



Tesina de Grado de la Licenciatura en Bioquímica

“Impacto de la estabilidad plasmídica en el diseño de vectores bacterianos basados en *Salmonella*”

Mayo 2012

Rodrigo González

Tutora: Dra. María Gabriela Kramer

Co-tutor: Dr. José Alejandro Chabalgoity

Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina
Instituto de Higiene

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. María Gabriela Kramer por el enorme tiempo y esfuerzo dedicado a este trabajo y sus incansables correcciones. A la ANII por la Beca de Iniciación de la que fui beneficiario. Me gustaría agradecer también a mis compañeros de equipo Martín Massner y Natalia Mazza por su aporte a nivel experimental y su apoyo a todo momento. Quiero agradecer además a todos los miembros del laboratorio porque siempre estuvieron dispuestos a responder las preguntas que les hice y me dieron una mano cuándo lo precisé. Y también un agradecimiento muy importante al Dr. José Alejandro Chabalgoity, por haberme aceptado en el Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene incluso antes de tener un proyecto disponible.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
Cepas bacterianas.....	15
Plásmidos.....	15
Crecimiento bacteriano.....	15
Preparación de bacterias competentes para transformación por el método de heat shock (E. coli DH5 α y TG2).....	15
Transformación de bacterias por el método de heat shock.....	15
Preparación de bacterias electrocompetentes (Salmonella SL5338, SL3261 y LVR01).....	15
Transformación bacteriana por electroporación.....	16
Extracción de ADN plasmídico desde bacterias y determinación de su concentración.....	16
Digestión enzimática.....	16
Electroforesis en gel de agarosa.....	16
Cuantificación bacteriana.....	16
Cuantificación de la actividad β -gal en bacterias.....	16
Crecimiento, tripsinización y cuantificación de células tumorales.....	17
Transfección de las células HeLa por el método de Ca ₃ (PO ₄) ₂ y revelado de la expresión de β -gal mediante tinción con X-gal.....	17
Modelo murino de cáncer de mama.....	17
RESULTADOS.....	19
1. Transformación de E. coli DH5 α y Salmonella LVR01 con los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ.....	19

2. Determinación del número de copias de los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ en E. coli DH5 α y en Salmonella LVR01.....	21
3. Estudio del efecto de pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ sobre el crecimiento de E. coli DH5 α y Salmonella LVR01	22
4. Estabilidad in vitro de los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ en E. coli DH5a y Salmonella LVR01.....	24
5. Estabilidad in vivo de los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ en Salmonella LVR01.....	27
6. Estudio de la actividad del promotor CMV de pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ en E. coli DH5 α y Salmonella LVR01.....	28
7. Expresión de β -gal en células tumorales transfectadas con pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ.....	30
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES.....	37
PERSPECTIVAS DE CONTINUACIÓN DEL TRABAJO	37
CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

ABREVIATURAS

ADN	-	ácido desoxirribonucleico
AMP	-	ampicilina
ARN	-	ácido ribonucleico
β -gal	-	β -galactosidasa
CMV	-	Citomegalovirus
dd	-	doblemente destilada
DMEM	-	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DO ₆₀₀	-	densidad óptica medida a 600 nm
EDTA	-	ácido etileno diamina tetra-acético
EtBr	-	bromuro de etidio
gr	-	gramos
hs	-	horas
LB	-	Luria Broth
M	-	molar
MCS	-	multiple cloning site
mg	-	miligramos
min	-	minutos
ml	-	mililitros
mM	-	milimolar
μ g	-	microgramos
μ l	-	microlitros
μ f	-	microfaraday
ng	-	nanogramos
nm	-	nanómetros

ON	-	overnight
ONPG	-	orto-nitrofenilgalactopiranosido
pb	-	pares de bases
PBS	-	buffer fosfato salino
rpm	-	revoluciones por min
seg	-	segundos
SFB	-	suero fetal bovino
TBE	-	buffer Tris Borato EDTA
TE	-	buffer Tris EDTA
V	-	volts
X-gal	-	5 bromo - 4 cloro - 3 indolil - β - D - galactósido

RESUMEN

Las bacterias del género *Salmonella* han adquirido un creciente interés para el tratamiento del cáncer, ya que poseen tropismo por una variedad de tumores experimentales, pudiendo replicarse en ellos y enlentecer el crecimiento tumoral en modelos animales. Las terapias basadas en bacterias son promisorias, aunque aún son incapaces de erradicar completamente los tumores. Con el fin de incrementar su efecto oncolítico, algunas cepas de *Salmonella* han sido transformadas con plásmidos que portan genes con actividad antitumoral. Se ha propuesto que la estabilidad segregacional de estos plásmidos podría ser uno de los factores determinantes de la eficacia tanto de las terapias contra el cáncer, como de vacunas basadas en cepas transformadas de *Salmonella*. Con el fin de profundizar en este tema, comparamos la estabilidad de los plásmidos de expresión: pUC-CMVlacZ de alto número de copias y pMB-CMVlacZ de bajo número de copias, en una cepa atenuada de *S. Typhimurium* desarrollada en nuestro laboratorio, y analizamos el efecto de ambos plásmidos sobre el crecimiento bacteriano. Observamos que las bacterias transformadas con pUC-CMVlacZ crecían más lento que aquellas transformadas con pMB-CMVlacZ y que la diferente carga metabólica, afectó, además, la estabilidad plasmídica, dado que pUC-CMVlacZ se perdió rápidamente de la población bacteriana en ausencia de presión selectiva, mientras que pMB-CMV lacZ se mantuvo de forma estable, tanto in vitro como in vivo. Sin embargo, observamos que en *E. coli* ambos plásmidos eran estables y casi no alteraron su dinámica de crecimiento, indicando que el hospedador es un determinante fundamental para que se manifieste el efecto de carga metabólica impuesto por el número de copias plasmídico. Por otro lado, se ha propuesto que los plásmidos podrían transferirse a las células tumorales desde las bacterias. Este supuesto se basa en datos que evidencian la expresión de genes clonados bajo el control de promotores eucariotas, detectada en animales tratados con bacterias transformadas. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que el promotor eucariota CMV presente en pUC-CMVlacZ parece ser bastante activo en bacterias, sugiriendo que la expresión observada en aquellos casos podría provenir del hospedador procariota, sobre todo cuando se emplearon plásmidos de alto número de copias. En suma, este trabajo describe el comportamiento de los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ en especies bacterianas diferentes, y sienta las bases para poder elegir los vectores y sistemas de expresión más adecuados para idear nuevas terapias antitumorales basadas en *Salmonella* como vector de genes terapéuticos.

INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación e inmunoterapias contra el cáncer, se está investigando el uso de cepas atenuadas de *Salmonella*. Se ha visto que *Salmonella* administrada de forma sistémica tiene tropismo por tumores primarios y metastásicos, donde puede ejercer una acción oncolítica capaz de enlentecer el crecimiento tumoral (Pawelek et al., 1997; Crull et al., 2011). Si bien los mecanismos responsables de este tropismo no están completamente caracterizados, la disponibilidad de nutrientes en las áreas necróticas y el ambiente inmunosuprimido del tumor parecen favorecer este fenómeno (Ryan et al., 2005). Sin embargo, rara vez se han logrado niveles significativos de regresión de tumores establecidos empleando solamente bacterias atenuadas como agentes terapéuticos. Con el fin de potenciar la terapia, se ha transformado a *Salmonella* con plásmidos que llevan genes que codifican proteínas con efecto antitumoral (como las citoquinas inmunoestimuladoras, los receptores inductores de apoptosis y algunos factores antiangiogénicos), lográndose mejores resultados terapéuticos (Ganai et al., 2009, Dong et al., 2008; revisado en Moreno et al., 2010). Hasta el momento, los plásmidos más empleados son derivados de los vectores de clonaje pUC (Sambrook y Russell, 2001). Estos vectores tienen un alto número de copias y pertenecen a la familia de incompatibilidad plasmídica de ColE1 (Novick, 1987). En esta familia se incluyen los plásmidos pBR322 y pMB1, que, al igual que ColE1, tienen un bajo número de copias. Explicaremos brevemente el mecanismo de replicación de estos plásmidos para entender qué hace que los vectores pUC tengan un número de copias elevado.

Los plásmidos de la familia de ColE1 (como pMB1) replican usando el mecanismo tipo theta. Estos plásmidos dependen exclusivamente de la maquinaria enzimática del hospedero para su replicación y requieren de un primer de ARN para iniciar la síntesis de la cadena líder (Fig. 1).

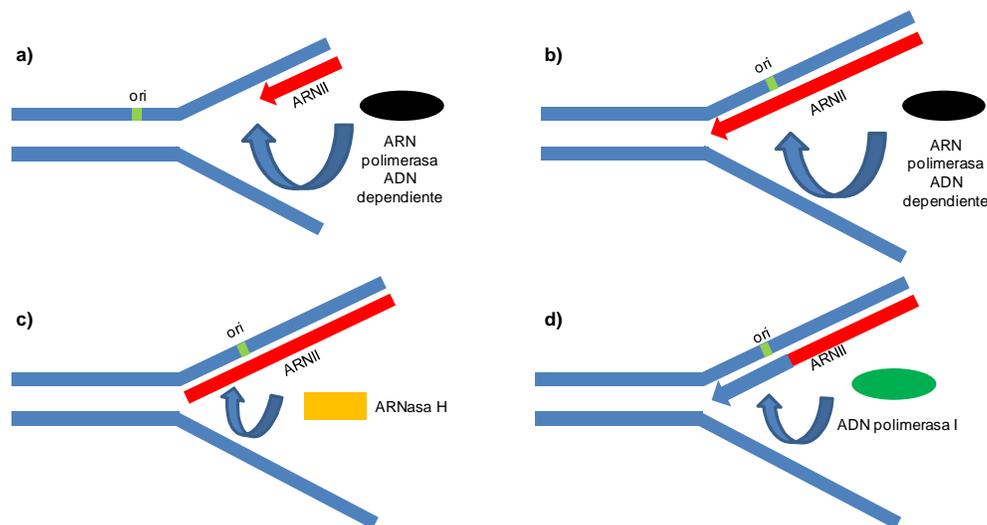


Figura 1. Representación esquemática de la replicación de los plásmidos de tipo ColE1. a) Iniciación de la síntesis del pre-primero, RNAII, por la RNA polimerasa ADN dependiente. b) La síntesis de RNA pasa a través del origen de replicación. c) La RNasa H degrada el RNAII para dar lugar a un primer maduro. d) A partir del primer maduro y por acción de la DNA polimerasa I comienza la síntesis de la cadena líder.

El ARN que va a dar lugar a este primer, llamado ARNII, se encuentra codificado por el propio plásmido. Su síntesis se inicia 555 pares de bases corriente arriba del origen de replicación (en ColE1) y es llevada a cabo por la ARN polimerasa ADN dependiente bacteriana. Una vez que el ARNII pasa a través del origen de replicación, es cortado por la ARNasa H. Este evento deja un OH⁻ disponible en su posición 3', listo para servir de primer a la ADN polimerasa I que es necesaria al inicio de la síntesis de la cadena líder, pero es substituida luego por la ADN polimerasa III encargada de completar la síntesis del ADN en dirección 5' → 3' sin interrupciones. La hebra complementaria o retrasada se inicia por acción del primosoma, un complejo proteico que va sintetizando pequeños ARN que sirven como primers para la síntesis de ADN. Este proceso ocurre a medida que el ADN molde va quedando expuesto, por el avance de la hebra líder. Estos fragmentos reciben el nombre de fragmentos de Okazaki (Rothman, 1984; Sambrook y Russell, 2001).

Los plásmidos no poseen un mecanismo para controlar la síntesis de moléculas de ARNII, pero sin embargo, mantienen un número de copias promedio bien definido en las células bacterianas. Por lo tanto deben tener un mecanismo para regular el número de eventos de replicación. En los plásmidos de tipo ColE1, la replicación se inhibe por acción de una molécula de ARN, el ARNI, que también está codificada por el plásmido (Fig. 2). El ARNI se transcribe desde de la hebra opuesta a la empleada como molde para el ARNII. Por lo tanto las secuencias del ARNI y ARNII son complementarias. El ARNI es capaz interactuar (hibridizarse) con el ARNII, y esta interacción desestabiliza la unión del ARNII con el ADN. Debido a que la ARNasa H, encargada de procesar el ARNII para dar lugar a un primer maduro, requiere que el ARNII esté unido al ADN para cortarlo, el híbrido de ARN inhibe el evento de replicación. La proteína Rom, codificada por el plásmido, favorece la interacción del ARNI con el ARNII y por lo tanto ayuda a inhibir la replicación (Rothman, 1984).

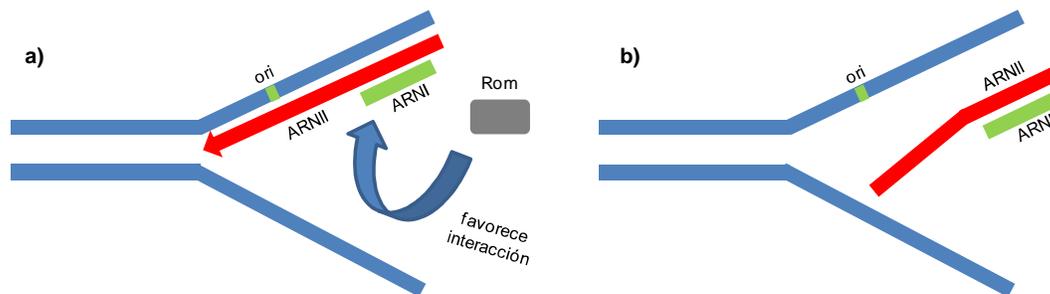


Figura 2. Representación esquemática de la regulación negativa de la iniciación de la replicación. a) Hibridación entre el RNAI y el RNAII. Esta interacción se ve favorecida por la proteína Rom. b) Separación del RNAII de la hebra molde de DNA a causa de la interacción con el RNAI. No ocurre la iniciación de la replicación.

