

TESIS DOCTORAL

Utilización de salmonellas atenuadas como sistemas de producción de agentes antitumorales

Memoria presentada por Beatriz Mesa Pereira para optar al grado de
Doctora
Sevilla, 12 de septiembre de 2012.

El Director de la Tesis,

El Codirector de la Tesis,

La Doctoranda

Dr. Eduardo Santero
Santurino

Dr. Amando Flores Díaz

Beatriz Mesa Pereira

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
Dpto. Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica

AGRADECIMIENTOS

Antes de comenzar esta tesis quiero agradecer a todos los que han colaborado y me han apoyado en la realización de este trabajo. Gracias a todos por enseñarme a crecer en lo personal y en lo profesional.

En primer lugar, agradecer a Eduardo por dejarme formar parte de “Micro” y especialmente del grupo de los “aspirinos”. Todos y cada uno de vosotros, Eduardo “el gran jefe”, Amando “el jefe” y mis “directores técnicos” Carlos y Eva, me habéis acogido, guiado y apoyado en cada momento y en cada experimento desde el principio. De todos he aprendido lo que es hacer ciencia de calidad sin dejar de lado lo personal y de todos es esta Tesis. Sin vuestro esfuerzo y trabajo, antes que yo me incorporara al grupo y durante todo este tiempo, esta Tesis no hubiera sido posible. Gracias Amando por tus consejos, por saber guiarme y enseñarme a ver el lado positivo de los resultados aunque fuesen negativos, por tu dedicación y tu paciencia. Siento el veranito que te he hecho pasar con las correcciones. Gracias Carlos por ser como mi hermano mayor, por enseñarme todo lo que sé, por las sesiones de peluquería y estética “ratoniles”, por nuestros paseos con R2D2 (el contenedor de nitrógeno) y nuestras conversaciones de ciencia y no ciencia, y por supuesto por aguantarme en mis días de agobio. Gracias Eva por dedicar tiempo a resolver mis dudas aún cuando no lo tienes, por enseñarme a ser ordenada (“lo sigo intentando pero no lo he conseguido del todo”) y por ser mi ejemplo del buen hacer en cada experimento. Me he sentido como la niña mimada del grupo y he crecido gracias a vosotros.

Gracias a todo el grupo de Micro. A los “mayores” Fernan, Paqui, Inés y Belén por compartir conmigo vuestros conocimientos y por mostrar tanto interés por mi trabajo. A todas mis niñas, las mayores, las medianas y las pequeñas. A las que andan por otros lugares, especialmente a Ana Grande por compartir con nosotras los secretos del laboratorio y ser tan divertida dentro y fuera del mismo. Y a las que se quedaron para no dejarnos solitas, a Aroa por los consejos de hermana mayor y su disponibilidad infinita, y a Laura Grande por sus historias cotidianas, ayudarme con las proteínas y dejarme “mangar” tampón de lisis cuando me hacía falta. También a las que pasaron por

el laboratorio, Ángela y Cristina (las peques de aspirinos) y Cristina Limón, y a las “nuevas” incorporaciones, aunque ya no tan nuevas (¡qué el tiempo pasa muy rápido!), Isa y Encarni, por el ánimo y el apoyo recibido. Gracias a las pequeñas Inma, Patri y Malu que me hacen volver a los viejos protocolos, y a las ya no tan pequeñas Helena, Sofía y Ali por la vidilla. Gracias a Guada y a Nuria por facilitarnos el día a día y ser como nuestras “madres” dentro el laboratorio. Mil gracias a todas ellas y a Laura Te, Elena, Ana Chi, Laura Chi y Cristina por su amistad incondicional dentro y fuera del laboratorio. A Laura Te por compartir conmigo laboratorio durante los primeros días, por apoyarme desde el principio y por ser mi compañera de aventuras viajeras. A Elena por estar siempre ahí para todo (“lo mismo un descosido que un peinado a lo Amy”), por su constancia, dedicación y su fuerza. A Ana Chi (mi “hermana gemela”) por sus buenos consejos y risas compartidas. A Cristina por su bondad y generosidad. Y a la loca de la colina, Laura Chi, por ser la alegría del laboratorio de aspirinos aunque no lo reconozcamos y por sus abrazos cuando más los necesitaba.

Gracias al personal del CABD, especialmente a Kathy por haberme enseñado todo lo que sé de microscopía y adentrarme en el mundo de la citometría, y a Corín, sin sus plantillas todo hubiera sido un infierno. A la gente del animalario, a Ana, Candi, Antonio y Judith, que han facilitado nuestro trabajo con los ratones, sin olvidar a Jaime Carvajal y al grupo de María José Sánchez. Gracias también a la gente del grupo de J.A. Alcázar y a Rafa Daga por ayudarnos a comprender los resultados y avanzar en nuestro trabajo, y especialmente a Valle por ayudarme con la optimización de los protocolos de citometría y mis mil problemas con los vídeos de las células. Gracias a Maribel, Ramón, Rafa, María, Ana (‘la portuguesa’), Fran, Adela, Machupi, etc. por los momentos “extraCABD”, y a Mer por su apoyo y ánimo durante la escritura de esta tesis, la unión hace la fuerza, (“Mercedes, *we can*”). Agradecer también a la gente de “Pepe” del departamento de genética de la universidad de Sevilla por acogernos en nuestra miniestancia y cedernos amablemente un huequito en su laboratorio.

Por último y no por ello menos importante, quisiera dar las gracias a aquellos que siempre han estado, incluso antes de comenzar este camino. Gracias a mis amigos por los buenos momentos y el apoyo en los malos, especialmente a Laura que me ha

acompañado siempre, a Christian por hacerme reír cada vez que nos vemos, a Rocío por los sabios consejos y al resto de las “biomarigomis”, Conso, Maricarmen e Isa por nuestras sesiones de marujeo que son mejor que un spa. Gracias también a Vero, Susana, Iván, Jose, María, Mariluz, etc. por los buenos momentos y vuestro apoyo incondicional. Gracias también a Cynthia que fue mi primera compañera del labo cuando andaba por el laboratorio de Ramón, por apoyarme entonces y seguir haciéndolo ahora. Y por supuesto quiero dar las gracias a mi familia a quienes debo todo lo que soy. A mi padre por ser el ejemplo de la constancia, la responsabilidad y la superación personal y a mi madre de la paciencia y a tener fe en lo que uno hace. Gracias también a mi hermano Álvaro por protegerme aún siendo el más pequeño. Y a mis abuelos (Paco, Isabel, Paco y Carmen) por enseñarme que aunque la vida no sea fácil, siempre hay tiempo para aprender, ser curioso y hacer lo que a uno le gusta.

GRACIAS A TODOS

ÍNDICE

	página
INTRODUCCIÓN	1
1. CÁNCER	3
2. CICLO CELULAR, APOPTOSIS Y CÁNCER	4
2.1. Ciclo celular	4
2.2. Apoptosis	6
2.3. La proteína p53 en la regulación del ciclo celular y la apoptosis	11
3. LIMITACIONES DE LA TERAPIA ANTITUMORAL ACTUAL	12
3.1. El microambiente tumoral	12
3.2. Terapias convencionales	13
3.3. La terapia génica del cáncer	15
4. LOS PROCARIOTAS COMO VECTORES ANTITUMORALES	15
5. <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	17
5.1. Proceso de infección	18
5.1.1. Sistemas de secreción tipo III (TTSS)	20
5.2. Invasión y colonización intratumoral	21
5.3. El sistema inmune en el tumor	22
5.4. El efecto antitumoral de <i>Salmonella</i>	23
5.5. <i>Salmonella</i> como vector de producción de agentes terapéuticos	23
5.5.1. Sistemas enzima/prodroga	23
5.5.2. Toxinas bacterianas y otros agentes citotóxicos	24
5.5.3. Estimulación del sistema inmune	24
5.5.4. Transferencia génica	25
5.6. Sistema de expresión regulado inducible por salicilato	26
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. MATERIAL BIOLÓGICO	35
1.1. Estirpes bacterianas y plásmidos	35

1.2. Bacteriófagos	40
1.3. Líneas celulares tumorales	40
2. MEDIOS, CONDICIONES DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN	41
2.1. Medios, condiciones de cultivo y conservación de bacterias	41
2.1.1. Conservación de estirpes bacterianas y plásmidos	41
2.2. Medios y condiciones de cultivo de líneas celulares	42
2.2.1. Congelación y descongelación de líneas celulares	42
2.3. Soluciones y otros compuestos químicos utilizados	43
3. MANIPULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE ADN.....	44
3.1. Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	44
3.2. Generación de fragmentos de ADN	45
3.2.1. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	45
3.2.2. Asociación de los oligonucleótidos complementarios.....	45
3.2.3. PCR recurrente	46
3.2.4. Oligonucleótidos	47
3.3. Digestión y modificación de los fragmentos de ADN	49
3.4. Electroforesis de ADN	50
3.5. Alineamiento, purificación de geles de agarosa y cuantificación de los fragmentos de ADN	51
3.6. Ligación de fragmentos de ADN	51
3.7. Transformación de <i>E.coli</i> mediante choque térmico	51
3.7.1. Obtención de células competentes	51
3.7.2. Transformación	52
3.8. Comprobación de candidatos	52
3.9. Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias	53
4. MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GENÉTICA EN <i>S. Typhimurium</i>	53
4.1. Electrotransformación de <i>S. Typhimurium</i> con ADN plasmídico	53
4.1.1. Preparación de células competentes	53
4.1.2. Electroporación	53
4.2. Transducción con el bacteriófago P22	54

4.2.1. Preparación de los lisados de P22	54
4.2.2. Transducción	54
4.2.3. Eliminación de pseudolisógenos	55
4.2.4. Comprobación de transductantes libres de lisógenos	55
5. CONSTRUCCIÓN DE ESTIRPES	56
5.1. Inactivación de genes cromosómicos utilizando productos de PCR	56
5.1.1. Preparación de ADN para la sustitución	57
5.1.2. Transformación de los receptores	58
5.1.3. Comprobación de los candidatos	58
5.2. Construcción de estirpes	59
5.3. Escisión del gen de resistencia a antibióticos	59
6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	59
6.1. Obtención de extractos totales de cultivos bacterianos	59
6.1.1. Producción de proteínas inducida por salicilato sódico	59
6.1.2. Obtención de extractos totales	60
6.2. Lisis de células eucarióticas infectadas	60
6.2.1. Obtención de extractos totales	60
6.2.2. Extracción de proteínas citoplasmáticas	61
6.3. Cuantificación de proteínas	61
6.4. Electroforesis de proteínas	61
6.5. Tinción de geles	62
6.6. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot	63
6.6.1. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	63
6.6.2. <i>Immunoblot</i>	63
6.6.3. Anticuerpos empleados	64
7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA. ENSAYOS DE ACTIVIDAD	
 β-GALACTOSIDASA	65
8. ANÁLISIS DE PRODUCCIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CITOSINA	
DEAMINASA	66
8.1. Test de sensibilidad a 5-fluorouracilo	66
8.2. Ensayos de actividad citosina deaminasa	67

8.2.1. Recogida de muestras, rotura y cuantificación de extractos	67
8.2.2. Ensayos de actividad citosina deaminasa	67
8.2.3. Cálculo de la actividad citosina deaminasa de los extractos	68
9. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR	68
9.1. Infecciones de células tumorales con <i>S. Typhimurium</i>	68
9.1.1. Condiciones de infección para mutantes $\Delta purD$	69
9.2. Ensayos de invasión y replicación intracelular	69
9.3. Microscopía de fluorescencia	70
9.3.1. Tinción de los filamentos de actina	70
9.3.2. Inmunofluorescencia	71
9.3.3. Imágenes a tiempo real <i>Time-lapse</i>	72
9.4. Análisis de la viabilidad celular mediante la determinación de la LDH libera	73
9.5. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo en presencia de yoduro de propidio	74
10. ENSAYOS EN MODELOS ANIMALES	75
10.1. Inducción de tumores	75
10.2. Infección bacteriana e inducción con salicilato sódico	76
RESULTADOS	77
Capítulo 1. Mejoras en los vectores de expresión	79
1. Mejora del módulo de expresión	81
2. Medida de los niveles de expresión génica de los nuevos vectores	83
3. Secreción dirigida de proteínas al citoplasma	87
4. Producción y secreción de proteínas de interés	89
Capítulo 2. Optimización de la producción de citosina deaminasa	93
1. Sistema citosina deaminasa/5-FC	95
2. Descripción de plásmidos y estirpes utilizadas	96
3. Superproducción de citosina deaminasa en respuesta a la inducción con salicilato sódico	97
4. Sensibilidad a 5-Fluorouracilo	98

5. Actividad citosina deaminasa	100
Capítulo 3. Superproducción del factor de virulencia de <i>Salmonella</i> SpvB.....	103
1. El factor de virulencia SpvB	105
2. Producción controlada en células tumorales	106
3. Utilización del mutante Δ purD para el análisis del efecto de SpvB en células eucarióticas	110
3.1. Eficiencia de la infección de la estirpe MPO325	111
3.2. Capacidad de inducción de muerte celular por la estirpe MPO325	112
3.3. Capacidad de producción y secreción de la estirpe MPO325	114
4. Producción de SpvB en distintas líneas tumorales usando la estirpe MPO325	115
5. Efecto de la producción controlada de SpvB sobre el ciclo celular	118
6. Seguimiento <i>in vivo</i> del efecto de la producción controlada de SpvB en el interior de las células tumorales	128
7. SpvB induce apoptosis mediante la activación de la caspasa-3 y -7	130
8. Expresión controlada de SpvB en animales infectados	132
8.1. Construcción de vectores de bajo número de copias	132
8.2. Construcción de la estirpe	134
8.3. Expresión controlada de SpvB intratumoral en ratones BALB/c	135
DISCUSIÓN	139
1. MEJORA DEL VECTOR DE EXPRESIÓN	141
1.1. El control de la expresión génica	141
1.2. Mejoras en el vector de expresión	143
1.3. Acoplamiento de la producción al sistema de secreción tipo III	144
2. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CIOTSINA DEAMINASA	145
3. ESTUDIO DEL EFECTOR SpvB. EFECTO EN CÉLULAS EUCARIÓTICAS Y USO EN TERAPIA ANTITUMORAL	147
3.1. La actina, diana de los nuevos agentes terapéuticos	148
3.2. Sobreexpresión de SpvB de forma controlada	148

3.3. Sistema $\Delta purD$ / adenina	148
3.4. Efectos de la producción de SpvB a largo plazo	149
3.5. Efecto de la sobreexpresión de SpvB en modelos animales	152
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	159

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estirpes bacterianas	35
Tabla 2. Plásmidos	36
Tabla 3. Líneas celulares tumorales	40
Tabla 4. Oligonucleótidos	47
Tabla 5. Anticuerpos	64
Tabla 6. Niveles de expresión β -galactosidasa y ratios de inducción obtenidos con diferentes vectores de expresión en la estirpe MPO96	85
Tabla 7. Porcentaje de células infectadas y binucleadas sin filamentos de actina	109
Tabla 8. Eficiencia de invasión y replicación intracelular de las estirpes de <i>S. Typhimurium</i> MPO302 y MPO325 en distintas líneas tumorales	112
Tabla 9. Eficiencia de invasión y replicación intracelular de la estirpe <i>S. Typhimurium</i> MPO325 en distintas líneas tumorales utilizando una m.o.i de 1:250	118
Tabla 10. Porcentaje de células HeLa en cada fase del ciclo celular	120
Tabla 11. Porcentaje de células MCF-7 en cada fase del ciclo celular	122
Tabla 12. Porcentaje de células HCT116 en cada fase del ciclo celular	124
Tabla 13. Porcentaje de células PANC-1 en cada fase del ciclo celular	125
Tabla 14. Porcentaje de células MDA-MB-231 en cada fase del ciclo celular	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del ciclo celular	4
Figura 2. Complejos de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas durante el ciclo celular	5
Figura 3. Ilustración de los cambios morfológicos que sufre una célula apoptótica	6
Figura 4. Representación de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis	9
Figura 5. Representación de las zonas viable, hipóxica y necrótica de un tumor y de los gradientes presentes en el ambiente tumoral	13
Figura 6. Rutas de <i>Salmonella</i> en la invasión del epitelio intestinal	19
Figura 7. Esquema del sistema de expresión en cascada transcripcional inducible por salicilato	27

Figura 8. Sistema de expresión en cascada inducible por salicilato con los elementos <i>nasR</i> y el atenuador <i>nasF</i>	28
Figura 9. Esquema de la PCR recurrente para sintetizar fragmentos de ADN	46
Figura 10. Esquema del proceso de inactivación de genes mediante productos de PCR	57
Figura 11. Representación esquemática de los diferentes elementos del módulo de expresión	82
Figura 12. Diferentes vectores de expresión	83
Figura 13. Actividad β -galactosidasa de estirpes de <i>S. Typhimurium</i> con o sin <i>nasR</i> en el módulo regulador	86
Figura 14. Secreción regulada de <i>sspH2</i> -HA en <i>S. Typhimurium</i> a través del sistema de secreción tipo III	88
Figura 15. Secreción regulada de p53 y Cp53 en <i>S. Typhimurium</i> a través del sistema de secreción tipo III al citoplasma de las células tumorales	91
Figura 16. Metabolismo del 5-FU y citotoxicidad	96
Figura 17. Análisis mediante SDS-PAGE de la superproducción de citosina deaminasa en condiciones de no inducción e inducción con salicilato sódico	98
Figura 18. Test de sensibilidad al 5-FU en gotas	99
Figura 19. Representación gráfica de la actividad citosina deaminasa de los extractos	101
Figura 20. Cambio morfológico producido por la expresión intracelular de SpvB en células MCF-7 infectadas tras 20 horas de inducción	107
Figura 21. Efecto de la expresión intracelular de SpvB en células tumorales tras 4h en ausencia o presencia del inductor salicilato sódico	108
Figura 22. Microscopía confocal SPE (630x) de células HeLa infectadas con <i>S. Typhimurium</i> Δ <i>spvB</i> produciendo SpvB durante 20 horas en presencia del inductor salicilato sódico	109
Figura 23. Citotoxicidad del mutante Δ <i>spvB</i> Δ <i>purD</i> ::Kan ^r en células HeLa tras 24 horas de infección	112
Figura 24. Producción y secreción de <i>sspH2</i> -2HA de las estirpes wt, Δ <i>purD</i> o/y Δ <i>spvB</i> en presencia o ausencia de adenina	115
Figura 25. Efecto de la expresión intracelular de SpvB en distintas líneas tumorales utilizando la estirpe MPO325 tras 24 horas de infección	116

Figura 26. Microscopía confocal SPE (630x) de las células HeLa infectadas con <i>S. Typhimurium</i> $\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$ produciendo SpvB durante 24 horas	117
Figura 27. Distribución de células HeLa en las distintas fases del ciclo celular según sus contenido de ADN	119
Figura 28. Representación de la distribución de células HeLa en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo	120
Figura 29. Representación de la distribución de células MCF-7 en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo	122
Figura 30. Representación de la distribución de células HCT116 en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo	123
Figura 31. Representación de la distribución de células PANC-1 en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo	125
Figura 32. Representación de la distribución de células MDA-MB-231 en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo	126
Figura 33. Microscopía confocal <i>time-lapse</i> de un cultivo infectado con <i>S. Typhimurium</i> MPO325 portando el vector vacío (control) o vector SpvB (SpvB) durante 20 horas de inducción	129
Figura 34. Estudio de la proteólisis de PARP-1 por superproducción de SpvB	131
Figura 35. Estudio de la proteólisis de las caspasas-3 y -7	132
Figura 36. Efecto de la expresión intracelular de SpvB utilizando los vectores de expresión de bajo número de copias con atenuador <i>nasF</i>	133
Figura 37. Representación gráfica de la progresión tumoral durante 9 días de infección	137

ABREVIATURAS

A: absorbancia

aa: aminoácido

Ap: ampicilina; **Ap^r:** resistente a ampicilina

ASA: ácido acetilsalicílico (aspirina)

BSA: seroalbúmina bovina (*bovine serum albumin*)

CD: citosina deaminasa

CDmod: versión modificada de la citosina deaminasa

Cm: cloranfenicol; **Cm^r:** resistente a cloranfenicol

D.O.₆₀₀: densidad óptica medida a 600 nm

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO: dimetil sulfóxido

dNTPs: desoxinucleótido trifosfato

DTT: ditioneitol

EBSS: *Earle's balanced salt solution*

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FBS: suero fetal bovino (*foetal bovine serum*)

5-FC: 5-fluorocitosina

5-FU: 5-fluorouracilo

GFP: proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)

Gm: gentamicina

IL: interleuquina

IP: yoduro de propidio (*iodide propidium*)

Kan: kanamicina; **Kan^r:** resistente a kanamicina

LB: medio Luria-Bertani

LDH: lactato deshidrogenasa

MCS: sitio de clonación múltiple (*multiple cloning site*)

MCSII: sitio de clonación múltiple modificado

m.o.i: multiplicidad de infección

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida (*poly-acrylamide gel electrophoresis*)

PBS: tampón fosfato salino (*phosphate buffer saline*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

p/v: peso/volumen

rpm: revoluciones por minuto

SD: secuencia del sitio de unión al ribosoma (Shine-Dalgarno)

SDS: dodecil sulfato sódico

SPI-1: isla de patogenicidad 1

SPI-2: isla de patogenicidad 2

STS: estaurosporina

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

Tet: resistente a tetraciclina

Ts: termosensible

TTSS: sistema de secreción tipo III

ufc: unidad formadora de colonia

v/v: relación volumen/ volumen

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER.

El término cáncer engloba a un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento excesivo y descontrolado de células que pueden invadir y propagarse a otros tejidos y órganos, provocando finalmente la muerte del individuo (Muñoz, 2004). Actualmente es la principal causa de muerte en los países desarrollados y la segunda en los países en vías de desarrollo, siendo el cáncer de mama el más frecuente entre las mujeres y el de pulmón entre los hombres (Jemal *et al.*, 2011).

El aumento de la proliferación de un grupo de células se denomina tumor o neoplasia. Los tumores pueden ser benignos, si crecen de forma localizada sin invadir los tejidos adyacentes, o malignos (denominados propiamente como cánceres) si invaden los tejidos cercanos y se extienden por todo el organismo (metástasis) mediante el sistema circulatorio y linfático. Ambos tipos de tumores se clasifican atendiendo a su origen celular. El 90% de los tumores humanos son de origen epitelial y se denominan carcinomas. Los otros tipos mayoritarios de cánceres son los sarcomas, derivados del tejido conectivo o muscular, las leucemias, linfomas y mielomas, originados por células de la sangre, y los neuroblastomas y gliomas que derivan de las células del sistema nervioso (Muñoz, 2004).

La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico en el que se produce una acumulación de mutaciones. Como consecuencia, la célula se divide anormalmente debido al mantenimiento de señales de proliferación y la elusión de señales anti-proliferativas, la evasión de la muerte celular y el sistema inmune, y la reprogramación de su metabolismo energético (Hanahan y Weinberg, 2011). Estas células tumorales, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular junto con otros componentes celulares, producen factores de crecimiento y proteasas que alteran la homeostasis del tejido normal y activan a las células del entorno para inducir la angiogénesis (Bergers y Benjamin, 2003) y la respuesta inflamatoria (Coussens y Werb, 2002), lo que contribuye a la proliferación y, por tanto, a la posibilidad de adquisición de nuevas capacidades por parte de algunas células de la población que les permitan

invadir otros tejidos y diseminarse por el organismo (Liotta y Kohn, 2001; revisado en Mueller y Fusening, 2004).

2. CICLO CELULAR, APOPTOSIS Y CÁNCER.

La disminución de la tasa de muerte celular y el incremento de la proliferación son dos de los principales factores implicados en la formación de los tumores. El conocimiento de ambos procesos es fundamental para el desarrollo de un tratamiento antitumoral eficaz.

