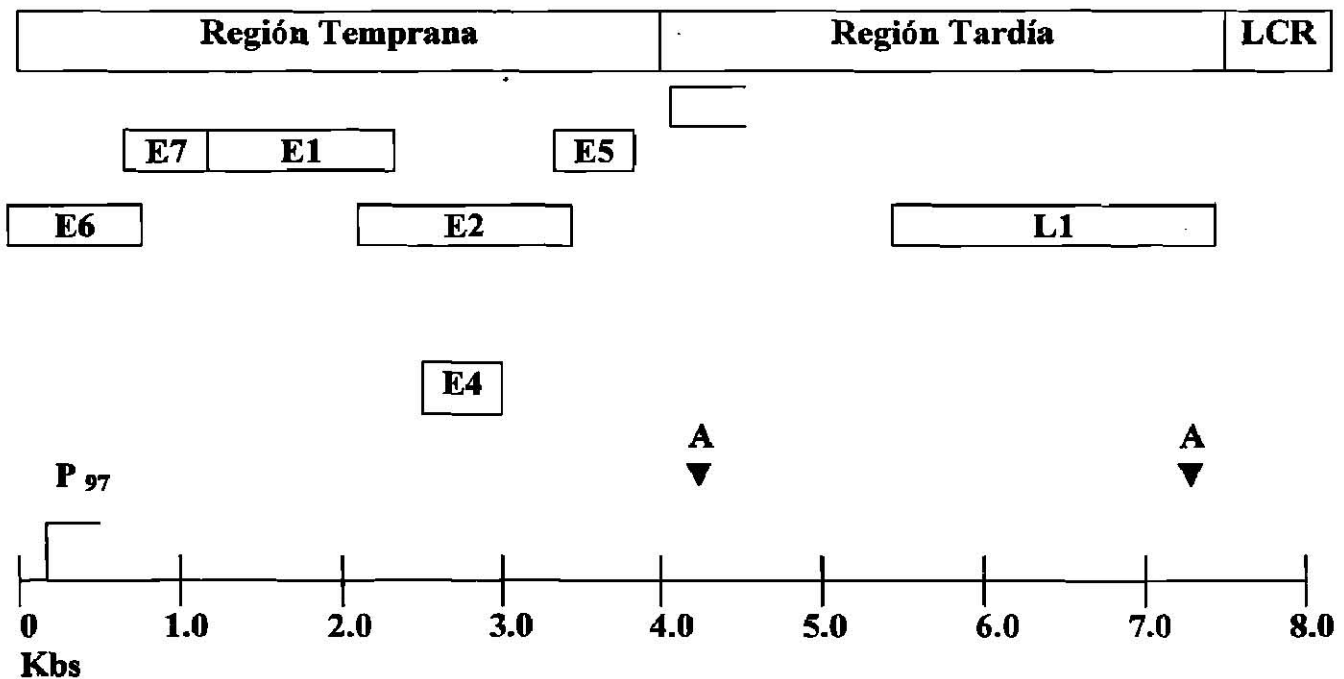


FIGURA 4. Genoma lineal simplificado del HPV-16. El genoma del HPV es una molécula de DNA circular de doble cadena de cerca de 8000 pb. Dividido en tres regiones principales, genes de expresión temprana (E), genes de expresión tardía (L) y la región larga de control (LCR). P₉₇, principal promotor temprano. A, sitios de poliadenilación.

El genoma de los Papilomavirus es transcrito como un complejo transcripcional largo, con múltiples regiones promotoras, dos señales de poliadenilación. Existen varios RNAm policistronicos resultado del splicing alternativo que codifican a genes tempranos y tardíos. El promotor viral P₉₇, localizado río arriba del marco de lectura abierta (ORF) de E6, es el

principal promotor temprano de los transcriptos que son iniciados; los principales RNAm generados por este promotor temprano, contiene los ORFs de los genes involucrados en la transformación de E6 y E7. El HPV-16 expresa una variedad de splicing alternativos de RNAm, conteniendo el ORF completo de la proteína reguladora de la transcripción E2 (Sherman and Alloul, 1992; Rohlfs et al., 1991).

4.1 PROTEÍNAS TEMPRANAS

Los genes E codifican proteínas no estructurales que regulan la transcripción y replicación del virus y son expresadas en células infectadas no productivas y en células transformadas. Dependiendo del tipo del HPV, los genes E4, E5 y E7 usualmente codifican para polipéptidos simples; en cambio los genes E1, E2 y E6 pueden ser expresados como algunas poliproteínas relacionadas, a través de splicing diferencial (McKaig, 1997).

El gen E1 del HPV codifica polipéptidos de 68 y 27 kDa. La proteína de 68 KDa codificada tiene actividad de Adenosin Trifosfatasa (ATPasa) y helicasa, se une a secuencias específicas de la LCR para iniciar la replicación de DNA viral. Juega un papel crítico en mantener el genoma viral como episoma durante el ciclo de vida viral. E1 y E2 forman un complejo en solución, el cual se une con alta afinidad y especificidad al origen de replicación, que contiene varios sitios de unión para ambas proteínas. E1 está involucrado en la regulación de la transcripción y transformación viral. Presumiblemente debido a la interacción con E2, E1 modula la capacidad de E2 para activar ciertos promotores virales (McKaig, 1997).

El gen E2 del HPV es expresado como uno o más proteínas de un rango de 370 a 430 aa de longitud; contiene dominios que regulan la transcripción de los genes virales durante la infección, además tiene un papel central en el ciclo de vida viral. La proteína E2 posee tres dominios funcionales: el extremo amino terminal, donde reside la actividad potenciadora de la transcripción que es, aparentemente, independiente de la interacción con el DNA; el extremo carboxilo terminal, donde se realiza la función de interacción con el DNA y, por lo tanto, es donde reside la capacidad de represión transcripcional; y la porción intermedia que, por su alto contenido de prolina, es considerada como una bisagra (Álvarez and López, 1995). La proteína E2 puede reprimir la transcripción de los

promotores virales P₉₇ del HPV-16 y P₁₀₅ del HPV-18, los cuales dirigen la expresión de las proteínas E6 y E7, reprimiendo o activando la transcripción, dependiendo de la cercanía entre sus sitios de interacción y la caja TATA (Álvarez and López, 1995; Francis et al., 2000). Esta represión ocurre a través de los sitios de unión a E2 localizadas en las regiones promotoras de los genomas virales. En los HPVs de alto riesgo la integración del genoma viral al DNA huésped es frecuente, perdiéndose la expresión del gen E2 y el control de la expresión de los genes E6 y E7. El gen E2 del papilomavirus bovino tipo 1, codifica a una proteína completa (E2TA), así como dos formas truncadas de E2, E2TR y E8/E2, como producto de *splincing* alternativos. Ninguna de las formas E2TR o E8/E2 contienen el dominio N-terminal de transactivación de E2TA, y ambos pueden actuar como inhibidores dominantes de la activación de la transcripción mediada por E2 (Francis et al., 2000).

El marco de lectura de E4 es expresado tardíamente en la replicación viral y se encuentra involucrado en la maduración y ensamblaje de partículas del virus. La expresión de E4 coincide con el comienzo de la replicación del DNA en estado vegetativo, ocurriendo en las capas más superficiales de la membrana basal en HPV específicos de mucosas (Álvarez and López, 1995).

El gen E5 codifica un polipéptido pequeño de 44 a 80 aminoácidos altamente conservado. E5 es un gen transformador del virus, estimulando la progresión de la célula y regulando positivamente los receptores de factores de crecimiento epidérmico, que son esenciales para que el queratinocito pase de la fase G1 del ciclo. Al aumentar esta actividad la célula es hiperestimulada a pasar a la fase S del ciclo con el riesgo de llevar daños cromosomales no reparados (Herrera and Restrepo, 2000).

Los genes E6 y E7 del HPV son expresados como poliproteínas de cerca de 151 y 98 aa de longitud respectivamente. Las propiedades de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV han sido extensivamente revisadas. La proteína E6 está localizada en la matriz nuclear y en otras membranas no nucleares y puede immortalizar queratinocitos primarios humanos junto con E7. Contiene dominios de unión al zinc y puede formar complejos con la proteína supresora de tumores p53 de la célula huésped. Debido a que p53 regula el crecimiento celular y actúa como un gen supresión de tumores, la pérdida de las funciones de p53 provoca la desregulación del ciclo celular y se promueven mutaciones, inestabilidad

cromosómica, y carcinogénesis en el genoma huésped. La proteína E6 puede también activar la telomerasa, crítica para la inmortalización celular (McKaig, 1997).

El gen E7 del HPV codifica a una pequeña proteína nuclear que induce la síntesis de DNA en células quiescentes y puede cooperar con oncogenes activados de la célula huésped para transformar fibroblastos primarios de rata. La proteína E7 muestra alguna homología estructural con proteínas transformantes del virus de simio (SV) 40 y adenovirus (LT y E1A), incluyendo la región de interacción con proteínas de la familia RB. Contiene dominios C-terminales de unión al zinc, sitios de fosforilación adyacente al dominio de unión a RB. La unión de E7 a miembros de la familia de Rb, resulta en el rompimiento del complejo E2F/pRb1, liberando a E2F que actúa como factor de transcripción de genes involucrados en la división celular, resultando en la pérdida del control de la progresión del ciclo celular (Phillips and Voousden, 1997).

4.2 PROTEÍNAS TARDÍAS.

Los genes L1 y L2 codifican las proteínas de la cápside, la proteína mayor (L1) de 55 kDa, y una proteína menor (L2) de 75 kDa. El tamaño de las proteínas L1 y L2 varía entre los diferentes tipos de HPV, pero presentan en forma general una longitud de 500 aa. Ambas proteínas son fosforiladas, L1 es fosforilada débilmente y parece ser bastante lábil, mientras que L2 es fosforilada excesivamente y parece ser más estable. La transcripción de los ORF's de L1 y L2 ocurre solamente cuando los viriones son ensamblados. La transcripción parece estar regulada por factores transcripcionales celulares que son únicamente producidos por las células epiteliales más diferenciadas en las capas superiores del epitelio. Aparentemente, las proteínas L1 y L2 no participan en la inducción de lesiones, pero en lesiones epiteliales de alto grado, hay una alta expresión de éstas (Xi and Banks, 1991).

5. E7 DEL HPV-16

La oncoproteína E7 del HPV-16 junto con E6, es responsable de la transformación celular, estas proteínas son retenidas y activamente expresadas en células de cáncer cervical

en humanos (Tzy-Chou, 1994). La expresión de la proteína E7 en un sistema *in vitro* produce la transformación de fibroblastos de ratón, solo o en cooperación con el oncogen *ras* activado y de queratinocitos primarios de humanos; puede interactuar con los inhibidores CDK p21 y p27, además de las ciclinas A y E (Jones et al., 1997; Dyson et al., 1989; McIntyre et al., 1996; Storey et al., 1988; Tanaka et al., 1989; Zerfass et al., 1995); así mismo, la expresión constante de E7 es requerida para mantener el fenotipo de células transformadas (Edmonds and Vousden, 1989).

La proteína E7 del HPV-16 presenta homología estructural con las proteínas transformantes del Virus de Simio SV40 y del Adenovirus LT y E1A, en regiones conservadas (CR) denominadas CR1 y CR2. Las regiones de homología CR se encuentran involucradas con la capacidad de interactuar con proteínas celulares de la célula huésped; incluyendo la región con la cual se media la interacción entre las oncoproteínas virales y las proteínas de la familia de Rb (Dyson et al., 1989).

El gen E7 del HPV-16 codifica a una fosfoproteína nuclear pequeña de 98 aa, que es la mayor proteína transformante del virus y la más abundante proteína viral en neoplasia cervicales (Stoler et al., 1992). En estudios realizados *in vitro*, se han identificado sus propiedades biológicas: inmortalización y transformación, solo o cooperando con *ras* o con la proteína E6, en una gran variedad de células de cultivo y líneas celulares; unión a proteínas hipofosforiladas de la familia de Rb; susceptibilidad a fosforilación por la CK II; presenta capacidad de unión al zinc; inducción de síntesis de DNA; transactivación del promotor E2 del adenovirus; rompimiento del complejo pRb1/E2F, entre otras funciones (Münger and Halpern, 97).

Estudios comparativos de proteínas E7 de tipos de HPV de alto y bajo riesgo, han mostrado que la actividad transformante de E7 del HPV-16 o 18 se correlaciona con la gran afinidad de unión a pRb1. Aunque la proteína E7 del HPV-1 es capaz de unirse con alta afinidad a proteínas celulares como RB1, p107 y el complejo ciclina A/CDK 2, no presenta alguna actividad transformante. E7 de los tipos de HPV de alto riesgo, tienen además otros dominios los cuales se encuentran involucrados en los procesos de transformación. Uno de esos dominios corresponde al sitio de fosforilación por la CK II, el cual se encuentra inmediatamente después de la región de unión a pRb1 (Ciccolini et al., 1994).

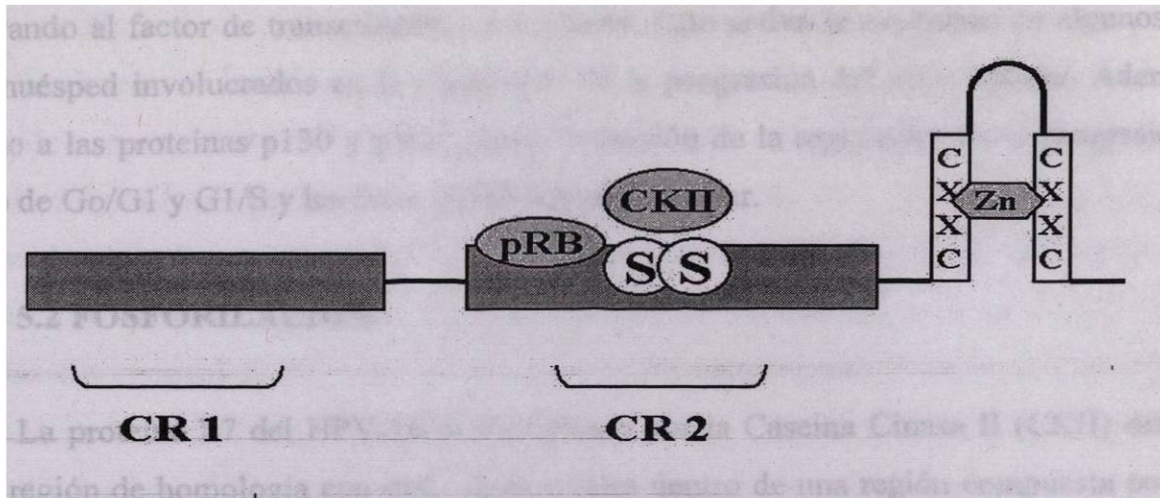


FIGURA 5. Representación Esquemática de la Proteína E7 del HPV-16. E7 muestra homología estructural con las proteínas E1A y LT de SV40 en las regiones conservadas CR1 y CR2. En la región CR2 se encuentra el sitio de interacción con pRb1 proteína celular y las serinas (S→31, S →32) blanco de fosforilación por la Caseína cinasa II (CKII). Motivos CXXC interactúan formando dedo de unión al zinc.

5.1 INTERACCIÓN CON pRb1.

El gen del retinoblastoma RB se encuentra deletado o mutado en muchas líneas celulares de tumor, incluyendo retinoblastomas, osteosarcomas, carcinomas de pulmón, de próstata, de mama y leucemias; así la pérdida de la actividad normal del gen es un factor en la generación de cánceres (Imai, 1991).

La proteína E7 forma complejos con proteínas de la familia del Gen de Retinoblastoma (Rb1, p107, p130) dentro del dominio de la Región Conservada 2 (CR2), los cuales son reguladores negativos del crecimiento celular. Rb1 regula la progresión del ciclo celular uniéndose al factor de transcripción E2F, los miembros de esta familia de factores de transcripción regulan la expresión de genes que intervienen en la síntesis de DNA. Rb1 es fosforilada por uno o más cinasas dependientes de ciclinas, las formas hipofosforiladas de pRb1 son capaces de bloquear la progresión del ciclo celular. Otras proteínas relacionadas con Rb, p130 o p107, regulan diferentes puntos de revisión en el control del ciclo celular y se unen a ciclinas A y E.