Los vectores de clonaje de tipo pUC, emplean un origen de replicación de tipo ColE1 modificado (generado en pMB1) que eleva su número de copias. Éstos poseen una mutación puntual en el ADN que codifica para el ARNII (Fig. 3). Esta mutación disminuye la tasa de hibridación entre el ARNII y el ARNI, permitiendo un número mayor de eventos de replicación antes de que ocurra la inhibición. Estos vectores carecen además del gen que codifica para la proteína Rom, y se ha visto que esta proteína es capaz de corregir el fenotipo asociado al número de copias (Lin-Chao et al., 1992).

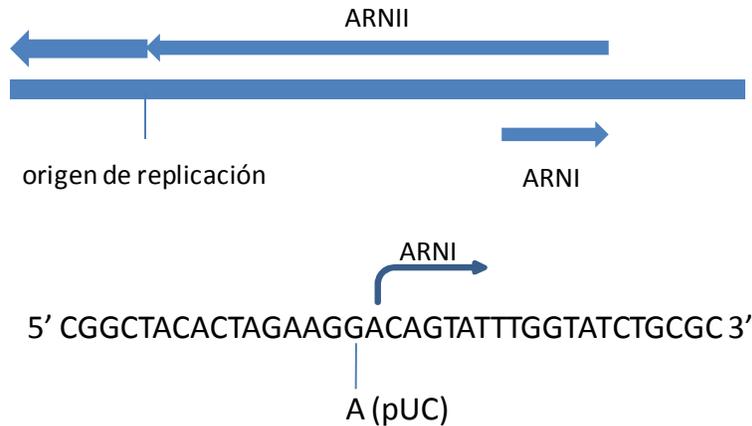


Figura 3. Se muestra el sitio de la mutación puntual en el origen de replicación pMB1 que da lugar al origen de replicación pUC. Esta mutación se encuentra en la secuencia del ARNII y afecta su plegado, lo que a su vez afecta su interacción con el ARNI. (Tomado de Lin-Chao, 1992)

Los vectores de clonaje son el resultado de décadas de investigación. El plásmido pBR322 (Fig. 4a), desarrollado en 1977 por Bolívar y Rodríguez, fue el precursor de los vectores de clonaje modernos. Este plásmido lleva el origen de replicación del plásmido pMB1, la resistencia a la ampicilina (AMP) del plásmido RSF2124, la resistencia a tetraciclina del plásmido pSC101 y un número útil de sitios de restricción para la inserción de fragmentos de ADN de pequeño tamaño. Posteriormente surgieron vectores de clonaje de menor tamaño y mayor capacidad, mayor número de copias y capaces de aceptar fragmentos de ADN generados por clivaje con un rango mayor de enzimas de restricción. Entre estos nuevos vectores de clonaje, destacan pUC18/19 desarrollados en el año 1985 (Yanisch-Perron et al., 1985) por Messing y colaboradores en la Universidad de California, de ahí su nombre "pUC" (Fig. 4b). Estos plásmidos llevan la resistencia a AMP y el origen de replicación pMB1 mutado que eleva su número de copias en ausencia de Rom, descrito en el párrafo anterior.

Los vectores pUC fueron los primeros en contener una serie de sitios de corte enzimático espacialmente cercanos denominados multiple cloning site (MCS), lo que permite una gran versatilidad a la hora de realizar clonajes. Si bien, a diferencia del plásmido pBR322, los vectores pUC no permiten detectar una inserción por la pérdida de una resistencia a antibiótico (dado que llevan sólo una), es posible detectar inserciones por pérdida de la α -complementación si se emplean las cepas adecuadas. Esto es posible dado que estos vectores llevan el MCS dentro del fragmento α del gen lacZ. Este fragmento por sí sólo no es funcional, pero si el plásmido se encuentra en bacterias cuyo genoma no codifica para este fragmento pero lo hace para el resto del operón lac, ocurre la trans-complementación y estas bacterias crecidas en un medio con Xgal dan colonias de color azul. Un inserto en el MCS interrumpe el fragmento α y por lo tanto, las colonias bacterianas crecidas con Xgal van a ser blancas (Sambrook y Russell, 2001).

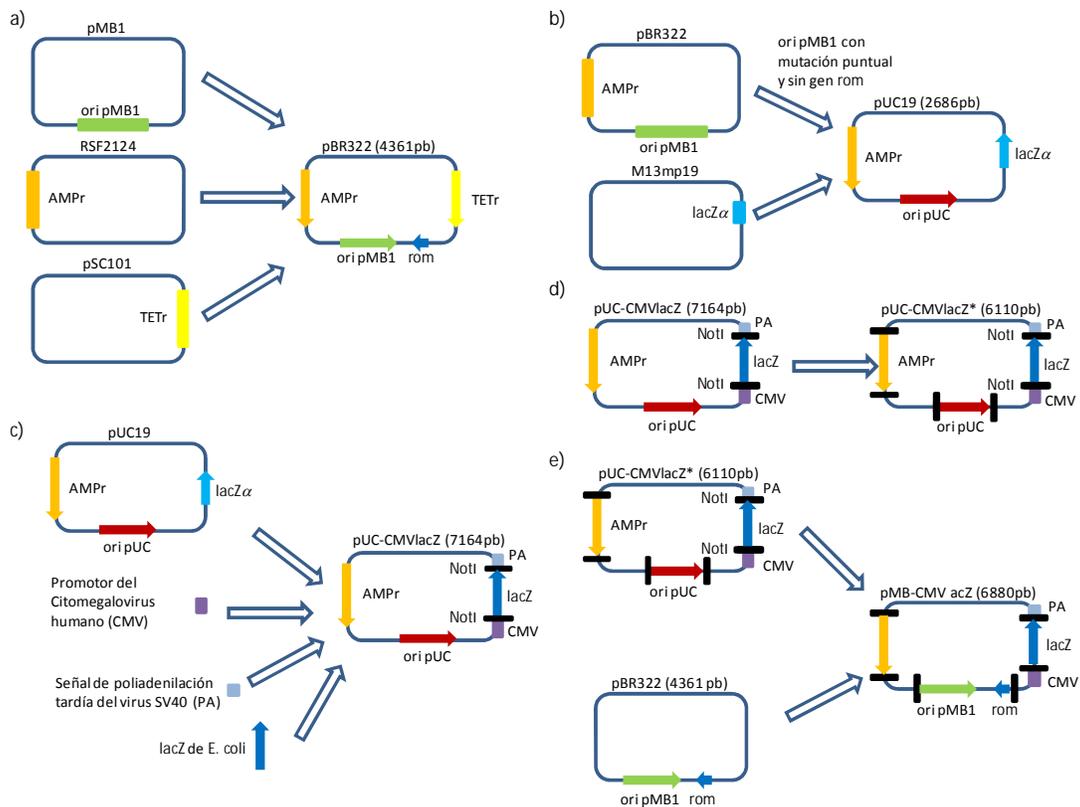


Figura 4. En esta ilustración se muestra en forma esquemática como se llevo a cabo la construcción de los plásmidos que se van a emplear en este trabajo, pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ. a) Construcción del precursor de pUC19, pBR322. b) Construcción de pUC19 a partir de pBR322 y del vector de clonaje derivado del bacteriófago M13, M13mp19. c) Construcción de pUC-CMVlacZ a partir de pUC19 (MacGregor y Caskey, 1989). d) pUC-CMVlacZ*: modificación de pUC-CMV lacZ por Bauer et al, 2005, con la introducción de nuevos sitios de restricción: Sall y SpeI en 5', y KpnI y BglII en 3' del ori; BglII, KpnI y SpeI en 5', y EcoRI en 3' del gen de resistencia a ampicilina (AMP^r); TET^r, gen de resistencia a tetraciclina. e) Construcción del plásmido pMB-CMVlacZ a partir de pUC-CMVlacZ y del origen de replicación pMB1 del plásmido pBR322.

Como mencionamos al inicio de esta sección, algunas cepas atenuadas *Salmonella* transformadas con plásmidos de *E. coli* que codifican proteínas con actividad antitumoral se han empleado para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, una limitación de estos enfoques es que los plásmidos usados, derivados de pUC, son inestables en *Salmonella*, es decir, se pierden en una población bacteriana en crecimiento y por lo tanto su efecto podría verse disminuido (Bauer et al., 2005; Gahan et al., 2007).

El nivel de expresión génica, el tamaño y la complejidad del plásmido y su número de copias, podrían afectar su estabilidad en la población bacteriana. Como el plásmido le impone una carga metabólica a la bacteria, si no se logra un equilibrio plásmido-hospedero, entonces las bacterias sin plásmido que vayan apareciendo podrían tener una ventaja de crecimiento en un medio sin presión selectiva y tomarán la población tras las sucesivas duplicaciones celulares.

Para evitar la aparición de bacterias sin plásmido se han desarrollado una serie de estrategias que van desde la introducción de sistemas activos de selección de bacterias con plásmido (Galen et al., 1999) a la sustitución del origen de replicación y reducción del número de copias del plásmido (Galen

et al., 2010). En este sentido, se ha visto que una reducción en el número de copias es capaz de lograr la estabilización de plásmidos en cepas de *Salmonella* y esto resulta en la optimización de la respuesta inmune contra los antígenos codificados por estos plásmidos. Uno de estos estudios lo realizaron Bauer y colaboradores (Bauer et al., 2005). Los autores demostraron que la sustitución del origen de replicación pUC por orígenes de replicación que determinan números de copias menores, entre ellos el origen de pMB1, estabilizaba el plásmido pUC-CMVlacZ (Fig 4e) en la cepa auxotrófica de *Salmonella Typhimurium* SL7207 (aroA-), tanto in vitro como in vivo. Además, observaron que el plásmido resultante, pMB-CMVlacZ, de bajo número de copias, daba lugar a una respuesta inmune mayor frente a un antígeno expresado por el plásmido, tanto a nivel humoral como celular, T CD4 y T CD8, comparado con la respuesta generada por el plásmido de alto número de copias pUC-CMVlacZ.

Otro trabajo que apoyó estas observaciones fue el de Gahan y colaboradores (Gahan et al., 2007). Aquí se estudió la respuesta humoral contra el fragmento C de la toxina del tétano expresada por plásmidos de alto y bajo número de copias, empleando la cepa auxotrófica de *Salmonella Typhimurium* BRD509 (aroA-/aroD-). También se observó que los plásmidos de bajo número de copias eran más estables que los de alto número de copias, tanto in vitro como in vivo. Sin embargo, sólo se obtuvo respuesta humoral a partir de uno de los plásmidos estables con número de copias intermedio, indicando que ambos factores: el nivel de expresión y la estabilidad plasmídica, son importantes a la hora de inducir la respuesta contra el antígeno expresado.

Es relevante destacar que los estudios mencionados se realizaron empleando plásmidos con sistemas de expresión eucariotas y que las conclusiones reportadas están basadas en el supuesto que ocurra transferencia plasmídica in vivo desde bacterias a células de mamífero (Bauer et al., 2005; Gahan et al., 2007). En la discusión de esta Tesina abordaremos el tema con mayor detalle.

En este trabajo, estudiaremos el efecto que tienen los plásmidos pUC-CMVlacZ de alto número de copias y pMB-CMVlacZ de bajo número de copias (Bauer et al., 2005) sobre el crecimiento de la cepa atenuada (aroC-) de *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* LVR01 (Chabalgoity et al., 2000) y sobre la cepa DH5 α de *E. coli*. Además, determinaremos la estabilidad de ambos plásmidos en cultivos bacterianos y en tumores experimentales in vivo y mediremos los niveles de expresión génica desde cada uno de estos vectores in vitro. Excepto por el origen de replicación y el gen rom en pMB-CMVlacZ, estos plásmidos son prácticamente idénticos. Ambos llevan el gen lacZ que codifica la β -galactosidasa (β -gal) de *E. coli* bajo el control del promotor CMV de los genes inmediatamente tempranos del Citomegalovirus humano (MacGregor y Caskey, 1989). Los resultados de este trabajo servirán para definir algunas variables de la estabilidad plasmídica en hospedadores bacterianos autólogos y heterólogos, así como para orientar el diseño de futuros experimentos de terapias contra el cáncer empleando bacterias transformadas con plásmidos que codifican proteínas antitumorales.

OBJETIVO GENERAL

Obtener un plásmido estable en la cepa atenuada LVR01 de *S. Typhimurium*, con el fin de emplearlo como vector de clonaje en ensayos de terapia génica contra el cáncer. Para ello, trabajaremos con los plásmidos pUC-CMVlacZ, de alto número de copias, y pMB-CMVlacZ, de bajo número de copias, ambos derivados de pUC19 de *E. coli*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el número de copias de los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ en *S. Typhimurium* LVR01 y *E. coli* DH5 α .
2. Estudiar el efecto de carga metabólica impuesta por los plásmidos a sus hospederos, comparando la cinética del crecimiento de bacterias transformadas con pUC-CMVlacZ o con pMB-CMVlacZ.
3. Determinar la estabilidad segregacional in vitro de pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ en cultivos de *S. Typhimurium* LVR01 y *E. coli* DH5 α .
4. Determinar la estabilidad in vivo de pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ en *S. Typhimurium* LVR01 en un modelo murino de cáncer de mama.
5. Determinar si ocurre expresión del gen de β -gal desde el promotor eucariota CMV en *S. Typhimurium* LVR01 y *E. coli* DH5 α .
6. Comprobar la funcionalidad del promotor CMV mediante el análisis de expresión β -gal en células tumorales transfectadas con los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Se emplearon las cepas bacterianas: DH5 α (fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17)(Woodcock et al., 1989) y TG2 (supE hsd Δ 5 thi Δ (lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15] Δ (srl-recA)306::Tn10 Tet^r (r-m-))(Hussain et al., 1989) de *E. coli* y SL5338 (galE r⁻ m⁺) (Lee et al., 2000), SL3261 (mutante en aroA derivado de SL1344)(Fagan et al., 2001) y LVR01 (aroC⁻ derivado del aislado canino p228067) (Chabalgoity et al., 2000) de *S. Typhimurium*.