2.1. Ciclo celular.

El ciclo celular es un proceso ordenado y repetitivo, en el que una célula duplica su contenido y se divide en dos células hijas genéticamente idénticas. Este ciclo consta de cuatro fases G_1 , S, G_2 y M (Figura 1). Durante la fase G_1 , la célula sintetiza y modifica proteínas necesarias para la síntesis de ADN que tiene lugar en la fase S. Con los cromosomas duplicados, la célula llega a la fase G_2 en la que se sintetizan las proteínas necesarias para la mitosis (fase M) durante la cual ocurre la división del núcleo (cariocinesis) y la división celular (citocinesis). Si las condiciones no son favorables para la división celular, las células pueden salir del ciclo a nivel de G_1 y permanecer en un estado de reposo o quiescencia (fase G_0) hasta que las condiciones sean propicias (Taylor y Grabovich, 2009).

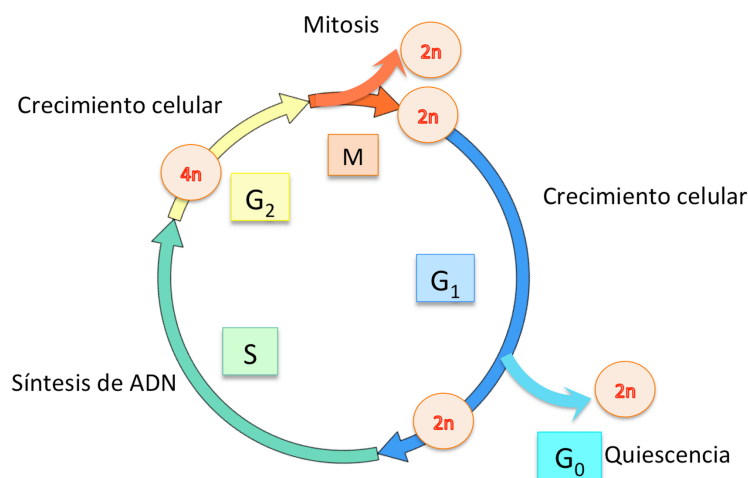


Figura 1. Representación del ciclo celular. Se muestran las fases del ciclo celular G_1 , S, G_2 , M, y la fase de quiescencia G_0 . Además se indica como varía el contenido en ADN ($2n$ y $4n$) a lo largo del proceso.

Durante el ciclo celular existen distintos puntos de control situados en la transición G_1/S , en el paso G_2/M y durante la mitosis (metafase/anafase) que aseguran el orden del proceso y evitan la continuidad del mismo si las condiciones extracelulares o intracelulares no son las adecuadas (King y Cidlowski, 1998; revisado en Pelengaris y Khan, 2009). El déficit de factores de crecimiento, defectos en la síntesis o en la reparación del ADN, problemas en la segregación de los cromosomas o la alteración de los componentes del citoesqueleto como la actina (Heng y Koh, 2010), son algunas de las señales que activan estos controles e inducen la parada del ciclo celular (Malumbres y Barbacid, 2009).

La progresión de una fase a otra está controlada por las quinasas dependientes de ciclinas o CDKs (*Cyclin-dependent kinases*) que son activadas por determinadas ciclinas durante el ciclo celular. Los complejos CDK4/Ciclina D, CDK6/Ciclina D y CDK2/Ciclina E son necesarios para el tránsito G_1/S . La progresión a través de la fase S se lleva a cabo por el complejo CDK2/Ciclina A y la transición G_2/M está regulada por la unión de CDK1 (CDC2) a la Ciclina A y después a la Ciclina B (revisado en Taylor y Grabovich 2009; Malumbres y Barbacid 2009) (Figura 2). Los complejos CDKs/Ciclinas pueden ser inhibidos por proteínas inhibidoras de las CDKs (CKIs), por degradación de las ciclinas o por procesos de fosforilación-desfosforilación de las CDKs (revisado en Taylor y Grabovich, 2009; Pelengaris y Khan, 2009).

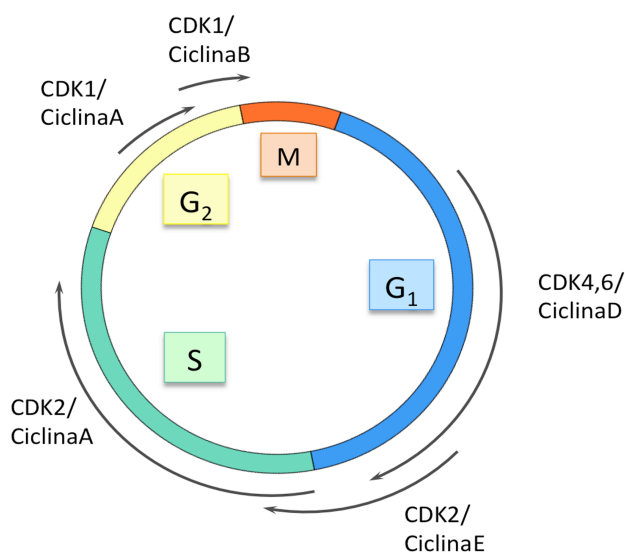


Figura 2. Complejos de ciclinas y de quinasas dependientes de ciclinas durante el ciclo celular. Adaptado de Taylor y Grabovich 2009.

El desarrollo de tumores se asocia con frecuencia a mutaciones en los genes implicados en la regulación del ciclo celular. Entre las alteraciones más frecuentes se encuentran la sobreexpresión de las ciclinas y CDKs, y la pérdida de función de inhibidores de las CDKs (revisado en Pelengaris y Khan, 2009).

2.2. Apoptosis.

La apoptosis es un mecanismo fisiológico que posee la célula para inducir su propia muerte ante determinados estímulos en beneficio del resto del organismo. Juega un papel fundamental en el desarrollo embrionario y el mantenimiento de los tejidos adultos, y constituye un mecanismo de defensa frente a células potencialmente peligrosas como células infectadas, mutadas o dañadas (Kerr *et al.*, 1972, revisado en Wong, 2011).

Durante la apoptosis la célula sufre una serie de cambios morfológicos que incluyen la disminución del volumen celular, la condensación de la cromatina, la aparición de protuberancias en la membrana plasmática (*blebbing*) y la fragmentación nuclear seguida de la fragmentación celular que da lugar a los cuerpos apoptóticos (compuestos por membrana plasmática que engloba material citoplasmático y nuclear), que son fagocitados por macrófagos y células vecinas (Figura 3) (Ziegler y Groscurth, 2004; Kroemer *et al.*, 2005).

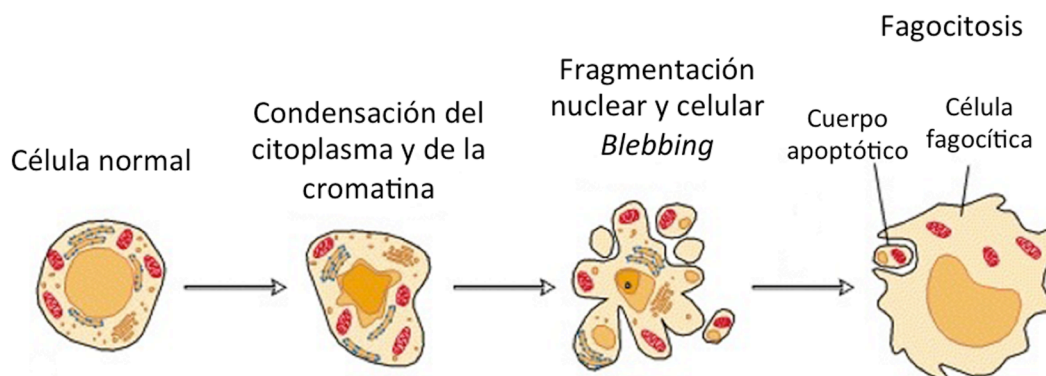


Figura 3. Ilustración de los cambios morfológicos que sufre una célula apoptótica.
Adaptado de Lodish *et al.*, 2000.

A diferencia de lo que ocurre en la muerte por necrosis, proceso en el que la célula se lisa liberando su contenido al espacio extracelular y causando inflamación, las células apoptóticas son retiradas de los tejidos de manera eficaz sin generar una respuesta inmune. En los cultivos celulares *in vitro*, debido a la falta de células fagocíticas que eliminen los restos celulares, las células apoptóticas pueden presentar daños en la membrana plasmática en estadios finales, del mismo modo que ocurre en la necrosis. A este estado se le denomina necrosis secundaria (Ziegler y Groscurth, 2004).

Paralelamente a los cambios morfológicos se producen una serie de cambios bioquímicos que generalmente incluyen la activación de las caspasas, la fragmentación de ADN por endonucleasas y cambios en la membrana plasmática que debido a la externalización de los residuos de fosfatidilserina permiten el reconocimiento de las células apoptóticas por los macrófagos (Hengartner, 2000; revisado en Wong, 2011).

Las caspasas son cisteína proteasas que fragmentan sus sustratos en residuos de ácido aspártico y están implicadas en el proceso apoptótico. Aunque no todas las caspasas participan en la apoptosis, como las caspasa-1, -4 y -5 que intervienen en la maduración de las citoquinas durante la respuesta inflamatoria (Creagh *et al.*, 2003). La caspasa-1 además induce la piroptosis, un mecanismo de muerte celular distinto a la apoptosis (Fink y Cookson, 2007). La regulación de la apoptosis está controlada por las caspasas iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10) que son capaces de autoactivarse e iniciar el procesamiento proteolítico de las caspasas efectoras o ejecutoras (caspasas-3, -6 y -7) que proteolizan diferentes sustratos y conducen a la muerte de la célula. Todas las caspasas se sintetizan como precursores inactivos (zimógenos) que se convierten a su forma activa por rotura proteolítica y dimerización (revisado en Fink y Cookson, 2005). La activación de las caspasas puede producirse a través de la mitocondria (vía intrínseca) o mediante la activación de los receptores de muerte presentes en la membrana plasmática (vía extrínseca). Existe una tercera vía menos conocida a través del retículo endoplásmico (Szegezdi *et al.*, 2003). Las vías intrínseca y extrínseca que se detallan a continuación se representan en la Figura 4.

La vía intrínseca es utilizada para eliminar células en respuesta a radiaciones ionizantes, agentes quimioterapéuticos, daño en el ADN, especies reactivas del oxígeno

y ante un déficit de factores de crecimiento (Wilson *et al.*, 2008). La inducción por esta vía se inicia con la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol, donde forma el apoptosoma junto con Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*) y la procaspasa-9 (Acehan *et al.*, 2002; Shiozaki *et al.*, 2002; Jiang y Wang, 2000). El complejo procesa la caspasa-9, que activa a las caspasas efectoras que dan lugar finalmente a la muerte celular. La vía mitocondrial está regulada por miembros de la familia Bcl-2, que incluyen proteínas pro-apoptóticas (Bax y Bak), anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-X_L) y otras proteínas que residen en el citoplasma hasta la llegada del estímulo apoptótico (Bid, Bad, Noxa y Puma, entre otras) (Reed, 1997). Bcl-2 y Bcl-X_L se unen e inhiben la dimerización de Bax y Bak. Tras el estímulo apoptótico, las proteínas Bad, Noxa y Puma se translocan a la mitocondria y se unen a Bcl-2 y Bcl-X_L que ya no pueden ejercer su acción anti-apoptótica. El procesamiento de la proteína Bid inicia la activación de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak y conduce a su oligomerización formando un poro que permite la liberación del citocromo c y otras moléculas pro-apoptóticas, como Smac/Diablo y Omi/HtrA2, que estimulan la actividad caspasa neutralizando a los inhibidores de las caspasas (IAPs) (Kroemer *et al.*, 2007). La caspasa-2 está implicada en esta vía (Lassus *et al.*, 2002). Cuando se produce un daño en el ADN, se forma el complejo de activación de la caspasa-2, conocido como PIDDosoma, compuesto por las proteínas PIDD, RAIDD y la procaspasa-2 (Tinel y Tschopp, 2004). La caspasa-2 activada procesa la proteína Bid, que interviene en la translocación de Bax, lo que resulta finalmente en la liberación del citocromo c. (Revisado en Wilson *et al.*, 2008; Wong, 2011; Park, 2012).

La vía extrínseca es la responsable de la eliminación de las células durante el desarrollo, la maduración del sistema inmune y la eliminación de células cancerosas y células infectadas. Se inicia por la unión de ciertas citoquinas a receptores de muerte localizados en la membrana plasmática pertenecientes a la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), como el receptor Fas (CD95/Apo-1) y los receptores para TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF), DR4 y DR5 (Ashkenazi y Dixit, 1998). La unión del ligando (Fas-L o TRAIL) induce la oligomerización de sus receptores de muerte, generando un complejo activador de caspasas en el interior de la célula denominado DISC, al que se une la proteína adaptadora FADD (*Fas-associated death domain*) responsable de la unión de la procaspasa-

8 (Kischkel *et al.*, 1995). Dentro de este complejo señalizador inductor de muerte (DISC) se activa la caspasa-8 y la caspasa-10, que dan lugar al procesamiento de las caspasas efectoras y de la proteína Bid, que resulta en la amplificación de la señal apoptótica a través de la mitocondria (Li *et al.*, 1998). (Revisado en Wilson *et al.*, 2008; y Park, 2012).

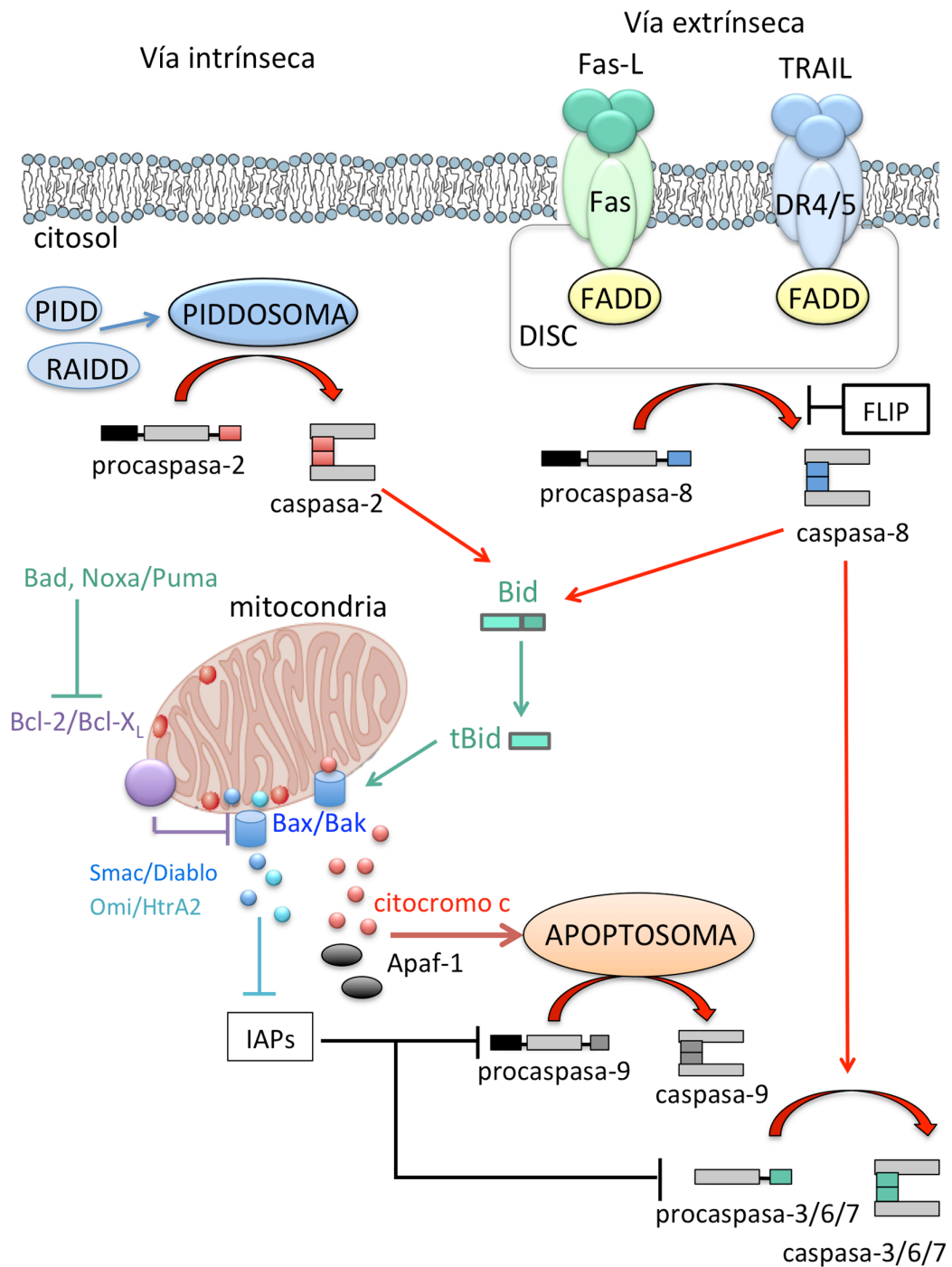


Figura 4. Representación de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Adaptado de Olsson y Zhivotovsky, 2011.

Una vez activadas, las caspasas efectoras (caspasas-3, -6 y -7) inactivan rápidamente a una serie de proteínas que protegen a las células de la apoptosis como el ICAD que inhibe a las endonucleasas CAD (*caspase-activated DNase*) responsables de la fragmentación del ADN, y la poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP), enzima implicada en la reparación del ADN fragmentado. La proteólisis de ambas conlleva a la fragmentación del ADN y asegura la irreversibilidad de la apoptosis. Por otro lado, las caspasas actúan sobre los componentes del citoesqueleto como la actina y participan en el desmantelamiento de las uniones de las células con la matriz extracelular y con las células adyacentes. Además intervienen en la proteólisis de las lamininas A, B y C, lo que provoca la desintegración de la lámina nuclear y el colapso de la envoltura nuclear. Esto contribuye a la condensación de la cromatina y a la fragmentación posterior del núcleo. Se estima que las caspasas pueden actuar sobre unos 400 sustratos (revisado en Fink y Cookson, 2005; Taylor *et al.*, 2008).

Una de las propiedades que caracterizan a las células tumorales es su capacidad para evadir la apoptosis. La mayoría de las terapias antitumorales están dirigidas a inducir la muerte de las células, sin embargo, en muchos casos los tumores son resistentes a dichos tratamientos debido a la disminución de la expresión de receptores de membrana plasmática, la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas, como los inhibidores de las caspasas y la proteína Bcl-2, y/o a la disminución o inactivación de proteínas pro-apoptóticas como Bax (revisado en Fulda, 2009). Además, la existencia de señales de supervivencia mediada por la sobreexpresión de tirosina quinasas como el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es crítica para el “éxito” de las metástasis. La unión de factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante α (TGF- α) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) resultan en la dimerización de sus receptores que se fosforilan y activan mecanismos de señalización anti-apoptóticos a través de las rutas PI3/Akt y STAT-3/-5. La activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3) conduce a su vez a la activación de la proteína-serina/treonina quinasa Akt que puede inhibir la proteína pro-apoptótica Bad y la caspasa-9, activar el factor de transcripción nuclear κ B (NF κ B) o inactivar el factor de transcripción *Forkhead*. A su vez NF κ B regula positivamente la expresión de numerosos genes anti-apoptóticos que codifican inhibidores de caspasas, FLIP (inhibidor de la

activación de la caspasa-8), Bcl-2 y Bcl-X_L, mientras la inactivación de *Forkhead* disminuye la expresión de genes pro-apoptóticos como *FasL*. Por su parte, la activación de STAT-3 y STAT-5 resulta en su translocación al núcleo donde sobreexpresan genes anti-apoptóticos como Bcl-X_L (revisado en Wilson *et al.*, 2008).

2.3. La proteína p53 en la regulación del ciclo celular y la apoptosis.

p53 es una proteína supresora de tumores que puede inducir la parada del ciclo celular en G₁ en respuesta a estrés celular (daños o alteraciones en el contenido de ADN, hipoxia, etc.) a través de la activación de la transcripción del inhibidor de la CDK p21 (Giono y Manfredi, 2006) o regular la transición G₂/M mediante la inhibición de CDK1 o represión de la ciclina B1 (Taylor y Stark, 2001).

Por otro lado, si la célula no puede reparar el daño, p53 puede activar la transcripción de genes implicados en la apoptosis como *bax* (Thornborrow *et al.*, 2002) y los genes que codifican Puma (Nakano y Vousden, 2001) y Noxa (Oda *et al.*, 2000), inducir la expresión de Apaf-1 (Moroni *et al.*, 2001) implicado en la activación del apoptosoma, y reducir la expresión de genes anti-apoptóticos como *bcl-2* (Miyashita *et al.*, 1994; Miyashita y Reed, 1995). Además, puede inducir la expresión de receptores Fas (Owen-Schaub *et al.*, 1995) y TRAIL (Wu *et al.*, 1997).

Aproximadamente el 50% de los cánceres humanos tienen mutaciones en el gen *p53* y en el resto, su actividad está comprometida por la sobreexpresión de inhibidores como MDM2 (Vogelstein *et al.*, 2000). Como consecuencia, la célula dañada no detiene el ciclo celular ni induce apoptosis, conduciendo a la inestabilidad genómica y la acumulación de mutaciones que resultan en la transformación de las células afectadas, metástasis y resistencias a agentes anticancerígenos (Wong, 2011).

3. LIMITACIONES DE LA TERAPIA ANTITUMORAL ACTUAL.

El objetivo principal del tratamiento antitumoral es la eliminación de las células tumorales sin afectar al resto de la población celular. A pesar de que los tratamientos convencionales (cirugía, radiación y quimioterapia) han supuesto un progreso en la lucha contra el cáncer, la eficacia de estas terapias está limitada por varios factores entre los que cabe destacar el microambiente tumoral.

3.1. El microambiente tumoral.

Los tumores sólidos son estructuras heterogéneas y complejas. El oxígeno y los nutrientes llegan a través de una red vascular compuesta por los vasos sanguíneos del tejido que las células han invadido y nuevos vasos inducidos por las células tumorales que están expresando factores proangiogénicos (Vajkoczy *et al.*, 2002). A diferencia de los tejidos normales, esta red vascular se encuentra poco organizada y el flujo sanguíneo es irregular (Carmeliet y Jain, 2000), dando lugar a regiones hipóxicas dentro del tumor (Moulder y Rockwell, 1987; Harris, 2002). Las células tumorales localizadas en estas zonas aumentan la expresión de los transportadores de glucosa y enzimas de la glucólisis para obtener la energía necesaria para la supervivencia y proliferación (Dang y Semenza, 1999). Como consecuencia, se producen ácido láctico y ácido carbónico que disminuyen el pH extracelular (Helmlinger *et al.*, 1997; Tannock y Rotin, 1989). Se ha descrito que estas condiciones de hipoxia y acidosis tumoral pueden contribuir a la tumorigénesis y la metástasis (Graeber *et al.*, 1996; Brizel *et al.*, 1996; Hockel *et al.*, 1996). Por otro lado, la falta de nutrientes en la región hipóxica reduce la tasa de proliferación de las células tumorales, por lo que dentro del tumor encontramos células que se dividen rápidamente y otras que apenas proliferan (Tannock, 1978). Adyacentes a las zonas hipóxicas se encuentran las regiones necróticas que constituyen la zona más alejada de los vasos sanguíneos (Figura 5). Estas regiones se forman debido a la desorganización vascular y la ausencia de vasos linfáticos funcionales que incrementan la presión intersticial del fluido (Stohrer *et al.*, 2000; Heldin *et al.*, 2004), inhibiendo la distribución de las moléculas por convección y comprimiendo los vasos sanguíneos de forma que la

sangre se desvía desde el centro del tumor a la periferia (revisado en Minchinton y Tannock, 2006; Tredan *et al.*, 2007).