E7 del HPV se une a formas hipofosforiladas de pRb1 y relaja la unión con E2F, liberando al factor de transcripción en la célula. Esto activa la expresión de algunos genes del huésped involucrados en la regulación de la progresión del ciclo celular. Además E7 unido a las proteínas p130 y p107 afecta la función de la regulación de la progresión del paso de Go/G1 y G1/S y las fases G2/M del ciclo celular.

5.2 FOSFORILACIÓN.

La proteína E7 del HPV-16 es fosforilada por la Caseína Cinasa II (CKII) dentro de una región de homología con otros tipos virales dentro de una región compuesta por 8 -10 aa cargados negativamente; la fosforilación ocurre en dos Ser adyacentes, Ser 31 y Ser 32. La actividad de la CKII puede distinguirse de otras cinasas por la habilidad de utilizar GTP y ATP con similar eficiencia y ser inhibida a bajas concentraciones de heparina. La CKII ha sido implicada en la regulación de la síntesis de RNA y proteína, así como en el metabolismo del DNA por fosforilación de enzimas y proteínas que median estos procesos (Barbosa et al., 1990). Mutaciones en estas posiciones afectan disminuyendo dos veces la eficiencia de fosforilación (Barbosa et al., 1990), sin embargo las mutaciones en el sitio CKII tiene solamente limitados efectos en la transformación (Firzlaff et al., 1990). La fosforilación de E7 no es requerida para la unión de pRb1, experimentos demuestran la unión a pRb1 en mutantes para los sitios de fosforilación y aa adyacentes. Sin embargo la fosforilación de E7 tiene un efecto en la transformación, pudiendo actuar positivamente regulando la actividad de transformación de E7 (Firzlaff et al., 1990).

5.3 UNIÓN AL ZINC

La transformación de células de mamíferos por el HPV-16 requiere la unión de la proteína viral E7 al producto del gen supresor de tumores RB. La unión de E7 a pRB1 inhibe algunas propiedades bioquímicas de éste último, incluyendo la asociación con el factor de transcripción E2F. Fragmentos derivados del dominio CR2 de la proteína E7 son capaces de unirse a pRb1 y son suficientes para inhibir la unión de la proteína E7 completa. Sin embargo esos fragmento de CR2 exhiben una reducida afinidad por pRb1 comparada con la proteína completa y no inhiben la formación del complejo pRb1-E2F; tales

observaciones sugirieron la posibilidad de sitios adicionales de contacto entre E7 y pRb1. Se identificó el dominio CR3, el cual contiene un motivo de unión al zinc en E7, adicionalmente se identificaron los aminoácidos que interactúan con esta región en pRb1. Péptidos provenientes de la región CR3 de E7, inhiben la unión de E2F a pRb1. Estos resultados indican que para que exista una óptima unión de E7 a pRb1 requiere de dos sitios de contacto distintos: el dominio previamente identificado de alta interacción entre el dominio CR2 de E7 y pRb1, y una segunda interacción entre el dominio CR3 y la región Carboxilo terminal de pRB, tal interacción es suficiente impedir la unión de E2F a pRb1 en presencia de E7 (Patrick et al., 1994).

El dominio CR3 se localiza en el extremo carboxilo terminal dentro de la proteína E7, contiene dos motivos Cys-X-X-Cys, presentando 29 aa entre cada repetición. La presencia de estas repeticiones conlleva a la formación de un dedo de zinc, involucrado en la estabilidad de la proteína así como en la actividad transformante de E7. Mutantes para los motivos Cys-X-X-Cys exhiben una reducida habilidad de transformar fibroblastos de roedores, falla en immortalizar queratinocitos humanos, y exhiben baja eficiencia de transactivación. Estos datos revelan que la región de los dedos de zinc de la proteína E7 es un dominio funcional importante en el fenómeno de transformación (McIntyre et al., 1993).

Mutaciones en las posiciones 65 Cys→Ser, 98 Cys→Ser dentro de los motivos Cys-X-X-Cys del E7 del HPV-18, reducen la actividad transformante y afecta la vida media de la proteína (McIntyre et al., 1993). Sin embargo el aumento o la disminución de la vida media de las proteínas mutantes, no se relaciona con la disminución de la actividad de transformación. La doble mutante para las repeticiones Cys-X-X-Cys, presentó un aumento de vida media pero una disminución de actividad transformante con relación a la E7 silvestre. Una posible explicación de la inhabilidad de transformar células de estas proteínas, es que ellas son incapaces de formar dímeros, esto debido a que pierden la habilidad de unir Zinc a sus estructuras y formar el dedo de zinc. La forma dimérica puede ser requerida para la interacción con factores celulares distintos a pRb1; además la dimerización de E7 puede ser requerido para el relajamiento del complejo E2F-pRb1, función importante en la actividad oncogénica de E7. (McIntyre et al., 1993)

En estudios mutacionales de la proteína E7 del HPV-16 dentro de las repeticiones Cys-X-X-Cys en sistemas eucariotes; en las mutaciones que afectan solamente una de las

motivos Cys-X-X-Cys se reduce severamente la actividad transformante pero no se interrumpe totalmente. Doble mutantes en las cuales ambos motivos fueron afectados, demostraron muy bajo nivel de actividad transformante. Esto implica que la presencia de las repeticiones Cys-X-X-Cys aumentan el potencial transformante de E7 pero no es esencial para ello (Edmonds and Vousden, 1989). Las mutaciones en los motivos de formación de dedo de zinc en las posiciones 58 Cys→Gly, 91 Cys→Gly de E7 del HPV-16 lleva a una rápida degradación de la proteína expresada en células eucariotas, basado en el hecho que la E7 mutante para estas posiciones puede ser detectada mejor en presencia de un inhibidor del proteosoma. Debido a que el dedo de zinc puede ser importante en mantener la estabilidad de la proteína E7, las mutaciones en tales motivos pueden reprimir la actividad de unión al Zinc y resultar en la inestabilidad de la proteína. Se sugiere que la mutante puede ser degradada rápidamente en el proteosoma y una gran cantidad de péptidos antigénicos pueden ser transportados a retículo endoplásmico y posteriormente ser presentados por moléculas presentadoras de antígenos (Shi et al., 1999).

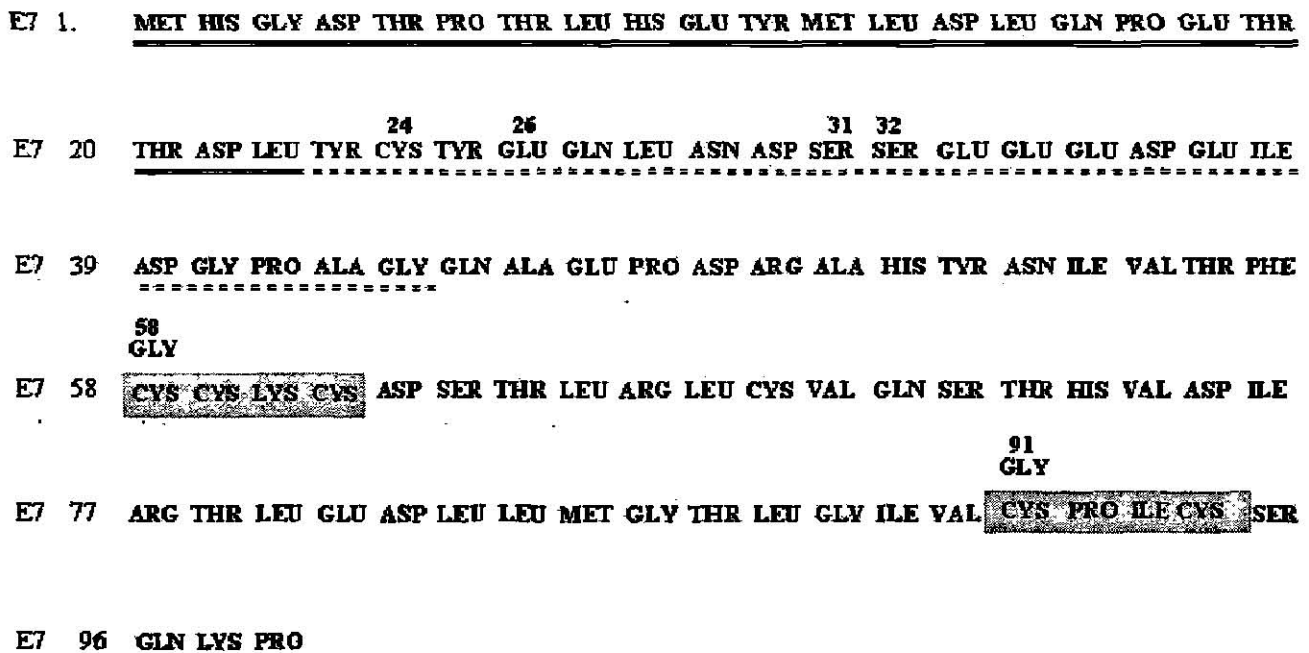


FIG. 6. Secuencia de Aminoácidos de E7 del HPV-16. E7 consta de 98 residuos de aminoácidos, se señala la regiones CR 1 y CR2 , residuos de interacción con pRB (24 CYS, 26 GLU), sitios de fosforilación por CKII 31 SER, 32 SER. Los motivos CYS-X-X-CYS (58 CYS GLY, 91 CYS GLY) muestran las posiciones que fueron sustituidas para la generación de la proteína mutante de E7

6. RESPUESTA INMUNE EN INFECCIONES POR HPV Y CANCER CERVICAL

Existen evidencias que indican que el sistema inmune está involucrado en la infección primaria y en la progresión maligna de las lesiones por el HPV, en especial la respuesta inmune mediada por células. En las etapas previas al cáncer invasor, como son el condiloma acuminado y las neoplasias preinvasoras, el sistema inmunológico aún es capaz de combatir y promover la regresión o mantener al tumor localizado. Durante la evolución del tumor, las células tumorales adquieren nuevas lesiones 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 (Berumen and Villegas, 1997).

6.1 RESPUESTA INMUNE HUMORAL.

Las infecciones virales son primariamente intracelulares, y los antígenos virales escapan al alcance de los anticuerpos. La respuesta humoral es importante sólo para infecciones virales productivas, en las que las partículas virales salen al espacio extracelular por exocitosis o durante la lisis celular por efecto del propio virus o las células citotóxicas del paciente. En las invasiones no productivas, como serían los casos de los NIC de alto grado y el cáncer 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. Sin embargo, en el suero de pacientes con cáncer cervical frecuentemente se encuentran anticuerpos contra la proteína E7 del HPV-16 ó el HPV-18 (Muller, 1992). Igualmente, se han detectado anticuerpos contra las proteínas E2 del HPV-16 y el HPV-18, E4 y E6 del HPV-16. Además, se ha encontrado que los títulos de anticuerpos contra las proteínas E2, E6 y E7 aumentan con el estadio clínico y varían de acuerdo con la manera en que es tratada la enfermedad (Viscidi, 1993), sugiriendo por lo tanto que estas proteínas virales son blancos para el sistema inmunológico.

6.2 RESPUESTA INMUNE CELULAR

En la respuesta celular participan, por un lado, componente del sistema inmune y, por otro, las células blanco infectadas por el virus que tratan de evadir el sistema inmune. De éste último los LTC, linfocitos T cooperadores, células NK, macrófagos, células presentadoras de antígenos, y las citocinas producidos por esas células. De las células blanco participan las moléculas del complejo de histocompatibilidad, otras moléculas coestimuladoras en la superficie de la membrana y citocinas secretadas por ellas mismas (Berumen and Villegas, 1997).

6.3 RESPUESTA INMUNE EFECTIVA CONTRA CELULAS INFECTADAS POR EL HPV.

En las etapas iniciales de la enfermedad, la respuesta inmune es aún efectiva porque las células infectadas por el HPV expresan moléculas de histocompatibilidad clase I. Las moléculas de clase I son proteínas de membrana involucradas en la presentación antigénica y juegan un papel muy importante en la respuesta inmune antitumoral. En los queratinocitos infectados, las proteínas virales se encuentran en el citosol mezcladas con las proteínas celulares, y ambas son degradadas en los proteosomas y posteriormente son transportadas a la membrana celular y presentadas a los linfocitos T citotóxicos. La participación de los linfocitos cooperadores en la activación de los linfocitos T citotóxicos y otras células inflamatorias es importante activando linfocitos T citotóxicos y macrófagos. Los linfocitos T cooperadores pueden ser activados por las citocinas liberadas por las células infectadas por el HPV o por células presentadoras de antígenos que presentan péptidos virales en el contexto de moléculas de clase I y II. La generación de una respuesta inmune efectiva depende de la secreción de citocinas específicas que recluten y activen células inmunes en el sitio de la infección. Las citocinas liberadas inhiben la expresión de los genes virales y estimulan la expresión de los genes virales así como estimulan la expresión de las moléculas de clase I del complejo de histocompatibilidad en los queratinocitos humanos, lo que permite una mejor presentación de los antígenos virales y con ello una respuesta inmune aumentada. Aumenta la sensibilidad de las células epiteliales

cervicales inmortalizadas con el HPV para ser destruidas por las células NK activadas (Berumen and Villegas, 1997).

6.4 RESPUESTA INMUNE INEFICIENTE CONTRA CELULAS INFECTADAS POR EL HPV.

La ineficiencia del sistema inmune para combatir el tumor puede estar asociada a múltiples fallas de los componentes del sistema inmune o de la célula blanco, las cuales se van acumulando durante la evolución de la enfermedad. En los pacientes no inmunodeficientes, las alteraciones locales del sistema inmune son inducidas, inicialmente por el HPV y las células tumorales. Las células blanco en etapas avanzadas utilizan cuando menos tres caminos diferentes para evadir la respuesta inmune: a) la modulación de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad; b) la modulación de otras moléculas de unión en la superficie celular, y c) la modulación de la secreción de citocinas celulares. Estos cambios inducen una depleción localizada de células inmunocompetentes y una disminución de su capacidad de respuesta a las citocinas reguladoras, lo cual pudiera contribuir a la progresión tumoral de las lesiones avanzadas (Berumen and Villegas, 1997).

7. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA E7 DEL HPV-16

Se ha producido la proteína E7 en eucariotes inferiores; en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, la expresión de E7 fue posible detectando la presencia de la proteína E7 en el núcleo en forma fosforilada (Tomassino et al. 1990). En otra levadura, la expresión de E7 en *Saccharomyces cerevisiae* (Carter et al., 1991), se realizó en forma secretada obteniéndose en forma soluble. La expresión de E7 en sistemas bacterianos, se realizó en *E. coli* fusionada a otras proteínas (Chinami et al., 1992., Liu et al., 1998), posteriormente se expresó en otras bacterias con fines de vacunación. Se han desarrollado estudios en los cuales ha sido usada un cepa recombinante atenuada de *Salmonella typhimurium*, expresando secuencias de E7 y/o secuencias de E6 del HPV-16, y se observó

la inducción de una respuesta inmune específica al HPV-16 en ratones (Londoño et al., 1996) *Salmonella* también ha sido estudiada en la expresión de partículas de la cápside viral del HPV-16. Otra estrategia de vacunación contra el HPV con el uso de vectores vivos, es el uso de la bacteria comensal del tracto genital como vector para maximizar la longevidad de la expresión de proteínas del HPV en mucosas. La inmunización intravaginal en ratones y monos con *Streptococcus gordonii* expresando la proteína E7 del HPV-16 anclada a membrana induce una respuesta sistémica y local (Pozzi et al., 1992). Recientemente se expresó la proteína E7 en un sistema inducible de *Lactococcus lactis* de localización citoplasmática y de secreción (Bermúdez et al., 2001).

8. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN BACTERIAS

El uso de vectores vivos, específicamente bacterias, para la expresión de proteínas heterólogas, representa una variedad de ventajas como estrategia de vacunación. Ambas, bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, incluyendo cepas micobacterianas, así como un amplio rango de virus han sido investigados para la expresión de antígenos. El conocimiento de técnicas de biología molecular y genética ha permitido desarrollar nuevas estrategias de atenuación, desarrollando cepas atenuadas de bacterias y virus por técnicas de DNA recombinante. Los genes codificando los antígenos pueden ser insertados en vectores de organismos no patógenos o atenuados para la expresión de tales genes (Liljeqvist and Ståhl, 1999).