Plásmidos

Los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ (Bauer et al., 2005) se esquematizan en la Fig. 5a y b. Ambos ADNs llegaron asociados a papel de filtro y se eluyeron mediante incubación en TE 10:1.

Crecimiento bacteriano

El crecimiento de las bacterias en medio líquido fue en shaker a 200 rpm y 37°C empleando el medio de cultivo LB (Sigma) y el crecimiento en medio sólido fue sobre placas LB-agar, en estufa a 37°C. Las bacterias con plásmido se crecieron con 50 μ g/ml de AMP. La AMP se preparó a una concentración de 100 mg/ml, diluyendo 1 gr de AMP sódica (Fluka) en 10 ml de ddH₂O y filtrando la solución con un filtro de 20 μ m. Cuando fue necesario visualizar colonias que expresan β -gal, se prepararon placas de LB-agar donde se agregó 40 μ l de una solución de X-gal (20mg/ml en dimetilformamida) distribuida de forma homogénea.

Preparación de bacterias competentes para transformación por el método de heat shock (*E. coli* DH5 α y TG2)

Se creció un cultivo ON en 5 ml de LB a partir de una colonia aislada en placa y una dilución 1/100 de este cultivo se usó para inocular 200 ml de LB precalentado. Se dejó crecer hasta una DO₆₀₀ de 0,4 y el matraz se colocó en hielo por 5 min. A continuación, las bacterias se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. El precipitado bacteriano se resuspendió en 100 ml de CaCl₂ 50mM frío. Se repitió la centrifugación en iguales condiciones y el precipitado obtenido se resuspendió en 4 ml de CaCl₂ 50 mM con 10% glicerol pre-incubado a 4°C. Se guardaron alícuotas de 100 μ l a -80°C.

Transformación de bacterias por el método de heat shock

Se mezclaron 100-200 μ g de ADN del plásmido a transformar en un tubo Eppendorf con 100 μ l de bacterias competentes y se incubó 20 min en hielo. Luego se realizó un choque térmico durante 2 min a 42°C. Inmediatamente después los tubos se colocaron en hielo por 5 min. Luego se añadió 900 μ l de LB y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación. Finalmente se plaquearon 100 μ l en LB-agar con AMP y el volumen restante se precipitó centrifugando a 4000 rpm 10 min, se resuspendió en 100 μ l y también se plaqueó. Las placas se incubaron ON en estufa a 37°C.

Preparación de bacterias electrocompetentes (*Salmonella* SL5338, SL3261 y LVR01)

Se creció un cultivo ON a partir de una colonia aislada y una dilución 1/100 de éste se empleó para inocular 150 ml de LB precalentado. El cultivo se dejó crecer hasta una DO₆₀₀ de 0,4 y se incubó en hielo durante 20 min. Luego se centrifugó a 3000 rpm y 4°C durante 20 min. El precipitado

bacteriano obtenido se resuspendió en 150 ml de ddH₂O fría y se centrifugó a 3000 rpm y 4°C durante 20 min. Las bacterias se resuspendieron en 540 µl de glicerol 10% (v/v) en ddH₂O fría y alícuotas de 60 µl se guardaron a -80°C.

Transformación bacteriana por electroporación

Se agregaron 5 µl de ADN plasmídico (100-200 ng) a un tubo Eppendorf conteniendo 60 µl de bacterias electrocompetentes. Se mezcló e incubó en hielo durante 60 seg y se transfirió a una cubeta especial (Sigma Aldrich). Las condiciones de electroporación fueron 40 µF de carga, 500 Ohm y 1750 V. Luego de electroporar se agregaron 900 µl de LB precalentado a 37°C y el contenido se pasó a un Eppendorf que se incubó 1 hora a 37°C con agitación. Se plaquero distintos volúmenes, partiendo de 50 µl en LB-agar con AMP.

Extracción de ADN plasmídico desde bacterias y determinación de su concentración

Para extraer pequeñas cantidades de ADN plasmídico, se partió de un cultivo ON de 5 ml y se empleó el Spin Miniprep Kit de QIAGEN siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Para la extracción de grandes cantidades de ADN plasmídico se partió de un cultivo ON de 300 ml y se empleó el Endofree Plasmid Maxi Kit de QIAGEN siguiendo las instrucciones de los fabricantes. La concentración de ADN se midió por absorbancia a 260 nm en Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Digestión enzimática

Los plásmidos (0,5-1 µg) se digirieron con 5 unidades de las siguientes enzimas de restricción: EcoRI y HindIII (Invitrogen) en buffer reactivo 2 y XhoI (Fermentas) en buffer Red. La digestión tuvo lugar a 37°C durante 45 min.

Electroforesis en gel de agarosa

La separación de fragmentos de ADN (100-150 ng) se realizó en geles de agarosa al 1% a 100 V usando el buffer de corrida TBE 0,5x. Se visualizaron las bandas de ADN incubando el gel en una solución de EtBr 0,5 µg/ml.

Cuantificación bacteriana

Para determinar el número de bacterias en un cultivo, se realizaron diluciones seriadas en PBS y se plaquearon en LB-agar. Las bacterias presentes en los homogenizados tumorales se cuantificaron plaqueandolas de forma incorporada en LB-agar. El número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml se determinó multiplicando el número de UFC que crecieron en la placa, por 50 o 10 según se hayan plaqueado 20 o 100 µl, respectivamente, y por el factor de dilución (FD). Tal que:

$$\text{UFC/ml} = \text{N}^{\circ} \text{ de UFC} * \text{FC} * \text{FD}$$

Cuantificación de la actividad β-gal en bacterias

Se inoculó una dilución 1/50 de un cultivo ON en 5 ml de LB precalentado y se dejó crecer hasta una DO₆₀₀ entre 0,4 y 0,6. A continuación, se realizó una dilución ½ del cultivo y se dejó crecer hasta una DO₆₀₀ de 0,4. Esta operación se repitió una vez más hasta volver a alcanzar una DO₆₀₀ de 0,4. El cultivo se incubó durante 20 min en hielo y se anotó el valor de DO₆₀₀. Se mezclaron 0,5 ml de cultivo

con 0,5 ml de Buffer Z (0,06 M de Na₂HPO₄, 0,04 M NaH₂PO₄, 1M de KCl, 1M de MgSO₄ 1 M y 0,05 M de β-mercaptoetanol). Las bacterias se lisaron agregando 15 μl de CHCl₃ y 24 μl de SDS 0,1% a la mezcla y vortexeando durante 10 seg. Se incubó el lisado a 28°C en baño de agua durante 5 min y luego se le añadieron 0,4 ml de una solución de ONPG 4 mg/ml en Buffer Z precalentado a 28°C. Se dejó que la reacción de degradación de ONPG tuviera lugar a 28°C hasta la aparición de color amarillo, punto en el que se detuvo la reacción agregando 0,5 ml de Na₂CO₃ 1 M. Las DO₄₂₀ y DO₅₅₀ se anotaron y se determinó la actividad de β-gal (Unidades Miller) en el lisado con la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades Miller} = \frac{1000 * (DO_{420} - 1,75 * DO_{550})}{\text{tiempo de reacción (min)} * \text{Volumen de cultivo (ml)} * DO_{600}}$$

Crecimiento, tripsinización y cuantificación de células tumorales

Las líneas celulares 4T1, CT26 y HeLa se obtuvieron de la American Cell Type Collection (ATCC) y se crecieron en DMEM+L-glutamina 1mM+10% SFB a 37°C en estufa con 5% de CO₂. El crecimiento se siguió por observación en el microscopio. La disgregación celular se realizó lavando primero la capa de células con PBS, agregando un pequeño volumen de tripsina (Sigma) e incubación a 37°C durante 5 min. La reacción de tripsinización se detuvo con el agregado de SFB al 15% en PBS. Las células viables se cuantificaron al microscopio con una cámara de Neubauer empleando una tinción con Trypan blue (Invitrogen) para distinguir a las células muertas.

Transfección de las células HeLa por el método de Ca₃(PO₄)₂ y revelado de la expresión de β-gal mediante tinción con X-gal

Se crecieron 75.000 células HeLa hasta una confluencia del 60-80% en placas de 24 pocillos. Estas células se transfectaron con 2 μg de ADN plasmídico en una solución 0,45 mM en Tris, 0,045 mM en EDTA, 125 mM en CaCl₂, 140 mM en NaCl, 0,75 mM en Na₂HPO₄ y 25 mM en Hepes (N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-ácido etano sulfónico). A los dos días las células se lavaron con PBS y se fijaron durante 10 min con 300 μl de glutaraldehído 0,5%. A continuación, los pocillos se cubrieron con 150 μl de X-gal 1 mg/ml y las placas se incubaron ON en estufa de CO₂ a 37°C. Al día siguiente las células se lavaron con PBS y se fotografiaron al microscopio.

Modelo murino de cáncer de mama

Se administraron 70.000 células tumorales 4T1 en la mama derecha de ratones BALB/c hembra de 8-9 semanas. Al cabo de 10 días, cuando los tumores alcanzan un tamaño aproximado de 5mm de diámetro, se inyectaron intratumoralmente las bacterias conteniendo cada plásmido.

RESULTADOS

1. Transformación de *E. coli* DH5 α y *Salmonella* LVR01 con los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ

Para iniciar este proyecto, en primer lugar solicitamos los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ descritos el trabajo de Bauer et al., 2005 a los autores, quienes tuvieron la generosidad de enviárnoslos. Ambos ADNs se transfirieron a *E. coli* DH5 α con el método heat shock. Las bacterias transformadas se seleccionaron en placas de LB-agar con AMP. De estas placas se aislaron colonias y se inocularon cultivos ON que se emplearon para la extracción de plásmido. Los clones se verificaron por análisis de restricción. La digestión enzimática de pUC-CMVlacZ se realizó con EcoRI y HindIII dando lugar a fragmentos de 4529 y 2635 pb y la digestión de pMB-CMV lacZ con EcoRI y XhoI da lugar a fragmentos de 6241 y 639 pb. En la Fig. 5a y b se puede ver el mapa de los plásmidos, a partir del cual se puede calcular el tamaño de los fragmentos de digestión esperados. Una vez confirmada la transformación en DH5 α , se utilizaron los plásmidos extraídos para electroporar la cepa de *Salmonella* SL5338. Esta cepa posee un genotipo recombinasa- y modificación+ y el pasaje de los plásmidos por ésta, aumenta la eficiencia de la electroporación de otras cepas de *Salmonella* (Khan et al., 1994). LVR01 se electroporó con los plásmidos que se extrajeron de SL5338. En la Fig. 5c, se observa el gel correspondiente al ADN de los plásmidos recuperados de *E. coli* y *Salmonella* digeridos y sin digerir. Las bandas de restricción obtenidas indican que la transformación/electroporación con cada uno de los plásmidos fue exitosa. Es de notar que en *Salmonella* detectamos un porcentaje considerable de elementos de tamaño mayor a la forma monomérica de los plásmidos sin digerir (Fig. 5c). Se probó que estos elementos eran multimeros del plásmido porque al digerir con enzimas de restricción aparecen bandas con el tamaño esperado para la digestión de monómeros. Este ensayo es una forma de probar que las bandas que migran más lento en el gel corresponden a multímeros (Bedbrook et al., 1976). Es interesante destacar que las formas multiméricas de los plásmidos no se observaron en *E. coli* (Fig. 5c).