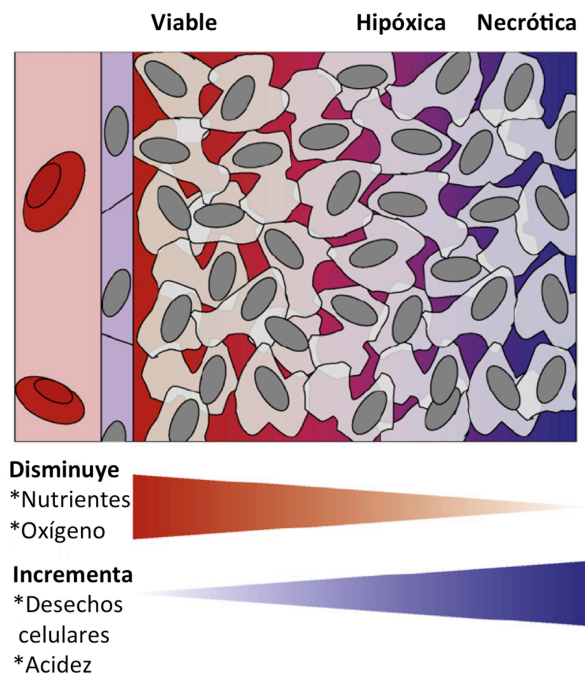


Figura 5. Representación de las zonas viable, hipóxica y necrótica de un tumor y los gradientes presentes en el ambiente tumoral. Los nutrientes y el oxígeno se extravasan desde la sangre (rojo) a través del endotelio vascular (morado) y se difunde por el tejido. Adaptado de St. Jean *et al.*, 2008.

3.2. Terapias convencionales.

La cirugía es la mejor opción en el tratamiento de tumores sólidos, sin embargo, su utilización y efectividad están restringidas por la localización del tumor, en muchos casos en órganos vitales, y la existencia de metástasis. Para incrementar el éxito de este tratamiento, la cirugía se combina con radioterapia o quimioterapia (Muñoz, 2004).

La radioterapia consiste en la irradiación de las células tumorales con rayos X, rayos γ o, con menos frecuencia, partículas subatómicas, que causan principalmente daños en el ADN directos o indirectos debido a la formación de radicales libres hidroxilo (Ward, 1988). Este tratamiento se basa en que la acumulación de mutaciones en células tumorales, que se dividen rápidamente, conduce a la muerte de dichas células, mientras que en las células normales la baja frecuencia de división permite reparar el ADN. La eficacia de la radioterapia sobre la célula tumoral depende de factores intrínsecos de la célula como la fase del ciclo celular, la activación de la apoptosis, la capacidad de

reparación del ADN y la acumulación de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, así como del ambiente en el que se encuentre, siendo el oxígeno el factor limitante más importante (Bernier *et al.*, 2004). Solo en presencia de oxígeno, las células son sensibles a la radiación. Por tanto, las células tumorales de las regiones hipóxicas son resistentes y pueden llegar a regenerar el tumor después del tratamiento (Minchinton y Tannock, 2006). Esto, junto con los efectos secundarios y la inducción de nuevos cánceres debido a la radiación, restringen su uso y eficacia a tumores localizados (revisado en Mundt *et al.*, 2003).

Para tratar las metástasis, además de los tumores localizados, se utiliza la quimioterapia, que consiste en la administración sistémica de agentes químicos que actúan sobre las células con alta tasa de división celular, normalmente en la fase de síntesis de ADN o durante la mitosis, inhibiendo la proliferación celular e induciendo la muerte por apoptosis. La quimioterapia presenta efectos secundarios debido a que afecta a otras células no tumorales altamente proliferativas, como las células hematopoyéticas, los folículos pilosos o las del epitelio intestinal (Chan, 2007). Sin embargo, el principal problema de este tratamiento radica en la aparición de resistencias, resultado de mutaciones en genes que codifican proteínas implicadas en el transporte, metabolización y acción de los agentes químicos, y de las condiciones del microambiente tumoral (Mellor y Callaghan, 2008). Al igual que ocurre con los gradientes de nutrientes y oxígeno, las células más alejadas de los vasos sanguíneos están expuestas a menos concentración del agente tóxico. Esto, junto con la baja proliferación de las células en estas zonas y las condiciones de hipoxia y acidez, reduce la actividad de los quimioterapéuticos y favorece la aparición de resistencias (Minchinton y Tannock, 2006; Tredan *et al.*, 2007).

Por lo tanto, la elevada toxicidad de estos tratamientos, asociada a su inespecificidad y la ineficacia en las zonas hipóxicas y necróticas del tumor, hacen necesario la búsqueda de terapias alternativas más específicas como la terapia génica.

3.3. La terapia génica del cáncer.

La terapia génica consiste en la introducción de material genético directamente en las células tumorales como agente terapéutico para recuperar determinadas funciones de la célula o dotarlas de nuevas capacidades, o indirectamente estimulando el sistema inmune y ayudando a las células del microambiente tumoral a erradicar el tumor. El éxito de esta terapia depende de la capacidad de transferir el material genético de forma segura y eficaz a las células tumorales *in vivo*. En las últimas décadas se han desarrollado distintos tipos de vectores de transferencia virales, como adenovirus y retrovirus, y no virales, basados en la utilización de compuestos químicos y procesos físicos. A pesar de que los virus son vectores de transferencia muy eficaces, en términos prácticos son difíciles de producir a gran escala y tienen restricciones de tamaño. Esto, junto con su inestabilidad y la posible respuesta inmunitaria que generan, ha hecho que se despierte el interés por vectores no virales, aunque la baja eficiencia que presentan estos vectores limitan su aplicación clínica (revisado en Oldham y Dilman, 2009; Habib, 2000).

4. LOS PROCARIOTAS COMO VECTORES ANTITUMORALES.

Como alternativa a las terapias antitumorales convencionales y debido a las limitaciones que presentan los vectores actualmente disponibles en terapia génica, se está explorando la posibilidad de utilizar bacterias como vectores dirigidos a los tumores debido a sus propiedades biológicas.

Las bacterias como agente antitumorales han sido estudiadas durante más de un siglo. A principios del siglo XIX, Vautier observó que las infecciones bacterianas con *Clostridium perfringens* en enfermos de cáncer producían la regresión de los tumores (Barbe *et al.*, 2006). En 1868, W. Busch realizó el primer tratamiento con bacterias de forma intencionada, colocando a una mujer con sarcoma en una cama previamente ocupada por un paciente con erisipelas (*Streptococcus pyogenes*) y observó una rápida reducción del tumor, aunque la paciente murió 9 días después debido a la infección. Años más tarde, F. Fehleisen (1883) y W. Coley (1891) observaron independientemente la regresión tumoral de determinados tipos de cáncer tras infecciones accidentales con *S.*

pyogenes en pacientes hospitalizados y comenzaron a utilizar cultivos bacterianos vivos como tratamiento. Coley abandonó su uso por preparaciones de toxinas bacterianas y desarrolló la primera vacuna compuesta por una mezcla inactivada de *S. pyogenes* y *Serratia marcescens* (Pawelek *et al.*, 2003). La “toxina de Coley” se utilizó en el tratamiento de sarcomas y linfomas (Nauts *et al.*, 1946), sin embargo, los efectos secundarios provocados por la respuesta inmune relegaron su utilización y el interés clínico se desvió hacia la quimioterapia y radioterapia, que se presentaban como métodos más seguros y controlables (Leschner y Weiss, 2010).

Las bacterias poseen unas propiedades únicas que las hacen adecuadas para el tratamiento antitumoral. Existen varios géneros bacterianos que se acumulan preferentemente en los tumores. Las condiciones presentes en el tumor, tales como la hipoxia, la presencia de nutrientes proporcionados por las células que crecen activamente y por las células necróticas, y la elevada presión intersticial que impide la entrada de los anticuerpos, favorecen el crecimiento selectivo de dichas bacterias (Sznol *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2004; Kasinskas y Forbes, 2006). Las bacterias anaerobias estrictas como *Clostridium*, *Bifidobacterium* (Kohwi *et al.*, 1978) y *Corynebacterium parvum* (Woodruff *et al.*, 1974) se acumulan únicamente en las regiones necróticas del tumor, siendo ineficaces para el tratamiento de tumores pequeños y metástasis que no presentan regiones hipóxicas (Malmgren y Flanigan, 1955). Esta limitación puede superarse utilizando anaerobios facultativos, que crecen tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Pawelek *et al.*, 1997), *Escherichia coli* (Critchley *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004; Stritzker *et al.*, 2007), *Shigella flexneri* (Stritzker *et al.*, 2007; Westphal *et al.*, 2008; Galmbacher *et al.*, 2010), *Vibrio cholerae* (Yu *et al.*, 2004) y *Listeria monocytogenes* (Yu *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2008). Además, la motilidad bacteriana y la quimiotaxis en algunos casos, como en *Salmonella*, permiten a las bacterias dispersarse por el tejido tumoral y acceder a las zonas hipóxicas y con bajo nivel de glucosa, donde otros tratamientos no son efectivos (Kasinskas y Forbes, 2006; Kasinskas y Forbes, 2007; Dang *et al.*, 2001; Forbes, 2010).

Además de colonizar los tumores selectivamente, se ha demostrado que bacterias del género *Salmonella*, *Escherichia*, *Bifidobacterium*, *Listeria* y *Streptococcus* entre otras,

presentan un efecto antitumoral que podría deberse a la sensibilización del sistema inmune, la competición por los nutrientes y la producción o secreción de toxinas bacterianas en el interior de las células tumorales o en el medio extracelular (revisado en Forbes, 2010; Sznol *et al.*, 2000).

En las últimas décadas, ha resurgido el interés por las bacterias en terapia antitumoral debido a los nuevos conocimientos y a las mejoras en técnicas de biología molecular que permiten construir bacterias seguras para su aplicación clínica (revisado en Leschner y Weiss, 2010; Patyar *et al.*, 2010). Un ejemplo de terapia bacteriana llevado a la práctica con éxito es la utilización de *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), un derivado de *Mycobacterium bovis*, en el tratamiento del cáncer superficial de vejiga tras la cirugía, que disminuye un 70% el riesgo de recurrencia (Akaza, 1995), siendo más eficaz que otros tratamientos quimioterapéuticos (Bohle *et al.*, 2003; Sylvester *et al.*, 2005).

5. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

Las bacterias del género *Samonella* son bacilos gram-negativos, móviles, intracelulares y anaerobios facultativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. El género *Salmonella* se divide en dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* (Tindall *et al.*, 2005). Esta última se subdivide en seis grupos filogenéticos, las subespecies *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Los miembros de cada subespecie se clasifican en serovares mediante el análisis de la diversidad de los antígenos de superficie somáticos (antígeno O), flagelares (antígeno H) y capsulares Vi (Grimont y Weill, 2007).

Aunque existen más de 2.500 serovares de *Salmonella*, solo algunos son patógenos para el hombre. La infección de *Salmonella* se adquiere generalmente mediante la ingestión de agua o alimentos contaminados, aunque la exposición a reptiles y anfibios, a menudo portadores de la bacteria, pueden representar también una fuente de infección (Haraga *et al.*, 2008). Los serovares Typhi y Paratyphi producen fiebre tifoidea, una infección sistémica grave que puede conducir a la muerte, mientras que los serovares Typhimurium y Enteriditis son los responsables de los casos de salmonelosis no

tifoideas o gastroenteríticas y afectan también a otros hospedadores de importancia para el consumo humano, como el ganado vacuno, cerdos y aves.

En ratones, la infección con *S. Typhimurium* produce una enfermedad similar a la fiebre tifoidea, por lo que es utilizado como organismo modelo en el estudio de las infecciones sistémicas causadas por serovar Typhi en humanos (Ibarra y Steele-Mortimer, 2009). Los ratones BALB/c son particularmente susceptibles a la infección debido a una mutación en el locus que codifica la proteína Nramp-1 (*Natural resistance-associated macrophage protein*), un transportador de cationes divalentes que limita la disponibilidad de estos e inhibe la replicación intracelular de *Salmonella* y otros patógenos intracelulares (Vidal *et al.*, 1995; Govoni y Gros, 1998; Bellamy, 1999; Blackwell *et al.*, 2001).

S. Typhimurium es probablemente la bacteria patógena mejor caracterizada a nivel molecular y una de las más estudiadas como vector en terapia antitumoral debido a su condición de anaerobia facultativa que le permite colonizar tanto tumores sólidos como metástasis. Su fácil manipulación ha permitido obtener estirpes atenuadas en virulencia, como mutantes metabólicos afectados en la síntesis de aminoácidos aromáticos, tales como $\Delta aroA$ (O' Callaghan *et al.*, 1988) y $\Delta aroA \Delta aroD$ (Al-Ramadi *et al.*, 2009), en la síntesis de purinas como $\Delta purI$ (Pawelek *et al.*, 1997) o en genes de virulencia implicados en supervivencia y proliferación intracelular, como el mutante *phoP/phoQ* (Zhang *et al.*, 2007), que permiten su administración de forma segura, ya sea por vía sistémica o por vía oral, y que han mostrado con éxito la colonización del tumor y la regresión de los mismos en modelos animales (Jia *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). Los primeros ensayos clínicos en pacientes han demostrado que las cepas atenuadas de *S. enterica* son bien toleradas y capaces de colonizar los tumores (Toso *et al.*, 2002; Nemunaitis *et al.*, 2003).

5.1. Proceso de infección.

Si la administración se realiza por vía oral, *Salmonella* tiene que sobrevivir al pH ácido del estómago y ser capaz de evadir los sistemas de defensa del intestino delgado para establecer la infección. Una vez alcanzado el epitelio intestinal del íleon distal,

Salmonella puede atravesar dicho epitelio por distintas vías (Figura 6). La ruta principal de invasión se realiza a través de las células M, que son células epiteliales especializadas en transportar antígenos intestinales por pinocitosis a las células linfoides situadas bajo el epitelio intestinal, en las placas de Peyer (Santos y Baumler, 2004). La invasión también puede producirse directamente a través de los enterocitos. En cualquier caso, el proceso implica una adhesión inicial al epitelio intestinal en el que interviene SiiE (Gerlach *et al.*, 2007), seguido de la endocitosis inducida por la propia bacteria mediante la expresión de proteínas bacterianas, denominados efectores, que modulan las funciones celulares en beneficio del patógeno. Los efectores que inducen la endocitosis son translocados al citosol de la célula a través del sistema de secreción tipo III (TTSS), codificado en la isla de patogenicidad tipo I (SPI-1), TTSS-1. Estos efectores inducen la reorganización del citoesqueleto de la célula hospedadora para formar ondulaciones en la membrana (*ruffles*) que engloban a la bacteria y la internalizan (revisado en McGhie *et al.*, 2009). Por otro lado, las bacterias pueden ser captadas directamente en el lumen por las prolongaciones emitidas por las células dendríticas desde la lámina propia (Rescigno *et al.*, 2001).

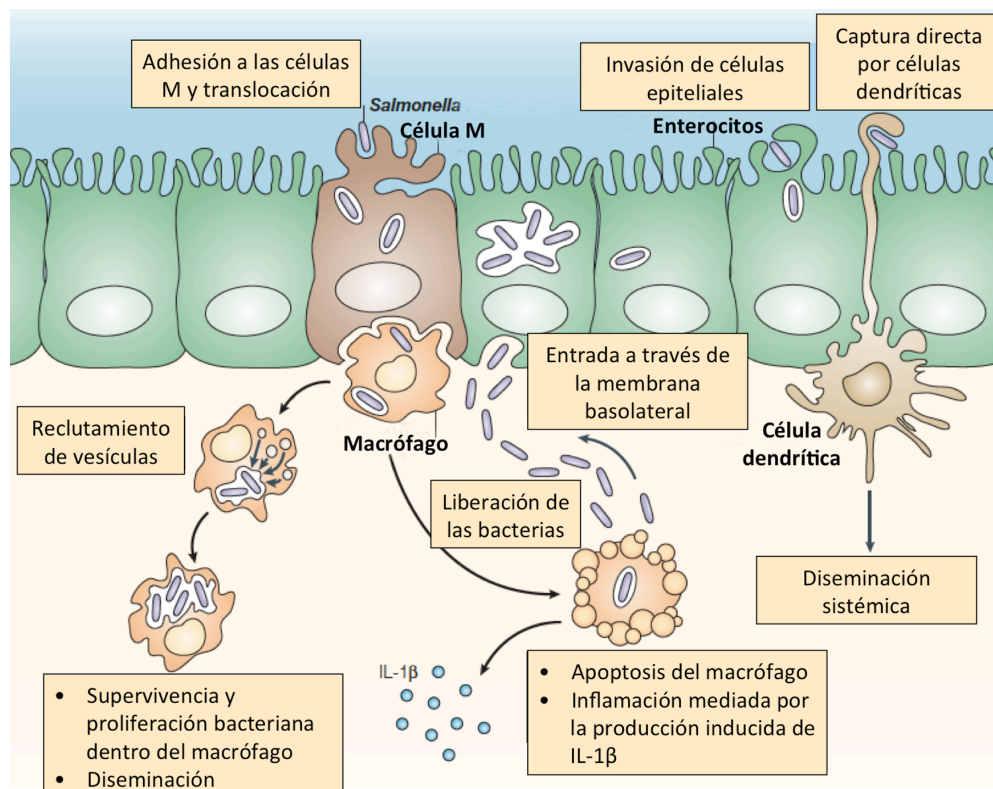


Figura 6. Rutas de *Salmonella* en la invasión del epitelio intestinal. Adaptado de Sansonetti, 2004.

Una vez atravesado el epitelio, las estirpes no tifoideas producen una respuesta inflamatoria temprana y localizada que induce la infiltración de neutrófilos en el lumen intestinal y provoca diarrea (McCormick *et al.*, 1995). En el caso de los serovares que causan infección sistémica, las bacterias son fagocitadas por macrófagos y células dendríticas (Hopkins *et al.*, 2000). *Salmonella* puede sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos gracias a la función de proteínas efectoras translocadas a través del TTSS codificado por la isla de patogenicidad tipo 2 (SPI-2) (Kuhle y Hensel, 2004), TTSS-2, y usar estas células como vehículos para alcanzar los órganos diana (nódulos linfáticos mesentéricos, bazo e hígado). Por otro lado, la bacteria puede inducir la muerte temprana de los macrófagos mediante la translocación del efector SipB (TTSS-1), que activa la caspasa-1 (Hersh *et al.*, 1999; Fink y Cookson, 2007) entre cuyos sustratos se encuentran las citoquinas IL-1 β e IL-18 (Fink y Cookson, 2007) que se liberan y median el reclutamiento de neutrófilos. Las bacterias que se liberan pueden invadir las células epiteliales por la membrana basolateral o distribuirse sistémicamente a través del torrente sanguíneo, libres o asociadas a leucocitos CD18⁺ (macrófagos y células dendríticas). *S. Typhimurium* puede además llegar al bazo y al hígado por una ruta alternativa que no requiere invasión intestinal, siendo transportada directamente desde el lumen intestinal a estos órganos, a través de la circulación, por fagocitos que expresan CD18⁺, principalmente macrófagos y células dendríticas (Vazquez-Torres *et al.*, 1999; revisado en Sansonetti, 2002; McGhie *et al.*, 2009; Mastroeni *et al.*, 2009; Watson y Holden, 2010).

Por otra parte, se ha descrito un mecanismo de muerte más lenta en los macrófagos en el que parece estar implicados efectores del TTSS-2 como SpvB (Libby *et al.*, 2000) y SseL (Rytönen *et al.*, 2007).

5.1.1. Sistemas de secreción tipo III (TTSS).

Como se ha indicado previamente, *S. Typhimurium* presenta dos sistemas de secreción tipo III distintos codificados en las islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI-1 y SPI-2), TTSS-1 y TTSS-2, respectivamente. El TTSS-1 es necesario para la invasión de las células no fagocíticas y la inducción de la respuesta inflamatoria (Galan, 1996; Galyov *et al.*, 1997), mientras el TTSS-2 es inducido tras la invasión y es esencial para la supervivencia

y replicación dentro de los macrófagos, por lo que está implicado en el desarrollo de la infección sistémica (Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996; Kuhle y Hensel, 2004). Entre los dos sistemas se secretan más de 30 efectores distintos.

Los TTSS conocidos también como “inyectosomas” o “agujas moleculares” son estructuras muy conservadas formadas por más de 20 proteínas diferentes. Tres de estas proteínas componen el cuerpo basal, que abarca desde la membrana interna de la bacteria hasta la membrana externa, al que se le ancla una estructura en forma de aguja que contacta con la membrana de la célula hospedadora. Este contacto provoca la exportación a través del sistema de proteínas translocadoras, que forman un poro o translocón en la membrana eucariótica que permite el paso del resto de proteínas efectoras (revisado en Cornelis, 2006).

Las proteínas efectoras contienen una secuencia señal en su extremo amino terminal que dirige la translocación a través del sistema de secreción (Miao y Miller, 2000, Karavolos *et al.*, 2005). Además de esta secuencia, muchos efectores poseen un sitio de unión para una chaperona específica que estabiliza y dirige los sustratos hacia el sistema de secreción o evita la interacción prematura de los efectores con el TTSS, entre otras funciones. La mayoría de las chaperonas son específicas de un solo sustrato, aunque algunas de ellas pueden facilitar la secreción de más de una proteína. Antes de ser exportados, los efectores son liberados de las chaperonas mediante la acción de una ATPasa asociada al TTSS que además aporta la energía necesaria para la translocación (Akeda y Galan, 2005; Galan y Wolf-Watz, 2006; revisado en Wooldridge, 2009).

5.2. Invasión y colonización intratumoral.

La administración sistémica de la estirpe de *S. Typhimurium* VNP20009 (*msbB-purI xyl*) ha permitido observar *in vivo* que *Salmonella* migra desde los vasos sanguíneos al interior tumoral y se distribuye por todas las zonas de este durante las primeras 48 horas. A partir de ese momento, la bacteria se acumula preferentemente en la frontera entre la zona viable y la zona necrótica, conocida como zona de transición, donde residen las células quiescentes que normalmente limitan el éxito de los tratamientos quimioterapéuticos. La utilización de mutantes auxótrofos de *S. Typhimurium* de

arginina y leucina (Zhao *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006; Hoffman, 2009) y de purinas (Pawelek *et al.*, 1997; Ganai *et al.*, 2011) han demostrado la acumulación preferencial en tumores y metástasis, sugiriendo la existencia de un gradiente de moléculas que dirige la colonización (Ganai *et al.*, 2011). Además, mediante estudios *in vitro* se han caracterizado tres tipos de quimorreceptores, el receptor de aspartato (TAR), el receptor de serina (TSR) y el receptor de ribosa/galactosa (TRG). Ciertos trabajos proponen que la bacteria llega al tumor atraída por la presencia del aspartato que es excretado por las células tumorales. A continuación, migra desde la red vascular al interior del tumor por la presencia de serina y continúa hacia la zona necrótica, donde se concentran purinas y azúcares, especialmente ribosa y galactosa, procedentes de la degradación de los núcleos de las células muertas (Kasinskas y Forbes, 2007).

Por otro lado, algunos estudios sugieren que la invasión tumoral puede llevarse a cabo por un mecanismo pasivo debido a que la respuesta inflamatoria inducida por la infección incrementa el nivel de TNF- α y otras citoquinas que provocan la rotura de los vasos sanguíneos. El flujo masivo de sangre hacia el interior tumoral permitiría la entrada de las bacterias y la formación de zonas necróticas donde las bacterias proliferan (Leschner *et al.*, 2009).

5.3. El sistema inmune en el tumor.

Independientemente del mecanismo de invasión, las bacterias se concentran en las zonas hipóxicas y necróticas. Se cree que estas áreas con baja concentración de oxígeno y alta presión intersticial constituyen un refugio inmunológico donde se inhiben los sistemas de eliminación de bacterias (Ryan *et al.*, 2009). Sin embargo, las zonas viables quedan intactas a pesar de la capacidad de *Salmonella* para crecer en presencia de oxígeno. Esto se debe a que la infección bacteriana incrementa la necrosis e induce la entrada de neutrófilos que se establecen en las áreas que delimitan la zona necrótica y evitan la expansión de la bacteria hacia las zonas viables (Agrawal *et al.*, 2004; Westphal *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la supresión transitoria de los neutrófilos produce la eliminación completa de los tumores implantados en ratones tras la infección con *S. Typhimurium* ya que, en ausencia de neutrófilos, las bacterias pueden diseminarse por

todo el tejido tumoral (Westhpal *et al.*, 2008). Lo mismo ocurre si se infectan ratones inmunodeprimidos (Zhao *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006).