Muchas enfermedades son causadas por patógenos residiendo en el tracto digestivo o en mucosas; para la inducción de protección contra estos patógenos o sus toxinas, además de la respuesta inmune sistemática, es importante el desarrollo de respuesta local de mucosas. El uso de bacterias vivas como vacuna de mucosas ha sido activamente estudiado, la vacunación en mucosas es fácilmente administrado, por ruta nasal u oral; y debido a que el vehículo es una bacteria, es fácil su producción (Liljeqvist and Ståhl, 1999). La expresión de antígenos heterólogos en el contexto de vacunas vivas, fue reportado primero para las

bacterias Gram-negativas, pero las bacterias Gram-positivas y las micobacterias también están siendo investigadas con este propósito (Fischetti et al., 1996; Ståhl and Uhlén, 1997).

Se han desarrollado estudios en los cuales ha sido usada un cepa recombinante atenuada de *Salmonella typhimurium*, expresando secuencias de E7 y/o secuencias de E6 del HPV-16, y se observó la inducción de una respuesta inmune específica al HPV-16 en ratones (Londoño et al., 1996). *Salmonella* también ha sido estudiada en la expresión de partículas de la cápside viral del HPV-16. Otra estrategia de vacunación contra el HPV con el uso vectores vivos, es el uso de la bacteria comensal del tracto genital como vector para maximizar la longevidad de la expresión de proteínas del HPV en mucosas. La inmunización intravaginal en ratones y monos con *Streptococcus gordonii* expresando la proteína E7 del HPV-16 induce respuesta sistémica y local (Pozzi et al., 1992).

8.1 EXPRESIÓN EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

Las bacterias Gram-positivas han sido investigadas para el desarrollo de sistemas de expresión de proteínas heterólogas, principalmente con fines de vacunación. Se han usado, por ejemplo, bacterias patógenas atenuadas como la cepa micobacteriana Bacilo Calmette-Guérin (BCG) y *Staphylococcus aureus*. Estas cepas han sido estudiadas con este propósito, pero recientemente el uso de bacterias no patogénicas de grado alimenticio representa una alternativa atractiva. Las bacterias no patogénicas son seguras para el uso de estrategias de vacunación, debido a que no representan ningún riesgo de reversión a virulencia; además el uso de bacterias de grado alimenticio, es poco probable el hecho de que se desarrolle una respuesta inmunitaria contra el vector, lo cual no es deseable (Liljeqvist and Ståhl, 1999).

Sistemas de expresión de Gram-positivas para la expresión citoplásmica o secreción de antígenos, ya han sido bien desarrollados. El uso de los sistemas de expresión en superficie en bacterias Gram-positivas ha sido extensivamente estudiado en algunas bacterias; diferentes antígenos han sido expresados (Tabla 1) y han sido considerados ventajosos para el desarrollo de inmunidad en mucosas cuando se usa bacterias Gram-positivas como sistema de vacunación. Por ejemplo la expresión en superficie en *Staphylococcus xylosus* (Hansson et al., 1992) y *S. carnosus* (Samuelson et al., 1995), empleando la región C-terminal de las regiones de anclaje a superficie celular de SpA. Las

proteínas heterólogas de fusión provenientes de *Staphylococcus* son expresadas a través de plásmidos en sistemas de superficie en *Streptococcus gordinii* (Pozzi et al., 1992) basada en la integración cromosomal de una fusión de genes entre la proteína M de *S. pyogenes* y el antígeno correspondiente (Pozzi et al., 1992). La proteína M fue posteriormente utilizada en la expresión en superficie en varias Bacterias Ácido Lácticas (Piard et al., 1997), sugiriendo la aplicabilidad del sistema de expresión en superficie a otras bacterias recombinantes. La expresión de proteínas fueron dirigidas a la superficie celular en *Lactococcus lactis* por la fusión de la región C-terminal de la proteína PtrP, enzima asociada a la superficie celular (Norton et al., 1996). La expresión de antígenos en el bacilo Calmette-Guérin (BCG) fue realizada por la fusión del gen codificando el antígeno y el gen de la lipoproteína asociada a membrana de *Mycobacterium tuberculosis* (Stover et al., 1993). Debido a que BCG es un patógeno extracelular, en analogía con *Salmonella* spp que es una bacteria Gram-negativa, es posible que se pueda obtener una buena respuesta inmune celular a los antígenos expresados en estas bacterias.

Bacterias comensales Gram-positivas o de grado alimenticio o fermentadores de alimento, son interesantes candidatos para desarrollar una vacuna para mucosas; esto ha sido demostrado por numerosos estudios de inmunización en el cual se obtuvo respuesta específica de anticuerpos, debida a la exposición de antígenos externos en superficie (Fischetti et al., 1996; Ståhl and Uhlen, 1997). La bacteria comensal humana *Streptococcus gordinii* ha sido extensivamente estudiados como vectores recombinantes de vacuna, expresando antígenos derivados de HIV (Pozzi et al., 1994; Di Fabio et al., 1998), Papilomavirus Humano (Oggioni et al., 1995; Medaglini et al., 1997) y el alérgeno Ag5.2 del avispon de cara blanca (Medaglini et al., 1995). La expresión en bacterias Gram-positiva ha sido también investigado para la aplicación en otras áreas, la biocatálisis microbial puede ser desarrollada por la expresión en superficie de enzimas activas de *S. carnosus* (Strauss and Götz, 1996), y expresión en superficie de una cadena simple de anticuerpo activo IgE humano, demuestra la posibilidad de desarrollar como instrumento de diagnóstico a células Gram-positivas (Gunneeriusson et al., 1996).

Bacteria	Sistema de Expresión	Proteína Expresada	Referencia
Bacterias Fermentadoras de Alimento			
<i>S. xylosum</i>	Proteína A de <i>S. aureus</i>	Epítoto de la glicoproteína G de RSV	Hansson et al., 1992; Nguyen et al., 1993, 1995; Robert et al., 1996
<i>S. carnosus</i>	Proteína A de <i>S. aureus</i>	Epítoto de la glicoproteína G de RSV	Samuelson et al., 1995; Robert et al., 1996; Ståhl et al., 1997
<i>Lactococcus lactis</i>	Proteinasa Ptp de <i>L. lactis</i>	Fragmento C de la Toxina del Tétanos	Wells et al., 1993a; Norton et al., 1996, 1997; Robinson et al., 1997
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Proteína M6 de <i>S. pyogenes</i>	Proteína gp41 del HIV-1	Rush et al., 1997
Bacterias Comensales			
<i>S. gordinii</i>	Proteína M6 de <i>S. pyogenes</i>	Alergeno Ag5.2	Medaglioni et al., 1995
		Proteína E7 del HPV-16	Oggioni et al., 1995; Medaglioni et al., 1997; Di Fabio et al., 1998
		Proteína gp120 del HIV-1	Pozzi et al., 1994; Di Fabio et al., 1998
Otras bacterias			
<i>B. subtilis</i>	CwbA de <i>B. subtilis</i>	Invasina de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Acheson et al., 1997
<i>Mycobacterium bovis</i>	Lipoproteína asociada a <i>M. bovis</i>	OspA de <i>Borrelia burgdorferi</i>	Stover et al., 1993

Tabla 1. Ejemplos de la expresión de proteínas heterólogas en bacterias Gram-positivas

8.2 MECANISMO DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

Las proteínas destinadas para el transporte a través de la membrana citoplasmática son marcadas por un péptido señal o líder, el cual está compuesto generalmente por un fragmento de 15 a 20 aa hidrofóbicos, flanqueados por un extremo amino terminal cargado positivamente. Para las proteínas secretadas, la señal es proteolíticamente removida por peptidasas. Los péptidos señal son necesarios y suficientes para el transporte a través de la membrana así, el polipéptido fusionado puede estar, mantenido en un estado competente de exportación, por medio de dos vías separadas (Navarre and Schneewind, 1999).

En una vía, la partícula de reconocimiento de la señal (SRP) puede unirse al péptido señal de las cadenas nacientes y temporalmente arrestar la traducción del ribosoma. En *E. coli* la SRP consiste en una ribonucleoproteína. La traducción continúa, después de que el complejo SRP-Ribosoma se rompe sobre el receptor de membrana con el cual se entrega el polipéptido naciente al canal de secreción SEC. Alternativamente el péptido señal unido al

propéptido o precursor pueden ser transportados después de que su síntesis ha sido completada, por ejemplo, por un proceso de transporte post traduccional. La unión de una chaperona de secreción, SecB, puede mantener a esos precursores en un estado de transporte competente. La proteína SecB unida a la porción madura puede además interactuar con la proteína SecA, otro componente de la vía de secreción. Una vez iniciada en la vía secretoria por el péptido señal, la chaperona secB se disocia del precursor, permitiendo el transporte de todo el polipéptido a través de la membrana. Las vías convergen en el canal de translocación, y la diferencia en las vías que son usadas puede ser en función en la hidrofobicidad del péptido señal (Navarre and Schneewind, 1999).

8.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.

Las Bacterias Ácido Lácticas se encuentran extensamente en la naturaleza, y son encontradas primariamente en el suelo y dondequiera que se encuentren altas concentraciones de carbohidratos, polipéptidos, vitaminas y baja concentración de oxígeno. Muchas LAB (Lactic Acid Bacteria) son normalmente encontradas en la leche, así como en carne y vegetales, y ciertas LAB son habitantes normales en el cuerpo humano. Muchas de ellas han sido utilizadas en la industria alimenticia para crear productos alimenticios fermentados.

LAB son organismos Procariotes unicelulares. Como otras bacterias, LAB se reproducen por fisión binaria, originándose con esto, réplicas exactas de las células originales, (excepto en raros casos de mutación). Se reproducen rápidamente, de 30 a 90 minutos en condiciones óptimas. Debido a que LAB es un grupo muy diverso, se encuentran clasificadas juntas debido a su principal producto final que tienen en común, el Ácido Láctico. Pueden tolerar condiciones de acidez de cerca de pH 4 por algunas semanas, son Gram-positivas, y son anaeróbicas pero aero tolerantes.

LAB son microorganismos con complejas y variadas necesidades nutrimentales para su cultivo en Laboratorio. LAB requiere carbohidratos, principalmente lactosa y glucosa como fuente de carbono y energía para producir ATP. Proteínas, péptidos, aminoácidos específicos y ácidos nucleicos derivados son también necesarios como fuente de Nitrógeno para la síntesis de proteínas. La vía principal del metabolismo de los carbohidratos

comienza con un transporte activo de la lactosa a través de la Membrana celular. La lactosa o lactosa-6-fosfato es entonces convertida a glucosa y galactosa o galactosa-6-fosfato. LAB no puede sintetizar algunos aminoácidos esenciales, y entonces la proteólisis de proteínas y péptidos del sustrato son necesarios para su crecimiento. LAB posee enzimas proteolíticas que se localizan en pared celular, membrana celular y citoplasma, que intervienen en los procesos fermentativos; el mecanismo de señalización de estas proteínas ha sido explotada la producción de proteínas heterólogas en bacterias lácticas.

8.4 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN *Lactococcus lactis*.

Las bacterias Ácido Lácticas son bacterias Gram-positivas que han sido extensivamente usadas en la industria alimenticia para la producción y preservación de productos fermentados, a estos organismos se les considera por lo general como seguros. *Lactococcus lactis* es una bacteria Gram positiva no invasiva y no colonizante de grado alimenticio.

Se han realizado estudios que investigan el potencial de las bacterias Ácido Lácticas para nuevas aplicaciones, tal como la expresión de proteínas heterólogas en procesos de fermentación o con otros fines. *L. lactis* es un modelo de bacteria Ácido láctica y se considera un buen candidato para la secreción de proteínas heterólogas dado que las cepas carentes de plásmidos no secretan proteasas (Langella and Le Loir, 1999).

L. lactis secreta relativamente pocas proteínas conocidas; la proteína Usp45 es la mayor proteína extracelular de la cual se desconoce su función. van Asseldonk M. et al en 1993 realizó un análisis funcional del péptido señal de la Usp45 de *L. lactis* para la secreción de una proteinasa homóloga y una proteína heteróloga la α -amilasa; los resultados indicaron que era posible secretar tanto la proteína homóloga así como la proteína heteróloga con el péptido señal de la Usp45 (van Asseldonk et al., 1993). Otros sistemas de expresión para bacterias Gram-positivas han sido desarrollados para la expresión de proteínas heterólogas; un sistema reportero consiste en la fusión en la fusión de la forma secretada de la nucleasa (Nuc) de *Staphylococcus aureus* a una proteína heteróloga en *L. lactis*. La evaluación de la actividad enzimática es sensitiva y no tóxica para las colonias, de esta manera puede ser un buen reportero de exportación con la

posibilidad de aplicación en otras bacterias Gram positivas (Poquet et al., 1998; Le Loir et al., 1998). También se han desarrollado sistemas para la expresión de proteínas para su anclaje a pared celular en *L. lactis* (Steidler et al., 1997).

El uso de *Lactococcus lactis* para el desarrollo de un sistema de vacunación, se reportó con la expresión de citocinas biológicamente activas en *L. lactis* (Steidler et al., 1995), sorprendentemente, la síntesis continua de esas citocinas no influenciaron el rango de crecimiento del organismo. Esto llevó a la idea de que *Lactococcus lactis* puede ser utilizada como vacuna con fines terapéuticos, dado que fue capaz expresar citocinas *in vivo*, además la expresión del antígeno el fragmento C de la toxina del Tétanos y como adyuvante la IL-2 o IL-6 elevó los títulos de anticuerpos presentes (Steidler et al., 1998).

Debido a que *L. lactis* es un microorganismo no colonizante, puede ser administrado con toda seguridad dado que como se ha mencionado es una bacteria de uso común en la industria alimenticia por lo que su administración no representa un riesgo en humanos. *Lactococcus lactis* puede ser cultivado y obtenido fácilmente a un bajo costo. Por tales razones, la expresión de proteínas terapéuticas, diferentes a las citocinas, pueden ser expresadas con éxito en *L. lactis*.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervical, junto con el cáncer de mama, es considerado entre los problemas de salud pública más importantes en México y a escala mundial. En México es la neoplasia más frecuente en la población femenina, siendo la infección por el virus del papiloma la causa principal de desarrollo de cáncer cervical. A escala mundial existen en la actualidad programas de detección de infecciones tempranas por HPV; sin embargo la falta de implementación o efectividad de tales programas ha permitido el mantenimiento del cáncer cervical como la principal causa de muerte en la población femenina. Por lo tanto es importante el desarrollo de investigaciones enfocadas al desarrollo de vacunas que prevengan o controlen el desarrollo del cáncer. La oncoproteína E7 del HPV es expresada de forma constitutiva en células de los tumores cervicales y su expresión es requerida para mantener a las células en estado transformado; por tal razón E7 representa un blanco para el desarrollo de una vacuna contra el cáncer cervical. El presente trabajo forma parte de un proyecto global para el desarrollo de una vacuna terapéutica contra el cáncer cervical mediante el uso de la proteína E7 en *Lactococcus lactis*. Sin embargo debido a la propiedad transformante de E7, su uso representa un riesgo para el desarrollo de una vacuna, por lo que se consideró la conveniencia del uso de una proteína E7 disminuida en esta propiedad. En el presente trabajo se expresó una proteína E7 mutante del HPV-16, la cual representa dos ventajas respecto a la forma silvestre: la forma mutante ha perdido sustancialmente la capacidad transformante lo que la constituye como un antígeno seguro, y es más efectiva para la inducción de una respuesta inmune celular. La construcción de una cepa recombinante de *L. lactis* que exprese la proteína E7 mutante, propósito de este trabajo, representa el primer paso en el desarrollo de la vacuna.

HIPÓTESIS

H₀ : La clonación del gen E7 mutante bajo la regulación de un promotor constitutivo no permite la expresión y secreción de una proteína E7 mutante del HPV-16 en *Lactococcus lactis*.

H_a : La clonación del gen E7 mutante bajo la regulación de un promotor constitutivo, permite la expresión y secreción de una proteína E7 mutante del HPV-16 en *Lactococcus lactis*.