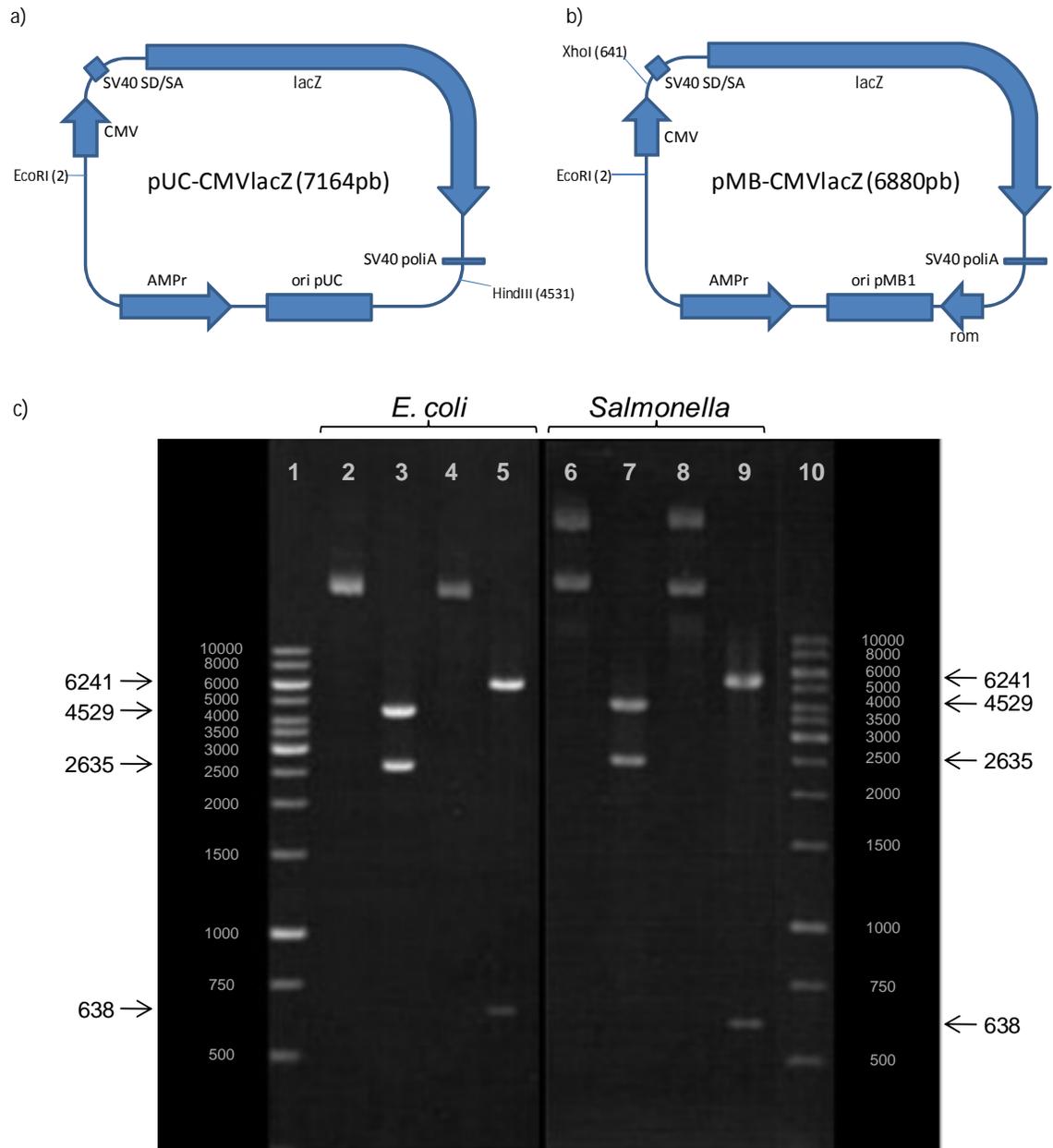


Figura 5. Representación esquemática de los plásmidos a) pUC-CMVlacZ y b) pMB-CMVlacZ descritos en Bauer et al., 2005 y utilizados en este trabajo. En ambos plásmidos se señalan sitios de restricción enzimática únicos que se emplearon para corroborar la transformación, el gen lacZ que codifica para β -galactosidasa (β -gal), dirigido por el promotor de los genes inmediatamente tempranos del Citomegalovirus humano (CMV), el sitio donador/aceptor de splicing de ARN (SD/SA) y la señal de poliadenilación tardía (poli A) de SV40 y el gen de resistencia a AMP (AMPr). La diferencia entre estos plásmidos está en el origen de replicación: pUC-CMVlacZ tiene el origen pUC (ori pUC) y pMB-CMVlacZ lleva el origen pMB1 (ori pMB1). Este plásmido lleva además el gen rom que está asociado a la regulación del número de copias. La digestión de pUC-CMVlacZ se realizó con las enzimas EcoRI y HindIII y la de pMB-CMVlacZ con las enzimas EcoRI y XhoI. Las flechas señalan el tamaño de los fragmentos de digestión obtenidos. Los plásmidos aislados de *E. coli* y *Salmonella* se corrieron en geles separados. Los carriles 1 y 10 corresponden al marcador de peso molecular. c) Electroforesis correspondiente los plásmidos pUC-CMVlacZ (carriles 2, 3, 6 y 7) y pMB-CMVlacZ (carriles 4, 5, 8 y 9) sin digerir (2, 4, 6 y 8) y digeridos (3, 5, 7 y 9).

2. Determinación del número de copias de los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ en E. coli DH5 α y en Salmonella LVR01

El origen de replicación es un determinante fundamental del número de copias plasmídico. En E. coli, hospedador natural de plásmidos del tipo ColE1, se ha visto que el origen pUC determina alto número de copias, mientras que pMB1 da lugar a un bajo número de copias. Por otro lado, se ha reportado que los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ mantienen la relación de alto y bajo número de copias en la cepa SL7207 (aroA-, hisG46, DEL407 [aroA::Tn10/Tc-s]) de Salmonella (Bauer et al., 2005), pero en ese trabajo no se calculó su valor absoluto. Por lo tanto, decidimos determinar el número de copias de cada plásmido en la cepa LVR01 de Salmonella y en E. coli DH5 α . El ADN plasmídico se obtuvo con Miniprep y se determinó el número de bacterias de partida y la concentración del ADN plasmídico extraído según se indica en la sección de Materiales y Métodos. Estos valores fueron empleados para calcular el número de copias de los plásmidos por bacteria con la fórmula que se muestra a continuación, donde el volumen de partida se refiere al volumen del cultivo bacteriano empleado para la extracción del plásmido y el volumen de elución refiere al empleado para su elución de la columna de Miniprep. 10^9 gr/ng es el factor de conversión de ng a gr. 660 gr/mol es el peso en gr de un mol de pares de bases. El n $^\circ$ de Avogadro es $6,02 \times 10^{23}$ y UFC: unidades formadoras de colonias.

$$\text{N}^\circ \text{ de copias de plásmido/bacteria} = \frac{\left(\frac{\text{Concentración de plásmido (ng/\mu l)} \times \text{Volumen de elución (\mu l)} \times 10^9 \text{ gr/ng}}{\text{N}^\circ \text{ de pb del plásmido} \times 660 \text{ (gr/mol de pb)}} \right) \times \text{N}^\circ \text{ de Avogadro}}{\text{UFC/ml} \times \text{Volumen de partida(ml)}}$$

En la Tabla 1 podemos observar que el número de copias en LVR01 de pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ es aproximadamente 400 y 30, respectivamente. Estos valores están en el orden de lo reportado para plásmidos con los orígenes de replicación pUC y pMB1 en E. coli (Lee et al., 2006). Sin embargo, el número de copias de estos plásmidos que hemos determinado para DH5 α (bacterias vivas) es más alto (Tabla 1). Esta diferencia podría estar asociada a el tipo de ensayo empleado, ya que Lee y colaboradores utiliza un método de cuantificación que no tiene en cuenta la viabilidad de las bacterias, pudiendo estar subestimando la cantidad real de los plásmidos en las bacterias vivas.

Cepa	Plásmido	Número de copias
LVR01	pUC-CMVlacZ	417 \pm 150
	pMB-CMVlacZ	29 \pm 8
DH5 α	pUC-CMVlacZ	2682 \pm 255
	pMB-CMVlacZ	470 \pm 97

Tabla 1. Número de copias plasmídico. Los resultados corresponden al promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

3. Estudio del efecto de pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ sobre el crecimiento de *E. coli* DH5 α y *Salmonella* LVR01

Se ha visto que la carga metabólica que los plásmidos le imponen a su hospedador es uno de los factores que influyen sobre su estabilidad. Para estudiar la carga que pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ le imponían a DH5 α y LVR01, se compararon las velocidades de crecimiento de las bacterias con y sin plásmido en medio líquido. Para ello, se partió de cultivos a una DO₆₀₀ de 0,05 y se registró la DO₆₀₀ cada 30 min durante 5-6 hs. Para estudiar el efecto del número de copias de los plásmidos sobre el tamaño de las colonias, se plaquearon las bacterias en LB-agar con AMP y se dejaron crecer en estufa durante 24 hs.

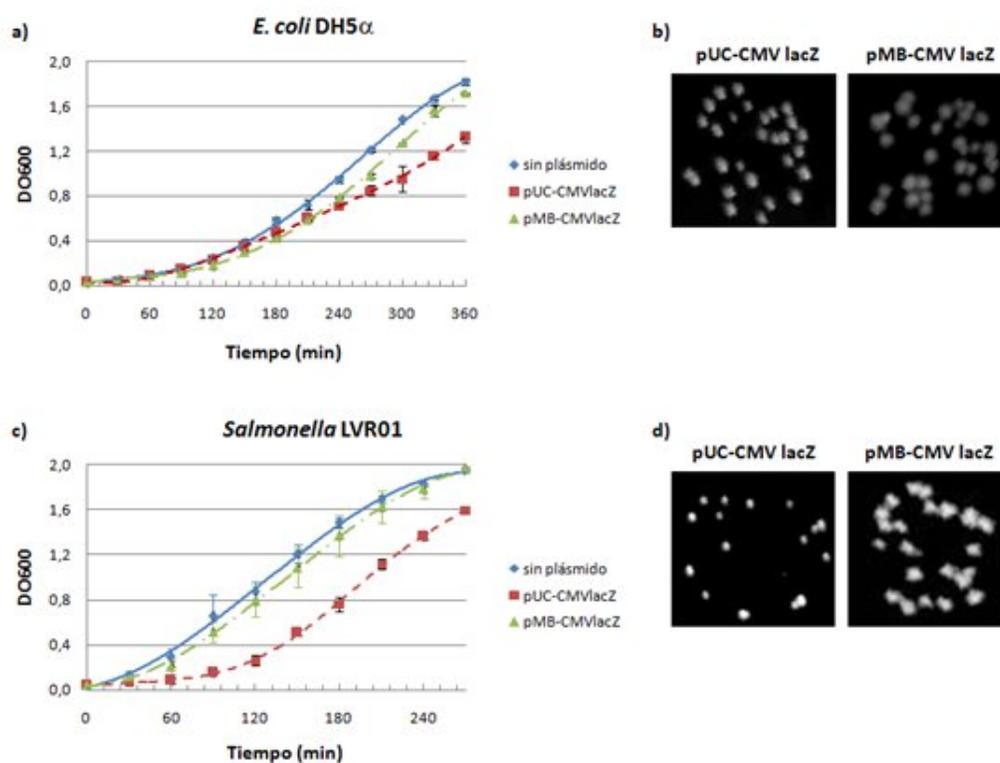


Figura 6. Efecto de los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB CMVlacZ sobre el crecimiento de las bacterias DH5 α (a y b) y LVR01 (c y d). Los resultados en medio líquido (a y c) corresponden al promedio de 2 experimentos independientes. El estudio en medio sólido (b y d) se realizó plaqueando las bacterias LB-agar+AMP y dejándolas crecer durante 24 hs. Las fotografías se tomaron en un G:BOX (SYNGENE) desde la misma placa.

En la Fig. 6a y c, podemos observar que las bacterias con plásmido crecen más lento que aquellas sin plásmido, ya sea en DH5 α o LVR01. También comprobamos que este efecto es dependiente del número de copias, siendo las bacterias con el plásmido de alto número de copias las que crecen más lento. Este efecto es dependiente del hospedador, siendo más acentuado para LVR01. En la Fig. 6d, se puede ver que las colonias de LVR01 con el plásmido pUC-CMVlacZ son claramente más pequeñas

que aquellas con pMB-CMVlacZ. En DH5 α , Fig. 6b, casi no hay diferencia en el tamaño de las colonias de las bacterias que llevan uno u otro plásmido.

Estos resultados muestran que en *E. coli* DH5 α los plásmidos tienen un efecto moderado sobre la velocidad de crecimiento bacteriana, mientras que en *Salmonella* LVR01 el efecto del plásmido pUC-CMVlacZ es muy marcado. Otra situación que se puede destacar es que DH5 α crece más lento que LVR01 y este efecto no se debe al plásmido.

Como complemento al estudio de crecimiento bacteriano en cultivo se determinó la relación entre la concentración de bacterias y la DO₆₀₀. Esto sirve para verificar el rango en el que el crecimiento bacteriano es más acentuado y seleccionar las condiciones experimentales de los ensayos siguientes.

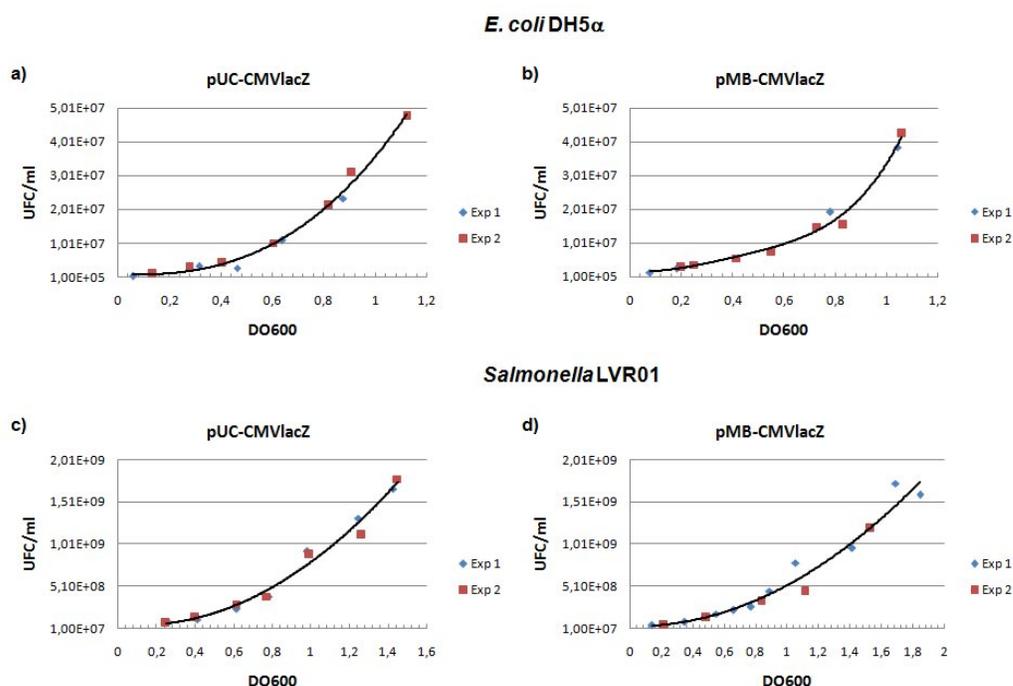


Figura 7. Estudio de correlación entre el número de bacterias en cultivo y la DO₆₀₀. Para el estudio se emplearon diluciones de cultivos de bacterias con plásmido y las bacterias se cuantificaron en placas de LB-agar+AMP. Este ensayo permite determinar el número de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml de cultivo. Los datos de cada gráfica corresponden a 2 experimentos independientes que se señalan como Exp1 y Exp2.