5.4. Efecto antitumoral de *Salmonella*.

El efecto antitumoral es el resultado de la combinación de varios mecanismos. La acumulación de *Salmonella* en el tumor induce una respuesta local inmune (Lee *et al.*, 2008) que se incrementa con la muerte de las células tumorales debido a la infección por la producción de proteínas citotóxicas translocadas al citosol a través del TTSS (Paesold *et al.*, 2002). La competencia por los nutrientes y la secreción de toxinas al medio extracelular contribuyen también a la regresión tumoral (Barak *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2005; Sznol *et al.*, 2000).

5.5. *Salmonella* como vector de producción de agentes terapéuticos.

La infección con *Salmonella* es suficiente, en muchos casos, para observar la regresión de tumores sólidos y metástasis en modelos animales (revisado en Forbes, 2010). Sin embargo, las zonas viables no infectadas acaban regenerando el tumor. Para incrementar la efectividad de *Salmonella* se están desarrollando distintas estrategias para utilizar la bacteria como vector dirigido de agentes terapéuticos que potencien el efecto antitumoral.

5.5.1. Sistemas enzima/prodroga.

El sistema enzima/prodroga se basa en la expresión de una proteína por la bacteria cuya actividad transforma un sustrato exógeno inocuo en un producto altamente tóxico para las células. *S. Typhimurium* se ha utilizado con varios de estos sistemas, entre los que se incluye el sistema timidina quinasa/ganciclovir y citosina deaminasa/5-fluorocitosina (5-FC). En el primer caso, la timidina quinasa del virus Herpes Simplex cataliza la fosforilación del ganciclovir, que actúa como análogo tóxico del nucleótido guanina, inhibiendo la síntesis de ADN e induciendo la muerte de las células. La administración conjunta de ganciclovir y la estirpe recombinante reduce el crecimiento de melanomas en ratones (Pawelek *et al.*, 1997). Resultados similares se

obtienen con la enzima citosina deaminasa de *E.coli*, que convierte la 5-FC en 5-fluorouracilo (5-FU) un metabolito muy tóxico que inhibe la timidilato sintasa, bloqueando la síntesis de ADN y ARN e induciendo la muerte de las células por apoptosis (King *et al.*, 2002; Nemunaitis *et al.*, 2003; Royo *et al.*, 2007). Los metabolitos tóxicos pueden difundir pasivamente (5-FU) o a través de las uniones intercelulares (ganciclovir fosforilado) a las células vecinas no infectadas, incrementando el efecto antitumoral. Este fenómeno se conoce como efecto *bystander*.

5.5.2. Toxinas bacterianas y otros agentes citotóxicos.

El potencial de las toxinas bacterianas como agentes antitumorales utilizando *S. Typhimurium* como vector dirigido se ha demostrado *in vivo* mediante la expresión de la citolisina A (ClyA o HlyE) de *E. coli* y *S. Typhimurium*. Esta proteína induce la apoptosis de las células por la formación de poros en las membranas y reduce el crecimiento tumoral en modelos animales (Ryan *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2010). El mismo efecto se obtiene con la colicina E3 de *E.coli* (Pawelek *et al.*, 2003) que degrada el ARN ribosómico 16S tanto de células procarióticas como eucarióticas. Para protegerse de la toxicidad, las bacterias que producen la colicina E3 expresan también la proteína de inmunidad, codificada en el gen *immE3*. Esta proteína se une al extremo con actividad ribonucleasa de la colicina E3 inactivándola (revisado en Lancaster *et al.*, 2007; Cascales *et al.*, 2007).

Además de las toxinas bacterianas, se han conseguido expresar agentes citotóxicos de origen eucariótico como la proteína TRAIL y el ligando FAS, que inducen la apoptosis de las células tumorales selectivamente e inhiben el crecimiento tumoral en ratones (Loeffler *et al.*, 2008; Ganai *et al.*, 2009).

5.5.3. Estimulación del sistema inmune.

S. Typhimurium se ha utilizado como vector para la expresión local de citoquinas, como la interleuquina 2 (IL-2), que inducen la infiltración de neutrófilos y otros leucocitos, inhiben el crecimiento de tumores y metástasis en modelos murinos y en algunos casos, previenen la formación del tumor (Feltis *et al.*, 2002; Loeffler *et al.*, 2008; Saltzman *et al.*, 1996; Sorenson *et al.*, 2008; Al-Ramadi *et al.*, 2009). Por otro lado,

mediante la expresión de antígenos específicos de tumores, se consigue la regresión del tumor por inducción de la respuesta inmune sistémica. En este caso no es necesario que se expresen dentro del tumor. Además, debido a la memoria inmunológica, pueden utilizarse como vacunas para prevenir la formación de tumores (revisado en Forbes, 2010).

5.5.4. Transferencia génica.

Salmonella puede transferir plásmidos que porten genes que codifican agentes terapéuticos bajo el control de promotores eucarióticos a las células tumorales, aunque se desconoce el mecanismo por el que esto ocurre. Hasta el momento, la transferencia de genes anti-angiogénicos, como la endostatina y la trombospondina 1 (Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005), genes que codifican proteínas que inducen apoptosis, como TRAIL y Smac (Fu *et al.*, 2008) y genes que expresan citoquinas, factores de crecimiento y antígenos tumorales han mostrado la regresión tumoral en modelos murinos (revisado en Forbes, 2010).

Por otro lado, *Salmonella* puede transferir plásmidos que codifican pequeños ARN interferentes específicos para silenciar determinados genes. Siguiendo esta estrategia, se han silenciado los genes que codifican la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Yang *et al.*, 2008) y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT-3) que promueve el crecimiento del tumor e inhibe la apoptosis (Zhang *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2012). En ambos casos se ha observado la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*, pero de forma transitoria. Esto se debe a que el ARN interferente no es capaz de bloquear totalmente la expresión génica, especialmente cuando el ARNm se expresa a niveles muy elevados (Elbashir *et al.*, 2002). Como solución, se sugiere el silenciamiento de varios genes o la combinación de estos ARN con la coexpresión de otros genes de interés. Se ha demostrado un efecto sinérgico en la regresión tumoral *in vivo* al expresar el ARN interferente específico para STAT-3 junto con su inhibidor de la transcripción (Zhang *et al.*, 2008). Resultados similares se obtienen al coexpresar el gen *p53* y el ARN interferente para el gen *mdm2* utilizando *S. enterica* serovar Typhi. Tanto la mutación de *p53* como su inactivación por la proteína MDM2 contribuyen a la formación de tumores,

por lo que la inhibición de MDM2, junto con la sobreexpresión de p53 WT, inhibe sinérgicamente el crecimiento de las células tumorales (Ji *et al.*, 2011).

5.6. Sistema de expresión regulado inducible por salicilato.

Para la utilización de salmonellas atenuadas como vectores de producción y administración dirigida de agentes antitumorales es necesario un sistema regulador de la expresión génica que permita controlar fielmente la producción de los agentes terapéuticos cuando la bacteria se encuentre en el interior del organismo. De esta forma se incrementa el efecto antitumoral a la vez que se reduce la toxicidad sistémica. En *Salmonella* se han utilizado distintos sistemas de expresión de este tipo, inducibles por L-arabinosa (Loessner *et al.*, 2007), salicilato (Royo *et al.*, 2007) o irradiación γ (Ganai *et al.*, 2009).

El sistema de expresión en cascada transcripcional descrito por Royo *et al.*, desarrollado en nuestro grupo y recientemente mejorado, permite la expresión de proteínas terapéuticas por *S. Typhimurium* en respuesta a ácido acetil salicílico (ASA), el componente activo de la aspirina (Cebolla *et al.*, 2002; Royo *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2011), uno de los fármacos analgésicos y antiinflamatorios más utilizados y mejor caracterizado del mercado (Hennekens, 2002). Este sistema de expresión en cascada se basa en el efecto activador del salicilato sobre dos activadores transcripcionales derivados de *Pseudomonas putida*; NahR, proveniente del plásmido de degradación de naftaleno pNAH7, y XylS2, una variante mutante de XylS, activador proveniente del plásmido de degradación de tolueno/xileno pWW0. Los dos reguladores responden a salicilato y la unión de salicilato a NahR o XylS2 activa la expresión de los genes controlados por los promotores *Psal* o *Pm*, respectivamente (Cebolla *et al.*, 2001; Cebolla *et al.*, 2002). El sistema en cascada consiste en un módulo regulador que combina *nahR* con *xylS2* bajo el control del promotor *Psal*, cuya transcripción es activada por NahR. El gen de interés se encuentra inserto en un módulo de expresión independiente y bajo el control del promotor *Pm*, cuya transcripción es activada por XylS2 (Figura 7). En ausencia de salicilato, o ASA, tanto NahR como XylS2 están inactivos, generando unos niveles de expresión basales a partir de *Pm* muy bajos. La presencia de salicilato activa

fuertemente la expresión del gen de interés de dos formas, en primer lugar, uniéndose a NahR para inducir la transcripción de *Psal-xylS2*, y a continuación, activando a su vez a XylS2 para inducir la transcripción desde Pm. Este circuito regulador se ha usado con éxito en *Salmonella* para controlar la expresión del gen de la citosina deaminasa en ratones con tumores implantados, observándose una reducción del crecimiento tumoral tras la inducción con ASA y la administración posterior del sustrato 5-FC (Royo *et al.*, 2007).

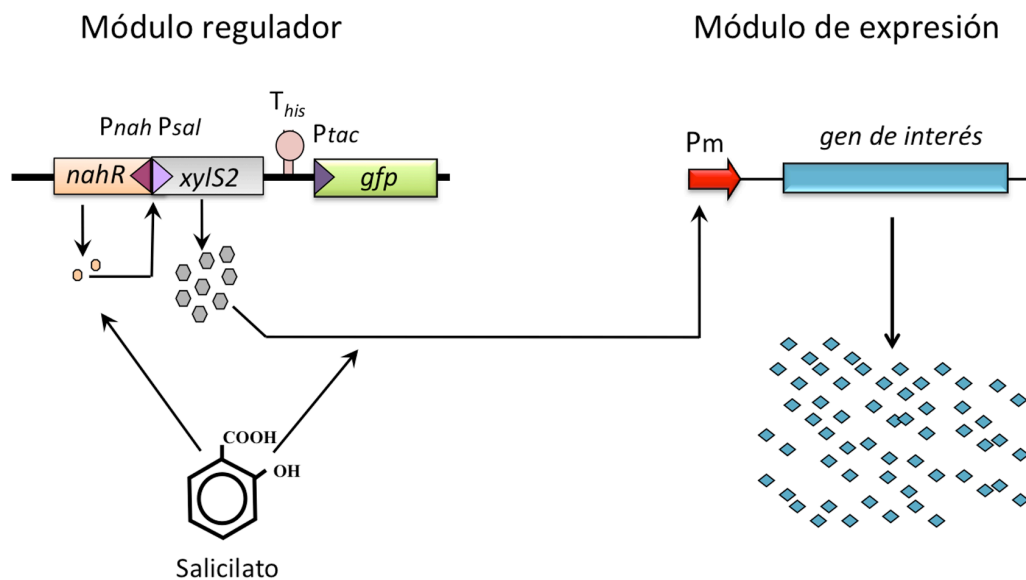


Figura 7. Esquema del sistema de expresión en cascada transcripcional inducible por salicilato. La inducción por salicilato de los dos módulos, el regulador y el de expresión, conlleva un aumento sinérgico de la expresión del gen de interés.

Recientemente, a este sistema se le ha incorporado un circuito regulador adicional que consiste en dos elementos de *Klebsiella oxytoca* implicados en la asimilación de nitrato: *nasF*, un atenuador transcripcional y *nasR*, que codifica la correspondiente proteína antiterminadora que evita la terminación transcripcional de *nasF* en presencia de nitrato o nitrito (Wu *et al.*, 1999). La incorporación de *nasF* en el módulo de expresión, corriente abajo de Pm, reduce los niveles de transcripción basales del módulo de expresión (Royo *et al.*, 2005). El otro elemento, *nasR*, se ha incluido en el módulo regulador integrado en el cromosoma de *Salmonella* bajo el control de *Psal* (Figura 8). Esto hace que, tras la adición de salicilato, se induzca la expresión desde el promotor Pm por la acción de NahR y XylS2 a la vez que NasR evita la terminación de la transcripción por *nasF*. Esta configuración permite inducir de forma específica la producción de

proteínas altamente tóxicas como la colicina E3 durante la infección de *Salmonella* (Medina *et al.*, 2011). Se han construido, por tanto, dos versiones del módulo regulador, con o sin NasR, dependiendo de la necesidad de reducir los niveles de expresión basales.

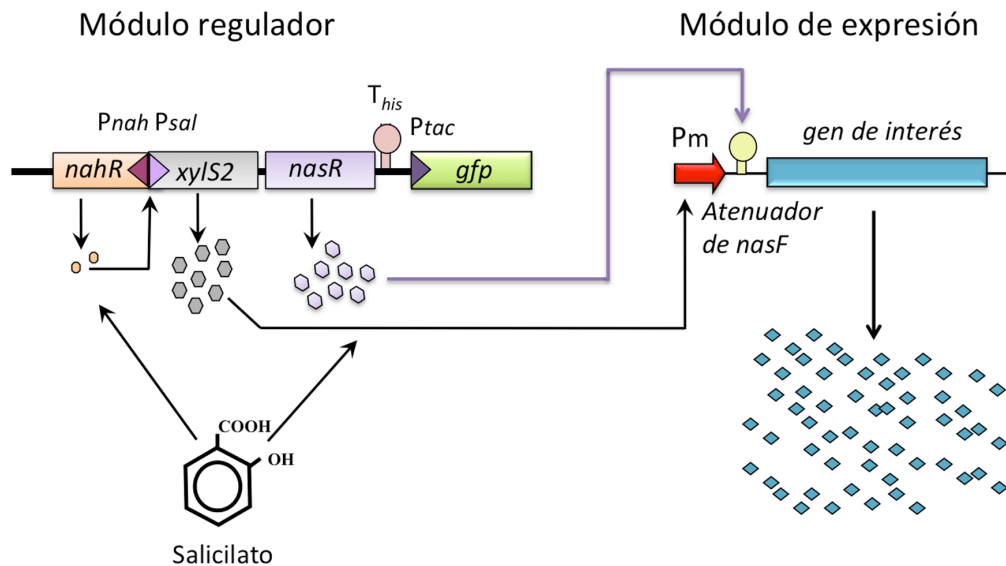


Figura 8. Sistema de expresión en cascada inducible por salicilato con los elementos *nasR* y el atenuador *nasF*. Estos elementos están incluidos en el módulo regulador y el módulo de expresión, respectivamente.

Los dos tipos de módulos reguladores incluyen el gen *gfp* bajo el control de un promotor constitutivo para la detección de la bacteria en el interior de la célula eucariótica y poder monitorizar la infección mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. En ambos casos, el módulo regulador está integrado en el locus *trg* del cromosoma de *S. Typhimurium*. Mutantes en este gen no parecen estar afectados en virulencia (Segura *et al.*, 2004) y podrían favorecer la acumulación preferencial de la bacteria en la zona de transición del tumor (Kasinskas y Forbes, 2007).

OBJETIVOS

La eficacia de *Salmonella* en la regresión del crecimiento de tumores sólidos y metástasis ha sido ampliamente demostrada en modelos animales, sin embargo, para su aplicación clínica es necesario, entre cosas, potenciar su efecto antitumoral. Con este fin se están llevando a cabo distintas aproximaciones mediante la utilización de *Salmonella* como vector dirigido de agentes terapéuticos.

El propósito general de esta Tesis ha sido optimizar el sistema de expresión inducible por salicilato descrito por Royo *et al.* (Royo *et al.* , 2007) para incrementar la producción controlada de agentes antitumorales ya empleados y la utilización de *S. Typhimurium* como herramienta para evaluar el potencial citotóxico de nuevas proteínas en células tumorales. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Modificar el módulo de expresión del sistema en cascada transcripcional inducible por salicilato para obtener distintos niveles de inducción de la producción de proteínas de interés en el interior de las células eucarióticas.
2. Optimizar la producción de la enzima citosina deaminasa utilizando los vectores de expresión mejorados y un mutante de *S. Typhimurium* resistente a 5-FU.
3. Desarrollar una estrategia para analizar el efecto de proteínas específicas producidas de forma controlada por *S. Typhimurium* en la fisiología de células eucarióticas.
4. Estudiar el efecto de la producción regulada de SpvB en células eucarióticas para su posible uso como agente antitumoral.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1. Estirpes bacterianas y plásmidos.

Todas las estirpes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Escherichia coli* utilizadas en esta tesis se incluyen en la Tabla 1. Las estirpes de *S. Typhimurium* derivan del tipo silvestre 14028.

Tabla 1. Estirpes bacterianas.

Estirpe	Características relevantes	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk \cdot mk $^+$) supE44 thi-1 gyrA relA1.	Hanahan, 1983
GM119	F $^-$ dam $^-$ 3 dcm $^-$ 6 metBI galK2 galT22 lacY1 tsx-78 supE44	Marinus y Morris, 1973
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium		
14028	Estirpe silvestre	Fields <i>et al.</i> , 1986
MPO36	14028 Δ spvB::Kan r	Esta tesis
MPO37	14028 Δ aroA::Kan r	Esta tesis
MPO39	14028 Δ purD::Kan r	Esta tesis
MPO94	14028 Δ trg:: Cm r :: (nahR/Psal-xylS2 /Ptac-gfp)	Medina <i>et al.</i> , 2011
MPO95	14028 Δ trg:: (nahR/Psal-xylS2 /Ptac-gfp)	Esta tesis
MPO96	14028 Δ trg::Kan r :: (nahR/Psal-xylS2-nasR/Ptac-gfp)	Medina <i>et al.</i> , 2011
MPO97	14028 Δ trg:: (nahR/Psal-xylS2-nasR/Ptac-gfp)	Esta tesis
MPO98	MPO95 Δ spvB::Kan r	Esta tesis
MPO301	MPO95 Δ purD::Kan r	Esta tesis
MPO302	MPO95 Δ spvB	Esta tesis
MPO305	MPO95 Δ purD	Esta tesis
MPO323	MPO95 Δ upp::Cm r	Esta tesis
MPO325	MPO95 Δ spvB Δ purD::Kan r	Esta tesis
MPO346	MPO97 Δ siiE::Kan r	Esta tesis
MPO357	14028 Δ siiE::Kan r	Esta tesis
MPO370	MPO97 Δ siiE	Esta tesis
MPO372	MPO97 Δ siiE Δ aroA::Kan r	Esta tesis

Los plásmidos utilizados en esta tesis se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos.

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pKD3	Cm ^r , Ap ^r	Datsenko y Wanner, 2000
pKD4	Kan ^r	Datsenko y Wanner, 2000
pKD46	Ap ^r , Ts.	Datsenko y Wanner, 2000
pMPO16	Ap ^r . Vector derivado de pCAS con fusión Pm- <i>codA</i> de <i>E.coli</i> K12.	Royo <i>et al.</i> , 2007
pMPO20	Ap ^r . Eliminación del sitio <i>NdeI</i> por digestión con esta enzima y rellenado con Klenow. Vector de bajo número de copias derivado de pMPO77 sin diana <i>NdeI</i> .	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO27	Ap ^r . Vector de expresión de alto número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- atenuador <i>nasF</i> ::MCS. Origen de replicación ColE1.	Royo <i>et al.</i> , 2005
pMPO51	Ap ^r . Eliminación del atenuador <i>nasF</i> por digestión con <i>EcoRI</i> de pMPO57. Vector de expresión de alto número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- MCSII. Origen de replicación ColE1.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO52	Ap ^r . Eliminación del atenuador <i>nasF</i> por digestión con <i>EcoRI</i> de pMPO58. Vector de expresión de alto número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- SDT7- MCSII. Origen de replicación ColE1.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO53	Ap ^r . Amplificación de la secuencia del péptido señal de <i>sspH2</i> de <i>Salmonella</i> 14028 usando los cebadores <i>sspH2</i> -1 y <i>sspH2</i> -3, y clonación en <i>NdeI</i> - <i>PstI</i> de pMPO52. Vector de expresión de alto número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- SDT7- MCSII- péptido señal de <i>sspH2</i> . Origen de replicación ColE1.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO54	Ap ^r . Fragmento <i>NotI</i> - <i>HindIII</i> de pMPO51 clonado en <i>NotI</i> - <i>HindIII</i> de pMPO20. Vector de expresión de bajo número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm-MCSII. Origen de replicación M13.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO55	Ap ^r . Fragmento <i>NotI</i> - <i>HindIII</i> de pMPO52 clonado en <i>NotI</i> - <i>HindIII</i> de pMPO20. Vector de expresión de bajo número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- SDT7- MCSII. Origen de replicación M13.	Medina <i>et al.</i> , 2011

pMPO56	Ap ^r . Amplificación de la secuencia del péptido señal de <i>sspH2</i> de <i>Salmonella</i> 14028 usando los cebadores <i>sspH2-1</i> y <i>sspH2-3</i> , y clonación en <i>NdeI-PstI</i> de pMPO55. Vector de expresión de bajo número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm-SDT7- MCSII- péptido señal de <i>sspH2</i> . Origen de replicación M13.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO57	Ap ^r . Eliminación de las dianas <i>SacI</i> y <i>KpnI</i> , y ligación del fragmento MCSII de 73 pb, obtenido por alineamiento de los oligonucleótidos MCS+ y MCS-, digerido con <i>SmaI-HindIII</i> clonado en pMPO27 <i>SmaI-HindIII</i> . Vector de expresión de alto número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- atenuador <i>nasF</i> - MCSII. Origen de replicación ColE1.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO58	Ap ^r . Alineamiento de los oligonucleótidos SDpT7-7+ y SDpT7-7- clonado en <i>SmaI-NdeI</i> de pMPO57. Vector de expresión de alto número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- atenuador <i>nasF</i> - secuencia SD T7- MCSII. Origen de replicación ColE1.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO59	Ap ^r . Amplificación de la secuencia del péptido señal de <i>sspH2</i> de <i>Salmonella</i> 14028 usando los cebadores <i>sspH2-1</i> y <i>sspH2-3</i> , y clonación en <i>NdeI-PstI</i> de pMPO58. Vector de expresión de alto número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- atenuador <i>nasF</i> - SDT7- MCSII- péptido señal de <i>sspH2</i> . Origen de replicación ColE1.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO60	Ap ^r . Fragmento <i>NotI-HindIII</i> de pMPO57 clonado en <i>NotI-HindIII</i> de pMPO20. Vector de expresión de bajo número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- atenuador <i>nasF</i> - MCSII. Origen de replicación M13.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO61	Ap ^r . Fragmento <i>NotI-HindIII</i> de pMPO58 clonado en <i>NotI-HindIII</i> de pMPO20. Vector de expresión de bajo número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- atenuador <i>nasF</i> - SDT7- MCSII. Origen de replicación M13.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO62	Ap ^r . Amplificación de la secuencia del péptido señal de <i>sspH2</i> de <i>Salmonella</i> 14028 usando los cebadores <i>sspH2-1</i> y <i>sspH2-3</i> , y clonación en <i>NdeI-PstI</i> de pMPO61. Vector de expresión de bajo número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- atenuador <i>nasF</i> - SDT7- MCSII- péptido señal de <i>sspH2</i> . Origen de replicación M13.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO72	Ap ^r . Amplificación de ADN complementario* de la secuencia de p53 humano (1182 nucleótidos) con los oligonucleótidos p53F3 y p53R3, y digestión con <i>EcoRV-SalI</i> , clonado en pMPO53 <i>EcoRV-SalI</i> . Vector de alto número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- SDT7- MCSII- péptido señal de	Esta tesis

sspH2- secuencia p53 completa.