OBJETIVO GENERAL

Construcción de una cepa recombinante de *Lactococcus lactis* MG1363 que exprese y secrete una proteína E7 mutante del Virus del Papiloma Humano 16.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Construir un vector de expresión para la síntesis y secreción de E7 en *Lactococcus lactis* utilizando un promotor constitutivo.
- 2) Transformar *Lactococcus lactis* con el vector de expresión.
- 3) Detectar la secreción de la proteína E7 por *Lactococcus lactis*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El gen E7 del HPV-16 en su estado mutante fué amplificado del plásmido BC219 y se subclonó en el vector pGEM-T Easy Vector de PROMEGA que permite la selección de clonas recombinantes por α -complementación; posteriormente el gen E7 mutante se purificó y clonó en el vector pVE5524. Este vector se transformó en células competentes de *Lactococcus lactis* MG1363 por electroporación, para la obtención de una cepa recombinante de *Lactococcus lactis* que produzca la proteína E7 mutante del HPV-16 bajo la regulación del promotor p59. Se analizó esta cepa, en primera instancia, realizando una extracción de DNA plasmídico y digestión con endonucleasas de restricción así como ensayos de PCR para comprobar la presencia del gen E7 mutante dentro de la construcción; el análisis de la producción de la proteína por la bacteria será por un ensayo Western de extractos de la cepa recombinante.

MATERIAL Y EQUIPO

EQUIPO:

Cámara de Electroforesis OWL Separation System Inc.

Campana de Flujo Laminar VECO S.A de C.V.

Cámara de Transferencia HEP-1 OWL Separation System Inc.

Centrífuga Avanti Centrifuge™ J-251, Beckman

Electroporador de Células ECM30 BTX® A Division of Genetronics, Inc.

Incubadora ORBIMIX 1010 BINKMANN, INCUBATOR.

Microcentrífuga 5415 C Eppendorf®

Termociclador PTC-100™, MJ Research, Inc.

Termo-mixer R Eppendorf 1.5 ml

Transiluminador FBTIV-88 Fischer Scientific

CEPAS BACTERIANAS:

Escherichia coli

DH5α F⁺ / *endA1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1Δ (lacIZYA-argF)U169 deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15) PROMEGA*

TGI F⁺ *traD36 lacI^q Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺ / supE Δ(hsdM-mcrB) 5(r_k⁻ m_k⁺ McrB) th Δ(lac-proAB)* INRA Collection

Lactococcus lactis

L. lactis subsp *cremoris* MG1363 INRA Collection

PLÁSMIDOS:

BC219-E7m Plásmido portando el gen E7 proporcionado por el Dr Lian Qiao

pGEM-T Easy Vector PROMEGA

pVE5524 (pBS:p59:NucA:CWA-long:pIL252) INRA Collection

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

***Apa*I ROCHE**

***Eco*RI ROCHE**

***Nsi*I ROCHE**

***Pvu*II ROCHE**

***Sal*I ROCHE**

***Spe*I ROCHE**

ENZIMAS DE MODIFICACIÓN

Lisozima BOEHRINGER MANHEIM GmbH/Germany

Mutanolisina SIGMA

RNAsaA SIGMA

T₄DNA Ligasa ROCHE

Taq Polimerasa

ANTICUERPOS

Anti E7 HPV-16 ED17 SANTA CRUZ Biotechnology

Proteína G:

METODOLOGÍA

1) Construcción del Vector de Expresión.

1.1 Amplificación el gen E7 mutante. El vector de expresión donde se clonó el gen E7 mutante posee un sitio de restricción *SaII* al término de la secuencia del péptido señal de *usp45* y un sitio de restricción *SpeI* al término de una señal de anclaje a membrana, el fragmento que comprenden ambos sitios fue eliminado; es necesario que el gen amplificado quede en fase de lectura con el péptido señal por lo que se amplificó agregando el sitio *SaII* en el extremo 5' del gen. Se realizó un PCR del gen E7 mutante del HPV-16 usando como templado el plásmido BC219-E7m. Los oligos utilizados fueron los siguientes: oligo E7/*SaII* 5' AGTCGACCCATTGCATGGAGATAC ACCTACATTG 3' el cual suprime el codón de inicio de la traducción e introduce un sitio de restricción *SaII* en el extremo 5' del gen. Y el oligo E7/TRP 5' ATCAAAAAAAAAAGCCCGCTCATTAGGCGGGCTATTTATG GTTTCTGAGAACAGA 3' el cual agrega un terminador de la transcripción independiente de Rho en el extremo 3' del gen. La amplificación se realizó en Termociclador (PTC-100™, MJ Research, Inc) bajo el siguiente programa en Tabla 2:

TEMPERATURA	TIEMPO
1) 94 °C	4 min
2) 94 °C	1 min
3) 55 °C	1 min
4) 72 °C	3 min
5) 34 ciclos al paso 2	
6) 72 °C	7 min
7) 25 °C	

Tabla 2. Programa de Amplificación de E7

Los reactivos se utilizaron a las siguientes concentraciones en una reacción de 25 μ l totales como se muestra en la Tabla 3:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD
Oligo 5' E7/SalI	100 ng/ μ l	1 μ l
Oligo 3' E7/Trp	100 ng/ μ l	1 μ l
dNTP's	2.5 mM	2.5 μ l
Taq Polimerasa	5 unidades	1 μ l
Buffer	10X	2.5 μ l
H ₂ O estéril		16 μ l
DNA templado	1 ng	1 μ l

Tabla 3. Tabla de Reactivos Utilizados en PCR.

1.2 Clonación en pGEM-T Easy Vector. El producto amplificado, se sometió a una reacción de ligación en el sistema de clonación de productos de PCR pGEM-T Easy Vector de PROMEGA, en las condiciones que especifica el kit, para la obtención de la construcción pGEM-E7m. La reacción de ligación se transformó en células Calcio competentes de *E. coli* cepa DH5 α (PROMEGA).

Ligación del gen E7m en el vector pGEM-T Easy Vector PROMEGA. Se tomó 1 μ l del producto de PCR del gen E7m, se mezcló con 1 μ l del vector, 5 μ l del Buffer 2X, 1 μ l de T₄ DNA ligasa (ROCHE), y H₂O estéril en un volumen de reacción de 10 μ l. La mezcla se incubó toda la noche a 4° C; inactivando la ligasa a 60° C por 15 minutos antes de la transformación.

Preparación de Células Ca⁺ Competentes. Se activó la cepa *E. coli* DH5 α en 5 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó a 37° C a 150 rpm (ORBIMIX 1010 BINKMANN, INCUBATOR) toda la noche para su crecimiento. Se tomó 1 ml del cultivo y se inocularon 30 ml de medio LB sin antibiótico, creciendo el cultivo a 37° C a 150 rpm, hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 0.6. Al alcanzar la densidad el cultivo se incubó en hielo por 10 minutos para

detener su crecimiento. El cultivo se centrifugaron (Avanti Centrifuge™ J-251, Beckman) a 7000 rpm a 4°C por 5 min. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 4 ml de CaCl 0.1M frío, se repitió dos veces el lavado y se resuspendieron en 0.5 ml de CaCl 0.1M y 0.5 ml de Glicerol 50% frío. Las células se almacenaron a -80° C en alícuotas de 200µl.

Transformación de células Calcio Competentes con la reacción de Ligación. Para realizar la transformación, se colocaron en un tubo de 1.5 ml, 50 µl de bacterias competentes de *E. coli* DH5 α, se agregaron 5 µl de ligación, se incubaron en hielo por 20 min. Posteriormente se les dio un choque térmico colocando la 42° C por 50 segundos y en hielo por 2 min. Se añadieron 950 µl de medio SOC (2 % de Peptona, 0.5 % de Extracto de Levadura, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 100 mM de MgCl²⁺, 100 mM de Glucosa) y se incubó a 37° C a 150 rpm por 90 minutos. Se sembraron por extensión 100 µl de las bacterias transformadas en placas LB/amp a una concentración de 100 ng/ml, conteniendo además 600 ng de IPTG y 800 ng de XGAL por placa, necesarios para el proceso de selección. Las placas fueron incubadas toda la noche a 37° C.

1.3 Caracterización y Purificación del gen E7 mutante. Las clonas resultantes se seleccionaron por el sistema de α-complementación. Tal sistema permite distinguir las colonias que poseen un inserto de las que no lo poseen, basándose en la coloración blanca o azul que desarrolla la colonia. Se realizó extracción de DNA plasmídico de las colonias y se sometió a una caracterización con la enzima de restricción *SalI* (ROCHE), con el fin de comprobar la presencia del inserto dentro del vector así como conocer la orientación en la que se encuentra éste. Una vez seleccionada la clona adecuada, se realizó una extracción de DNA plasmídico a gran escala. Para la purificación del gen E7 mutante de la clona seleccionada, se digirió con las enzimas de restricción *SpeI* (ROCHE) que posee el vector y el sitio *SalI* que fue introducido por PCR, para liberar el inserto con los extremos apropiados. Se purificó el fragmento de 340 pb, correspondiente al gen E7 mutante.

Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*. Método de Lisis Alcalina. Las colonias blancas obtenidas se activaron en 3 ml de LB/amp y se incubaron ON a 150 rpm a 37° C. Del cultivo obtenido se centrifugaron 1.5 ml de medio a 14,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 150 µl de Sol'n I (50mM de Glucosa, 10mM

EDTA pH 8.0, 25mM TRIS-HCl pH 8.0). Se agregaron 300 µl de Sol'n II (0.2 M de NaOH, y 1 % de SDS) se mezcló por inversión hasta observar clarificación. Se agregaron 250 µl de Sol'n III (3 M de Acetato de Potasio pH 4.8), se mezcló por vortex y se centrifugaron 10 min a 14 000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 1 vol de Isopropanol se mezcló por vortex, y se incubó 20 min a -20° C. Se centrifugó a 14,000 rpm a 4° C por 15 min. Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla en 1 ml de Etanol al 70 % y una vez seca, se resuspendió en 30 µl de H₂O estéril y 3 µl de RNasaA (SIGMA) a una concentración de 10 mg/ml.

Caracterización de clonas. Digestión con *SaII*. Una vez obtenido el DNA plasmídico de las colonias blancas resultantes se procedió con un análisis de restricción con la enzima de restricción-*SaII*, en presencia del Buffer de reacción y H₂O estéril en un volumen total de 20 µl de reacción. Se incubaron las digestiones a 37° C por espacio de 1 hora.

Extracción de DNA plasmídico a gran escala. MIDI preparación de PROMEGA. Una vez seleccionada la clona adecuada, con el marco de lectura en posición 5' a 3' dentro del vector, se procedió a realizar una extracción de DNA plasmídico a gran escala. La cepa fue activada en 5 ml de medio LB/amp y colocada a 37° C a 150 rpm ON. Se inoculó un volumen de 100 ml de LB/amp y se incubó para su crecimiento por espacio de 12 a 16 horas. Se centrifugó el cultivo a 10000 g por 10 minutos a 4° C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet completamente en 3 ml de Sol'n de resuspensión. Se le añadió 3 ml de Sol'n de Lisis y se mezcló por inversión por espacio de 3 min. Se le añadió la Sol'n de Neutralización, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 G por 20 minutos a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante y se le añadió 10 ml de Resina de Purificación, se mezcló suavemente y se hizo pasar por una midicolumna con aplicación de vacío. Se lavó dos veces con 15 ml de Sol'n de Lavado de Columna. Se centrifugó la porción de midicolumna conteniendo Resina-DNA para desechar residuos. Finalmente se eluyó el DNA mediante la adición de agua a 65° C, se centrifugó a 8,000 rpm por 5 min y se almacenó a -20° C. El plásmido obtenido fue caracterizado con las enzimas de restricción *EcoRI* y *PvuII* (ROCHE).

Purificación del Fragmento E7m. El DNA obtenido del MIDI Preparación, se sometió a digestión para la liberación del fragmento de E7m. Los extremos de corte que se generaron con las enzimas de restricción *SaII* - *SpeI*, son del tipo cohesivo. La reacción de

digestión se realizó en presencia de la enzima *SpeI*, el Buffer H de Reacción, DNA y agua estéril en un volumen de 30 μ l finales de reacción. Se incubó por 2 hrs a 37° C, posteriormente se le añadió la enzima *Sall* y se digirió por 2 hrs más. Posteriormente se inactivó la digestión colocándola a 65° C por 15 min. Se corrieron las digestiones en una electroforesis en gel de Agarosa al 0.8 % en Buffer TAE (2M de TRIS Base, 17.5 % de Ácido Acético, 0.05 M de EDTA pH 8.0), se tiñó el gel con Bromuro de Etidio para purificar el fragmento. Se cortó del gel la banda de interés, en trozos y se colocó en un tubo de 1.5 ml. Se agregó 1 vol de H₂O estéril y 2 vol de Fenol. Se incubó 5 min a -20° C y 10 min a 65° C, se repitió el procedimiento tres veces. Se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min se recuperó el sobrenadante y se agregó 1 vol de SEVAG (24 vol de Cloroformo, 1 vol de Alcohol Isoamílico) y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 1 vol de Isopropanol y 1/10 de vol de Sol'n III, se dió vórtex e se incubó 20 min a -20° C. Se centrifugó a 4° C por 15 min a 14 000 rpm. Se lavó la pastilla con 1 ml de Etanol 70% y una vez seca se resuspendió 6 μ l de H₂O estéril.

1.4 Subclonación en el Vector de Expresión. Se realizó una extracción de DNA plasmídico a gran escala midi preparación de la cepa de *E.coli* TGI (INRA Collection) que contiene al vector pVE5524 (INRA Collection), vector de expresión en el que fué ligado el gen E7m en los sitios *Sall* y *SpeI* del vector.

Digestión del vector pVE5524 en sitios *Sall* y *SpeI*. Se realizó una extracción a mediana escala del vector pVE5524 con el kit de MIDI prep descrito previamente, y fue caracterizado con las enzimas *NsiI* y *Sall* (ROCHE). El DNA obtenido se sometió a una digestión con las enzimas *Sall* y *SpeI* simultáneamente, en presencia del Buffer H de en un volumen de 30 μ l finales de reacción. Se incubó la digestión por 2 hrs a 37° C. Se inactivó la digestión a 65°C por 15 min.

Ligación de E7m en el vector pVE5524 en sitios *Sall* y *SpeI*. La reacción de Ligación se realizó en presencia del fragmento del gen E7m purificado y el vector pVE5524 digerido, ambos fragmentos presentando los extremos cohesivos *Sall* y *SpeI*. Se agregó T₄DNA Ligasa y Buffer de Reacción 10X, en un volúmen total de 10 μ l de reacción, para la obtención de la construcción pVE5524-E7mS. Se incubó la reacción a 4° C por 24 hrs, se inactivó la ligasa a 65° C por 15 minutos.

2) Transformación en *Lactococcus lactis* con el Vector de Expresión.

La reacción de ligación se transformó por electroporación en células electrocompetentes de *Lactococcus lactis* MG1363 (INRA Collection). Las clonas resultantes de la transformación se crecieron en medio GM17/erit y se realizó una extracción de DNA plasmídico por el Método de Lisis Alcalina. El DNA plasmídico se sometió a una digestión con la enzima de restricción *ApaI* y se realizaron ensayos de PCR para comprobar la presencia del gen.

Preparación de Células Electro competentes de *Lactococcus lactis* MG1363. Se preparó un preinóculo de la cepa de *L. lactis* MG1363 de 2 ml de medio GM17 (M17 Base, 5 % de Glucosa) y se incubó ON a 30° C. Se inoculó un volumen de 200 ml de GM17S + Glicina (GM17, 0.5 M de Sucrosa, 0.5 % de Glucosa, 2 % de Glicina); se incubó a 37° C hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 0.6. Se centrifugó el cultivo en por 10 min a 7,500 rpm a 4° C. Se resuspendió la pastilla en 10 ml en una solución estéril y fría de Sucrosa al 0.5 M y Glicerol al 10 %. Se repitió el lavado 2 veces, resuspendiendo en 1 ml de una Sol'n fría de Glicerol al 10% y PEG 3 300 al 10%. Se almacenaron a -80° C en alícuotas de 100 µl congelando inmediatamente.