En la Fig. 7, observamos que a DO₆₀₀ de 0,8 el crecimiento bacteriano es más acentuado y corresponde a la fase exponencial de crecimiento (Fig. 6). Una observación adicional que pudimos rescatar de este estudio, es que, a una misma DO₆₀₀, el número de bacterias en DH5 α es menor que para LVR01; por ejemplo, a DO₆₀₀ = 0,8 la diferencia es de unas 20 veces. Para ver si ésto podría deberse a diferencias morfológicas de las bacterias, observamos preparaciones al microscopio óptico pero no evidenciamos diferencias de tamaño, ni formación de sincitios. Esta particularidad podría deberse a diferencias en el coeficiente de absorción o a la distinta viabilidad en cultivo de cada especie bacteriana.

4. Estabilidad in vitro de los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ en E. coli DH5a y Salmonella LVR01

En el desarrollo de vacunas usando Salmonella como vector y sistemas de expresión tanto eucariotas como procariotas (Dunstan et al., 2003) se ha visto que la respuesta inmune desencadenada contra antígenos, es más intensa cuando éstos están codificados por plásmidos que se mantienen de forma estable en la población bacteriana que cuando se expresan desde plásmidos inestables (Bauer et al., 2005, Gahan et al., 2007). Por lo tanto para emplear a LVR01 como vector en inmunoterapias contra el cáncer sería de interés poder contar con plásmidos de expresión estables. Además, en Salmonella se ha visto que plásmidos de bajo número de copias son más estables que los de alto número de copias (Bauer et al., 2005, Gahan et al., 2007). En nuestro trabajo comparamos la estabilidad de los plásmidos de alto y bajo número de copias, pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ, en LVR01. Con fin de evaluar el efecto del hospedador sobre la estabilidad plasmídica, realizamos los mismos estudios en E. coli, por ser esta bacteria el hospedador natural de plásmidos de tipo ColE1. Para el estudio de la estabilidad de los plásmidos se empleó el método descrito en Kramer, 1997. Cultivos de las bacterias conteniendo cada plásmido se crecieron en medio líquido con AMP hasta una DO_{600} de 0,8 (fase exponencial de crecimiento, Figs. 6 y 7). Estos cultivos son la generación de partida (generación 0). A continuación, los cultivos fueron diluidos sucesivamente en una proporción 1/1024 en medio líquido sin antibiótico y se crecieron nuevamente hasta alcanzar una DO_{600} de 0,8. En este intervalo transcurren 10 generaciones. Este dato se deriva del siguiente razonamiento: el número de bacterias en un cultivo en fase exponencial (NE) depende del número de bacterias que se inocularon (NI) y del número de generaciones que transcurrieron desde el inóculo (G). Por lo tanto, cumple con la siguiente ecuación:

$$NE = NI * 2^G$$

Al sustituir en esta ecuación el número de generaciones por 10, vemos que el número de bacterias se incrementó 1024 veces:

$$NE = NI * 2^{10} = NI * 1024$$

Por lo tanto, empleando como inóculo una dilución 1/1024 del cultivo anterior, habrán transcurrido 10 generaciones hasta que el nuevo cultivo alcance la misma DO_{600} del cultivo precursor. Esto se cumple siempre y cuándo el número de bacterias a este valor de DO_{600} se mantenga constante, lo que sabemos se cumple para nuestras cepas a una DO_{600} de 0,8.

El estudio fue realizado durante 50 generaciones. Muestras de cada cultivo se plaquearon en medio sólido con y sin AMP. El porcentaje de bacterias con plásmido se calculó según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de bacterias con plásmido} = \left(\frac{\text{Nº de colonias crecidas en LB-agar+AMP}}{\text{Nº de colonias crecidas en LB-agar}} \right) * 100$$

Los plaques se realizaron de dos formas distintas: a) por el método de réplicas y b) por dilución seriada. El método de réplicas (Fig. 8) se empleó solamente en las primeras 10 generaciones y fue

sustituido por el método de dilución seriada, dado que cuando el plásmido es inestable, Fig. 8a, si bien las impresiones en LB-agar con y sin AMP son claramente distintas, es difícil en algunos casos saber si las colonias resultan de un crecimiento real o si son artefactos del proceso de impresión. Otro inconveniente de este método es que en el proceso de impresión muchas veces se pierden las colonias que se encuentran cerca del borde de la placa. Sin embargo, esta primera aproximación nos permitió vislumbrar los resultados que confirmaríamos posteriormente con el método por dilución seriada.

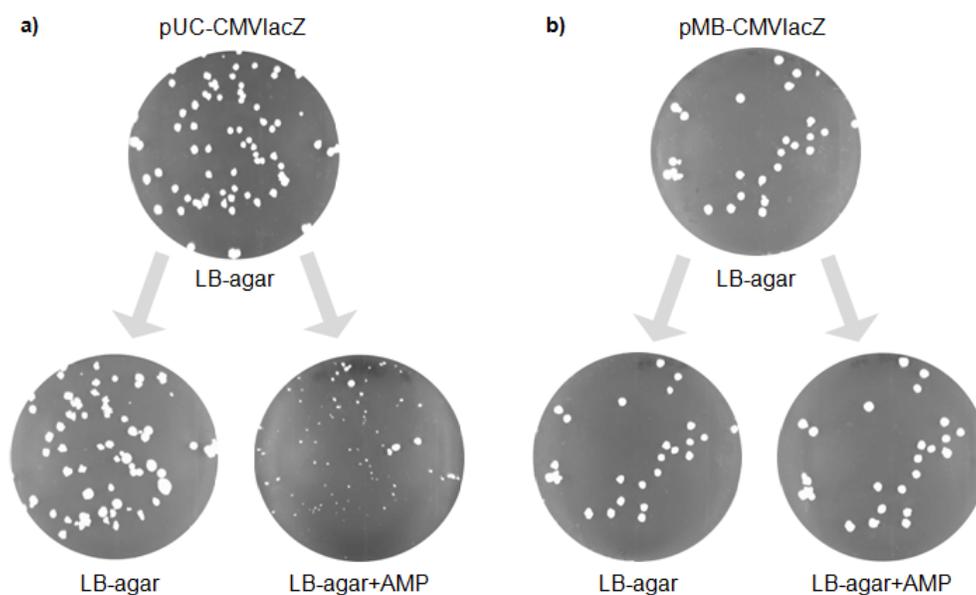


Figura 8. Ensayo de estabilidad plasmídica empleando el método de réplicas. Las fotografías corresponden a la generación 10 de LVR01 con a) pUC-CMVlacZ y b) pMB-CMVlacZ. La placa superior es la que se empleó para realizar las impresiones y las placas inferiores corresponden a las réplicas.

La determinación final de la estabilidad de los dos plásmidos durante las 50 generaciones se realizó plaqueando diluciones seriadas de cada cultivo en placas de LB-agar con y sin AMP. En la Fig. 9a se observa que los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ son estables en DH5 α . En este caso, la estabilidad plasmídica no se ve afectada por su número de copias.

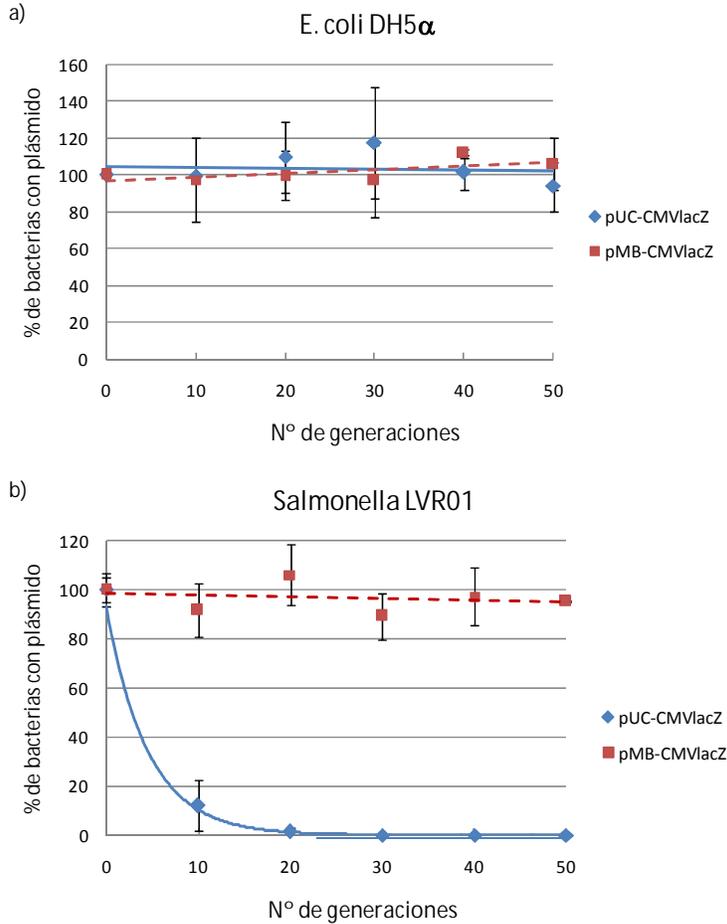


Figura 9. Ensayo de estabilidad in vitro. Las bacterias DH5 α a) y LVR01 b) se crecieron sin AMP y cada 10 generaciones se plaquearon en LB-agar y LB-agar+AMP para determinar el porcentaje de bacterias con plásmido. Cada punto en las gráficas corresponde a 2 experimentos independientes.

A diferencia de DH5 α (Fig. 9a), en LVR01, el plásmido de alto número de copias pUC-CMVlacZ se perdió rápidamente de la población, mientras que pMB-CMVlacZ, de un número de copias menor, se mantuvo de forma estable (Fig. 9b). Dado que la principal diferencia entre estos plásmidos es su número de copias, 417 ± 150 en el caso de pUC-CMVlacZ y 29 ± 8 en el caso de pMB-CMVlacZ, se puede concluir que este es el factor responsable de la diferencia en sus estabilidades en LVR01. Sin embargo, es interesante destacar que el plásmido pUC-CMVlacZ que tiene un número de copias incluso mayor: 2682 ± 255 en DH5 α , se mantuvo de forma estable durante las 50 generaciones de estudio en esta cepa de *E. coli*, indicando que existen factores propios del hospedador que pueden determinar el comportamiento de un plásmido en la población.

5. Estabilidad in vivo de los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ en Salmonella LVR01

Como la finalidad de este trabajo es sentar las bases para el desarrollo de LVR01 como vector de expresión para el tratamiento del cáncer, era importante comprobar que la estabilidad de pMB-CMVlacZ observada in vitro se mantuviera también en un contexto tumoral in vivo. Para ello se seleccionó un modelo del tumor mamario. Las células tumorales 4T1 se implantaron en ratones Balb/c y una vez que el tumor se desarrolló, se inyectaron 2×10^7 bacterias LVR01 con cada uno de los plásmidos. A los 2, 6 y 12 días post-inoculación, se sacrificaron 3 ratones por grupo. Los tumores se extrajeron y homogeneizaron en PBS, y las bacterias presentes en estas diluciones se plaquearon de forma incorporada en LB-agar con y sin AMP. En la Fig. 10 se observa que el plásmido pMB-CMVlacZ mantuvo su estabilidad in vivo, encontrándose todavía en un 80% de las bacterias a los 12 días post-inoculación, mientras que el plásmido pUC-CMVlacZ se perdió rápidamente de la población bacteriana al igual que ocurrió in vitro. Estos mismos resultados se observaron en un estudio similar realizado en un modelo de cáncer de colon basado en la implantación subcutánea de células tumorales CT26 en ratones Balb/c (datos no mostrados).

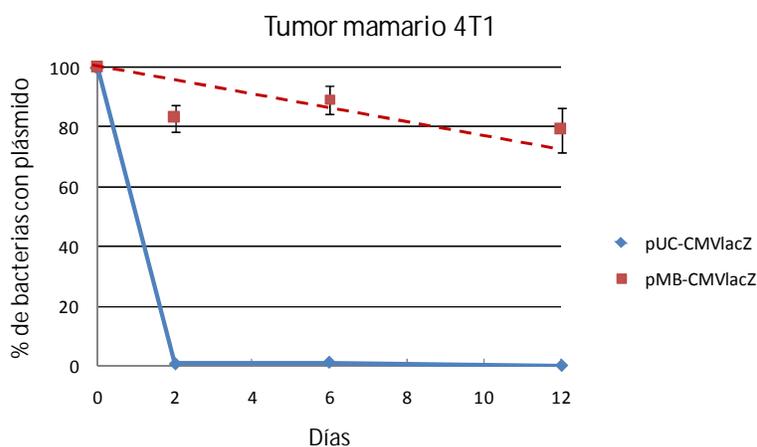


Figura 10. Ensayo de estabilidad in vivo. Ratones Balb/c con tumores 4T1, se inocularon intratumoralmente con 2×10^7 de LVR01 con cada plásmido y se determinó el porcentaje de bacterias que conservaban los plásmidos en el tumor en función del tiempo.