pMPO73	Ap ^r . Amplificación de ADN complementario* del extremo C-terminal de p53 humano (63 nucleótidos) con los oligonucleótidos p53F4 y Cp53tagR, y digestión con <i>EcoRV-SalI</i> , clonado en pMPO53 <i>EcoRV-SalI</i> . Vector de alto número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- SDT7- MCSII- péptido señal de <i>sspH2</i> - Cp53.	Esta tesis
pMPO77	Ap ^r . Eliminación del promotor <i>Plac</i> por digestión <i>SacI-PshAI</i> y religación de los extremos romos generados por la ADN polimerasa T4, y del fragmento <i>KpnI-ClaI</i> del MCS original del pWSK29. Vector de bajo número de copias que contiene un MCS modificado.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO88	Ap ^r . Secuencia de <i>codA</i> de <i>E. coli</i> modificada en el codón de inicio, amplificada con los cebadores F-CID-TG y R-CID clonado en <i>NdeI</i> (rellenado con Klenow) de pMPO52.	Esta tesis
pMPO90	Ap ^r . Fragmento <i>NotI-HindIII</i> de pMPO88 clonado en <i>NotI-HindIII</i> de pMPO77. Vector de expresión de bajo número de copias con Pm- SDT7- <i>codA</i> modificado.	Esta tesis
pMPO94	Ap ^r . Clonación de la fusión <i>cat::lacZ</i> de pMP220 en pMPO57. Vector de expresión de alto número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- atenuador <i>nasF</i> -MCSII- <i>cat::lacZ</i> . Origen de replicación Cole1.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO96	Ap ^r . Clonación de la fusión <i>cat::lacZ</i> de pMP220 en pMPO51. Vector de expresión de alto número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- MCSII- <i>cat::lacZ</i> . Origen de replicación Cole1.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO200	Ap ^r . Vector de fusión traduccional <i>lacZ</i> derivado de pBBR1MCS-4.	Garcia-Gonzalez <i>et al.</i> , 2005
pMPO1000	Ap ^r . Fragmento <i>NotI-HindIII</i> de pMPO94 clonado en <i>NotI-HindIII</i> de pMPO20. Vector de expresión de bajo número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- atenuador <i>nasF</i> - MCSII- <i>cat::lacZ</i> . Origen de replicación M13.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO1001	Ap ^r . Fragmento <i>NotI-HindIII</i> de pMPO96 clonado en <i>NotI-HindIII</i> de pMPO20. Vector de expresión de bajo número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm - MCSII- <i>cat::lacZ</i> . Origen de replicación M13.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO1004	Ap ^r . Doble secuencia de HA obtenida por alineamiento de los oligonucleótidos Sal-HA-Hind+ y Sal-HA-Hind-, clonada en <i>SalI-HindIII</i> de pMPO53. Vector de expresión de alto número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- SDT7- MCSII- péptido	Medina <i>et al.</i> , 2011

	señal <i>sspH2</i> – 2 epítomos HA. Origen de replicación ColE1.	
pMPO1005	Ap ^r . Fusión <i>lacZ</i> de pMPO200 en <i>NdeI</i> de pMPO52. Vector de expresión de alto número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm-SDT7- MCSII- <i>lacZ</i> . Origen de replicación ColE1.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO1006	Ap ^r . Fragmento <i>NotI-HindIII</i> de pMPO1005 clonado en <i>NotI-HindIII</i> de pMPO20. Vector de expresión de bajo número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- SDT7- MCSII- <i>lacZ</i> . Origen de replicación M13.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO1007	Ap ^r . Fusión <i>lacZ</i> de pMPO200 en fase en <i>NdeI</i> de pMPO58. Vector de expresión de alto número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- atenuador <i>nasF</i> - secuencia SDT7- MCSII- <i>lacZ</i> . Origen de replicación ColE1.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO1008	Ap ^r . Fragmento <i>NotI-HindIII</i> de pMPO1007 clonado en <i>NotI-HindIII</i> de pMPO20. Vector de expresión de bajo número de copias con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- atenuador <i>nasF</i> - SDT7- MCSII- <i>lacZ</i> . Origen de replicación M13.	Medina <i>et al.</i> , 2011
pMPO1016	Ap ^r . Alineamiento de los oligonucleótidos SHAC1F y SHAC1R, clonado en pMPO72 digerido con <i>PstI</i> (parcialmente) y <i>EcoRV</i> . Vector de expresión con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- SDT7- MCSII- péptido señal de <i>sspH2</i> - 2HA- secuencia p53 completa. Origen de replicación ColE1.	Esta tesis
pMPO1017	Ap ^r . Alineamiento de los oligonucleótidos SHAC1F y SHAC1R, clonado en pMPO73 digerido con <i>PstI</i> (parcialmente) y <i>EcoRV</i> . Vector de expresión con <i>rrnBT1T2</i> - Pm- SDT7- MCSII- péptido señal de <i>sspH2</i> - 2HA- secuencia Cp53. Origen de replicación ColE1.	Esta tesis
pMPO1036	Ap ^r . Fragmento <i>NdeI-EcoRV</i> del producto de amplificación mediante PCR del gen de <i>spvB</i> de <i>Salmonella</i> 14028 con los cebadores <i>spvB</i> F1 y <i>spvB</i> R1, clonado en <i>NdeI-EcoRV</i> de pMPO52. Vector de expresión de alto número de copias Pm-SDT7- <i>spvB</i> .	Esta tesis
pMPO1044	Ap ^r . Fragmento <i>SmaI-SalI</i> de pMPO1036 clonado en <i>SmaI-SalI</i> de pMPO60. Vector de expresión de bajo número de copias con Pm- atenuador <i>nasF</i> - SDT7- <i>spvB</i> .	Esta tesis
pMPO1045	Ap ^r . Fragmento <i>SmaI-BclI</i> del producto de la amplificación mediante PCR recurrente de la secuencia de 50 pb que precede al gen <i>spvB</i> junto con la secuencia del gen <i>spvB</i> de <i>Salmonella</i> 14028, con los cebadores SD <i>spvB</i> F2 y SD <i>spvB</i> R2, clonado en <i>SmaI-BclI</i> de pMPO1044. Vector de expresión de	Esta tesis

	bajo número de copias Pm- atenuador <i>nasF</i> - <i>SDspvB</i> - <i>spvB</i> .	
pMPO1088	Ap ^r . Fragmento <i>NotI</i> - <i>HindIII</i> de pMPO16 clonado en <i>NotI</i> - <i>HindIII</i> de pMPO20. Vector de expresión de bajo número de copias con Pm- <i>codA</i> de <i>E.coli</i> K12.	Esta tesis
pMP220	Tet ^r . Vector para fusiones <i>cat</i> - <i>lacZ</i> .	Spaink <i>et al.</i> , 1987
pWSK29	Ap ^r . Vector de clonación de bajo número de copias	Wang y Kushner, 1991

*cedido por Bert Vogelstein.

1.2. Bacteriófagos.

Como bacteriófago transductor se usó P22 HT105/1 *int201* (Schmieger, 1972). Para los ensayos de sensibilidad a P22 se usó el derivado no lisogénico H5, que tiene una mutación en el gen *c2*.

1.3. Líneas celulares tumorales.

Las características de las líneas celulares tumorales utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Líneas celulares tumorales.

Línea celular	Descripción	Fuente
F1A11	Línea celular derivada de un fibrosarcoma de ratón (estirpe BALB/c).	Paglia <i>et al.</i> , 1998
HCT116	Línea celular epitelial derivada de un carcinoma colorrectal humano.	D. Tuveson
HeLa	Línea celular epitelial derivada de un adenocarcinoma cervical humano.	J. Casadesús
HeLa Kyoto H2B-mCherry mEGFP- α -tubulina	Línea HeLa Kyoto que expresan establemente la histona H2B marcada con mCherry y la α -tubulina con mEGFP.	D. Gerlich
MCF-7	Línea celular epitelial humana derivada de un adenocarcinoma de mama. No expresa caspasa-3.	A. López- Rivas
MDA-MB-231	Línea celular epitelial humana derivada de un adenocarcinoma de mama. Presenta una mutación puntual en el aminoácido 280 en la	A. López-Rivas

	secuencia del gen <i>p53</i> .	
PANC-1/P8.5	Línea celular epitelial humana derivada de un adenocarcinoma pancreático ductal. Presenta una mutación puntual en el aminoácido 273 en la secuencia del gen <i>p53</i> .	D. Tuveson

2. MEDIOS, CONDICIONES DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN.

2.1. Medios, condiciones de cultivo y conservación de bacterias.

El medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) se utilizó como medio rico tanto en cultivos líquidos como sólidos. Cuando fue necesario, y para asegurar el mantenimiento de plásmidos, se añadieron los siguientes antibióticos: ampicilina (Ap) a 100 µg/ml, kanamicina (Kan) a 50 µg/ml o cloranfenicol (Cm) a 15 µg/ml.

Medio LB: Bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l.

(Añadir agar 15 g/l para medio sólido). Autoclavar.

Como medio mínimo se usó el medio E (Vogel y Bonner, 1956) que se preparó como una solución de sales concentrada 50 veces (Ex50), esterilizada con cloroformo. Los suplementos se añadieron a las concentraciones descritas por Maloy (Maloy, 1990).

Medio Ex50: 1,4 g MgSO₄ anhidro, 30 g ácido cítrico (granular), 196 g K₂HPO₄ 3H₂O (150 anhidro), 52 g NaNH₄HPO₄ 4H₂O. Calentar 150 ml (sin hervir) y disolver las sales una a una, agitando. Llevar a 300 ml con agua destilada. Enfriar. Añadir 5 ml de cloroformo.

Medio Ex1: 100 ml de agua o agar-agua (medio sólido), 2 ml Ex50 y 400 µl glucosa 50%.

Agar-agua: 20 g/l agar noble (DIFCO™).

En general, los cultivos bacterianos se realizaron a una temperatura de 37°C con agitación suave (180 rpm).

2.1.1. Conservación de estirpes bacterianas y plásmidos.

Las estirpes y plásmidos se conservaron a corto plazo a 4°C en placas de LB sólido. Para su conservación a largo plazo se congelaron a -80°C en LB líquido con glicerol al 15 % (v/v).

2.2. Medios y condiciones de cultivo de líneas celulares.

Las líneas tumorales se cultivaron en un incubador Biotech Galaxy R⁺ a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5 % de CO₂. Las células se mantuvieron en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, D6545 Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (previa inactivación del complemento), L-glutamina 2 mM y una mezcla de los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml). En los experimentos de infección con *Salmonella* no se añadieron antibióticos al medio.

Las células, todas adherentes, se cultivaron en cajas de 10 cm de diámetro con 10 ml de medio de cultivo, o en cajas multipocillos de 6 ó 24 pocillos, con 4 ml ó 1 ml de medio por pocillo, respectivamente. Las células se subcultivaron 3 veces por semana en medio fresco, evitando su confluencia. Para ello, se retiró el medio de cultivo y se lavaron dos veces con tampón fosfato salino 1x (PBS 1x). A continuación, se añadió la décima parte del volumen del medio de cultivo de una solución estéril de tripsina al 0,25% en PBS 1x y se incubaron a 37°C entre 3-10 minutos, según la línea celular. Una vez despegadas, la reacción de la tripsina se neutralizó añadiendo 10 volúmenes de medio de cultivo y se pasaron a nuevas cajas realizando la dilución adecuada.

Inactivación del complemento del suero: descongelar el suero en un baño a 37°C y posteriormente calentarlo a 56°C durante 30 minutos.

PBS 10x: NaCl 80 g/l, KCl 2,01 g/l, Na₂HPO₄ 14,2 g/l, KH₂PO₄ 2,72 g/l. Ajustar a pH 7,4.

Autoclavar.

2.2.1. Congelación y descongelación de líneas celulares.

Para la conservación de las líneas celulares a largo plazo se recogieron 5x10⁶ células adherentes por vial de congelación. Tras centrifugar durante 10 minutos a 1.000 rpm, el precipitado de las células se resuspendió en 1 ml de medio de congelación y el vial se mantuvo 2 h a -20°C, 24 h a -80°C y, finalmente, se guardó en una atmósfera de nitrógeno líquido hasta el momento de su descongelación.

Para la descongelación de las células, los viales se incubaron a 37°C. Seguidamente las células se diluyeron en 10 ml de medio y se centrifugaron durante 10 minutos a 1.000 rpm. A continuación el precipitado celular se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo con antibióticos que se depositaron en una caja de cultivo.

Medio de congelación: 10% de DMSO y 90% de suero fetal bovino. Conservar a -20°C.

2.3. Soluciones y otros compuestos químicos utilizados.

- **5-Fluorouracilo** (5-FU, F6627 Sigma-Aldrich). El stock (15,37 mM) se preparó a 2 mg/ml en 10 ml de DMSO y se conservó a 4°C en oscuridad.
- **5-Fluorocitosina** (5-FC, F7129 Sigma-Aldrich). El stock (100 mM) se preparó con 13 mg/ml en 10 ml de agua bidestilada, se filtró y conservó a 4°C en oscuridad. A partir de este, se hicieron stocks de 10 y 1 mM diluyendo en agua bidestilada.
- **Salicilato sódico** (S3007 Sigma-Aldrich). El stock (1M) se preparó a 160,1 mg/ml en 100 ml de agua bidestilada. Se filtró y se alicuotó en volúmenes de 10 ml. Los alícuotas se almacenaron a 4°C en oscuridad.
- **Adenina hemisulfato** (A9126 Sigma-Aldrich). El stock (73,30 mM) se preparó a 13,5 mg/ml en 10 ml de HCl 0,1N. Se filtró y se guardó a 4°C. Dado que precipita en frío, es necesario calentarlo a 50°C antes de usarlo para disolverlo.
- **Aromix:** se prepara a partir de los stocks de:
 - **p-aminobenzoato** (PABA) al 0,06% (p/v) filtrado y conservado a 4°C en oscuridad. Se añadieron 500 µl del stock por cada 100 ml de medio.
 - **2-3 dihidrobenzoato** (DHBA) al 0,06% (p/v) filtrado y conservado a 4°C. Se añadieron 500 µl del stock por cada 100 ml de medio.
 - **L-Tirosina** (L-Tyr) al 0,36 % (p/v) en NaOH 1 N, filtrado y conservado en oscuridad. Se añadieron 500 µl del stock por cada 100 ml de medio.
 - **L-Triptófano** (L-Trp) al 0,41% (p/v), filtrado y conservado en oscuridad. Se añadieron 500 µl del stock por cada 100 ml de medio.
 - **p-hidroxibenzoato** a 10 mM, filtrado. Se añadieron 10 µl del stock por cada 100 ml de medio.
 - **fenilalanina** (Phe) al 0,99 % (p/v). Se añadieron 500 µl del stock por cada 100 ml de medio.
- **Latrunculin A** (L5163-Sigma-Adrich). El stock (2,37 M) se preparó diluyendo 100 µg en 1 ml de etanol. También es soluble en DMSO.

- **Estaurosporina** (STS, S4400, Sigma-Aldrich). El stock (1 mM) se preparó en 1 ml de DMSO. Se conservó a -20°C en oscuridad.
- **Hoechst** (Bisbenzimidazoles 33258, B2883, Sigma-Aldrich). El stock (1mg/ml) se preparó en agua bidestilada, se filtró, alicuotó y guardó en oscuridad a 20°C.
- **Yoduro de propidio** (IP, 4170, Sigma-Aldrich). El stock (0,5 mg/ml) se preparó en agua bidestilada. Se alicuotó y guardó en oscuridad a -20°C.

3. MANIPULACIÓN Y TRANSFERENCIA DEL ADN.

3.1. Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli*.

Para extraer ADN plasmídico de *E. coli* DH5 α se siguió el protocolo simplificado de lisis alcalina (Stephen *et al.*, 1990). La biomasa de 3 ml de un cultivo saturado se recogió por centrifugación a 13.000 rpm durante 30 segundos. El sedimento se resuspendió en 100 μ l de solución I (GTE) y se incubó durante 5 minutos en hielo. A continuación, se lisó con 200 μ l de solución II recién preparada, y tras mezclar por inversión varias veces, se incubó 5 minutos en hielo. Luego, se neutralizó con 150 μ l de la solución III, se mezcló por inversión varias veces, y se incubó durante al menos otros 5 minutos en hielo. Los restos celulares se eliminaron por sedimentación centrifugando durante 10 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y el ADN fue precipitado añadiendo igual volumen (~450 μ l) de etanol al 96% (v/v) a -20°C, centrifugando inmediatamente durante 10 minutos a 13.000 rpm. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70% (v/v) a -20°C, y se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm. Dicho precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 25 ó 50 μ l de TER dependiendo del número de copias del plásmido por célula. Las preparaciones de plásmidos se almacenaron a -20°C.

Solución I (GTE): glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.

Solución II: NaOH 0,2 N, SDS 1% (p/v).

Solución III: acetato potásico 3 M ajustado a pH 4,8 con ácido fórmico.

TER: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, ribonucleasa 0,02 % (p/v).

Alternativamente, para la obtención de ADN plasmídico de alta calidad para secuenciación u otras aplicaciones que requerían mayor grado de pureza, se utilizó el kit Nucleospin® Plasmid (Macherey-Nagel).

3.2. Generación de fragmentos de ADN.

3.2.1. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cuando fue necesario amplificar fragmentos de ADN para su posterior clonación, se realizaron reacciones de PCR utilizando el ADN correspondiente como molde. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l en tubos de 0,2 ml en presencia de 2,5 unidades de ADN polimerasa termorresistente de alta fidelidad, *Expand High Fidelity Plus* (Roche) o *i-pfu DNA Polymerase* (Intron biotechnology), en el tampón con $MgCl_2$ que suministra la casa comercial. Con la primera enzima, se utilizaron los oligonucleótidos adecuados a una concentración de 1 μ M y los dNTPs a 200 μ M de concentración final. En el caso de utilizar la *i-pfu*, añadimos 0,2 μ M de oligonucleótidos y dNTPs a 800 μ M. Como molde se usaron 0,5 ng de ADN plasmídico.

El programa de PCR del termociclador varió en función del tamaño del fragmento a amplificar, pero en líneas generales consistió en un primer paso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C. A continuación, 35 ciclos con 3 etapas: 30 segundos a 94°C (desnaturalización), seguida de 30 segundos a temperatura variable en función de la temperatura de desnaturalización (T_m) de los oligonucleótidos (etapa de hibridación) y por último la etapa de extensión a 72°C que consistió en 60 segundos por kilobase de ADN a amplificar. Finalmente, 5-7 minutos de extensión final a 72°C.

3.2.2. Asociación de oligonucleótidos complementarios.

Para obtener fragmentos pequeños de ADN de los que no se disponía de un molde con la secuencia para ser amplificada, se diseñaron oligonucleótidos que contenían la secuencia de interés flanqueada por las dianas de restricción necesarias para su clonación posterior en el vector adecuado. La mezcla de reacción consistió en 9 μ l de cada oligonucleótido a 10 μ M y 2 μ l del tampón de asociación.

La asociación se llevó a cabo en el termociclador con una primera etapa a 94°C durante 10 minutos seguida de una bajada progresiva de la temperatura a un grado por minuto durante 18 ciclos.

Tampón de asociación: Tris-HCl 20 mM pH 7.4, MgCl₂ 2 mM, NaCl 50 mM.

3.2.3. PCR recurrente.

Para la obtención de determinados fragmentos de ADN de gran tamaño se utilizó la técnica descrita por Prodromou (Prodromou y Pearl, 1992). Esta técnica consiste en amplificar una secuencia a partir de oligonucleótidos solapantes, de modo que cada cebador sirve de molde al oligonucleótido con el que se alinea (Figura 9). Para ello, se diseñaron oligonucleótidos de entre 50-80 pb de longitud con un mínimo de 20 pb de solapamiento, y se utilizaron los oligonucleótidos externos correspondientes a las secuencias flanqueantes del fragmento 100 veces más concentrados que los internos (0,01 μM).

A la mezcla de reacción se le añadieron además 200 μM de dNTPs y 2.5 unidades de *Expand High Fidelity Plus* (Roche) en el tampón con MgCl₂ que suministra la casa comercial.

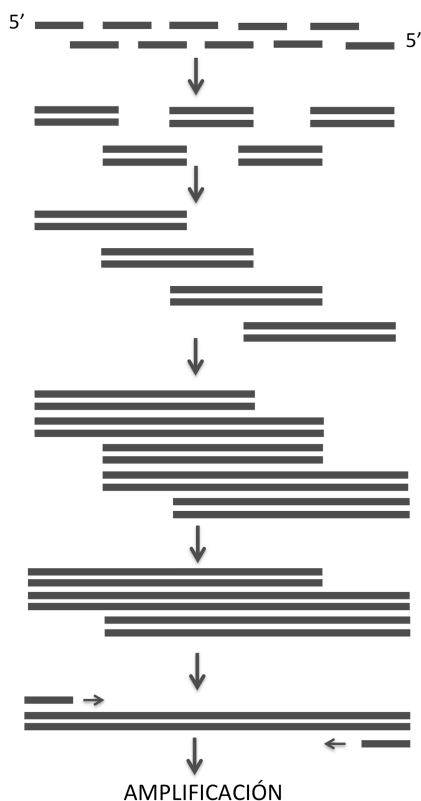


Figura 9. Esquema de PCR recurrente para sintetizar fragmentos de ADN. (Prodromou y Pearl, 1992)

3.2.4. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación y secuenciación fueron sintetizados por Sigma-Aldrich. Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos.