Transformación por Electroporación de *L.lactis* MG1363 con la reacción de ligación. Se colocaron 50 µl de bacterias electrocompetentes de *L. lactis* y 10 µl de la ligación E7m purificado y pVE5524 (ambos fragmentos con extremos *SalI* y *SpeI*), en una cuveta de electroporación, se colocó en hielo por unos minutos. Se le dio un pulso eléctrico en Electroporador (ECM30 BTX® A Division of Genetronics, Inc) con las condiciones de 200 Ω, 2,500 V, 25 µF. Después del pulso, se le agregó 1 ml de medio GM17 y se incubó por 2 hrs a 30° C. Se concentró el cultivo en 100 µl finales los cuales fueron sembrados en placas GM17/erit 5ng/µl y se incubó ON a 30° C.

Extracción de DNA plasmídico de *L. lactis*. Las clonas obtenidas de la transformación fueron activadas en 4ml de medio GM17/erit, se recuperó la pastilla de todo el cultivo centrifugando a 13,000 rpm, 3 min a 4° C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 300 µl de Buffer TES (50 mM Tris-HCl pH8.0, 1mM de EDTA pH 8.0, 25% de Sacarosa) Lisozima (BOEHRINGER) 10 mg/ml y Mutanolisina (SIGMA) 100

ng/ml , se incubó 30 min a 37° C, para la preparación de protoplastos. Se agregó 400 µl de Sol'n II y se incubó 4° C. Se agregó 400 µl de Sol'n III y se incubó 10 min a 4° C y se centrifugó a 13,000 rpm a 4° C por 15 min. El sobrenadante se le agregó 1 vol de Fenol:Cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 13 000 rpm a 4° C por 5 min. Se precipitó con 1 vol de Isopropanol y 1/10 de vol de Acetato de Sodio pH 5.2 y se incubó a -20° C. Se centrifugó a 13,000 rpm a 4° C por 15 min. Se lavó la pastilla con etanol 70 % y se resuspendió el DNA en Agua estéril y RNAsa.

Caracterización de Clonas. PCR y Digestión. Para la caracterización de las clonas se realizó un PCR para la amplificación del gen E7m en las condiciones anteriormente utilizadas. Una vez obtenido el producto de PCR, éste se sometió a una digestión con la enzima de restricción *ApaI* (Roche), sitio de restricción presente en la secuencia de E7m y dentro del vector, con lo que una clona positiva resultaría en la liberación de un fragmento de tamaño determinado. La reacción de PCR se realizó utilizando los oligos con los cuales se realizó la amplificación original en las mismas condiciones.

3) Detección de la Secreción de la Proteína por *Lactococcus lactis*

3.1 Preparación de Extractos Proteínicos. Se creció un cultivo de 2 ml a una OD₆₀₀ = 1, se centrifugó a 14,000 rpm a 4° C por 5 minutos; el medio de cultivo y la fracción celular que fueron procesados por separado para la obtención de proteínas de las dos fracciones.

Medio de cultivo:La fracción del medio de cultivo se filtró (0.22mm MILLEX-GV, de Millipore). Se agregó 1mM de PMSF y 10mM de DTT y 100 µl de TCA al 100% y se incubó 10 minutos en hielo para precipitar. Se centrifugó a 4° C y se resuspendió en 10 µl de NaOH 50mM y 10 µl de Buffer de Carga (30 mM TRIS HCl pH 6.8, 4% de SDS, 20% de Glicerol, 2mg/ml de Azul de Bromofenol) frío y 1mM de PMSF. Se almacenaron las muestra a -20° C.

Fracción Celular : Se resuspendió la pastilla del cultivo en 30 µl de Buffer TES lisozima/mutanolisina, 1mM de PMSF y 10mM de DTT y se procedió a incubar por 20 min a 37° C. Se le agregó 20 µl de SDS al 10 % se mezcló por vortex y se añadió 50 µl de Buffer de Carga y 1mM de PMSF. Se almacenaron las muestras a -20° C.

Tinción de SDS-PAGE con Nitrato de Plata. Se preparó un gel de poliacrilamida desnaturalizante SDS-PAGE (Laemmli, 1970) con un gel resolutivo al 12%. A las muestras se les agregó 2µl de β-mercaptoetanol como agente reductor, y se calentaron a 99°C por 5 min para la desnaturalización de las proteínas antes de cargar en el gel. Una vez terminada la electroforesis, el gel resolutivo se colocó en una Solución Fijadora (40 % de Etanol, 10 % de Ácido Acético y 50 % de Agua) por 30 min en agitación suave. Después se colocó en una Solución Sensibilizante (30 % de etanol, 800mM de Acetato de Sodio, 0.2 % de Tiosulfato de Sodio y 0.125 % de Glutaraldehído). Posteriormente se realizaron lavados en agua destilada tres veces por 5 min. Después se le colocó en una Solución de Plata (0.20 % de Nitrato de Plata, 0.024 % de Formaldehído) por 20 min y se realizaron dos lavados en agua destilada por 1 min. Posteriormente se colocó en Solución Desarrolladora (2.5 % de Carbonato de Sodio, 0.0074 % de Glutaraldehído) de 2 a 5 min, una vez visualizadas las bandas, el gel se colocó en Solución de paro de Reacción (400 mM de EDTA) por 10 minutos y se lavó en agua destilada 3 veces por 5 minutos.

3.2 Western Blot.

Se preparó el gel resolutivo a una concentración del 12 % y posteriormente el gel de empacamiento. A las muestras se les agregó 2µl de β-mercaptoetanol y se calentaron a 99°C por 5 min antes de cargar en el gel.

Transferencia. Después de terminada la electroforesis, se obtuvo la fracción del gel resolutivo y se colocó en Buffer de Transferencia (50mM de TRIS, 380mM de Glicina, 20 % de Metanol, 0.01 % de SDS) por 15 min. Se preparó la membrana para proteínas PVDF (PVDF Western Blotting Membranes de ROCHE) realizando lavados con metanol y agua destilada, posteriormente se colocó en Buffer de transferencia. Para realizar la transferencia, se colocó el gel en contacto con la membrana PVDF entre papel filtro humedecido con Buffer de Transferencia. Se colocó por 2hrs en una Cámara de Transferencia en Semi-Seco (HEP-1, OWL Separation Systems).

Bloqueo. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se bloqueó la membrana con una Solución de TBST (TRIS 20mM pH7.5, NaCl 137mM, Tween 0.5%) y 10% de Leche. Se incubó en esta solución ON a 4°C en agitación suave.

Anticuerpos. Se lavó la membrana en TBST, después se colocó la membrana en una solución del primer anticuerpo monoclonal de ratón anti E7 HPV-16 ED17 (SANTA CRUZ Biotechnology) a una concentración de 1:500 en solución con TBS y 2% de leche. Se incubó ON a 4° C con agitación suave. Se realizaron lavados con TBST 3 veces por 15 min; y se incubó con el segundo anticuerpo, un conjugado de Proteína G:HRP (BIORAD) a una concentración de 1:1000 en solución con TBST y 2% de leche. La membrana se incubó por 4 horas a 4°C, posteriormente se realizaron lavados con TBST 3 veces por 15 min.

Revelado y Exposición. El revelado del segundo anticuerpo se realizó con el kit para detección de Western blot por quimioluminiscencia, Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Se mezclaron cantidades iguales de las Solución Luminol A y Solución Luminol B, usando 0.125 ml por cm² de la membrana como volumen total. Se añadió la mezcla de soluciones por la cara de la membrana donde se realizó la transferencia, se incubó por 3 min a temperatura ambiente. Se desecharon las soluciones y se removió el exceso al contacto con papel secante cuidando de no tocar la superficie de la membrana. Posteriormente se envolvió la membrana en papel plástico evitando la formación de burbujas, una vez envuelta se colocó en un cassette para realizar la exposición, con la cara de la membrana que corresponde a las proteínas hacia arriba. En la oscuridad, se expuso la membrana al film fotosensible por 3 min; el film fue revelado en soluciones fotográficas de desarrollo y fijación.

RESULTADOS

1) Construcción del Vector de Expresión

Para la amplificación del gen E7 mutante del HPV-16 se realizó un PCR a partir del plásmido BC219-E7 mutante que contiene la secuencia del gen E7 mutante del HPV-16. El producto de PCR amplificado fue de 340 pb (Fig. 7) conteniendo en el extremo 5' un sitio de corte para la enzima *SaI* y suprime el codón de inicio de la traducción; y en el extremo 3' una secuencia terminadora de la transcripción independiente de Rho. El producto fue caracterizado con la enzima *ApaI* según el mapa de restricción correspondiente a E7m como se observa en la Figura 8, la digestión del producto de PCR con *ApaI* genera un fragmento de 281 pb como era de esperarse para el E7 mutante (también se genera un segundo fragmento de 59 pb que no es visualizado a la concentración del gel de Agarosa mostrado).

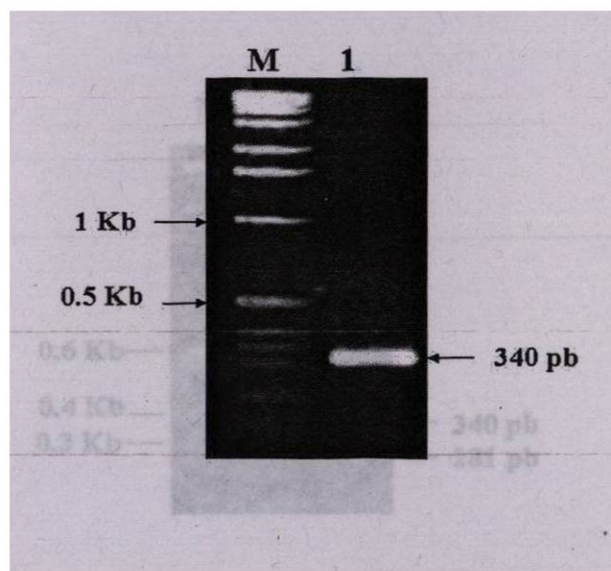


FIGURA 7 Amplificación del gen E7 mutante. M, marcador de peso molecular, Carril 1, producto de PCR del gen E7 mutante

A)

```
atgcatggagatacacctacattgcatgaatataatgtagattgcaaccagagacaactgatctctactgttatgagcaattaaatgac
|
1                               Pvu II                               50
|
agctcagaggaggaggatgaatagatgggccagctggataagcagaaccggacagagcccattacaatattgtaacctttggttg
|                               |                               |
100                             122                           150
|
caagtgtgactctacgcttcggttgtgcgtacaaagcacacacgtagacattgtactttggaagacctgtaatgggcacactagga
|                               |                               |
Apa I                             200                           250
|
attgtggccccatctgttctcagaaaccataa 297
|
271
```

B)

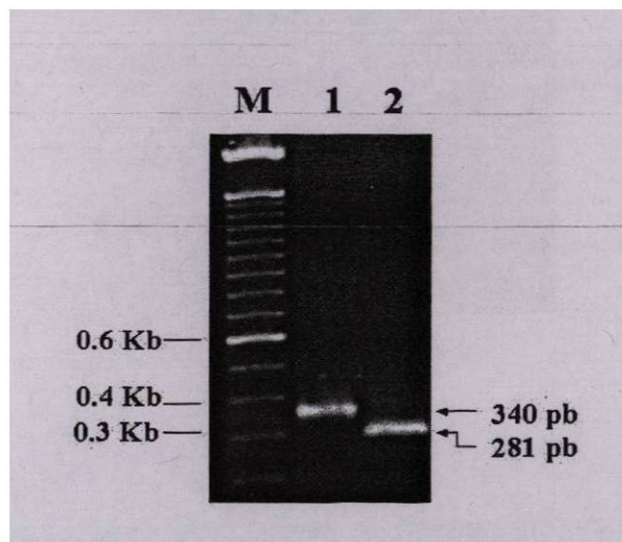
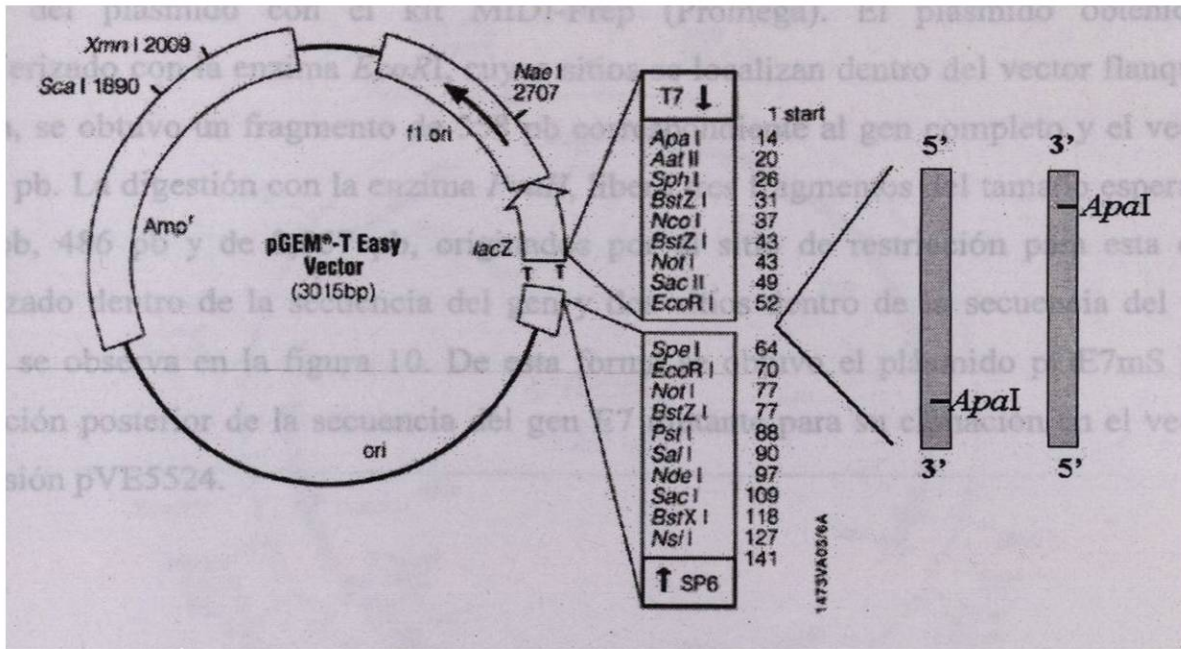


FIGURA 8. Patrón de Restricción del Gen E7m del HPV-16. A) Secuencia de nucleótidos del gen E7m del HPV-16, se señalan los sitios de restricción de las enzimas *ApaI* y *PvuII*. B) M, Marcador de peso molecular; Carril 1, Producto de PCR del gen E7m; Carril 2, E7m digerido con enzima *ApaI*

Una vez caracterizado el producto de la amplificación, se sometió a una reacción de ligación para la subclonación dentro del vector para productos de PCR pGEM-T Easy, obteniendo la construcción pGEM-E7mS. La reacción de ligación se transformó por choque térmico en células Calcio competentes de *E. coli* DH5α y fue sembrada en medio LB Agar/amp para la selección de bacterias que fueron transformadas con el plásmido, dado que contiene el gen que le confiere resistencia a ampicilina.

Las clonas resultantes de la transformación, se crecieron en medio LB/amp, se purificó el DNA plasmídico de cada una de ellas y se caracterizaron con la enzima *ApaI* para determinar la orientación en que fue ligado el producto (la clonación del gen dentro del vector es posible en dos orientaciones, 5' a 3' o 3' a 5' respecto a un punto de referencia). En la figura 9 se observan los plásmidos que liberaron un fragmento de 280 pb que corresponde a un fragmento del gen E7 y un fragmento de 3,070 pb correspondiente al vector (carriles 2 al 4). Estas clonas se consideran de orientación positiva, dado que el gen se encuentra de 5' a 3' respecto al sitio *ApaI* del vector; aquellas que no liberaron fragmento se tomó como de orientación negativa, 3' a 5' respecto al sitio de restricción.