El leve descenso en la estabilidad de pMB-CMVlacZ podría deberse a que las bacterias que replican en el ambiente tumoral están sometidas a condiciones de crecimiento distintas a las dadas in vitro, y esto podría conllevar que se les hiciera más difícil a las bacterias tolerar la carga metabólica que implica mantener el plásmido.

6. Estudio de la actividad del promotor CMV de pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ en *E. coli* DH5 α y *Salmonella* LVR01

El objetivo final de este trabajo consiste en la utilización de plásmidos en *Salmonella* como vector de genes terapéuticos para el tratamiento del cáncer. Para poder optimizar la terapia, es importante conocer tanto las características de infectividad de la bacteria, como diseñar un cassette de expresión adecuado en los plásmidos. Para ello, es fundamental saber si el gen terapéutico insertado en estos plásmidos se expresa desde las bacterias o si los plásmidos se transfieren a las células tumorales y es allí donde ocurre la expresión. En este sentido, se ha reportado que *Salmonella* transformada con plásmidos en los que el promotor eucariota CMV dirige la expresión genes como las interleuquinas 4 y 18, la fosforilasa ePNP de *E. coli*, la endostatina, o el receptor del factor de crecimiento endotelial Flk-1, se logra un mayor efecto antitumoral que si se emplanea la bacteria sola (Agorio et al., 2007; Fu et al., 2008; Lee et al., 2004; Feng et al., 2004; Lu et al., 2008). Por otro lado, se ha afirmado que, usando este mismo promotor para dirigir la expresión de un gen reportero en un plásmido, ésta debía ocurrir en la célula eucariota y no en la bacteria, dado que se introdujo un intrón en este gen (Fló et al., 2001). Además, se vio que *Salmonella* transformada con un plásmido estable derivado de pMB-CMVlacZ conteniendo el gen de la listeriolisina de *Listeria monocytogenes*, inducía una respuesta inmune específica y robusta frente a este antígeno (Bauer et al., 2005). Todo esto sugiere que podría haber transferencia de ADN plasmídico de la bacteria a las células eucariotas y qué esta transferencia podría verse favorecida empleando plásmidos estables. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se comprobó que realmente hubiera ausencia de expresión génica *in vivo* proveniente desde la bacteria hospedadora. Por este motivo, en primer lugar, nos interesó realizar estos controles y conocer si había o no expresión de β -gal en LVR01 y DH5 α desde el promotor CMV de los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ.

Para ello, se realizaron diluciones de cultivos ON y se plaqueron en LB-agar con AMP y X-gal. El X-gal (5 bromo – 4 cloro – 3 indolil – beta – D – galactósido) es un compuesto que se degrada por la β -gal, y el producto de esta degradación es de una coloración azul. En la Fig. 7a y b, se puede observar que las colonias de las bacterias que llevan el plásmido pUC-CMVlacZ son de color azul, siendo su intensidad mayor en DH5 α que en LVR01. Sin embargo, las bacterias transformadas con el plásmido pMB-CMVlacZ dan lugar a colonias de coloración azul muy tenue, lo que sugiere que este plásmido estaría expresando cantidades muy bajas de β -gal posiblemente debido a su menor número de copias respecto a pUC-CMVlacZ. Con el fin de cuantificar estos valores, realizamos un ensayo que se basa en la degradación del compuesto orto-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG) por acción de la β -gal. Esta reacción produce orto-nitrofenil, un compuesto de color amarillo, que se puede cuantificar en el espectrofotómetro. La Fig. 7c confirma que las bacterias transformadas con el plásmido pMB-CMVlacZ expresan cantidades muy bajas de β -gal, mientras que la actividad β -gal en las bacterias transformadas con pUC-CMVlacZ es de unas 25 unidades Miller en LVR01 y de 155 en DH5 α , respectivamente. Esta relación es de 6 veces mayor en DH5 α que en LVR01 y está de acuerdo con la mayor intensidad de azul observada en el ensayo hecho en placas con X-gal. Esta diferencia coincide con que el plásmido pUC-CMVlacZ tiene unas 6 veces más copias en DH5 α que en LVR01 (Tabla 1). La correlación entre número de copias y valores de expresión de β -gal también se cumple para pMB-CMVlacZ en DH5 α (16,5 unidades Miller), dado que este plásmido tiene un número de copias muy parecido a pUC-CMVlacZ en LVR01 (Tabla 1).

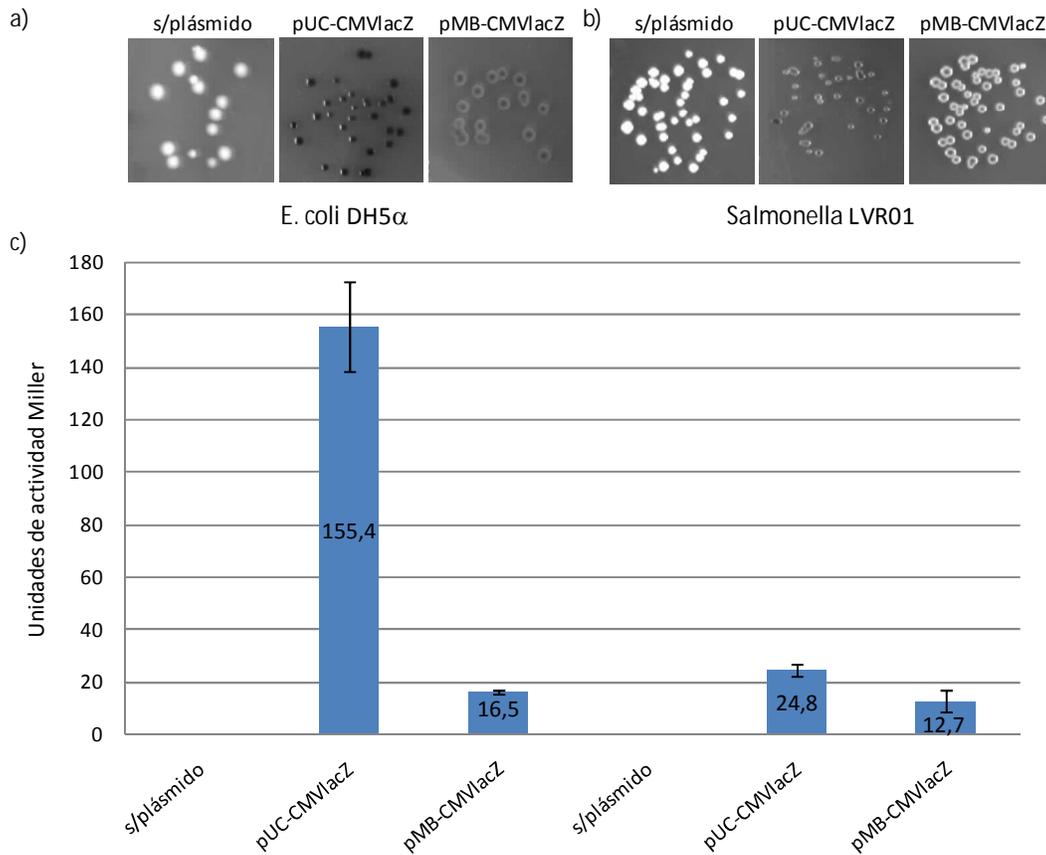


Figura 11. Estudio de expresión de β -gal a partir de los plásmidos indicados. Se muestran fotografías de las colonias de a) DH5 α y b) LVR01 crecidas en placas de LB-agar (sin plásmido) o en LB-agar+AMP y X-gal (con plásmido). Las fotografías fueron tomadas en un G:BOX (SYNGENE) en blanco y negro. c) Valores correspondientes a la medición de la actividad de la β -gal con ONPG por el método de Miller (Sambrook y Russell, 2001).

A continuación, verificamos la expresión de β -gal desde ambos plásmidos en células eucariotas.

7. Expresión de β -gal en células tumorales transfectadas con pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ

Se han desarrollado diversos métodos para la transferencia de plásmidos de expresión a células eucariotas (transfección). Uno de estos métodos se basa en la formación de agregados de ADN con fosfato cálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) y posterior incubación sobre líneas celulares (Sambrook y Russell, 2001). La eficiencia de transfección con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ depende en gran medida de la línea celular empleada, y se ha visto que es muy eficiente para células HeLa (Kramer et al., 2003), mientras que es muy baja para células 4T1 y CT26 (datos no mostrados). Por lo tanto, transfectamos células HeLa con los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ usando el método de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y se se revelaron luego de 48 hs para permitir la expresión de β -gal. Las células entonces se fijaron y revelaron con X-gal. En la Fig. 12, se muestra que las células transfectadas con los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ son de color azul intenso, mostrando que no hay diferencias de expresión desde ellos. Igualmente, observamos que ambos plásmidos transfectan con la misma eficiencia las células HeLa.

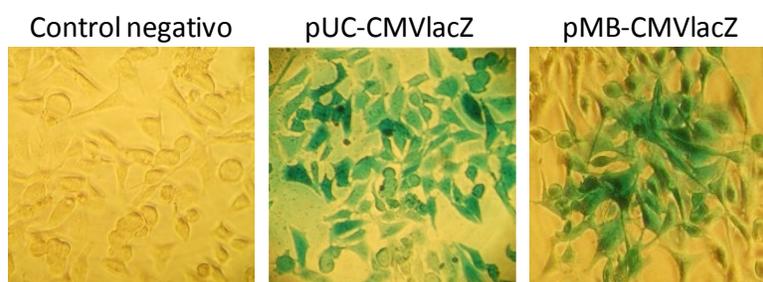


Figura 12. Expresión de β -gal a partir de células HeLa transfectadas con los plásmidos indicados. Control negativo: células sin transfectar. Se muestra el revelado con X-gal después de 48 hs de la transfección. Las fotos corresponden a un aumento 10x.

Estos resultados demuestran que, como se esperaba, el promotor CMV presente en los dos plásmidos es funcional en células eucariotas.

El siguiente paso de este trabajo sería estudiar si ocurre la transferencia de estos plásmidos desde *Salmonella* a células tumorales, usando el gen β -gal como reportero. En el caso de que esta ocurra nos interesaría determinar si ésta es mayor cuando se emplea el plásmido estable pMB-CMVlacZ, según ha sido propuesto por Bauer et al, 2005. La detección de células azules en tumores aislados de ratones tratados con *Salmonella* transformada con cada uno de estos plásmidos, sería un indicador de que hubo transferencia plasmídica a células tumorales. Esta segunda parte del trabajo será objeto de un proyecto de Maestría donde se emplearán los modelos tumorales 4T1 (cáncer de mama) y CT26 (cáncer de colon).

DISCUSIÓN

Los plásmidos son elementos genéticos extra cromosómicos que pueden conferir ventajas selectivas a la bacteria hospedadora (por ejemplo, la resistencia a antibióticos), pero no son indispensables para su viabilidad. La replicación y segregación plasmídica es independiente de la del cromosoma bacteriano, sin embargo ambas funciones son dependientes de las enzimas del hospedador (Sambrook y Russell, 2001). La tecnología de ADN recombinante ha permitido la selección y el clonaje de genes en vectores plasmídicos. Estos vectores presentan una serie de características deseables como aceptores de ADN, como ser pequeños y de fácil manipulación. Además, las bacterias transformadas pueden expresar proteínas recombinantes. Aprovechando esto se han empleado cepas de *Salmonella* transformadas con plásmidos recombinantes que codifican proteínas antigénicas, inmunoestimuladoras y/o inductoras de citotoxicidad para el desarrollo de vacunas y terapias contra el cáncer. En estos trabajos se ha visto que la pérdida del plásmido de la población bacteriana es un factor limitante para la eficiencia de vacunas basadas en *Salmonella* (Bauer et al., 2005; Gahan et al., 2007). Por lo tanto, para mejorar la eficacia de estas vacunas, se han desarrollado una serie de estrategias con el fin que las bacterias conserven los plásmidos. Estas estrategias se pueden dividir en dos grupos:

1. Las basadas en eliminar de la población las bacterias que pierden el plásmido, y
2. las basadas en reducir la carga metabólica que el plásmido le impone al hospedador.

El primer grupo hace uso de los llamados sistemas de killing post-segregacional (Diago-Navarro et al., 2010) y balanced-lethal (Galen et al., 1999). Los sistemas de killing post-segregacional se encuentran en plásmidos naturales y se basan en la expresión de una toxina de vida media alta y su correspondiente antitoxina de vida media baja. Debido a esta diferencia, las bacterias requieren una síntesis continua de la antitoxina para mantener la toxina neutralizada, y por lo tanto, aquellas bacterias que pierden el plásmido mueren por acción de la toxina (Fig. 13a). Galen et al., 1999 mostraron que la introducción del sistema de killing post-segregacional hok-sok del plásmido R1 en un plásmido de tipo ColE1 lograba aumentar la estabilidad de portadores en comparación a aquellos plásmidos sin sistema de estabilización, y plantean su utilidad en el diseño de vectores de expresión de antígenos en *Salmonella* para el desarrollo de vacunas.