Oligonucleótido/uso	Secuencia 5'-3'
Modificación del vector de expresión	
MCS+	GTT <u>CACCCGGGC</u> ATATGGCAAGAACTGCAGATATCCATGGTAC CGAGCTCGGATCCGTCGAC <u>AAGCTT</u> ACTTG
MCS-	CAAGT <u>AAGCTT</u> GTCGACGGATCCGAGCTCGGTACCATGGATAT CTGCAGTTCTTGCCATATG <u>CCCCGGT</u> GAAAC
SD-pT7-7+	GGGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACA
SD-pT7-7-	TATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCCC
sspH2-1	GATATACATATGCCCTTTCATATTGGAAG
sspH2-3	TATACTGCAGCCCGGATGCCCTTC
Construcción de pMPO72	
p53F3	AATGCGATATCCATGGAGGAGCCG
p53R3	TAGCTGTCGACTCAGTCTGAGTC
Construcción de pMPO73	
p53F4	AATGCGATATCCGGGAGCAGGGCT
Cp53tagR	AAGCTT <u>GTCGAC</u> CTAATGGC
Construcción de pMPO88	
F-CID-TG	TGTCGAATAACGCTTTAC
R-CID	TCAACGTTTGTAATCGATG
Construcción de pMPO1004	
Sal-HA-Hind+	TCGACGTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGTACCCATACGA TGTTCTGACTATGCGTAA
Sal-HA-Hind-	AGCTTTACGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTACGCATAGTC AGGAACATCGTATGGGTACG
Construcción de pMPO1016 y pMPO1017	
SHAC1 F	GTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGTACCCATACGATGTTT CTGACTATGCGTACGG
SHAC1 R	CCGTACGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTACGCATAGTCAG GAACATCGTATGGGTACTGCA

Construcción de pMPO1036

spvB F1 CGTATCATATGTTGATACTAAATGG

spvB R1 ATATGATATCCTATGAGTTGAGTAC

Construcción de pMPO1045

SDspvB F2 CGGTTCA~~CCCGGG~~CAGAAAATATACCTGGCCATCGTCAGACGG
CCAGTTTCAGGAGATAGTGTATGTTGATACTAAATGG

SDspvB R2 GGGGGAGT~~GATC~~AGCGCTAAAGTGGCAGATGAAAAACCATTT
AGTATCAACATACTACTATCTCCTGAAACTGGCCGCTCTG

Comprobación y secuenciación

pCASB800R AGGAACGGTACGCCAGCAAG

PmFw TCTCTAGAAAGGCCTACC

Pm-Ter-F ACAAAGATGGTGAGC

SDspvB F3 CAGAAAATATACCTGGCCATC

spvB F3 CGAGCATATCTATTACTCCTAC

spvB R3 GCAGGCGGTACCTGTGGATC

T7 GTAATACGACTCACTATAGGGC

Construcción de Δ aroA::Kan^r

aroAprin-P2 TTTAGCTTGTGGTAAAACCGCTCTGACGAATCTGCTGGATAGCG
ATGACGcatatgaatatacctccttag

aroA_{lrv}-p1 GCGCCAGCCCGTCTGACTGGCGCAACAGAAGACTTAGGCAGGC
GTACTCATgtgtaggctggagctgcttc

aroAE fw CCATGCCGATTGAAGGG

aroAE rv GTGCGAATACGGACTCG

Construcción de Δ purD::Kan^r

purD_{prin}-P2 CCGCGTTGCAGAACGTGGCTATCGGCGTCACCGATATCCGGC
GCTGCTGcatatgaatatacctccttag

antifinpurD-P1 CCAGCGCGGTGGCGCACAGTACGCGGCCGCGCTGGTCAACAC
GCGGTCgtgtaggctggagctgcttc

purD fw TGACATGCGCCACTTCCG

purD rv ACGCGCAAACGCTGCTG

Construcción de Δ siiE::Kan^r (sólo se elimina un fragmento del extremo 5' de *siiE*)

F-siiE-FRT-P2 ACCAGTTAATACTAAACGATTAGATACACCTTGAGAGTGAATA
TAATATTcatatgaatatacctccttag

R-siiE-FRT-P1 AGCGAGGTTATTGCCTTTGATACTTGAATAAAGAGCGCCATTGA
CAATGAgtaggctggagcgcttc

siiE_{ext2}-F TATGACTGTTGACGCCAGTG

Construcción de $\Delta spvB::Kan^r$	
SpvBprin-P2	CTTTCCTGCCAAAAGGGGGCAAGGCGCTGAGTCAGTCAGGCC TGACGGCcatatgaatatcctccttag
antispvBfin-P1	GGGATCCACAATTTACAATGCTTTCGATTTTGAGTTTAGTATTG GAGGgtgtaggctggagctgcttc
spvB fw	TGGCCATCGTCAGACGGC
spvB rv	GCTAGGCCGCTCATAACC
Construcción de $\Delta upp::Cm^r$	
F-upp-P1	TCCGGCGATTTTTTTTTGTGGTTGCCAGTCATCTGAGGATAGGAG AAGAGTgtgtaggctggagctgcttc
R-upp-P2	GGCTTTTAATTATTTATTCACCTATTGGTACCAAAAATCTTATC GCCGGcatatgaatatcctccttag
upp-F	ATCCAGGTCAAGCATAATTGTGTTG
upp-R	CGATAGCACGGCGCGTCAT

*Las dianas de restricción aparecen subrayadas. En minúsculas se representan P1 ó P2, las regiones de homología de las secuencias que flanquean el gen de resistencia a antibióticos utilizadas en la obtención de mutantes siguiendo el método de Datsenko y Wanner descrito en el apartado 5.1 de esta tesis.

3.3. Digestión y modificación de los fragmentos de ADN.

Los fragmentos de ADN, procedentes de un plásmido o de una reacción de PCR, se digirieron con las enzimas de restricción adecuadas y el correspondiente tampón de reacción suministrado por el fabricante (Roche, New England Biolabs o Fermentas (enzimas FastDigest)).

Cuando fue necesario realizar digestiones parciales, se tomaron 50 μ l de ADN plasmídico, se añadieron 10 μ l del tampón de reacción correspondiente a la enzima y agua bidestilada hasta un volumen final de 100 μ l. La mezcla se dividió en fracciones alícuotas de 30, 20, 20, 20 y 10 μ l, y se añadió 0,2 U de enzima/ μ g al primer tubo con 30 μ l. A continuación, se pasaron 10 μ l de un tubo a otro. La preparación de las mezclas se realizó en hielo. Todas las muestras se incubaron durante 15 minutos a la temperatura de acción de la enzima, y finalmente se detuvieron las reacciones con 0,5 μ l de EDTA 0,5 M. Seguidamente se realizó una electroforesis de las muestras en gel de agarosa para determinar que cantidad de enzima era necesaria para obtener parciales.

Cuando fue necesario convertir extremos cohesivos en romos se empleó ADN polimerasa Klenow (Roche) si se trataba de extensiones en 5' o la ADN polimerasa de T4 (Roche) si eran extensiones 3'.

3.4. Electroforesis de ADN.

La electroforesis de ADN en gel se empleó para comprobar la eficiencia de las extracciones de ADN, determinar el perfil de fragmentos tras la digestión de plásmidos, estimar la eficacia de la digestión con una endonucleasa, etc.

En general, si el fragmento de interés era superior a 100 pb se utilizaron geles de agarosa de baja electroendoósmosis, cuya concentración osciló entre 0,7 y 2% (p/v) dependiendo de los tamaños a separar, en tampón TAE 1x. Estos geles se sometieron a una diferencia de potencial fija de entre 90 y 120 v. Por el contrario, si el fragmento de interés era inferior a 100 pb se usaron geles verticales no desnaturizantes de poliacrilamida (acrilamida: bisacrilamida 29:1) al 8% que permiten resolver fragmentos de 50-200 pb, en TBE 0,5x. En este caso los geles se sometieron a una corriente fija de 30 mA.

En ambos casos, se utilizó el marcador de peso molecular comercial *1 Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen). Antes de cargar las muestras en el gel, se les añadió tampón de carga 6x.

Después de la electroforesis, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio a 1 mg/l durante 15 minutos y las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de radiación ultravioleta (Vilbert Lourmat), se fotografiaron y cuantificaron con una cámara acoplada a una impresora de impresión térmica.

Tampón de carga 6x: azul de bromofenol 0,25% (p/v) , xileno cianol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 10 mM pH 8 y Na₂EDTA 1 mM pH8.

Tampón TAE 1x: Tris-ácido acético 40 mM, 10 mM EDTA pH 7,7.

Tampón TBE 0,5x: Tris-ácido bórico 45 mM, 1mM EDTA pH 8,3.

3.5. Aislamiento, purificación de geles de agarosa y cuantificación de los fragmentos de ADN.

Los fragmentos se identificaron mediante visualización con un transiluminador de radiación ultravioleta de baja energía y se aislaron recortando los mismos del gel de agarosa. A continuación, se purificaron con el kit GFX (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuando se necesitó estimar la cantidad de ADN presente en la muestra se usó 100 ng de ADN del bacteriófago λ digerido con *Hind*III como ADN de referencia, o bien, se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

3.6. Ligación de fragmentos de ADN.

La ligación de los fragmentos, previamente purificados y cuantificados, se realizó en un volumen final de 10 μ l en presencia de 1 unidad de DNA ligasa de T4 (Roche) en tampón quinasa con ATP 1 mM, si los fragmentos a ligar tenían al menos un extremo cohesivo, o ATP 0,1 mM si los fragmentos a ligar eran romos, y se incubó al menos 12 h a 16 °C.

Tampón quinasa: Tris-HCl 0,5 M (pH 7,6), MgCl₂ 0,1M, DTT 50 mM, 0,5 mg/ml BSA.

3.7. Transformación de *E.coli* mediante choque térmico.

3.7.1. Obtención de células competentes.

Para la transformación de *E. coli* DH5 α con mezclas de ligación las células se hicieron competentes siguiendo el método de Inoue *et al.* (Inoue *et al.*, 1990), con el que se consigue una alta frecuencia de transformación (hasta 10⁹ transformantes por μ g de ADN plasmídico) y permite la conservación de las células competentes a -80°C. Un cultivo saturado de DH5 α se diluyó 5.000 veces en un litro de LB con 125 ml de SOB (con Mg) y se incubó en agitación (230 rpm) a 18°C durante 48 horas hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,6, momento en el cual se transfirió rápidamente a hielo donde se mantuvo durante 10 minutos. Seguidamente, las células se recogieron por centrifugación a 4° a 3.000 rpm durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 40 ml de TB frío, se

mantuvo 10 minutos en hielo y se centrifugó a 3.000 rpm a 4º durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en 10 ml de TB frío y se añadió DMSO hasta 7% de concentración final, gota a gota. Tras incubar 10 minutos en hielo, se hicieron fracciones alícuotas de 100 µl, que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Las células así preparadas mantienen su competencia durante varios meses.

Medio SOB: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM. Autoclavar. A parte preparar **solución de Mg⁺² 2 M** con 1 M de MgCl₂ y 1 M de MgSO₄ y filtrar. En el momento de usar el SOB, añadir 10 ml de esta solución al litro de medio, para obtener una concentración final de 20 mM. El pH del SOB final debe ser 6,8-7.

TB: Pipes 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM. Ajustar el pH a 6,7 con KOH o HCl. Añadir MnCl₂ 55 mM. Esterilizar por filtración.

3.7.2. Transformación.

Para la transformación se mezclaron 50 µl de células competentes con 1 µl de preparación de ADN plasmídico ó 10 µl de mezcla de ligación y se incubó en hielo durante 15 minutos. A continuación, la mezcla se sometió a choque térmico a 42°C durante 45 segundos, se enfrió en hielo durante 5 minutos y se añadió 1 ml de LB. La mezcla se incubó durante 45 minutos a 37°C, se sembraron 100 µl y el resto (centrifugado y resuspendido en 100 µl de LB) en placas de medio selectivo y se incubó toda la noche a 37°C.

3.8. Comprobación de candidatos.

Para la selección de clones positivos se llevaron a cabo reacciones de PCR a partir de las colonias obtenidas en la transformación en un volumen final de 25 µl, usando 0,5 unidades de *BiotaqTM ADN polimerasa*, 0,2 µM dNTPs y 0,2 µM de oligonucleótidos. Los clones positivos obtenidos se comprobaron mediante restricción, y si el fragmento clonado provenía de PCR, por secuenciación. Una vez comprobado, se seleccionó un clon para congelarlo por duplicado en la colección de estirpes del laboratorio.

3.9. Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias.

Las reacciones de secuenciación para confirmar posibles mutaciones o ausencia de ellas en el ADN clonado fueron llevadas a cabo por la empresa Secugen (Madrid), usando como molde productos de PCR o preparaciones de ADN plasmídico. El análisis de las secuencias obtenidas se realizó empleando las herramientas del paquete BLAST disponible en la página web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

4. MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GENÉTICA EN *S. Typhimurium*.

4.1. Electrotransformación de *S. Typhimurium* con ADN plasmídico.

4.1.1. Preparación de células competentes.

Para la preparación de células electrocompetentes de *S. Typhimurium* se diluyó un cultivo saturado 50 veces en 5 ml de LB y se incubó a 37°C en agitación (180 rpm) hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,6. Las células se recogieron por centrifugación a 4.000 rpm durante 15 minutos. A continuación, se resuspendieron en 1,5 ml de glicerol al 10% frío y estéril, y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 minuto a 4°C. Seguidamente, se repitió el proceso resuspendiendo las células en 1 ml de glicerol frío y estéril al 10%. Tras su centrifugación, se resuspendieron en 500 µl de glicerol frío y estéril al 10%. Finalmente las células se recogieron en un último paso de centrifugación, se concentraron en 100 µl de glicerol frío y estéril al 10% y se incubaron en hielo hasta su uso.

4.1.2. Electroporación.

Para la electroporación se mezclaron 40 µl de células electrocompetentes con 1-2 µl (50-100 ng totales) de ADN plasmídico libre de sales. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación con una distancia entre los electrodos de 2 mm, previamente enfriada, y se sometió a una diferencia de potencial de 2,5 kV, 25 µF y 200 Ω (programa Ec2) en un electroporador Micropulser™ (Bio-Rad). Inmediatamente después del pulso, las células se diluyeron en 1 ml de LB y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Tras la

incubación se sembraron 100 µl y el resto (centrifugado y resuspendido en 100 µl de LB) en placas de medio selectivo y se incubaron toda la noche a 37°C.

4.2. Transducción con el bacteriófago P22.

Para introducir mutaciones en las estirpes de *Salmonella* por recombinación homóloga, se utilizó el bacteriófago P22 HT105/1 *int201* (Schmieger, 1972). Este fago presenta una alta frecuencia de transducción debido a la mutación HT105 que hace que la nucleasa viral sea menos específica por los sitios *pac* (sitios de empaquetamiento del ADN). El alelo *int-201* previene la integración del ADN del fago en el cromosoma bacteriano, impidiendo la formación de lisógenos estables.

4.2.1. Preparación de los lisados de P22.

A 1 ml de un cultivo saturado de la estirpe donadora se le añadieron 4 ml de caldo de P22, y se incubó de 8 a 16 horas en agitación (180 rpm) a 37°C. Posteriormente para eliminar las células y los restos celulares, la mezcla se centrifugó a 4.400 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante, donde se encuentran las partículas fágicas, se recogió en un tubo con rosca. Para eliminar las células que aún quedasen en el sobrenadante y que podrían contaminar el lisado, se añadieron unas gotas de cloroformo y se agitó vigorosamente en un vórtex. El cloroformo se dejó decantar durante toda la noche a temperatura ambiente y después el lisado se guardó a 4°C hasta su uso. En estas condiciones, los lisados son estables durante meses o años.

Caldo de P22: 100 ml de NB estéril, 2 ml de Ex50, 500 µl glucosa 50% y 100 µl de un lisado de P22 HT 105/1 *int201*.

Medio NB: 13 g/l de NB (Nutrient Broth). Autoclavar.

4.2.2. Transducción.

Se mezclaron 100 µl de un cultivo saturado de la estirpe receptora con 25 µl del lisado de la estirpe donadora y se incubó, sin agitación, 30 minutos a 37°C. Tras la incubación, se sembró en placas de medio selectivo. Paralelamente, se sembraron el lisado y la estirpe receptora para comprobar que no había crecimiento en ningún caso. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

4.2.3. Eliminación de pseudolisógenos.

Los transductantes, además de haber recibido el marcador seleccionado, pueden haber sido infectados por P22. Por tanto, pueden ser pseudolisógenos (al impedir la integración, la mutación *int* dificulta o retrasa la formación de lisógenos verdaderos). Con el tiempo los pseudolisógenos se hacen resistentes o inmunes a nuevas infecciones por P22 y a partir de ese momento no pueden ser lisados ni transducidos. De ahí que convenga eliminar los pseudolisógenos si la estirpe ha de ser usada en posteriores experimentos de transducción. Para ello, se aislaron colonias del transductante en placas EBU (con antibióticos, si es necesario) que se incubaron a 37°C toda la noche. En estas placas las colonias con pseudolisógenos son de un color verde oscuro y las colonias libres de P22 son claras. La diferencia de color se debe a la existencia de lisis en las colonias de pseudolisógenos que acidifica la colonia y hace virar el compuesto indicador.

Generalmente se necesitaron dos siembras sucesivas en placas EBU para detectar aislados libres de fagos. Dichos aislados se forman por segregación espontánea de células libres de profago (ADN del bacteriófago). Se consideró que un transductante estaba "limpio" cuando en el aislamiento correspondiente no apareció ninguna colonia de color verde oscuro.

Medio EBU: 100 ml de LB agar, glucosa 0,25% (p/v), K₂HPO₄ 0,25% (p/v), azul de Evans 0,0125 g/l, Uranina 0,0250 g/l. Añadir antibiótico si es necesario.

4.2.4. Comprobación de transductantes libres de lisógenos.

En las placas EBU, los aislados de color claro pueden ser lisógenos en los que no se está produciendo lisis. Estos aislados son resistentes a P22 y pueden ser confundidos con aislados libres de fagos, ello hace aconsejable disponer de un ensayo alternativo para determinar si una estirpe es sensible a P22. Con este objeto se usó el mutante virulento H5 que es incapaz de entrar en lisogenia porque tiene una mutación en el represor *c2*.

Sobre una placa de LB o EBU se realizó una estría de un lisado de H5 y se dejó secar. Posteriormente se cruzaron perpendicularmente a la estría de H5, estriás de las estirpes a ensayar, así como una estría de una estirpe indicadora (sensible a P22) como control. La placa se incubó durante 12 horas a 37°C. Las estirpes libres de lisógenos son

sensibles a la infección presentando sólo crecimiento hasta la estría de H5, mientras que las resistentes a una nueva infección crecen cruzando la estría.

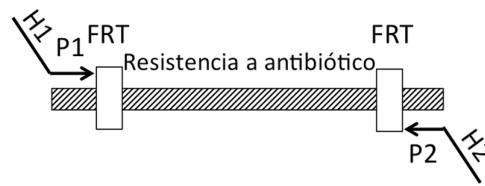
5. CONSTRUCCIÓN DE ESTIRPES.

5.1. Inactivación de genes cromosómicos utilizando productos de PCR.

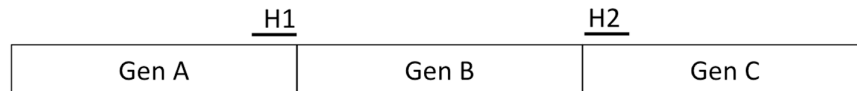
Para la construcción de mutantes de delección en *Salmonella* se utilizó el método descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000). Este procedimiento está basado en el sistema de recombinación Red del fago λ . Una de las razones por las que *E. coli* o *Salmonella* no son transformables con ADN lineal es la presencia de exonucleasas intracelulares que lo degradan. El sistema Red del fago λ incluye los genes γ , β y *exo* que especifican las proteínas Gam, Bet y Exo, respectivamente. Gam inhibe la exonucleasa V del hospedador permitiendo el acceso de Bet y Exo a los extremos de ADN para promover la recombinación.

La estrategia básica consiste en reemplazar una secuencia cromosómica (el gen B en la Figura 10) por un gen de resistencia a antibiótico seleccionable, que es generado por PCR usando cebadores que contienen 50 nucleótidos de homología con la secuencia que queremos reemplazar (H1 y H2 en la Figura 10). La recombinación es llevada a cabo por el sistema Red del fago λ , expresado desde un promotor inducible en un plásmido de bajo número de copias y termosensible (pKD46). Tras la selección, el gen de resistencia puede eliminarse usando otro plásmido (pCP20) que expresa la recombinasa FLP del plásmido de 2 μ de *Saccharomyces cerevisiae*. El sistema FLP actúa en las repeticiones directas FRT (*FLP recognition target*) que flanquean la secuencia (Figura 10). Los plásmidos que contienen los sistemas Red y FLP son termosensibles y pueden curarse fácilmente mediante crecimiento a 37°C.

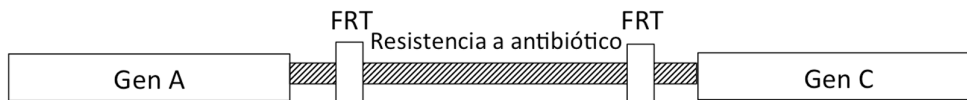
Paso 1. Amplificación por PCR del gen de resistencia a antibiótico flanqueado por las secuencias FRT



Paso 2. Transformación de la estirpe que expresa la recombinasa Red



Paso 3. Selección de transformantes resistentes al antibiótico



Paso 4. Eliminación del gen de resistencia a antibiótico usando el sistema FLP

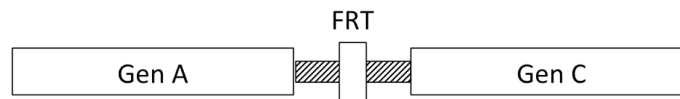


Figura 10. Esquema del proceso de inactivación de genes mediante productos de PCR. H1 y H2 indican regiones de homología de las secuencias flanqueantes del gen a deleccionar. P1 y P2 son las regiones de homología de las secuencias que flanquean el gen de resistencia a antibióticos. Figura adaptada de Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000).

5.1.1. Preparación del ADN para la sustitución.

Los plásmidos usados como molde en las reacciones de PCR fueron pKD3 (Cm^r) o pKD4 (Kan^r). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores se diseñaron de forma que el gen de resistencia quedara en sentido contrario al gen objeto de la deleción. Estos oligonucleótidos contenían, en su extremo 5', 50 nucleótidos de homología con la región flanqueante del gen a deleccionar y 20 nucleótidos de homología con pKD3 y pKD4. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla 4.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo a una temperatura de hibridación de 56°C y 2 minutos de síntesis a 72°C usando la enzima *Taq Expand™ High Fidelity Plus* (Roche Diagnostics GmbH). El producto de PCR fue sometido a electroforesis en gel de agarosa y la banda correspondiente a la secuencia amplificada fue purificada mediante el kit comercial GFX™ PCR DNA (GE Healthcare) eluyendo en el tampón Tris-HCl suministrado en el kit. A continuación, para eliminar el ADN molde utilizado en la PCR,

el ADN purificado se digirió con *DpnI* que reconoce selectivamente el ADN metilado, y se purificó de nuevo eluyendo en agua bidestilada.

5.1.2. Transformación de los receptores.

Se prepararon células electrocompetentes de la estirpe receptora *S. Typhimurium* 14028 portando el plásmido pKD46, que expresa el sistema λ Red bajo el control del promotor de *araB* inducible por arabinosa. Para la obtención de células electrocompetentes, inóculos cultivados a 30°C en LB con ampicilina se diluyeron 1:100 en 50 ml de SOB (sin magnesio) suplementado con ampicilina 100 μ g/ml y L-arabinosa 1mM, y se incubaron a 30°C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,8-0,9. Las células fueron recogidas por centrifugación durante 15 minutos a 4.000 rpm en una ultracentrífuga a 4°C y se resuspendieron en 20 ml de glicerol al 10% frío y estéril. Posteriormente se centrifugó de nuevo 15 minutos a 4.000 rpm a 4°C y se resuspendió en 10 ml de glicerol al 10% frío. Tras una nueva centrifugación, se resuspendió en 5 ml de glicerol al 10% frío. Las células se centrifugaron por última vez y se resuspendieron en 500 μ l de glicerol frío al 10%.

Fracciones alícuotas de 100 μ l de células electrocompetentes se electroporaron con 10 μ l (1-1,5 μ g totales) de ADN purificado tras la digestión con *DpnI*. Tras el pulso eléctrico a 2,5 kV, las células se resuspendieron en 1 ml de LB y se incubaron a 37°C durante 90 minutos. Tras la incubación, las células se recogieron por centrifugación y se sembró la mitad en medio selectivo (LB agar suplementado con kanamicina o cloranfenicol) a 37°C. El resto se dejó a temperatura ambiente y en caso de no obtener ningún transformante resistente a antibiótico, se sembró tras 24 horas de incubación.

5.1.3. Comprobación de candidatos.

Las colonias obtenidas se segregaron en medio sólido LB+Kan o LB+Cm, y LB+Ap y se incubaron a 37°C. Tras 24 horas, se seleccionaron aquellas colonias sensibles a ampicilina, que habían perdido pKD46, y resistentes al antibiótico Kan o Cm. La inserción del gen de resistencia en el gen que queríamos delecionar se comprobó mediante PCR con distintas parejas de oligonucleótidos (Tabla 4) y fenotípicamente en los mutantes *aroA*, *purD* y *upp*.

La comprobación fenotípica de los mutantes se realizó en placas de medio mínimo Ex1 suplementado con aromix en el caso de los mutantes *aroA*, con 366,5 μ M de adenina hemisulfato para los mutantes *purD* y con 2 μ g/ml de 5-FU en el caso de los mutantes *upp*.

5.2. Construcción de estirpes.

Una vez delecionado el gen de interés, la mutación fue introducida en los fondos genéticos apropiados mediante transducción con P22 y selección de la resistencia a antibiótico. Siempre que fue posible se comprobó que el transductante presentaba el fenotipo adecuado.

5.3. Escisión del gen de resistencia a antibiótico.

La eliminación del gen de resistencia de los hospedadores se realizó transduciendo el plásmido pCP20 con P22 HT. La transducción se incubó 30 minutos a 30°C y se sembró en LB con ampicilina. Para eliminar el plásmido pCP20, las limpiezas de fagos se llevaron a cabo en placas EBU sin antibiótico incubadas a 37°C. Una vez que los candidatos estuvieron limpios de fagos, la pérdida de la resistencia a antibióticos se detectó sembrando en placas de LB+Ap y LB+Cm o LB+Kan, según cada caso. La escisión del casete de resistencia se comprobó mediante PCR con los cebadores externos.