A)



B)

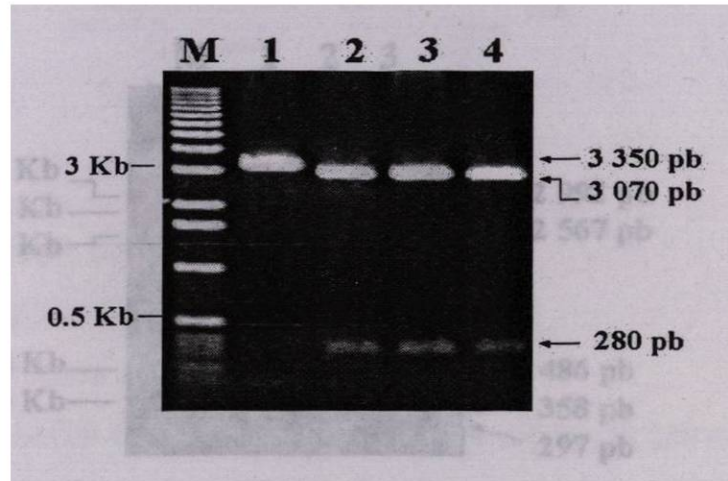


FIGURA 9. Análisis de Restricción de Clonas pGE7mS. (A) Mapa del vector pGEM-T Easy. (B) M, marcador de peso molecular; Carril 1, Clona de orientación negativa digerida con *ApaI*, Carril 2 al 4, clonas de orientación positiva digeridas con *ApaI*.

De las clonas positivas se seleccionó una para la preparación a mediana escala del DNA del plásmido con el kit MIDI-Prep (Promega). El plásmido obtenido fue caracterizado con la enzima *EcoRI*, cuyos sitios se localizan dentro del vector flanqueando el gen, se obtuvo un fragmento de 358 pb correspondiente al gen completo y el vector de 2,992 pb. La digestión con la enzima *PvuII*, liberó tres fragmentos del tamaño esperado, de 297 pb, 486 pb y de 2,567 pb, originados por el sitio de restricción para esta enzima localizado dentro de la secuencia del gen y dos sitios dentro de la secuencia del vector, como se observa en la figura 10. De esta forma se obtuvo el plásmido pGE7mS para la obtención posterior de la secuencia del gen E7 mutante para su clonación en el vector de expresión pVE5524.

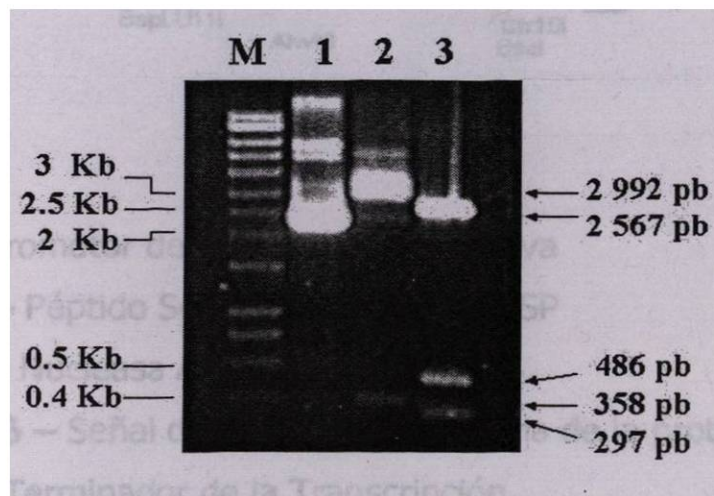
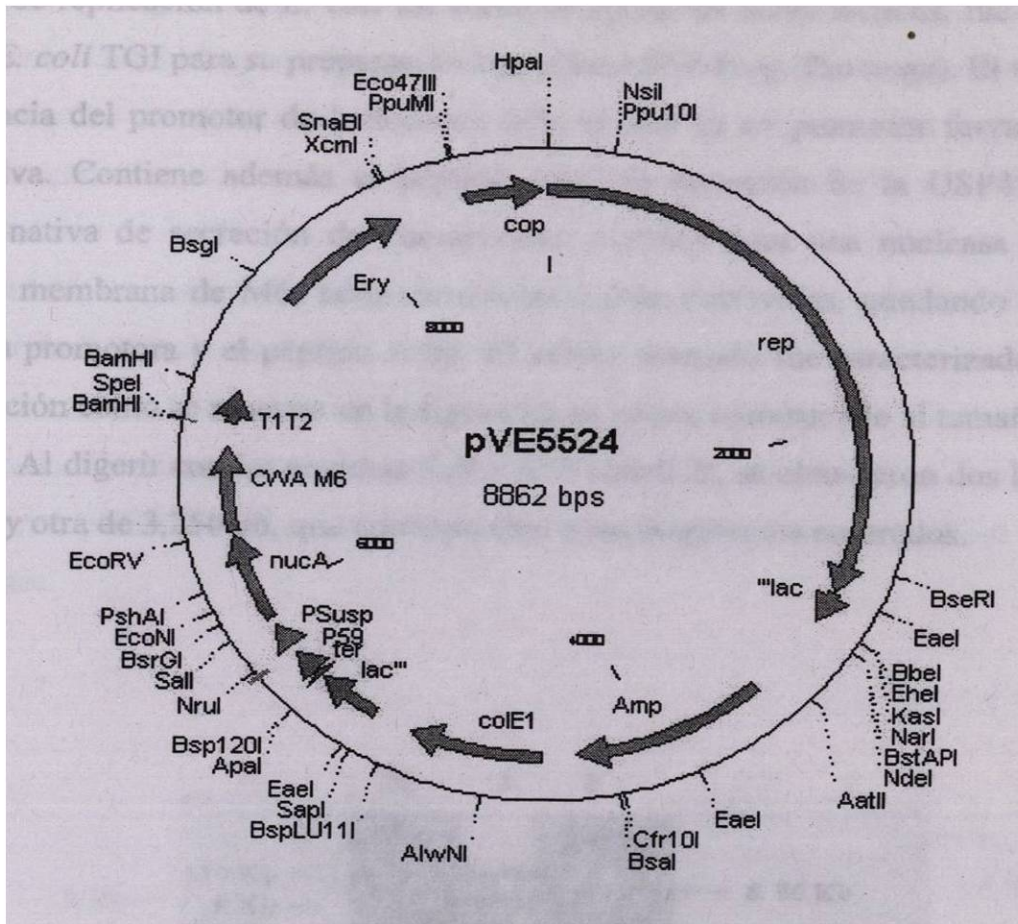


FIGURA 10. Caracterización de la Construcción pGE7mS. M, Marcador de peso molecular; Carril 1, pGE7mS; Carril 2, pGE7mS digerido con enzima *EcoRI*; Carril 3, pGE7mS digerido con enzima *PvuII*.



- ➔ **P59** – Promotor de Expresión Constitutiva
- ➔ **PSusp** – Péptido Señal de la proteína USP
- ➔ **Nuc A** – Nucleasa A
- ➔ **CWA M6** – Señal de Anclaje a Membrana de la proteína M6
- ➔ **T1T2** – Terminador de la Transcripción
- ➔ **Ery** – Gen de Resistencia a Eritromicina
- ➔ **Rep**- Origen de Replicación en Bacterias Ácido Lácticas
- ➔ **Amp**- Gen de Resistencia a Ampicilina
- ➔ **ColE1**- Origen de Replicación en *E. coli*

FIGURA 11. Mapa de Restricción del Vector de Expresión pVE5524

El vector de expresión pVE5524, cuyo mapa se muestra en la figura 11, contiene orígenes de replicación de *E. coli* así como de Bacterias ácido lácticas, fue obtenido de la cepa de *E. coli* TGI para su preparación con el kit MIDI-Prep (Promega). El vector contiene la secuencia del promotor de lactococos P59, el cual es un promotor fuerte de expresión constitutiva. Contiene además el péptido señal de secreción de la USP45, la principal proteína nativa de secreción de *Lactococcus*; codifica para una nucleasa y la señal de anclaje a membrana de M6, tales secuencias fueron removidas, quedando únicamente la secuencia promotora y el péptido señal. El vector obtenido fue caracterizado con enzimas de restricción como se muestra en la figura 12, el vector corresponde al tamaño de 8,860 pb (carril 1). Al digerir con las enzimas *SalI* y *NsiI* (carril 2), se obtuvieron dos bandas, una de 5,600 pb y otra de 3,250 pb, que corresponden a los fragmentos esperados.

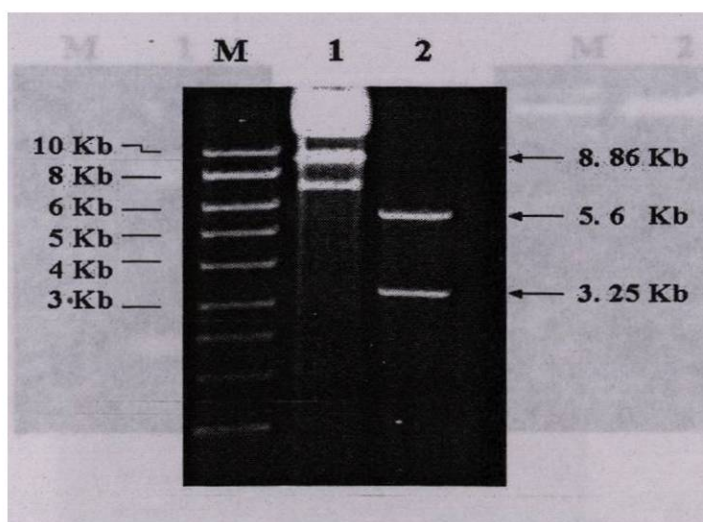


FIGURA. 12. Patrón de Restricción del Vector de Expresión pVE5524. M, Marcador de peso molecular; Carril 1, pVE5524; Carril 2, pVE5524 digerido con enzimas *SalI* y *NsiI*.

Una vez caracterizados los vectores tanto el que contiene la secuencia de E7m como el vector de expresión se procedió a la construcción final del vector para la expresión de E7m en *Lactococcus lactis*. El vector pGE7mS fue digerido primero con la enzima *SpeI*, sitio de restricción localizado en el extremo 3' dentro de la secuencia del vector. Posteriormente fue

digerido el extremo 5' con la enzima *SalI*, secuencia de restricción insertada en la secuencia del gen con el oligo E7/*SalI*. Se obtuvo un fragmento de 340 pb correspondiente al gen E7m; de esta forma, después de su purificación, se obtuvo el gen en marco de lectura para insertarlo dentro del vector de expresión. El vector pVE5524 por otra parte, fue digerido con las enzimas de restricción *SalI* y *SpeI*. En la figura 13 se observa la obtención de dos fragmentos uno de 1,000 pb que corresponde a la secuencia de la nucleasa A y la señal de anclaje de M6, las cuales no interesan para los fines de secreción de la proteína. El segundo fragmento de 7,800 pb, corresponde al vector conteniendo el promotor y el péptido señal, con un extremo 5' *SalI* cohesivo y un extremo 3' *SpeI* cohesivo. El vector digerido y el fragmento de 340 pb purificado fueron sometidos a una reacción de ligación para obtener la construcción pVE5524-E7mS, la ligación fue transformada en células de *L. lactis* competentes.

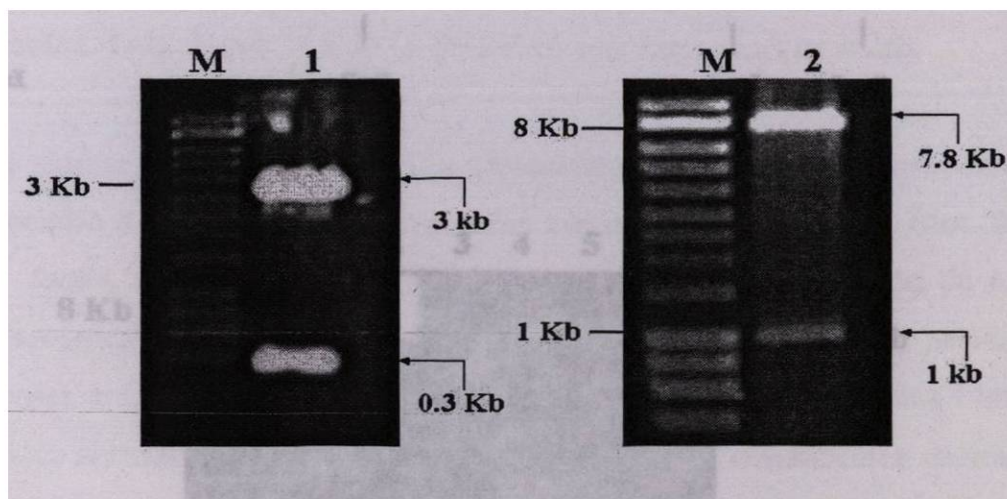


FIGURA 13. Construcción del vector pVE5524-E7mS. M, Marcador de peso molecular; Carril 1, pGE7mS digerido con enzimas *SalI/SpeI*; Carril 2, pVE5524 digerido con enzimas *SalI/SpeI*. El fragmento de 0.3 kb portando el gen E7m se ligó con el fragmento de 7.8 kb correspondiente al vector pVE5524.

2) Transformación en *Lactococcus lactis* con el Vector de Expresión.

Las colonias resultantes de la transformación en *L. lactis* se crecieron en medio para la extracción de DNA plasmídico y se realizó un análisis de restricción con la enzima *ApaI*, así como ensayos de PCR para comprobar la clonación del gen E7m dentro del vector de expresión (Figura 14).

pVE5524-E7mS

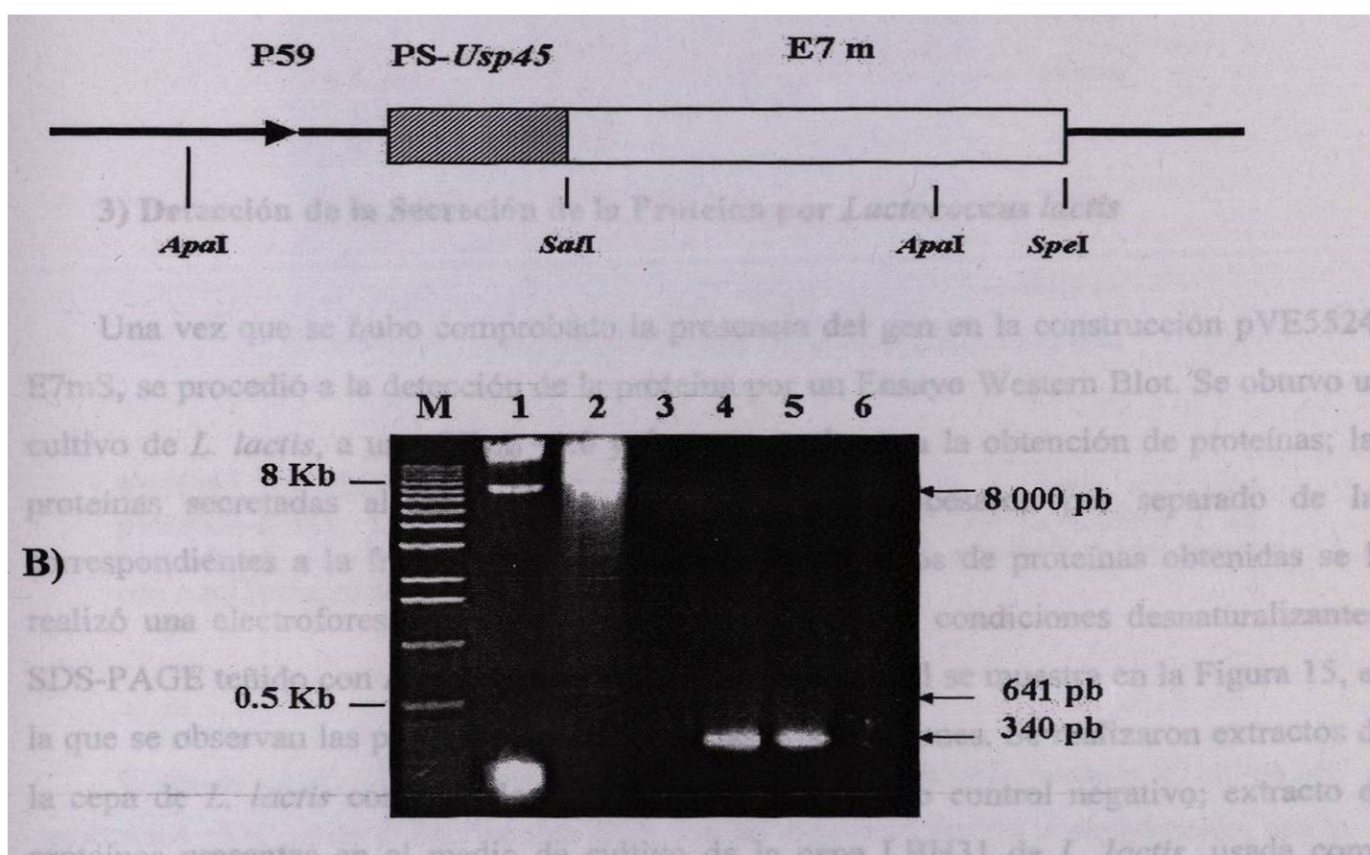


FIGURA 14. Caracterización de la Construcción pVE5524-E7mS. A) Mapa de la fusión del promotor P59 con el gen E7m. B) Análisis de Restricción: M, marcador de peso molecular; Carril 1, pVE5524-E7mS; Carril 2, pVE5524-E7mS digerido con *ApaI*. Ensayo de PCR para E7: Carril 3, pVE5524; Carril 4 y 5, pVE5524-E7mS; Carril 6, Control Negativo de Reacción.