El sistema balanced-lethal consiste en emplear bacterias que lleven la delección de un gen esencial en su genoma y clonar este gen en el plásmido de expresión (Fig. 13b). De esta forma si el plásmido se pierde la bacteria deja de tener la capacidad de producir la proteína esencial, lo que resulta en la muerte de la bacteria. Un sistema balanced-lethal fue empleado por Galen et al., 2010 y consiste en la delección de la proteína de unión a ADN de simple hebra (SSB) y su clonaje en el vector de expresión. De esta forma se lograba un aumento de la estabilidad frente a un plásmido control que no llevaba sistema de estabilización. Es interesante que, cuando plásmidos de 5 y 15 copias que se habían estabilizado con este sistema se empleaban para la expresión de un antígeno, la respuesta de anticuerpos era mayor para aquellos de menor número de copias (Galen et al., 2010).

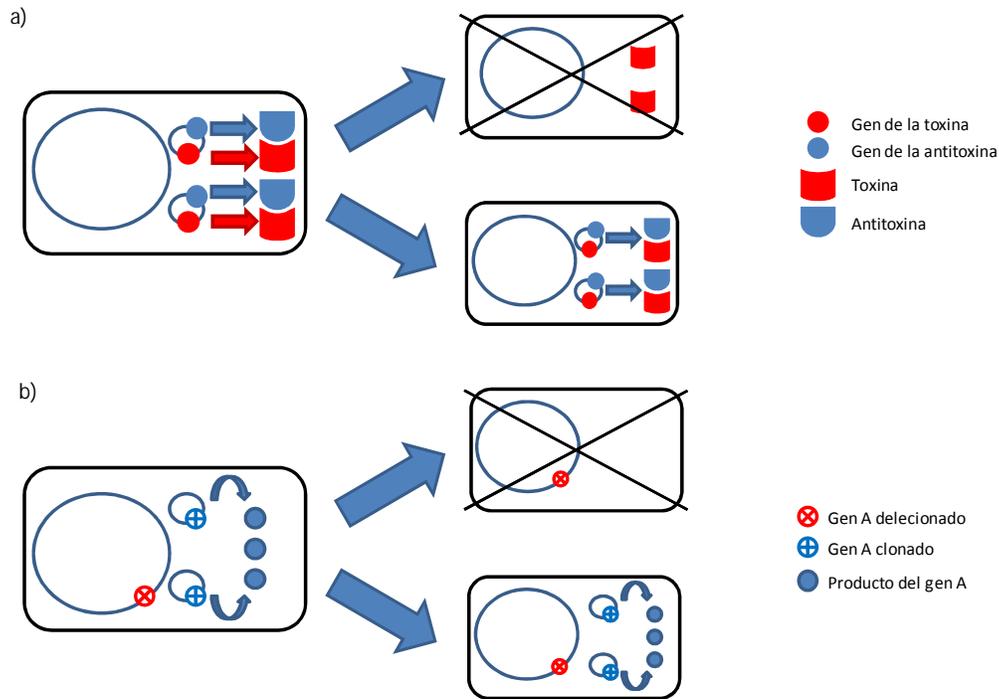


Figura 13. Funcionamiento de los sistemas que evitan la acumulación de bacterias sin plásmido. a) Sistema de killing post-segregacional basado en el par toxina y antitoxina y b) Sistema balanced-lethal basado en la delección de un gen esencial de la bacteria y su complementación por parte del vector de expresión.

Si bien los sistemas de killing post-segregacional y balanced-lethal evitan la acumulación en la población de bacterias sin plásmidos, logran esto eliminando aquellas bacterias que pierden el plásmido y no actuando sobre las causas de la inestabilidad segregacional. Por lo tanto la introducción de cualquiera de estos sistemas en un plásmido inestable, va a resultar en un número total de bacterias menor. Esto podría significar una limitación en el caso que se requiera un alto número de bacterias para la aplicación en inmunización o terapias basadas en vectores bacterianos.

Un enfoque distinto para lograr la estabilización de los plásmidos de expresión, ha sido minimizar la carga metabólica que estos le imponen al hospedador bacteriano. Dado que esta carga aumenta con el número de copias (Watve et al., 2010), una forma de reducirla sería empleando vectores de expresión con bajo número de copias. En ese sentido, se mostró que un vector de expresión con el origen de replicación pUC, y por lo tanto de alto número de copias, era inestable en *Salmonella* SL7207 y que, al cambiar este origen de replicación por los orígenes de pMB1, p15A o pSC101, resultando todos en un menor número de copias, se lograba estabilizar el plásmido tanto in vitro como in vivo (Bauer et al., 2005). En otros trabajos también se observó que vectores plasmídicos de bajo número de copias eran más estables que plásmidos con un número de copias alto (Gahan et al., 2007; Loessner et al., 2008). Empleando *Salmonella* con plásmidos que llevan el gen de un antígeno bajo el control del promotor eucariota CMV, se observó que la intensidad de la respuesta inmune contra este antígeno era mayor cuando se encontraban en plásmidos de bajo número de copias que en aquellos de alto número de copias (Bauer et al., 2005; Gahan et al., 2007). En estos trabajos se especula que la razón de esta respuesta inmune más intensa sería que la transferencia de plásmido

de expresión desde las bacterias a las células eucariotas sería más eficiente con un plásmido estable ya que tendría más tiempo para ocurrir (Bauer et al., 2005).

Esta lógica podría ser aplicable también a las terapias contra el cáncer. Una de las cualidades de *Salmonella* como vector de plásmidos que llevan genes con actividad antitumoral, es que tiene tropismo por los tumores y es capaz de replicar en ellos (Pawelek et al., 1997), lo que permitiría amplificar la dosis de la proteína con efecto antitumoral a nivel local (Ryan et al., 2005). En nuestro trabajo empleamos la cepa de *Salmonella* LVR01 descrita previamente como vector de antígenos vacunales (Chabalgoity et al., 2000) y que posee un alto tropismo por tumores mamarios desarrollados en ratones inmunocompetentes Balb/c (Masner et al., datos aún no publicados). Por lo tanto, y con el fin de optimizar la transferencia de plásmidos a las células tumorales, consideramos necesario contar con plasmidos estables.

A la hora de elegir una estrategia para la estabilización plasmídica, descartamos los sistemas de killing post segregacional y balanced-lethal, dado que podrían afectar la replicación bacteriana a nivel del tumor. En vez de ello, optamos por reducir la carga metabólica impuesta a la bacteria hospedadora empleando vectores de expresión de bajo número de copias. Con esta finalidad le solicitamos a la Dra. Heike Bauer el plásmido pMB-CMVlacZ de bajo número de copias y su predecesor de alto número de copias pUC-CMVlacZ (ambos plásmidos se detallan en las Figs. 4 y 5).

Estudiamos la estabilidad de estos plásmidos en *Salmonella* LVR01 y observamos que pUC-CMVlacZ se perdía rápidamente de la población bacteriana tanto *in vitro* como en el modelo de cáncer de mama establecido en ratones Balb/c (Figs. 9 y 10). Por el contrario el plásmido de bajo número de copias pMB-CMVlacZ era estable en ambas condiciones (Figs. 9 y 10). Cuando determinamos el efecto de estos plásmidos sobre el crecimiento de LVR01 vimos que la velocidad de crecimiento de las bacterias que llevaban el plásmido de bajo número de copias pMB-CMVlacZ era similar al de las bacterias sin plásmido, mientras que el plásmido de alto número de copias pUC-CMVlacZ inducía un marcado enlentecimiento de su crecimiento (Fig. 6). Esta diferencia podría deberse al incremento de carga metabólica que un plásmido de alto número de copias podría estarle imponiendo a las bacterias (Watve et al., 2010), lo que podría reducir el fitness o estado saludable bacteriano (Binet y Maurelli, 2005). Sin embargo, interesa destacar que el costo metabólico que podría suponer hospedar un plásmido no parece depender exclusivamente de su número de copias, dado que en *E. coli* DH5 α ambos plásmidos tienen números de copias significativamente mayores que los determinados en LVR01 (Tabla 1) y sin embargo, prácticamente no afectan el crecimiento de estas bacterias (Fig. 6). Más aún, pMB-CMVlacZ es estable en *E. coli* pese a tener un número de copias similarmente alto al de pUC-CMVlacZ en LVR01 (Fig. 9) y el plásmido pUC-CMVlacZ, que tiene 6 veces más copias en *E. coli* que el LVR01 es también estable en *E. coli* (Fig. 9). Este hecho podría explicarse si se supone que la carga metabólica que le impone un plásmido a la bacteria es más evidente en un hospedador distinto al natural. Esta relación entre la estabilidad plasmídica y su hospedador bacteriano ha sido observada previamente para plásmidos de bacterias Gram (+) como pMV158, pT181 y pUB110 (Kramer, 1997). Coincidente con estos resultados, tenemos datos preliminares que indican que en otra cepa de *E. coli*, TG2, los plásmidos pMB-CMVlacZ y pUC-CMVlacZ son tan estables como en DH5 α , mientras que en la cepa SL3261 de *Salmonella* pUC-CMVlacZ se pierde rápidamente como en LVR01 y pMB-CMVlacZ es más estable (Fig. 14).

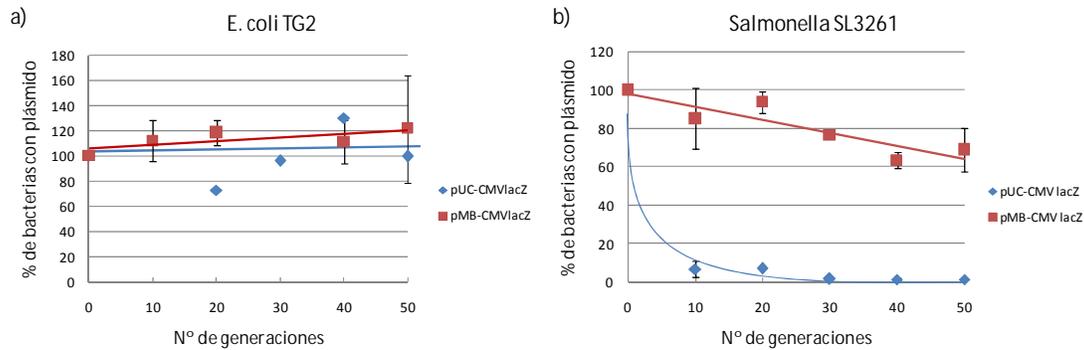


Figura 14. Ensayo de estabilidad in vitro. Las bacterias a) *E. coli* TG2 y b) *Salmonella* SL3261 se crecieron sin ampicilina y cada 10 generaciones se plaquearon en LB-agar y LB-agar+AMP para determinar el porcentaje de bacterias con plásmido. Los puntos en la gráfica corresponde a 2 medidas independientes.

Un segundo factor que podría explicar la inestabilidad de pUC-CMVlacZ en LVR01 y su estabilidad en DH5 α , es que en LVR01 se forman multímeros mientras que en DH5 α esto no ocurre (Fig. 5c). La presencia de multímeros aumenta la inestabilidad plasmídica, dado que estos reducen el número de unidades que segregan de forma independiente durante la división bacteriana (Summers, 1998). La formación de multímeros en LVR01 es posible dado que esta cepa lleva intacto el gen de *recA*, mientras que en DH5 α este gen está deletado. La enzima RecA es necesaria para la recombinación entre regiones homólogas de ADN y permite la formación de multímeros plasmídicos (Bedbrook et al., 1976). Los plásmidos naturales de tipo ColE1 evitan la acumulación de multímeros debido a que llevan una secuencia específica (*cer*) necesaria para resolver los multímeros en plásmidos individuales, proceso que es mediado por un tipo de recombinación independiente de RecA (Summers et al., 1984). La resolución de multímeros de ColE1 requiere las proteínas del hospedador ArgR, PepA, XerC y XerD (Sharpe et al., 1999). Los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ fueron construidos sin incorporar *cer* y esta deficiencia podría conllevar la acumulación de multímeros observados en la Fig. 5c. Por lo tanto, la presencia de multímeros podría explicar la inestabilidad de pUC-CMVlacZ en *Salmonella* (Figs. 9 y 14). Sin embargo, esto no explicaría que el plásmido pMB-CMVlacZ, que también forma multímeros (Fig. 5c), sea estable. En este caso, la estabilidad estaría mayormente asociada a su bajo número de copias. De todas formas, una manera de poder aumentar la estabilidad de pUC-CMVlacZ en *Salmonella* LVR01 sería deletando el gen *recA*, ya que se observó que la inactivación de *recA* en *S. Typhimurium* UK-1 reducía la frecuencia de formación de multímeros plasmídicos (Zhang et al., 2011).

Es importante notar que los plásmidos empleados en este trabajo llevan el gen de la β -gal bajo el control del promotor eucariota de los genes inmediatamente tempranos del Citomegalovirus humano (CMV) y por lo tanto, no se esperaba que este promotor fuera activo en bacterias (Bauer et al., 2005). Basándose en esta premisa, varios autores han empleado *Salmonella* como vehículo de plásmidos en los que el promotor CMV dirige la expresión de genes con función antitumoral para terapias in vivo, y el beneficio terapéutico se atribuyó a la transferencia y expresión a partir de las células tumorales (Fu et al., 2008; Dong et al., 2008). Sin embargo, este punto no está tan claro, ya que se ha visto que algunos de los promotores virales ampliamente utilizados para la expresión en células eucariotas son activos en bacterias (Goussard et al., 2003, Lewin et al., 2005). Incluso se

podieron definir en el promotor CMV secuencias consenso con promotores procariotas que son necesarias para su actividad en bacterias (Gahan et al., 2009). Esta situación hace necesario ser cauteloso cuando se afirma que la expresión de genes codificados por un plásmido bajo control de promotores eucariotas se debe a la transferencia de ADN a las células eucariotas y no a la expresión desde la bacteria. De hecho, cuando se administra de forma oral *Salmonella* con un plásmido que codifica un antígeno cuya expresión está dirigida por el promotor CMV, la producción de anticuerpos contra este antígeno se vio beneficiada por su expresión desde las bacterias (Gahan et al., 2009).