6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

6.1. Obtención extractos totales de cultivos bacterianos.

6.1.1. Producción de proteínas inducida por salicilato sódico.

Para analizar la producción de proteínas utilizando el sistema en cascada inducible por salicilato sódico, se diluyeron los inóculos saturados de las estirpes transformadas con los plásmidos de interés hasta D.O.₆₀₀ de 0,1 en LB ampicilina y se incubaron a 37°C durante 1 hora en agitación (180 rpm). Tras la incubación, cada cultivo se repartió equitativamente en dos matraces, añadiendo a uno de ellos salicilato sódico a una concentración final de 2 mM (cultivos inducidos). Ambos cultivos, inducidos y no

inducidos, se incubaron durante 4 horas a 37°C en agitación y se midió la D.O.₆₀₀ alcanzada.

6.1.2. Obtención de extractos totales.

Un volumen de 1 ml de células fue recogido por centrifugación durante 5 minutos a 13.000 rpm. El sedimento obtenido se lavó con tampón fosfato 1x, se centrifugó otros 5 minutos a 13.000 rpm y se resuspendió en 25 µl de agua por cada unidad de D.O.₆₀₀ de cultivo. A esto se le añadió igual volumen de tampón de carga 2x, se hirvió 10 minutos y se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm para eliminar los restos celulares. Se utilizaron normalmente de 1,5-3 µl del sobrenadante para visualizar las proteínas en gel.

Tampón de carga 2x: Tris-HCl 160 mM pH 8, glicerol 20% (v/v), SDS 4%, azul de bromofenol 0,1%, β-mercaptoetanol 10% (v/v).

Tampón fosfato 50x: 302,5 g/l Na₂HPO₄ 12H₂O y 50 g/l KH₂PO₄. Disolver con calor. Autoclavar.

6.2. Lisis de células eucarióticas infectadas.

6.2.1. Obtención de extractos totales.

Entre 5 y 6 millones de células no infectadas (control) e infectadas a una m.o.i de 1:250, se recogieron después de 24- 48 horas de inducción con salicilato sódico. Antes de tratar con tripsina 1x-1 mM EDTA, se recogió el medio con las células flotantes. Después de neutralizar la reacción con el medio recogido anteriormente, las células se centrifugaron a 2.000 rpm durante 5 minutos y se lavaron 2 veces con PBS 1x estéril a 4°C. El precipitado celular se guardó a -20°C hasta su lisis.

La lisis de las células se realizó usando el tampón urea (100 µl / 5·10⁶ células) incubando 30 minutos en hielo, agitando con el vórtex cada 3 minutos. A continuación, los extractos se centrifugaron a 4°C durante 10-20 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su uso.

Tampón urea: Urea 7M, Thiourea 2M y CHAPS 4%. Antes de usar se le añade DTT 40 mM y 1 µl por cada 100 µl de tampón de lisis de un cóctel de inhibidores de proteasas (*Protease-Inhibitor MixM*, SERVA Electrophoresis).

6.2.2. Extracción de proteínas citoplasmáticas.

Para la extracción de proteínas citoplasmáticas de células eucarióticas infectadas con *Salmonella* sin afectar a la fracción bacteriana se utilizó un tampón de lisis más suave. Aproximadamente se recogieron unos $6 \cdot 10^6$ de células infectadas por tripsinización y centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos. Tras 2 lavados con PBS 1x, el precipitado celular se resuspendió en 100 μ l de tampón de lisis (Senatus *et al.*, 2006) y se incubó en hielo durante 30 minutos, invirtiendo la muestra cada cierto tiempo. El lisado se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos y el sobrenadante (proteínas citoplasmáticas) fue transferido a un tubo nuevo. La fracción restante (restos celulares y bacterias) se lavó con PBS 1x, se lisó con 100 μ l de tampón de lisis hirviendo la muestra a 100°C durante 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 13.000 rpm para eliminar los restos celulares.

Tampón de lisis: 20 mM Tris HCl (pH 7,6), 1 mM EDTA (pH 8), 150 mM NaCl, 1 % Tritón X-100 y 1 μ l por cada 100 μ l de tampón de lisis de un cóctel de inhibidores de proteasas (*Protease-Inhibitor MixM*, SERVA Electrophoresis).

6.3. Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas bacterianas se determinó usando un método basado en el descrito por Bradford (Bradford, 1976) utilizando el reactivo de Bio-Rad *Protein Assay* (Bio-Rad).

Para la cuantificación de muestras lisadas con tampón Urea se utilizó el kit RC DC *Protein Assay* (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para las muestras lisadas con tampón de lisis se usó el protocolo de la BCA (Sigma-Aldrich) o el kit RC DC *Protein Assay* (Bio-Rad) indistintamente.

En todos los casos se utilizó como patrón la seroalbúmina bovina (BSA).

6.4. Electroforesis de proteínas.

Las proteínas se separaron por su peso molecular mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida con SDS 0,1% (p/v) (SDS-PAGE) según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles de poliacrilamida-SDS discontinuos

consistían en una zona de empaquetamiento de 1 cm de longitud y una zona de separación de unos 5 cm. Se usaron geles de separación al 7,5, 10, 12 ó 15% de acrilamida, según el tamaño de las proteínas a separar, con un gel de empaquetamiento al 4%.

Las muestras se mantuvieron en hielo en todo momento y antes de someterlas a electroforesis se les añadió tampón de carga 2x, se hirvieron durante 10 minutos y se centrifugaron a 4°C a 13.000 rpm durante 10 minutos.

Como marcador de peso molecular se usó el marcador *B Ready Gel Bands* (Bio-Rad) o el marcador preteñido *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo-Scientific) dependiendo del uso posterior del gel. La electroforesis se realizó en Tank Buffer 1x a una intensidad de corriente de 30 mA, usando el equipo Mini Protean®III (Bio-Rad).

Gel de empaquetamiento: Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 0.1% (p/v), acrilamida:bisacrilamida 40% (37,5:1) al 4,5% (p/v), persulfato amónico 0,1% (p/v), TEMED 0,1% (v/v).

Gel de separación: Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,1% (p/v), acrilamida:bisacrilamida 40% (37,5:1) al 7,5%-15%, persulfato amónico 0,05% (p/v), TEMED 0,075%.

Tank buffer 1x: Trizma base 25mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v). No autoclavar.

Tampón de carga 2x: Tris-HCl 160 mM pH 8, glicerol 20% (v/v), SDS 4%, azul de bromofenol 0,1%, β-mercaptoetanol 10% (v/v).

6.5. Tinción de geles.

El gel se lavó 2 veces con agua destilada durante 10 minutos, se tiñó con *EZBlue Gel Staining Reagent* (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos y después se lavó con agua destilada hasta que las bandas correspondientes a las proteínas teñidas se visualizaron claramente.

Para conservar el gel una vez desteñido, tras escanearlo, se secó en un secador de gel Hoefer TM Slab Gel Dryer CD 2000 (GE Healthcare) durante 1 h a 80°C.

6.6. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot.

6.6.1. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF.

Las proteínas sometidas a SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF (*Amersham HybondTM-P*, GE Healthcare), previamente activada en metanol durante 10 segundos y lavada con agua destilada durante 5 minutos, usando un sistema de transferencia húmeda (*Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell*, Bio-Rad). El gel se puso en contacto con la membrana, y el conjunto se rodeó con papel Whatman 2MM. Todos estos componentes se equilibraron durante un mínimo de 15 minutos en tampón de transferencia antes de ser introducidos en el tanque de electroforesis. La transferencia se realizó a 100 V durante 1 hora.

La transferencia se puede comprobar opcionalmente mediante la tinción de la membrana, previamente lavada 2 veces con agua destilada, con rojo Ponceau durante 5 minutos en agitación suave y un lavado posterior con agua destilada hasta que se visualicen las bandas.

Tampón de transferencia: 100 ml de Tank buffer 5x, 200 ml de metanol y 700 ml de agua destilada.

Tank buffer 5x: Trizma base 0,125 M, glicina 0,96 M y SDS 0,5% (p/v). No autoclavar.

Rojo Ponceau: 0,5% p/v en 1% ácido acético.

6.6.2. Immunoblot.

Después de la transferencia, la membrana se lavó 3 veces con TTBS 1x durante 5 minutos y se saturó con tampón de bloqueo a temperatura ambiente en agitación suave durante 2 horas (o toda la noche a 4°C). Después, se incubó con el anticuerpo primario diluido adecuadamente en el tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente (o toda la noche a 4°C). A continuación se realizaron 4 lavados de 10-15 minutos cada uno con TTBS 1x y posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa durante un tiempo máximo de 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación, se realizaron 4 lavados de 10-15 minutos cada uno con TTBS 1x. Finalmente, se realizó la reacción de detección de la peroxidasa de rábano (HRP) usando *SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando fue necesario

cuantificar dicha señal las películas reveladas se digitalizaron con un escáner Typhoon 9410 y se analizaron con el programa informático ImageQuant (Amersham).

Los anticuerpos primarios y secundarios usados en esta tesis se presentan en la Tabla 5.

TBS 10x: 150 ml de Tris 1 M, 800 ml de NaCl 2,5 M y 50 ml de agua bidestilada. No autoclavar.

TTBS 1x: Tween-20 al 0,05% (v/v) en TBS 1x.

Tampón de bloqueo: 5% (p/v) de leche en polvo en TTBS 1x.

6.6.3. Anticuerpos empleados.

Los anticuerpos empleados en este trabajo, sus usos y diluciones, se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos.

Anticuerpos	Tipo	Origen	Uso y dilución
Anti- DnaK	Primario, monoclonal, ratón	Assay designs	WB 1: 5.000
Anti-HA.11	Primario, monoclonal, ratón	Covance	IF 1: 1.000 WB 1: 5.000
Anti-PARP	Primario, policlonal, conejo	Cell Signalling #9542	WB 1: 1.000
Anti-caspasa-3	Primario, policlonal, conejo	Cell Signalling #9662	WB 1: 500
Anti-caspasa-3 procesada (Asp175)	Primario, monoclonal, conejo	Cell Signalling #9664	WB 1: 500
Anti-caspasa-7	Primario, policlonal, conejo	Cell Signalling #9492	WB 1: 1.000

Anti- α -tubulina mAb (DM1A)	Primario, monoclonal, ratón	Calbiochem	WB 1: 5.000-1: 10.000
Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG (H+L)	Secundario	Invitrogen	IF 1: 300
IgG peroxidasa anti-ratón	Secundario	Sigma-Aldrich (A9044)	WB 1: 5.000
IgG peroxidase anti-conejo	Secundario	Sigma-Aldrich (A8275)	WB 1: 5.000

WB: Western Blot. IF: Inmunofluorescencia

7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA. ENSAYOS DE ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA.

Inóculos cultivados durante toda la noche en LB con ampicilina se diluyeron 50 veces en el mismo medio y se dejaron crecer hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,2-0,3 antes de inducir con 2 mM de salicilato sódico. Cuando fue necesario potenciar la actividad antiterminadora de NasR e incrementar la expresión de *lacZ*, en los casos en los que el atenuador *nasF* estaba presente, se añadió además 0,2 g/l de nitrato de sodio. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación a 180 rpm durante 3 horas antes de ensayar la actividad β -galactosidasa.

Los ensayos de β -galactosidasa de las fusiones a *lacZ* se realizaron siguiendo el método descrito por Miller (Miller, 1972) con algunas modificaciones. Un volumen de 100 μ l del cultivo (o una dilución del mismo, si se preveían actividades muy altas) se mezcló en hielo con 655 μ l de tampón Z con β -mercaptoetanol recién añadido, 30 μ l de cloroformo y 15 μ l de SDS 0,1% (p/v). La mezcla se homogeneizó con el vórtex y se incubó durante 2 minutos en un baño a 30°C. A continuación, se añadieron 200 μ l de una solución de ONPG (o-nitrofenil galactopiranosido 4mg/ml en tampón Z), se agitó en el vórtex y se incubó a 30°C hasta observar un color amarillo en las muestras, momento en el que se añadieron 500 μ l de Na₂CO₃ 1M para detener la reacción y se colocaron en

hielo. Las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 minutos para separar el cloroformo y se midió la absorbancia a 420 nm de la fase acuosa en un espectrofotómetro.

Tampón Z: Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄·H₂O 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄·7H₂O 1 mM. El pH debe estar a 7. No autoclavar. Añadir β-mercaptoetanol 0,27% (v/v) en el momento de usar.

La actividad β-galactosidasa de cada muestra en unidades Miller se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad } \beta \text{ - galactosidasa (Unidades Miller)} = \frac{A_{420}}{V \cdot DO_{600} \cdot t} \cdot 1000$$

Donde A₄₂₀ es la absorbancia a 420 nm, V es el volumen de cultivo usado en el ensayo en ml (normalmente 0,1 ml), DO₆₀₀ es la densidad óptica del cultivo en el momento de comenzar el ensayo y t es el tiempo de reacción en minutos. En todos los casos se realizaron tres réplicas independientes, mostrando los valores medios y la desviación estándar entre dichas réplicas.

8. ANÁLISIS DE PRODUCCIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CITOSINA DEAMINASA.

8.1. Test de sensibilidad a 5-fluorouracilo.

Tras la incubación de los cultivos inducidos y no inducidos (apartado 6.1) durante 4 h se recogió 1 ml de cada cultivo, se centrifugó durante 1 minuto a 13.000 rpm y el sedimento se resuspendió en 1 ml de tampón fosfato 1x. Este paso se repitió una segunda vez, se hicieron diluciones hasta 10⁴ en tampón fosfato y se sembraron 10 μl de cada una de las diluciones en placas de medio mínimo Ex1 con ampicilina y 0.5, 1, 1.5, 3 ó 5 μM de concentración final de 5-fluorocitosina. La preparación de las placas y del stock 1 mM de 5-FC se describen en el apartado 2. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y tras este tiempo, se escanearon.

8.2. Ensayos de actividad citosina deaminasa.

8.2.1. Recogida de muestras, rotura y cuantificación de los extractos.

Tras la incubación de los cultivos inducidos y no inducidos durante 4 h (apartado 6.1), se recogieron 55 ml de cada cultivo por centrifugación a 4°C y 4.000 rpm durante 15 minutos. El sedimento se resuspendió en 10 ml de PBS 1x frío y se centrifugó a 4°C a 4.000 rpm durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de PBS 1x frío y se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 13.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y las células se guardaron a -20°C hasta su rotura.

La extracción de proteínas se realizó mediante rotura mecánica. Para ello, las células se resuspendieron en 750 µl de PBS 1x a 4°C en microtubos con tampón de rosca (SARSTEDT, Alemania) con aproximadamente el equivalente a 250 µl de *Glass Beads* (425-600 µm, Sigma-Aldrich) y se sometió a 4 pulsos de 30 segundos a velocidad 6 en un *Ribolyser Hybaid* con intervalos de 2 minutos en hielo. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 4°C a 13.000 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo.

Tras la cuantificación proteica, todos los extractos fueron diluidos hasta una concentración final de 0,5 µg de proteínas/µl.

8.2.2. Ensayo de actividad citosina deaminasa.

La actividad citosina deaminasa se determinó midiendo la desaparición del sustrato 5-FC en un espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu (Kyoto, Japón) equipado con un termostato, utilizando cubetas de cuarzo de 10 mm de longitud de paso de luz. Para ello se prepararon 2 muestras directamente en las cubetas de cuarzo con 100 µg de cada extracto en 1 ml de PBS 1x frío, y tras homogeneizar la mezcla y hacer blanco, a una de las muestras se le añadió 0,3 mM de 5-FC. Inmediatamente tras invertir la muestra varias veces se realizó una cinética a una longitud de onda (λ) de 290 nm y una temperatura de 37°C, midiendo cada segundo durante 5 minutos. Los datos fueron adquiridos y analizados con el programa UvpProbe.

8.2.3. Cálculo de la actividad citosina deaminasa de los extractos.

La concentración relativa de la proteína citosina deaminasa en el extracto se calculó aplicando la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot L \cdot C.$$

Donde A es la absorbancia; ϵ , el coeficiente de extinción molar; L, la longitud del paso de luz y C, la concentración de la proteína.

En nuestro caso, la absorbancia era el valor absoluto de la diferencia de la absorbancia en un minuto con respecto a la absorbancia registrada en el minuto anterior; la longitud del paso de luz (L), 1 cm, y el coeficiente de extinción molar del sustrato 5-FC, 3,1586 mM cm⁻¹. Este coeficiente se determinó midiendo las absorbancias a 290 nm de muestras a distintas concentraciones de 5-FC (0,05-0,350 mM) en un volumen final de 1 ml en PBS 1x a 4°C. El coeficiente de extinción molar del sustrato 5-FC es el valor de la pendiente de la recta de calibrado obtenida al representar absorbancia frente a concentración (mM).

A partir de la concentración de proteína obtenida se calculó la actividad de citosina deaminasa en el extracto ((μ moles/minuto)/ mg de proteína total). Se realizaron tres réplicas independientes del experimento, se calcularon las medias y las desviaciones estándar y se representaron gráficamente.

9. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR.

9.1. Infecciones de células tumorales con *S. Typhimurium*.

Los ensayos de infección se realizaron siguiendo el método descrito por Beuzon et al. (Beuzon *et al.*, 2000) con algunas modificaciones. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (Nunc) a una densidad de 10⁵ células por pocillo (70.000 células en el caso de MCF-7) 19 horas antes de la infección y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ en medio DMEM con antibióticos. Las bacterias (*S. Typhimurium*) se incubaron a 37°C en agitación (180 rpm) en LB con antibiótico, normalmente ampicilina (100 μ g/ml), cuando fue necesario. Tras 16 horas, los cultivos se diluyeron 1:33 en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubaron durante 3,5 horas en las mismas

condiciones. Unos 15-30 minutos antes de la infección, las células se lavaron 2 veces con PBS 1x y se equilibraron con EBSS (*Earle's balanced salt solution*, E2888 Sigma-Aldrich). Transcurrido ese tiempo, se añadieron las bacterias a una multiplicidad de infección (m.o.i) de 1:50-1:250 (50-250 bacterias por célula eucariota) para que se produjera la infección durante 15 minutos a 37°C y 5% CO₂. Seguidamente, las células se lavaron 2 veces con PBS 1x y se incubaron en medio DMEM suplementado con 100 µg/ml de gentamicina (PAA laboratorios) para eliminar las bacterias extracelulares. Tras 1 hora de incubación, la concentración de gentamicina se redujo a 16 µg/ml y se añadió 2 mM de salicilato sódico cuando fue necesario para inducir la expresión de la proteína de interés. Las células se mantuvieron en este medio a 37°C y 5% CO₂ durante 3-24 h.

Todos los cambios de medio se realizaron lavando las células 2 veces con PBS 1x. Para experimentos largos de más de 24 horas se ajustó el número de células teniendo en cuenta el tiempo de división de cada línea celular.

9.1.1. Condiciones de infección para mutantes $\Delta purD$.

Cuando utilizamos mutantes $\Delta purD$, al medio DMEM con 100 µg/ml de gentamicina se le añadió 366 µM de adenina hemisulfato (concentración normal de adenina). Después de 1 hora de incubación el medio se sustituyó por DMEM con una concentración normal de adenina, 16 µg/ml de gentamicina y 2 mM de salicilato sódico, permitiendo a la bacteria proliferar y producir la proteína de interés. Una hora después se redujo la concentración de adenina 40 veces para evitar la producción de otras proteínas bacterianas que inducen la muerte celular. Las células se mantuvieron en este medio (DMEM con salicilato sódico 2 mM, 16 µg/ml de gentamicina y 9,15 µM de adenina hemisulfato) hasta su análisis. Todos los cambios de medio se realizaron lavando previamente las células 2 veces con PBS 1x.

9.2. Ensayo de invasión y replicación intracelular.

Distintas líneas tumorales (10^5 células /pocillo) se infectaron con *S. Typhimurium* a una m.o.i de 1:100 como se ha descrito en el apartado 9.1. 3 horas después de la inducción con salicilato sódico, las células se lavaron 2 veces con PBS 1x y se trataron con tripsina durante 5-10 minutos (según la línea celular) a 37°C. La reacción se neutralizó

con 1 ml de DMEM y las células se recogieron por centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos. El precipitado celular se resuspendió en 400 µl de PBS 1x y se analizaron 10.000 eventos (R1) en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA) usando el programa CellQuest. Se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas independientes de cada muestra. Se seleccionó la población de células infectadas (GFP positivas) con respecto al control no infectado y se obtuvieron los porcentajes de células infectadas con respecto al total de células analizadas. Se calcularon las medias y las desviaciones estándar y se representaron los porcentajes de invasión-replicación intracelular obtenidos para cada línea tumoral.

9.3. Microscopía de fluorescencia.

9.3.1. Tinción de los filamentos de actina.

Se sembraron 25.000 células/cm² en cubres depositados en el fondo de los pocillos, previamente lavados con etanol 70% durante 5 minutos y aclarados con agua bidestilada otros 5 minutos. Tras realizar la infección como se ha descrito anteriormente en el apartado 9.1, los cubres se lavaron 2 veces con PBS 1x y las células se fijaron con 3,7 % de formaldehído en PBS 1x durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras retirar el formaldehído, las células se lavaron 2 veces con PBS 1x y se permeabilizaron con 0,1% de Tritón X-100 en PBS 1x durante 10 minutos. A continuación, se lavaron las células y se incubaron en PBS 1x conteniendo 1:1000 de Hoechst 1 mg/ml (bisbenzimidaz 33258) para teñir los núcleos de las células y 1:100 de faloidina marcada con rodamina (R415 Molecular Probes 300 U) para teñir los filamentos de actina. La incubación se realizó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos. Las células se lavaron 3 veces con PBS 1x, y los cubres se montaron en un portaobjeto en medio de montaje y se sellaron con esmalte de uñas.

En el caso de células como las PANC-1 en las que una gran parte de la población se levantó tras el tratamiento se utilizaron cubres con poli-l-lisina. Para ello, se recogió el medio (células flotantes) y se trató el resto de las células infectadas con tripsina 1x- 1 mM de EDTA que fueron neutralizadas con el medio recogido anteriormente. A continuación se centrifugó a 4°C a 2.000 rpm durante 5 minutos y tras la eliminación del sobrenadante

las células se resuspendieron en 100 μ l de PBS 1x y se depositaron sobre los cubres tratados con poli-l-lisina. Para permitir la adherencia de estas células al cubre, las muestras se dejaron en reposo 30 minutos en el incubador. La fijación, la permeabilización y la tinción se realizaron como se ha descrito anteriormente en este apartado.

Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Leica SPE (630x) o en un microscopio de fluorescencia Leica DMI4000B (200x-320x) (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). El tratamiento de las imágenes se realizó con el programa ImageJ.

Medio de montaje: 50% glicerol y 50 % PBS 1x.

Preparación de cubres con poli-l-lisina: sobre cubres previamente lavados con etanol y agua bidestilada, se añadieron unos 80 μ l de poli-l-lisina diluida 1:10 en agua bidestilada (*Poly-l-lysine solution* 0,1%(p/v, P8920 Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se eliminó la poli-l-lisina y se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se lavaron con agua bidestilada y se secaron durante 1 hora a 37°C (o toda la noche a temperatura ambiente). Los cubres pueden ser almacenados a 4°C durante 7 días hasta su uso.