El análisis de restricción de la construcción pVE5524-E7mS, cuyo mapa se muestra en la figura 14-A, con la enzima *Apal*, libera dos fragmentos uno correspondiente al vector y una banda de 641 pb. Lo anterior comprueba la presencia del gen dentro del vector, dado que uno de los sitios proviene de la secuencia del vector, anterior a la región promotora y el segundo de la secuencia del gen. En el ensayo de PCR realizado para E7 del vector pVE5524-E7mS mostrado en la figura 14-B, se obtuvo una banda de 340 pb (carriles 4 y 5) que corresponde a E7m, para el vector pVE5524 utilizado como control negativo no se obtuvo ninguna amplificación, de la misma manera que el control negativo de reacción (carriles 3 y 6 respectivamente).

3) Detección de la Secreción de la Proteína por *Lactococcus lactis*

Una vez que se hubo comprobado la presencia del gen en la construcción pVE5524-E7mS, se procedió a la detección de la proteína por un Ensayo Western Blot. Se obtuvo un cultivo de *L. lactis*, a una $OD_{600}=1.0$ y fue procesado para la obtención de proteínas; las proteínas secretadas al medio de cultivo (MC) se procesaron por separado de las correspondientes a la fracción celular (FC). A los extractos de proteínas obtenidas se le realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes, SDS-PAGE teñido con Azul Brillante de Coomassie, lo cual se muestra en la Figura 15, en la que se observan las proteínas obtenidas de las dos fracciones. Se realizaron extractos de la cepa de *L. lactis* conteniendo el vector pVE5524 como control negativo; extracto de proteínas presentes en el medio de cultivo de la cepa LBH31 de *L. lactis*, usada como control positivo. La cepa LBH31 expresa la proteína E7 del HPV-16 bajo un promotor inducible por nisina, la inducción se realizó a una $OD_{600}=4.0$ por espacio de una hora, y al término fue procesada de la misma forma que el control negativo y la construcción. Los extractos de la fracción celular tanto del control negativo como de la cepa de *L. lactis* presentaron gran cantidad de proteínas que corresponden a las proteínas presentes tanto en

el citoplasma como en membrana y pared celular. En el extracto de proteínas del medio de cultivo del control positivo como de la cepa obtenida no se observó alguna banda correspondiente a la proteína E7; en todas las fracciones obtenidas del medio de cultivo de las tres cepas se observó una banda de aproximadamente 50 Kda correspondiente a la Usp45 nativa de *L. lactis*.

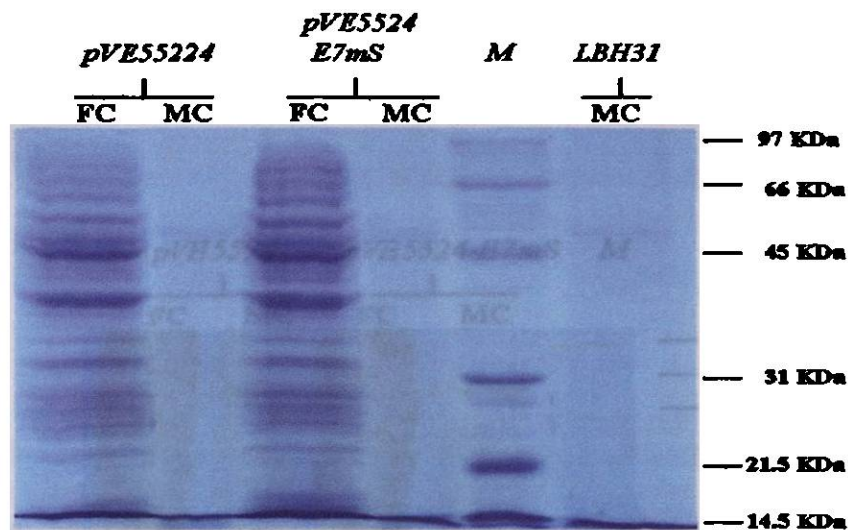


FIGURA 15. SDS-PAGE de Extractos de Proteínas de *L. lactis* pVE5524, pVE5524-E7mS, LBH31. FC, Fracción Celular, MC, Medio de Cultivo y M, Marcador de peso molecular para proteínas. Gel de Poliacrilamida-SDS al 12% teñido con Azul Brillante de Commasie

Como se mencionó anteriormente no fue posible el observar la proteína E7 en los MC analizados en el gel de poliacrilamida-SDS, por tal motivo se repitió el experimento, con la finalidad de teñir con nitrato técnica que incrementa la sensibilidad de detección proteínas Únicamente se incluyó la cepa control (pVE5524) y la cepa recombinante construida para la expresión y secreción de E7m (pVE5524-E7m). Como se observa en la Figura 16 en el carril correspondiente al extracto de proteína del medio de cultivo de *L. lactis* pVE5524-E7m, se observó una banda de aproximadamente 21 KDa de tamaño similar al esperado para la proteína E7m (no se observó ninguna banda a este nivel en los extractos proteicos

del medio de cultivo del control negativo). Este resultado indicó que si había expresión de una proteína adicional del tamaño de E7. Con la finalidad de poder observar dicha proteína en tinciones con Azul de Coomassie, concentramos los extractos proteicos en un volumen final de 20 μ l, fueron analizados en el gel de poliacrilamida-SDS y teñido con el Azul de Coomassie. En la Figura 17 se observa que fue posible visualizar la proteína recombinante dentro del rango reportado para la proteína E7 del HPV-16 de 19 KDa a 21 KDa, así como otras proteínas típicas de *L. lactis*

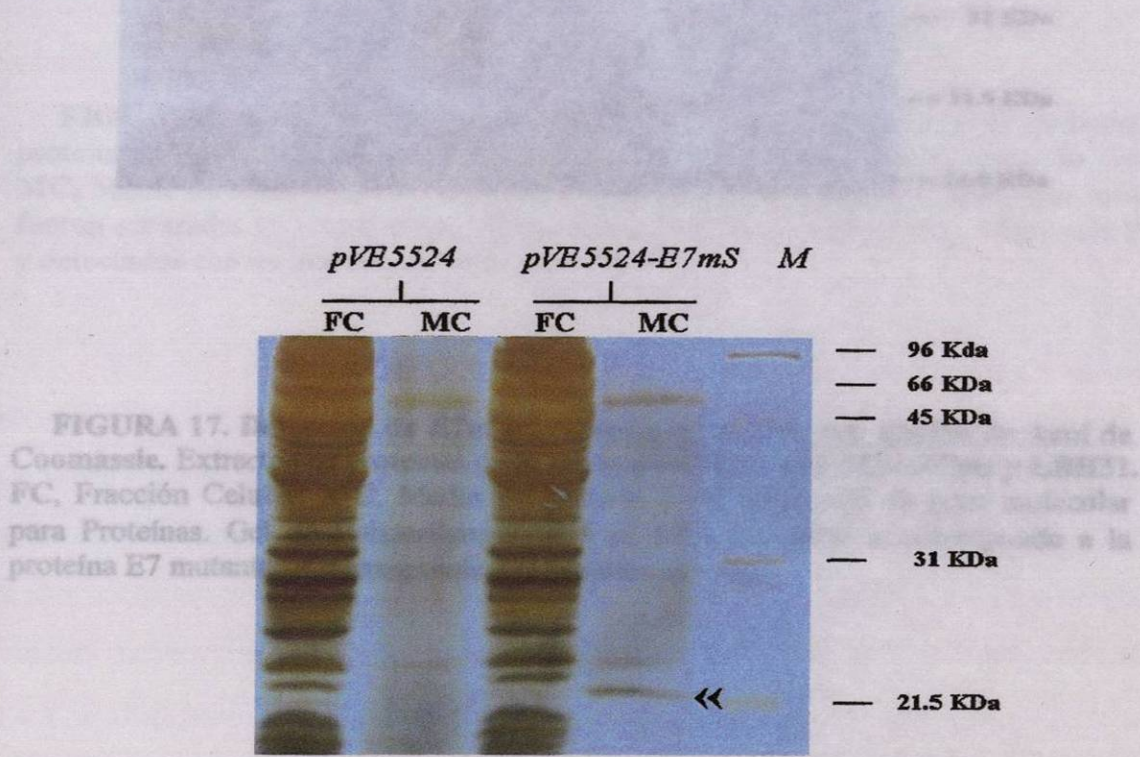


FIGURA 17. Detección de E7m en Extractos de Proteínas en el medio de cultivo con tinción de Azul de Coomassie. Extractos de proteínas de *L. lactis* pVE5524 y pVE5524-E7ms. FC, Fracción Celular; MC, Medio de Cultivo; y M, Marcador de peso molecular para Proteínas. Gel de poliacrilamida-SDS al 12% teñido con Azul de Coomassie.

FIGURA 16. Detección de E7m en Extractos de Proteínas en el medio de cultivo con tinción de Nitrato de Plata. Extractos de proteínas de *L. lactis* pVE5524 y pVE5524-E7ms. FC, Fracción Celular; MC, Medio de Cultivo; y M, Marcador de peso molecular para Proteínas. Gel de poliacrilamida-SDS al 12% teñido con Nitrato de Plata. « Proteína E7 mutante

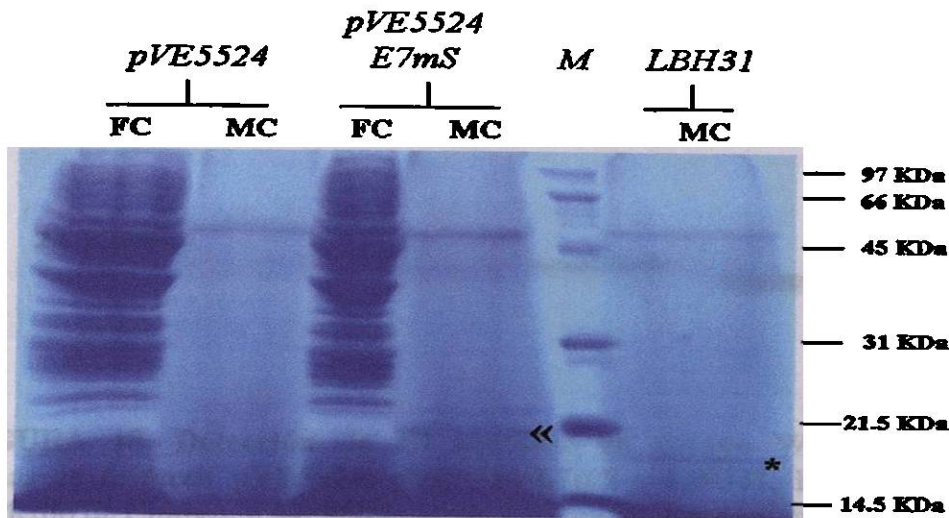


FIGURA 17. Detección de E7m en el medio de cultivo con tinción de Azul de Coomassie. Extractos de proteínas de *L. lactis* pVE5524, pVE5524-E7ms y LBH31. FC, Fracción Celular; MC, Medio de Cultivo; y M, Marcador de peso molecular para Proteínas. Gel de Poliacrilamida-SDS al 12%. La señal « corresponde a la proteína E7 mutante, * corresponde a la proteína silvestre.

Para confirmar que la proteína recombinante observada en los geles de poliacrilamida-SDS se procedió a realizar una detección específica de la proteína E7. En la figura 18 se muestra el resultado del Western en el que la fracción MC tanto de la cepa recombinante pVE5524-E7m como del control positivo (LBH31), se detectó una señal para la proteína E7. La señal correspondió en tamaño a las bandas previamente observadas en los geles de poliacrilamida-SDS teñidos con Nitrato de Plata y Azul de Coomassie. El control negativo *L. lactis* pVE5524 no presentó ninguna señal. La expresión de la proteína E7 fue localizada en su totalidad en los extractos correspondiente al Medio de Cultivo. El peso mostrado por la proteína E7m producido fue ligeramente mayor que el mostrado por la proteína utilizada como control positivo debido a la adición de algunos aminoácidos en su extremo amino utilizados para la secreción de la proteína.

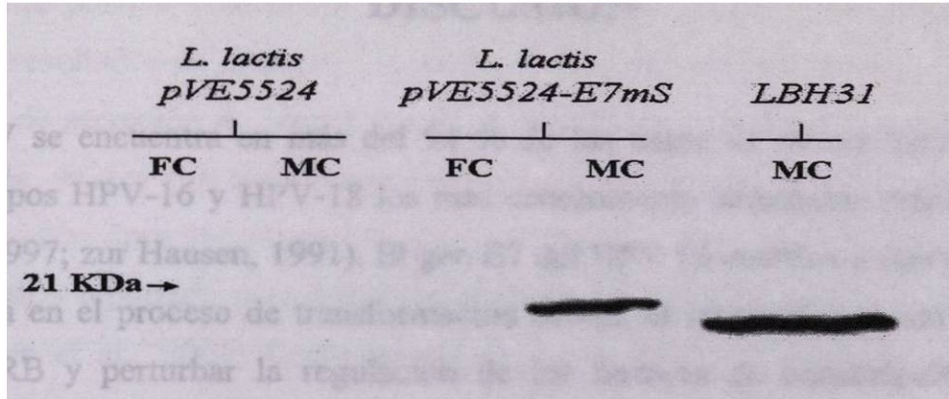


FIGURA 18. Detección de E7 mutante en ensayo Western. Extractos de proteínas de *L. lactis* pVE5524, pVE5524-E7mS y LBH31, FC, Fracción Celular; MC, Medio de Cultivo; y M, Marcador de peso molecular para proteínas. Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida-SDS, transferidas a una membrana PVDF y detectadas con un anticuerpo monoclonal anti-E7.