Para estudiar si el promotor CMV presente en pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ era funcional en *Salmonella* LVR01 y *E. coli* DH5 α medimos la actividad de β -gal en ambos cultivos bacterianos. Observamos que la expresión de β -gal fue proporcional al número de copias calculado para cada plásmido en cada especie bacteriana (Tabla 1), siendo relativamente más alta en DH5 α con pUC-CMVlacZ y notoriamente más baja en LVR01 con pMB-CMVlacZ (Fig. 11). Sin embargo, esta baja expresión, de haber ocurrido solamente en la bacteria hospedadora, tal vez sería insuficiente para desencadenar la respuesta inmune detectada en animales de experimentación (Bauer et al., 2005), y sugiere la posibilidad de haber podido ser transferido a las células animales, donde la expresión desde este plásmido es claramente mayor (Fig. 12).

En resumen, nuestros datos indican que no hay un solo factor que determine la estabilidad plasmídica, y que en éste podrían estar influyendo, tanto el número de copias, como el hospedador bacteriano, la formación de multímeros y la expresión del transgen en la bacteria. En todo caso, el contar con un plásmido estable, como pMB-CMVlacZ, es importante, ya sea porque podría favorecer la transferencia plasmídica a las células tumorales o, porque si el gen terapéutico se expresa desde las bacterias, la retención del plásmido en la población bacteriana permitiría su expresión durante más tiempo. Si éste fuera el caso, seguramente convendría emplear promotores y sistemas de expresión procariotas para aumentar los niveles de producción de proteínas terapéuticas *in vivo*. La expresión desde células eucariotas tiene como ventaja el permitir emplear genes cuyo producto requiera modificaciones postraduccionales específicas de células eucariotas para su función, como es el caso de algunas citoquinas inmunoestimuladoras. Por lo tanto, sería de interés continuar estos estudios en una dirección que nos permita evaluar dónde ocurre la expresión principal de los genes codificados en los plásmidos tras la administración de bacterias transformadas, porque de ello va depender la elección racional de los genes terapéuticos y el sistema de expresión/secreción a emplear.

CONCLUSIONES

1. Determinamos que los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ tienen un número de copias promedio de 417 y 29 en *Salmonella* LVR01 y 2682 y 470 en *E. coli* DH5 α .
2. Pudimos ver que la carga metabólica impuesta al hospedador aumentaba con el número de copias del plásmido. La magnitud de este efecto era, sin embargo, dependiente del hospedador, siendo más marcado en LVR01 que en DH5 α .
3. Observamos que pMB-CMVlacZ es estable y pUC-CMVlacZ es sumamente inestable en LVR01 en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. En DH5 α ambos plásmidos son estables.
4. Medimos la actividad del promotor CMV en LVR01 y DH5 α . Esta actividad fue detectable en placas con X-gal y en ensayos cuantitativos con ONPG y fue proporcional al número de copias plasmídico en cada especie bacteriana.
5. Comprobamos mediante la transfección de células eucariotas, que el promotor CMV dirige con igual eficiencia la expresión de β -gal desde pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ.

PERSPECTIVAS DE CONTINUACIÓN DEL TRABAJO:

1. Estudiar la expresión β -gal desde los plásmidos pUC-CMVlacZ y pMB-CMVlacZ en líneas celulares 4T1 y CT26 empleando técnicas de lipo-transfección.
2. Administrar *Salmonella* con los plásmidos pMB-CMVlacZ y pUC-CMVlacZ a tumores 4T1 y CT26 implantados en ratones Balb/c y detectar la expresión de β -gal en cortes histológicos del tumor para probar si ocurre la transferencia de plásmidos desde las bacterias a las células tumorales. Estudiar el efecto que tiene la estabilidad plasmídica en este proceso. Para complementar el estudio, se podría sustituir el gen β -gal por el de la Green Fluorescent Protein (GFP) o Red Fluorescent Protein (RFP), para analizar células que expresan la proteína fluorescente por citometría de flujo partiendo de tumores disgregados.
3. En función de los resultados anteriores, se diseñará un cassette de expresión óptimo (eucariota o procariota) con un gen que codifique una citoquina con actividad antitumoral como IL-12 o IL-18. Se cuantificarán los niveles de expresión *in vitro* e *in vivo*.
4. Se tratarán tumores 4T1 y CT26 desarrollados en ratones BALB/c con *Salmonella* transformada con estos nuevos plásmidos y se evaluará el efecto antitumoral en función de la estabilidad de los plásmidos usados.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agorio C, Schreiber F, Sheppard M, Mastroeni P, Fernandez M, Martinez MA, Chabalgoity JA. Live attenuated *Salmonella* as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. *J Gene Med*. 2007. 9(5):416-23.
- Bauer H, Darji A, Chakraborty T, Weiss S. *Salmonella*-mediated oral DNA vaccination using stabilized eukaryotic expression plasmids. *Gene Ther*. 2005. 12(4):364-72.
- Binet R, Maurelli AT. Fitness cost due to mutations in the 16S rRNA associated with spectinomycin resistance in *Chlamydia psittaci* 6BC. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005. 49(11):4455-64.
- Chabalgoity JA, Moreno M, Carol H, Dougan G, Hormaeche CE. *Salmonella typhimurium* as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. *Vaccine*. 2000. 19(4-5):460-9.
- Cooper TF, Heinemann JA. Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. 97(23):12643-8.
- Crull K, Bumann D, Weiss S. Influence of infection route and virulence factors on colonization of solid tumors by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011. 62(1):75-83.
- Diago-Navarro E, Hernandez-Arriaga AM, López-Villarejo J, Muñoz-Gómez AJ, Kamphuis MB, Boelens R, Lemonnier M, Díaz-Orejas R. parD toxin-antitoxin system of plasmid R1--basic contributions, biotechnological applications and relationships with closely-related toxin-antitoxin systems. *FEBS J*. 2010. 277(15):3097-117.
- Dong J, Yang J, Chen MQ, Wang XC, Wu ZP, Chen Y, Wang ZQ, Li M. A comparative study of gene vaccines encoding different extracellular domains of the vascular endothelial growth factor receptor 2 in the mouse model of colon adenocarcinoma CT-26. *Cancer Biol Ther*. 2008. 7(4):502-9.
- Dunstan SJ, Simmons CP, Strugnell RA. In vitro and in vivo stability of recombinant plasmids in a vaccine strain of *Salmonella enterica* var. Typhimurium. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003. 37(2-3):111-9.
- Fagan PK, Walker MJ, Chin J, Eamens GJ, Djordjevic SP. Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. *Microb Pathog*. 2001. 30(2):101-10.
- Feng K, Zhao H, Chen J, Yao D, Jiang X, Zhou W. Anti-angiogenesis effect on glioma of attenuated *Salmonella Typhimurium* vaccine strain with flk-1 gene. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2004. 24(4):389-91.
- Fló J, Tisminetzky S, Baralle F. Oral transgene vaccination mediated by attenuated *Salmonellae* is an effective method to prevent Herpes simplex virus-2 induced disease in mice. *Vaccine*. 2001. 19(13-14):1772-82.

- Fu W, Lan H, Li S, Han X, Gao T, Ren D. Synergistic antitumor efficacy of suicide/ePNP gene and 6-methylpurine 2'-deoxyriboside via *Salmonella* against murine tumors. *Cancer Gene Ther.* 2008. Jul; 15(7):474-84.
- Gahan ME, Webster DE, Wesselingh SL, Strugnell RA, Yang J. Bacterial antigen expression is an important component in inducing an immune response to orally administered *Salmonella*-delivered DNA vaccines. *PLoS One.* 2009. 4(6):e6062.
- Gahan ME, Webster DE, Wesselingh SL, Strugnell RA. Impact of plasmid stability on oral DNA delivery by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Vaccine.* 2007. 25(8):1476-83.
- Galen JE, Nair J, Wang JY, Wasserman SS, Tanner MK, Szein MB, Levine MM. Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine strain *Salmonella typhi* CVD 908-htrA. *Infect Immun.* 1999. 67(12):6424-33.
- Galen JE, Wang JY, Chinchilla M, Vindurampulle C, Vogel JE, Levy H, Blackwelder WC, Pasetti MF, Levine MM. A new generation of stable, nonantibiotic, low-copy-number plasmids improves immune responses to foreign antigens in *Salmonella enterica* serovar Typhi live vectors. *Infect Immun.* 2010. 78(1):337-47.
- Ganai S, Arenas RB, Forbes NS. Tumour-targeted delivery of TRAIL using *Salmonella typhimurium* enhances breast cancer survival in mice. *Br J Cancer.* 2009. 101(10):1683-91.
- Hussain K, Bowler C, Roberts LM, Lord JM. Expression of ricin B chain in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 1989. 244(2):383-7.
- Khan CM, Villarreal-Ramos B, Pierce RJ, Riveau G, Demarco de Hormaeche R, McNeill H, Ali T, Fairweather N, Chatfield S, Capron A, et al. Construction, expression, and immunogenicity of the *Schistosoma mansoni* P28 glutathione S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro A attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994. 91(23):11261-5.
- Kramer MG. Orígenes de replicación de la cadena retrasada del plásmido pMV158. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 1997.
- Kramer MG, Barajas M, Razquin N, Berraondo P, Rodrigo M, Wu C, Qian C, Fortes P, Prieto J. In vitro and in vivo comparative study of chimeric liver-specific promoters. *Mol Ther.* 2003. 7(3):375-85.
- Lee CH, Wu CL, Shiau AL. Endostatin gene therapy delivered by *Salmonella choleraesuis* in murine tumor models. *J Gene Med.* 2004. 6(12):1382-93.
- Lee CL, Ow DS, Oh SK. Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. *J Microbiol Methods.* 2006. 65(2):258-67
- Lee JJ, Sinha KA, Harrison JA, de Hormaeche RD, Riveau G, Pierce RJ, Capron A, Wilson RA, Khan CM. Tetanus toxin fragment C expressed in live *Salmonella* vaccines enhances antibody responses to its fusion partner *Schistosoma haematobium* glutathione S-transferase. *Infect Immun.* 2000. 68(5):2503-12.
- Lewin A, Mayer M, Chusainow J, Jacob D, Appel B. Viral promoters can initiate expression of toxin genes introduced into *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* 2005. 20;5:19.

- Lin-Chao S, Chen WT, Wong TT. High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Mol Microbiol.* 1992. 6(22):3385-93.
- Loeffler M, Le'Negrata G, Krajewska M, Reed JC. Attenuated Salmonella engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. 104(31):12879-83..
- Lu XL, Jiang XB, Liu RE, Zhang SM. The enhanced anti-angiogenic and antitumor effects of combining flk1-based DNA vaccine and IP-10. *Vaccine.* 2008. 26(42):5352-7.
- MacGregor GR and Caskey CT. Construction of plasmids that express E. coli beta-galactosidase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 1989. 17(6):2365.
- Moreno M, Kramer MG, Yim L, Chabalgoity JA. Salmonella as live trojan horse for vaccine development and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2010. 10(1):56-76.
- Novick RP. Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev.* 1987. 51(4):381-95.
- Paulsson J. Multileveled selection on plasmid replication. *Genetics.* 2002. 161(4):1373-84.
- Ryan RM, Green J, Lewis CE. Use of bacteria in anti-cancer therapies. *Bioessays.* 2006. 28(1):84-94.
- Sambrook and Russell. *Molecular Cloning 3rd edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- Scott JR. Regulation of plasmid replication. *Microbiol Rev.* 1984 ; 48(1):1-23.
- Sharpe ME, Chatwin HM, Macpherson C, Withers HL, Summers DK. Analysis of the ColE1 stability determinant Rcd. *Microbiology.* 1999. 145 (Pt 8):2135-44.
- Sherratt DJ. The maintenance and propagation of plasmid genes in bacterial populations. The Sixth Fleming Lecture. *J Gen Microbiol.* 1982. 128(4):655-61.
- Summers D, Sherratt DJ. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell.* 1984. 36(4):1097-103.
- Summers D. Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. *Mol Microbiol.* 1998. 29(5):1137-45.
- Sutcliffe JG. Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1979. 43 Pt 1:77-90.
- Sznol M, Lin SL, Bermudes D, Zheng LM, King I. Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer. *J Clin Invest.* 2000 105(8):1027-30.
- Vassaux G, Nitcheu J, Jezzard S, Lemoine NR. Bacterial gene therapy strategies. *J Pathol.* 2006. 208(2):290-8. Review.
- Wang Z, Xiang L, Shao J, Wegrzyn A, Wegrzyn G. Effects of the presence of ColE1 plasmid DNA in Escherichia coli on the host cell metabolism. *Microb Cell Fact.* 2006. 5:34.
- Watve MM, Dahanukar N, Watve MG. Sociobiological control of plasmid copy number in bacteria. *PLoS One.* 2010. 5(2):e9328.
- Williams DR, Thomas CM. Active partitioning of bacterial plasmids. *J Gen Microbiol.* 1992. 138(1):1-16.

- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW. Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 1989. 17(9):3469-78.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 1985. 33(1):103-19. Erratum in: *Gene.* 1992. 114(1):81-3.
- Zhang X, Wanda SY, Brenneman K, Kong W, Zhang X, Roland K, Curtiss R 3rd. Improving Salmonella vector with rec mutation to stabilize the DNA cargoes. *BMC Microbiol.* 2011 Feb 8; 11:31. Agorio C, Schreiber F, Sheppard M, Mastroeni P, Fernandez M, Martinez MA, Chabalgoity JA. Live attenuated Salmonella as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. *J Gene Med.* 2007. 9(5):416-23.