DISCUSIÓN

El HPV se encuentra en más del 94 % de los casos de cáncer cervical estudiados, siendo los tipos HPV-16 y HPV-18 los más comúnmente detectados (Man, 1998; Muñoz and Bosch, 1997; zur Hausen, 1991). El gen E7 del HPV 16 codifica a una proteína nuclear que participa en el proceso de transformación celular al interaccionar con proteínas de la familia de RB y perturbar la regulación de los factores de transcripción E2F, con la consecuente pérdida del control de la progresión del ciclo celular. La expresión de la proteína E7 en un sistema *in vitro* produce la transformación de fibroblastos de ratón y de queratinocitos primarios de humanos, solo o en cooperación con el oncogen *ras* activado; además puede interactuar con los inhibidores CDk p21 y p27, además de las ciclinas A y E (Jones et al., 1997; Dyson et al., 1989; McIntyre et al., 1996; Storey et al., 1988; Tanaka et al., 1989; Zerfass et al., 1995). E7 es fundamental en el proceso de transformación ya que es necesario una expresión constante de esta proteína (Tzy-Choou, 1994), y por tal motivo es un blanco ideal para el control del tumor o desarrollo de una inmunoterapia. Sin embargo dicha capacidad transformante del E7 representa un riesgo en su administración para inducir una respuesta inmune y por tal motivo es imprescindible el uso de proteínas E7 que tengan disminuida su capacidad transformante pero que mantengan el potencial de inducir una respuesta inmune (McIntyre et al., 1993; Edmonds and Vousden, 1989; Shi et al., 1999). La reducción de la actividad transformante, constituye una de las razones fundamentales de haber expresado una proteína E7 mutante en *L. lactis*, en el presente trabajo, para su evaluación posterior como vacuna terapéutica. La mutación en el gen E7 se comprobó por la digestión con la enzima de restricción *ApaI*, la cual no corta al gen E7 silvestre. Durante los diferentes pasos de clonación, desde el PCR inicial, pGEm7S hasta su clonación en el vector de expresión pVE5524-E7mS, se analizó el gen E7 con la enzima mencionada, comprobando que la secuencia expresada corresponde al gen E7 mutante. Posteriormente, mediante el ensayo de Western Blot, utilizando un anticuerpo monoclonal para E7, se comprobó la expresión por *Lactococcus lactis* de la proteína E7, dirigida a secreción hacia afuera de la célula utilizando el péptido señal de la proteína Usp45. El método de extracción de proteínas permitió recuperar, por separado, proteínas que fueran

secretadas al medio de cultivo y aquellas proteínas que se localizaran dentro de la célula, de esta forma fue posible determinar que la localización de E7 correspondió al medio de cultivo. Los resultados de la expresión de E7 en *L. lactis* con anticuerpos anti-E7 indicaron que la señal de secreción de Usp45 funciona adecuadamente para la secreción de E7, con alta eficiencia, ya que con el Western blot se detectó únicamente en el medio de cultivo y no en la fracción correspondiente al extracto celular. Esta gran eficiencia de secreción también ha sido reportada para otras proteínas heterólogas usando el Péptido señal de la Usp45 (Dieye et al., 2001; Langella and Le Loir, 1999). El péptido señal al que fue fusionado la secuencia de E7 para dirigir su expresión corresponde a un fragmento de 41 aminoácidos, de los cuales 27 son eliminados durante la secreción mediante la enzima peptidasa I (van Asseldonk et al., 1990; Wiley and Schneewind, 1999). Debido a este proceso de secreción, la proteína E7 se liberó con 14 aminoácidos adicionales correspondientes al resto del péptido señal; esto explica el hecho de que la proteína E7 mutante migre con una Movilidad relativa mayor que la proteína silvestre en los geles de poliacrilamida-SDS. Sin embargo la adición de los aminoácidos en el extremo amino de la secuencia de E7 no altera la capacidad de inducción de respuesta inmune, dado que no afecta el epítipo de E7 responsable de la inmunidad celular.

La proteína E7 mutante expresada en *L. lactis* es una proteína que se degrada más fácilmente en comparación con la proteína silvestre, debido a que las dos mutaciones en los motivos C-X-X-C eliminan la formación de puentes disulfuro. Esta degradación confiere ventajas desde el punto de vista inmunogénico, ya que es fácilmente procesada para su presentación a las células del sistema inmune. Así junto con la disminución de su capacidad transformante, la proteína E7 mutante expresada es un antígeno de menor riesgo y con mayor capacidad inmunogénica.

El desarrollo de vacunas mediante la administración de antígenos mediado por bacterias lácticas es un campo nuevo debido a que se han reportado pocos trabajos en los que se ha inducido una respuesta inmune con el uso de bacterias lácticas, a las que denominamos como “vacunas probióticas”. Por tal motivo la expresión de la proteína E7 mutante en *Lactococcus lactis* es un logro importante que representa el paso inicial para generar una vacuna probiótica terapéutica en contra del cáncer cérvico uterino.

CONCLUSIONES

Lactococcus lactis es capaz de secretar la proteína E7 en estado mutante del virus del papiloma humano tipo 16

El péptido señal de la proteína Usp45 funcionó eficientemente para la secreción de la proteína E7 en *Lactococcus lactis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALVAREZ SLM and LÓPEZ BE. 1995. Regulación Genética de los Papilomavirus Humanos Genitales. *Salud Pública Mex.* Vol 37. No. 3: 240-247.
- 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 heterologous α -amylase. *Molecular General Genetics.* 240:428-434.
- van ASSELDONK M, RUTTEN G, OTEMAN M, SIEZEN RJ, de VOS WM, SIMONS G. 1990. Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Gene* 95: 155-160.
- BARBOSA MS, EDMONDS C, FISHER C, SCHILLER JT, LOWLY DR, VOUSDEN KH. 1990. The Region of the HPV E7 Oncoprotein Homologous to Adenovirus E1a and SV40 large T Antigen Contains Separate Domains for Rb Binding and Casein Kinase II Phosphorylation. *The EMBO Journal.* vol.9 no.1, pp. 153-160.
- BARBOSA MS, LOWLY DR and SCHILLER JT. 1989. Papillomavirus Polypeptides E6 and E7 are Zinc-Binding Proteins. *Journal of Virology.* 1404-1407.
- BERMUDEZ L, LANGELLA P, GRUSS A, MONTES DE OCA-LUNA R, LE LOIR. 2001. Production of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein in *Lactococcus lactis*. Enviado a Publicación.
- BERUMEN J and VILLEGAS N. 1997. Vacunas terapéuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino. *Salud Pública Mex.* 39:288-297.
- BERRY JM and PALEFSKY JM. 1998. Pathogenesis and clinical manifestations of HPV-associated anogenital neoplasia. *AIDS, Knowdle base.*
- BRASPENNING J, MESCHEDE W, MARCHINI A, MÜLER M, GISSMANN L, TOMMASINO M. 1998. Secretion of Heterologous Protein form *Schizosaccharomyces pombe* Using the Homologous leader Sequence of *pho1* + Acid Phosphatase. *Biochemical and Biophysical research Communications.* 245, 166-171.
- B.M JM, VOSSSEN VD, LELIE DVD, VENEMA G. 1987. Isolation and Characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-Specific Promoters. *Applied and Enviromental Microbiology.* Vol.53, No.10:2452-2457.
- CARTER JJ, YAEGASHI N, JENISON SA, GALLOWAY DA. 1991. Expression of Human Papillomavirus Proteins in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology.* 181:513-521.

- CICCOLINI F, Di PASQUALE G, CARLOTTI F, CRAWFORD L, TOMMASINO M. 1994. Functional studies of E7 proteins from different HPV types. *Oncogene*. 2633-2638.
- DIEYE Y, USAI F, CLIER A, GRUSS and PIARD JC. 2001. Design of a Protein-Targetin System for Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 4157-4106.
- DUGGAN-KEEN MF, BROWN MD, STACEY SN, STERN P. 1998. Papillomavirus Vaccines. *Frontiers in Bioscience* 3, d1192-1208.
- DYSON N, HOWLEY PM, MÜNGER, HARLOW E. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. Vol. 243: 934-936.
- EDMONDS C and VOUSDEN KH. 1989. A point mutational analysis of Human Papillomavirus type 16 E7 protein. *Journal of Virology*. 2650-2656
- DI FABIO S, MEDAGLINI D, RUSH CM, CORRIAS F, PANZINI GL, PACE M, VERANI P, POZZI G, TITTI F. 1998. Vaginal immunization of cynomolgous monkeys with *Streptococcus gordonii*: expressing HIV-1 and HPV 16 antigens. *Vaccine*. 5: 485-92.
- FARTHING AJ and VOUSDEN KH. 1994. Functions of human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. Reviews. *Elsevier Science*.
- FLORES ER, ALLEN-HOFMANN BL, LEE D, LAMBERT PF. 2000. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *Journal of Virology*. 6622-6631.
- FIRZLAFF JM, LÜSCHER 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. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. Vol. 88, pp. 5187-5191.
- FISCHETTI VA, MEDAGLINI D, POZZI G. 1996. Gram-positive commensal bacteria for mucosal vaccine delivery. *Curr. Opin. Biotechnol*. 7 (6): 659-66.
- FRANCIS DA, SCHMID SI, HOWLEY PM. 2000. Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells, *Journal of Virology*. 2679-2686.
- GOODWIN EC AND DiMAIO. 2000. Repression of human papillomavirus oncogenes in hela cervical cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc. Nat. Acadm. Sci. USA*. Vol. 97. No. 23, pp. 12513-12518.
- GUNNERIUSSON E, SAMUELSON P, RINGDAHL, GRONLUND H, NYGRES PA, STAHL S. 1999. Staphylococcal surface display of immunoglobulin A (IgA)- and IgE- specific in vitro - selected binding proteins based on *Staphylococcus aureus* protein A. *Appl. Environ. Microbiol*. 65 (9): 4124-40.

- 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 xylosum*. *Journal of Bacteriology*. 174 (13): 4239-45.
- zur HAUSEN H. 1991. Human Papillomaviruses in the Pathogenesis of Anogenital Cancer. *Virology*. 184:9-13.
- HERRERA CH and RESTREPO SP. 2000. El Virus del Papiloma Humano y su relación con la Neoplasia Cervical Humana. Pontificia Universidad Javeriana.
- 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*. 4966-4972.
- 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.
- LANGELLA P and LE LOIR Y. 1999. Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis* : a novel antigen delivery system, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32:191-198.
- LE LOIR Y, GRUSS A, EHRLICH SD, LANGELLA P. 1994. Direct screening of recombinants in Gram-Positive Bacteria Using the Secreted Staphylococcal nuclease as a Reporter. *Journal of Bacteriology*. 5135-5139.
- LILJEQVIST S and STÅHL S. 1999. Production of recombinant subunit vaccines. protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. Review article. *Journal of Biotechnology*. 73:1-33.
- LONDOÑO PL, CHATFIELD S, TINDLE RW, HERD K, GAO XM, FRAZER, DOUGAN G. Immunization of mice using *Salmonella typhimurium* expressing human papillomavirus type 16 E7 epitopes inserted into hepatitis B virus core antigen. *Vaccine*. Vol. 14, No. 6, pp. 545-552, 1996.
- MAN S. Human cellular immune responses against human papillomaviruses in cervical neoplasia. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 1998. <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>
- MEDAGLINI D, OGGIONI MR, POZZI G. 1998. Vaginal immunization with recombinant Gram-positive bacteria. *Am J Reprod Immunol*. 39(3): 199-208.
- McINTYRE MC, FRATTINI MG, GROSSMAN SR, LAIMINS LA. 1993. Human Papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for Zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *Journal of Virology*. 3142-3150.

- McINTYRE MC, RUESCH MN, LAIMINS LA. 1996. Human papillomavirus E7 oncoproteins bin a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology*. 215: 73-82.
- McKAIG RG, BARIC RS, LOSAN AF. 1998. Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer: Epidemiology and Molecular Biology. *Head and Neck*. 250-265
- MÜNGER K and HALPERN AL. 1997. HPV16 E7: Primary Structure and Biological Properties. III, 17-36.
- MUÑOZ N and BOSCH FX. 1997. Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Pública Mex*. Vol. 39, No.4.
- MULLER M, VISCIDI RP, SUN Y, GUERREO E, HILL PM, SHAF' et al. 1992. Antibodies to VPH-16 E6 and E7 proteins as markers for VPH-16 associated invasive cervical cancer. *Virology*. 187:508-514.
- NORTON PM, WELLS JM, BROWN HW, MACPHERSON AM, LE PAGE RW. 1997. Protection against tetanus toxin in mice nasally immunized recombinant *Lactococcus lactis* expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine*. 15 (6-7): 616-9.
- OGGIONI MR, MANGANELLI R, CONTORNI M, TOMMASINO M, POZZI G. 1995. Immunization of mice by oral colonization with live recombinante commensal streptococci. *Vaccine*. 13 (8): 775-9.
- PATRICK DR, OLIFF A, HEIMBROOK DC. 1994. Identification of a novel retinoblastoma gene product binding site on human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Biol Chem*. 269 (9): 6842 -50.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 268. No. 34:26018-26125.
- PIARD JC, JIMENEZ-DIAZ R, FISCHETTI VA, EHRLICH SD, GRUSS A. 1997. The M6 protein of *Streptococcus pyogenes* and its potencial as a tool to anchor biologically active molecules at the surface of lactic acid bacteria. *Adv Exp Med Biol*. 418:545-50.
- PHILLIPS AC and VOUSDEN KH. 1997. Analysis of the interaction between human papillomavirus type 16 E7 and the TATA-binding protein, TBP. *Journal of General Virology*. 78, 905-909.
- POQUET I, EHRLICH S D, GRUSS. 1998. An Export -Specific reporter designed for Gram-Positive bacteria: Application to *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 1904-1912.

- POZZI G, CONTORNI M, OGGIONI MR, MANGANELLI R, TOMMASINO M, CAVALIER F, FISCHETTI VA. 1992. Delivery and expression of a heterologous antigen on the surface of streptococci. *Infection and Immunity*. 60(5):1902-7.
- QUE Y, HAEFLIGER JA, FRANCIOLI P, MOREILLON P. 2000. Expresión of *Staphylococcus aureus* Clumping Factor A in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Using a New Shuttle Vector. *Infection and Immunity*. 68, No.6:3516-3522.
- ROHLFS M, WINKENBACH S, MEYER S, RUPP T, DURST. 1991. Viral trascription in human keratinocyte cell immortalized by human papillomavirus type-16. *Virology*. 183:331-342
- SAMUELSON P, HANSSON M, AHLBPRG N, ANDREONI C, GOTZ, BACHI T, NGUYEN TN, BINZ H, UHLEN, STAHL S. 1995. Cell surface display of recombinant proteins on *Staphylococcus carnosus*. *Journal of Bacteriology*. 177 (6): 1470-6.
- SHERMAN L and ALLOUL N. 1992. Human papillomavirus type 16 expresses a variety of alternative spliced mRNA putatively encoding the E2 protein. *Virology*. 191:953-959.
- SHI W, BU P, LIU J, POLACK A, FISHER S, QIAO L. 1999. Human Papillomavirus Type 16 E7 DNA Vaccine: Mutation in the Open Reading Frame of E7 Enhances Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Induction and Antitumor Activity. *Journal of Virology*. Vol. 73, No. 9: 7877-7881.
- SIMONEN M and PALVAL. 1993. Protein Secretion in *Bacillus* species. *Microbiological Reviews*. 57:109-137.
- SMITH-McCUNE K, KALMAN D, ROBBINS C, SHIVAKUMAR, YUSCHENKOFF, BISHOP M. 1999. Intranuclear localization of human papillomavirus 16 E7 during transformation and preferential binding of E7 to Rb family member p130. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. Vol. 96, pp.6999-7004.
- STAHL S and UHLEN M. 1997. Bacterial surface display: trends and progress. *Trends Biotechnol*. 15 (5): 185-92.
- STLEIDER L, WELLS JM, RAEYMAEKERS A, VANDEKERCKHOVE J, FIERIS W, REMAUT E. 1995. Secretion of Biologically Active Murine Interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Applied and Enviromental Microbiology*. Vol 61, No.4:1627-1629.
- 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.
- STOVER CK, BANSAL GP, HANSON MS, BURLEIN JE, PALASZYNSKI SR, YOUNG JF, KOENING S, YOUNG DB. 1993. Protective immunity elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine. *J Exp Med*. 178 (1): 197-209.

- STRAUSS A and GOTZ F.** 1996. In vivo immobilization of enzymatically active polypeptides on the cell surface of *Staphylococcus carnosus*. *Molecular Microbiology*. 21 (3): 491-500.
- TAJA ChL and SALAS GM.** 1996. Bases moleculares de la carcinogénesis viral del papiloma y polioma. *Salud Pública Mex.* 38: 47-57.
- 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.
- TOMASSINO 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*. 265-270.
- TZYY.CHOOU WU.** 1994. Immunology of the human papilloma virus in relation to cancer. Review article. *Current Opinion in Immunology*. 6: 746-754.
- VISCIDI RP, SUN Y, TSUZAKI B, BOSCH FX, MUÑOZ N, SHAH KV.** 1993. Serologic response in human papillomavirus-associated invasive cervical cancer. *Int J Cancer*. 55 :780-784.
- WILEY NW and SCHNEEWIND O.**1999. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 174-229.
- XI S-Z and BANKS LM.** 1991. Baculovirus expression of the human papillomavirus type 16 capsid protein: detection of L1 -L2 protein complexes. *Journal Gen Virol*. 1991; 72: 2981-2988.
- ZERFASS TK, 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.