9.3.2. Inmunofluorescencia.

Las células se sembraron en cubres depositados en los pocillos, previamente lavados con etanol 70% durante 5 minutos y aclarados con agua destilada otros 5 minutos, a una densidad de 70.000-100.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos. La infección se realizó a una m.o.i de 1:100 como se ha descrito previamente en el apartado 9.1 y después de 3 a 16 horas de inducción se procedió al tratamiento de las muestras. Tras 2 lavados con PBS 1x, las muestras se fijaron con 3,7% formaldehído en PBS 1x durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizó la permeabilización en PBT durante 5 minutos y se bloquearon los receptores de membrana con una solución de bloqueo durante 45 minutos a 37°C. La incubación con el anticuerpo primario se realizó en solución de bloqueo siguiendo la dilución recomendada por el fabricante durante 90 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación las muestras se lavaron 3 veces con PBT durante 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo durante 90 minutos a temperatura ambiente, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Posteriormente, las muestras se lavaron una vez con PBT, se añadió Hoechst 1 mg/ml a una dilución 1:1000 y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, se realizaron 4 lavados de 10 minutos con PBT y finalmente los cubres se montaron y se sellaron como se ha descrito en el apartado 9.3.1. Los anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia se detallan en la Tabla 5.

Las muestras se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Leica DMI4000B (200x-320x) o microscopio confocal Leica SPE (630x-1000x) (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) y el tratamiento de las imágenes se realizó con el programa ImageJ.

PBT: 0,1% (v/v) Tritón X-100 en PBS 1x.

Solución de bloqueo: 5% (p/v) de suero fetal bovino en PBT.

9.3.3. Imágenes a tiempo real *Time-lapse*.

Las células HeLa Kyoto H2B-mCherry mEGFP- α -tubulina, sembradas a una densidad de 150.000 células en placas de 35 mm (*Glass Bottom Culture Dishes*, P35GC-1.5-10-C, MatTeK), se infectaron con *S. Typhimurium* a una m.o.i de 1:100 como se ha descrito previamente en el apartado 9.1.1. con una ligera modificación. Tras la hora de incubación en medio DMEM conteniendo 16 μ g/ml de gentamicina, adenina a una concentración normal y 2 mM de salicilato sódico, se sustituyó por un medio independiente del aporte exógeno de CO₂. Para ello, se lavaron las células 2 veces con PBS 1x estéril y se añadió medio Leibovitz L-15 (Sigma-Aldrich) suplementado con 2 mM L-glutamina y 10% de FBS y conteniendo 16 μ g/ml de gentamicina, una concentración baja de adenina y 2 mM de salicilato sódico. Seguidamente, las imágenes fueron tomadas como un *stack* de 16 planos de 1 μ m cada 30 minutos durante 20 horas en un microscopio Deltavision (Applied Precision) equipado con un termostato a 37°C, utilizando un objetivo de 60x y un binning de 2X2. Las imágenes fueron tratadas con el programa ImageJ.

9.4. Análisis de la viabilidad celular mediante la determinación de la LDH liberada.

El porcentaje de muerte celular tras la infección con distintas estirpes de *S. Typhimurium* después de 24 horas se determinó midiendo la liberación de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH) que sólo ocurre cuando se produce la lisis celular. Para ello, se utilizó el kit comercial *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega) basado en la formación de formazán (compuesto de color rojo) mediante la reacción acoplada de la LDH ($\text{NAD}^+ + \text{lactato} \rightarrow \text{piruvato} + \text{NADH}$) y la diaforasa ($\text{NADH} + \text{sales de tetrazolium} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{formazan (rojo)}$).

Los ensayos se realizaron con células HeLa sembradas a una densidad de 50.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos e infectadas con *Salmonella* a una m.o.i de 1:100. Tras 24 horas se recogió el medio de las células infectadas (LDH experimental liberada) y el medio de los controles, células no infectadas no confluyentes (LDH espontánea liberada). Estas muestras se midieron utilizando como blanco una muestra con el mismo medio que usamos para la infección.

Por otra parte, las células se lisaron con 100 μl de Tritón X-100 al 9% en agua (v/v) en 1 ml del medio (DMEM con salicilato sódico 2 mM, 16 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina y 9,15 μM de adenina hemisulfato) durante 60 minutos a 37°C (LDH interna). Como blanco de estas muestras se utilizó 1 ml del mismo medio conteniendo 100 μl de Tritón X-100 al 9%.

Todas las muestras, junto con los blancos, se centrifugaron a 4°C a 2.000 rpm durante 5 minutos y se traspasaron 50 μl de cada muestra por triplicado a una placa de 96 pocillos. A continuación se añadieron 50 μl de *Reconstitute Substrate Mix* preparado según las indicaciones del fabricante y, tras 30 minutos de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, se añadieron 50 μl de *STOP solution* suministrado en el kit. Se midió la absorbancia a 490 nm en un multilector de microplacas POLARstar Omega (BMG LABTECH GmbH, Alemania). Con la media de los datos con los blancos corregidos de cada muestra se calculó el porcentaje de citotoxicidad como:

$$\frac{\text{LDH experimental liberada} - \text{LDH espontánea liberada no infectadas}}{\text{LDH máxima liberada} - \text{LDH espontánea liberada no infectadas}} \times 100$$

La LDH experimental liberada corresponde a las células muertas durante las 24 horas debido a la infección, mientras que la LDH interna corresponde a las células que han sobrevivido. Siendo la LDH máxima liberada la suma de la LDH experimental liberada más la LDH interna.

9.5. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo en presencia de yoduro de propidio.

El análisis de la distribución del ciclo celular por citometría de flujo consiste en clasificar las células atendiendo a su contenido en ADN mediante la tinción con yoduro de propidio (IP). Este compuesto se intercala en la doble hebra de ADN y emite fluorescencia con una intensidad proporcional a la cantidad de ADN que contiene la muestra. De esta forma podemos conocer la proporción de células en fase SubG₁ (células muertas), G₀/G₁, S, G₂/M y poliploides de la población celular analizada.

Para el tratamiento de las muestras se siguió el método descrito por Doyle *et al.* (Doyle *et al.*, 1995) con ligeras modificaciones. El número de células sembradas se ajustó teniendo en cuenta el tiempo de división de cada línea celular, el porcentaje de infección y el efecto esperado en el ciclo celular, de forma que se dispusiera de 500.000 células por pocillo en el momento deseado. Para la obtención de las células, se recogió el medio (células flotantes) y se lavaron los pocillos con 1 ml de PBS 1x estéril a 4°C que posteriormente fue añadido al medio recogido anteriormente. Las células adheridas se trataron con tripsina 1x -1 mM EDTA a 37°C y la reacción se neutralizó con el medio y PBS 1x recogido previamente. Las células se centrifugaron a 2.000 rpm durante 5 minutos, y tras retirar el medio, se resuspendieron en 4 ml de PBS 1x frío estéril. Tras su centrifugación, las células se resuspendieron en 100 µl de PBS 1x estéril frío a los que se le añadieron 900 µl de etanol al 80% a 4°C, gota a gota mientras se agitaba la muestra con un vórtex, para fijar las células. Las muestras se mantuvieron al menos 24 horas a -20°C antes de ser analizadas.

Para eliminar el etanol, las muestras se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 2.000 rpm. Seguidamente, se lavaron 2 veces con 0,1% BSA (seroalbúmina bovina) en PBS 1x frío y se centrifugaron de nuevo. El precipitado celular se resuspendió con 400 µl

de solución de extracción de ADN (preparada el día antes y conservada a 4°C), se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 minutos. A continuación, el precipitado se incubó con 600 µl de solución de tinción durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Las muestras se filtraron con filtros de 70 µm de nailon (BD Biosciences) antes de ser analizadas en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) a una velocidad de 200 eventos/segundo.

Se realizaron tres réplicas biológicas independientes de cada muestra y se analizaron un total de 10.000 eventos por muestra eliminando los agregados celulares. Para la adquisición y el análisis de los datos se utilizó el programa CellQuest (Becton Dickinson).

Solución de extracción de ADN: 8 partes de ácido cítrico 0,1 M y 192 partes de Na₂HPO₄ 0,2 M. Se ajustó el pH a 7,8. Guardar a 4°C.

Solución de tinción: 100 µg/ml de RNasa A (10 mg/ml) (Ribonucleasa A, R5125, Sigma-Aldrich), 0,1% (v/v) Tritón X-100, 0,1 mM de EDTA (pH 8), 40 µg/ml de yoduro de propidio (500 µg/ml) en PBS1x estéril a 4°C.

10. ENSAYOS EN MODELOS ANIMALES.

El mantenimiento y los procedimientos con modelos animales se realizaron según la normativa establecida por el comité ético de la Universidad Pablo de Olavide.

10.1. Inducción de tumores.

Se utilizaron ratones hembras de la estirpe BALB/c con 8 semanas de edad y aproximadamente 20 gramos de peso. Para la generación de los tumores se usó un cultivo de células F1.A11 fresco. Las células se trataron con tripsina1x durante 2 minutos a 37°C y la reacción se neutralizó con medio DMEM. Las células se contaron y se concentraron a razón 10⁶ células/ml por centrifugación durante 10 minutos a 1.000 rpm. A continuación se lavaron con PBS 1x estéril, se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en 1 ml de PBS 1x estéril. De esta solución se inyectaron subcutáneamente 100 µl (aproximadamente 10⁵ células) en el flanco inferior derecho del ratón previamente depilado, utilizando agujas de 20G y 25 mm. La depilación se realizó

tres días previos a la inducción tumoral tratando con crema depilatoria *Veet* durante 3-4 minutos y aclarando con agua.

10.2. Infección bacteriana e inducción con salicilato sódico.

Cuando los tumores fueron palpables (1-1,5 mm de diámetro), aproximadamente 6 días después de la inyección de células F1.A11, se administraron intraperitonealmente 10^6 unidades formadoras de colonias (ufc) de *Salmonella* en 100 μ l de PBS 1x estéril por ratón. Tras 5 días de infección, se inyectaron intraperitonealmente 150 μ l de salicilato sódico 0,1 M para inducir la expresión de las proteínas citotóxicas. Esta dosis se administró cada 48 horas hasta el final del experimento. Desde el inicio del tratamiento, se siguió la evolución del crecimiento tumoral midiendo el ancho (*w*) y el largo (*l*) de los tumores con un calibre. Para calcular el volumen tumoral (mm^3) se aplicó la siguiente fórmula: $0,5 \cdot l \cdot w^2$.

RESULTADOS

Capítulo 1

Mejoras en los vectores de expresión.

1. MEJORA DEL MÓDULO DE EXPRESIÓN.

Para la utilización de *Salmonella* como vector de producción y administración dirigida de agentes antitumorales partimos del sistema de expresión en cascada transcripcional descrito por Royo *et al.* (Royo *et al.*, 2007) que consta de un módulo regulador y un módulo de expresión. Tras mejorar en nuestro laboratorio el módulo regulador del sistema introduciendo los genes *nasR* y *gfp* (Medina *et al.*, 2011), nos planteamos modificar el módulo de expresión para optimizar la producción de proteínas de interés.

Dado que *Salmonella* no metaboliza el salicilato, se pueden obtener diferentes niveles de expresión utilizando un único vector y distintas concentraciones del inductor (Cebolla *et al.*, 2001). Sin embargo, esta opción no es factible para controlar los niveles de expresión al trabajar con células eucarióticas en cultivo, ya que estas sí lo metabolizan y esto hace imposible mantener constante su concentración en el medio. Como alternativa, se decidió construir una serie de vectores que permitieran producir diferentes cantidades de proteína bajo las mismas condiciones de inducción.

Para la obtención de los nuevos vectores de expresión se utilizó el vector de alto número de copias pMPO27 (Royo *et al.*, 2005), derivado de pCASB, que contiene un sitio de clonación múltiple (MCS) situado corriente abajo de los terminadores *rrnBT1T2*, el promotor Pm y el atenuador *nasF*. En primer lugar, se modificó el MCS introduciendo nuevas dianas de restricción y eliminando duplicaciones para generar el vector pMPO57. El sitio de clonación múltiple modificado (MCSII) se generó mediante la asociación de los oligonucleótidos complementarios MCS+ y MCS-. El fragmento obtenido de 73 pb se digirió con las enzimas de restricción *SmaI* y *HindIII* y se clonó en pMPO27 digerido con las mismas enzimas. El vector pMPO57 porta los terminadores de la transcripción *rrnBT1T2*, el promotor Pm y el sitio MCSII flanqueado por dianas *NotI*, lo que permite transferir fácilmente el módulo de expresión entre distintos vectores. Entre las nuevas dianas de restricción del MCSII se incluye el sitio *NdeI*, que incorpora el codón de inicio ATG para la clonación en fase de proteínas de interés. La representación de los

elementos relevantes del módulo de expresión y las distintas dianas del MCSII se muestran en la Figura 11.

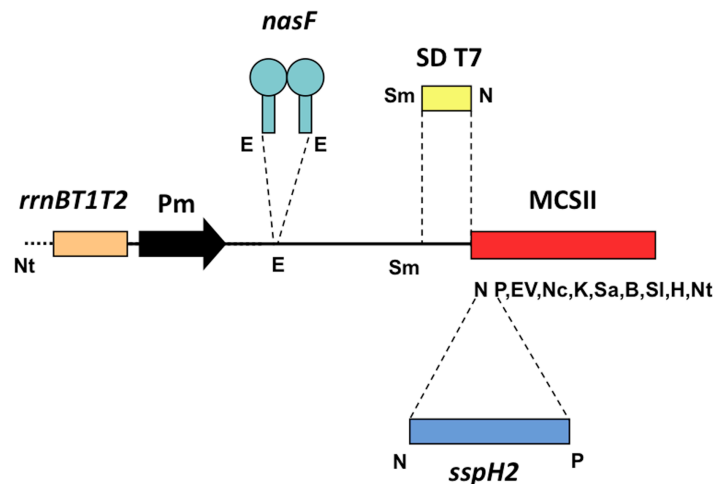


Figura 11. Representación esquemática de los diferentes elementos del módulo de expresión. *rrnBT1T2*, terminadores de los operones de ARN ribosomal; *Pm*, promotor *Pm*; *nasF*, atenuador transcripcional; *SD T7*, secuencia Shine-Dalgarno de pT7-7; *sspH2*, péptido señal del sistema de secreción tipo III; *MCSII*, sitio de clonación múltiple modificado. Las letras representan las dianas de restricción para las enzimas: *Nt*, *NotI*; *E*, *EcoRI*; *Sm*, *SmaI*; *N*, *NdeI*; *P*, *PstI*; *EV*, *EcoRV*; *Nc*, *NcoI*; *K*, *KpnI*; *Sa*, *SacI*; *B*, *BamHI*; *SI*, *Sall*; *H*, *HindIII*.

Para expresar genes de origen eucariótico en bacterias o aumentar los niveles de expresión de proteínas de interés, se introdujo la secuencia del sitio de unión al ribosoma del bacteriófago T7 (*SD T7*) precedida por una secuencia rica en AT que estabiliza el ARNm y potencia la traducción. El fragmento completo se obtuvo mediante la asociación de los oligonucleótidos *SD pT7-7+* y *SD pT7-7-*, la digestión del producto resultante con las enzimas de restricción *SmaI* y *NdeI* y su clonación en el vector pMPO57, generando el plásmido pMPO58. Para obtener versiones de estos vectores sin el atenuador *nasF*, ambos se digirieron con *EcoRI*, enzima que flanquea el atenuador, y se religaron para generar los plásmidos, pMPO51 (*MCSII*) y pMPO52 (*MCSII-SDT7*), respectivamente.

Finalmente, a partir de estos plásmidos se obtuvieron las versiones equivalentes en vectores de bajo número de copias utilizando el pMPO20, un vector derivado de pWSK29. Este plásmido se modificó eliminando el promotor *Plac* mediante restricción con las enzimas *SacI* y *PshAI* y religación del fragmento tras hacer romos los extremos

con la ADN polimerasa de T4. El MCS original se sustituyó por el modificado MCSII mediante restricción con *KpnI* y *ClaI* y se eliminó la diana *NdeI* por digestión y rellenado con Klenow. Los módulos de expresión de pMPO51, pMPO52, pMPO57 y pMPO58 digeridos con las enzimas *NotI* y *HindIII* se clonaron en pMPO20, generándose los vectores pMPO54, pMPO55, pMPO60 y pMPO61, conservando las características de sus equivalentes en alto número de copias (Figura 12).

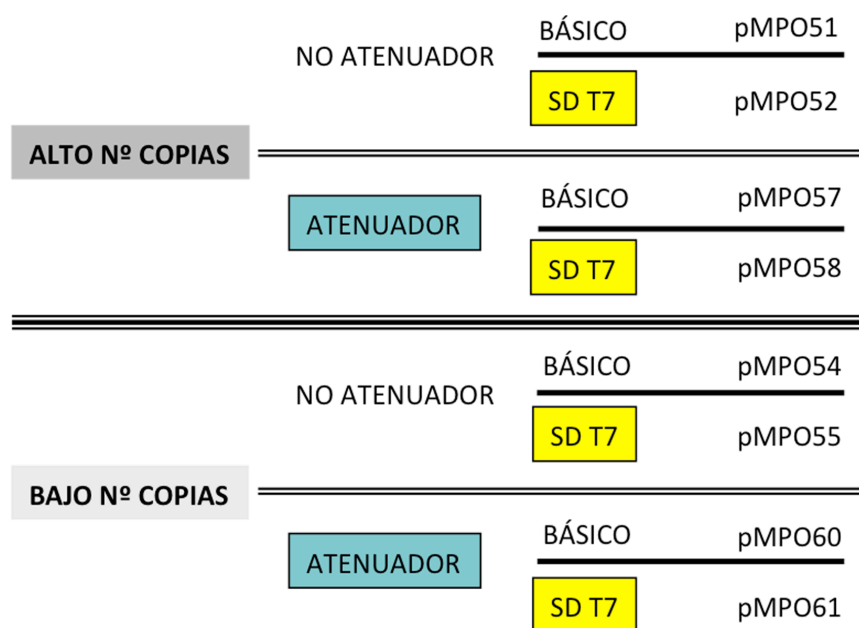


Figura 12. Diferentes vectores de expresión. Combinaciones de las principales características de los vectores construidos a partir de pMPO27.

2. MEDIDA DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS NUEVOS VECTORES.

Para comprobar la funcionalidad de los nuevos elementos incluidos en el módulo de expresión (secuencia SD T7, atenuador *nasF* y la baja dosis génica de los vectores en bajo número de copias) se construyeron fusiones traduccionales a *lacZ* en aquellos vectores que portaban la secuencia SD T7. Con el fin de comparar los niveles de expresión obtenidos utilizando la SD T7 con los que se consiguen con otras SD diferentes, se clonó la fusión traduccional *cat-lacZ* (Spaink *et al.*, 1987) en los vectores sin

SD T7 (*SDcat*), y se construyeron las versiones equivalentes de ambas fusiones en bajo número de copias.

Los ensayos de actividad β -galactosidasa de las fusiones *lacZ* construidas se realizaron usando la estirpe de *S. Typhimurium* MPO96 (Medina *et al.*, 2011), que expresa *nasR* desde el módulo regulador integrado en *trg*. A esta estirpe se le transfirieron los plásmidos de alto número de copias con *SDcat*, pMPO94 (con atenuador *nasF*) y pMPO96 (sin atenuador *nasF*), y con la SD T7, pMPO1005 (sin atenuador) y pMPO1007 (con atenuador *nasF*), o sus versiones equivalentes en bajo número de copias, pMPO1000, pMPO1001, pMPO1006 y pMPO1008, respectivamente. Los cultivos se indujeron durante 3 horas con 2 mM de salicilato sódico o con esta molécula junto con nitrato de sodio, a una concentración de 0,2 g/l, para potenciar la actividad antiterminadora de NasR e incrementar la expresión de *lacZ* en los casos en los que el atenuador *nasF* estaba presente. 2 mM de salicilato sódico se encuentra dentro de la concentración terapéutica en sangre (Frantz y O'Neill, 1995) y es suficiente para inducir completamente el sistema de expresión (Royo *et al.*, 2007).

En la Tabla 6 se muestran los datos de actividad β -galactosidasa y estos indican diferencias considerables en los niveles de expresión basales e inducidos obtenidos con los distintos vectores construidos. El máximo nivel de actividad β -galactosidasa tras la inducción con salicilato sódico (77.608 Unidades Miller) se obtiene con el vector multicopia, sin atenuador *nasF* y en presencia de la secuencia SD T7, siendo 18 veces superior al nivel inducido más bajo, que se obtiene con el vector de bajo número de copias, con atenuador *nasF* y sin SD T7. En general, con los vectores portadores de la secuencia SD T7 se consigue un nivel de actividad tras la inducción de 4 a 10 veces superior al obtenido con los vectores que llevan la *SDcat*.

Por otro lado, se puede observar que, como esperábamos, el uso del atenuador *nasF* reduce los niveles basales de expresión en todos los casos. Sin embargo, tras inducir con salicilato, con estos vectores se obtienen unos elevados niveles de expresión, llegando a alcanzar aproximadamente el 70% de los obtenidos en las mismas condiciones con los plásmidos equivalentes carentes de atenuador. Esta expresión puede

incrementarse al añadir nitrato al medio de cultivo, resultando en este caso unos niveles de expresión similares a los alcanzados con los vectores sin atenuador.

La mayor inducción (>100 veces) se obtiene con los vectores de bajo número de copias que llevan el atenuador *nasF*. Cabe destacar que el nivel de inducción más alto obtenido con los vectores de bajo número de copias es equivalente al alcanzado con su correspondiente versión multicopia mientras que el nivel basal es más bajo (véanse los valores de actividad β -galactosidasa del vector pMPO1008 con respecto a pMPO1007 en la Tabla 6). Este resultado indica que el uso de vectores de bajo número de copias permite incrementar la capacidad de regulación de la expresión sin comprometer la producción de proteínas.

Tabla 6. Niveles de expresión β -galactosidasa y ratios de inducción obtenidos con diferentes vectores de expresión en la estirpe MPO96.

Vector	<i>nasF</i>	SD	Nivel de expresión (Unidades Miller)			Veces de inducción	
			-Sal	+Sal	+Sal+NO ₃	+Sal	+Sal+NO ₃
pMPO94	si	cat	177 ± 34	13.133 ± 1.999	14.246 ± 898	74	80
pMPO96	no	cat	944 ± 55	17.593 ± 3.807	17.380 ± 1.180	19	18
pMPO1000	si	cat	59 ± 19	4.308 ± 290	9.156 ± 1.402	73	154
pMPO1001	no	cat	297 ± 33	7.209 ± 258	7.144 ± 377	24	24
pMPO1007	si	T7	1.950 ± 212	76.883 ± 9.661	75.576 ± 4.889	39	39
pMPO1005	no	T7	8.572 ± 482	77.608 ± 5.179	73.615 ± 5.729	9	9
pMPO1008	si	T7	662 ± 183	49.326 ± 1.653	71.041 ± 4.324	75	107
pMPO1006	no	T7	4.203 ± 715	70.125 ± 4.676	72.167 ± 4.282	17	17

Estirpe MPO96 con los plásmidos de alto número de copias (filas sombreadas) y bajo número de copias (filas no sombreadas). MPO96 porta *nasR* en el módulo regulador. El salicilato sódico (+Sal) induce el inicio de la transcripción desde el promotor P_m, mientras el nitrato activa a NasR (proteína antiterminadora). Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes ± la desviación estándar de los datos.

Para mostrar la funcionalidad del sistema *nasF*/NasR, se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa utilizando los vectores de bajo número de copias con la secuencia SD T7, pMPO1006 (sin atenuador *nasF*) y pMPO1008 (con atenuador *nasF*), en las estirpes de *S. Typhimurium* MPO96 (productora de la proteína antiterminadora NasR) y MPO94 (sin NasR). Los resultados mostrados en la Figura 13 indican que, en

ausencia de NasR, los niveles de expresión inducida del vector con atenuador (+*nasF*) es el 33,4% de la obtenida con el vector sin atenuador y que dicha expresión no varía en presencia de nitrato. Por el contrario, en una estirpe NasR⁺ (MPO96), la presencia de salicilato induce la expresión de *lacZ* y esta se potencia con la adición de nitrato hasta alcanzar los niveles obtenidos con el vector sin atenuador en la misma estirpe. Por tanto, estos resultados muestran que el incremento de la expresión debida a la adición de nitrato al medio de cultivo depende de la presencia de la proteína antiterminadora NasR, además de que una sola copia de NasR bajo el promotor *Psal* es suficiente para bloquear la terminación transcripcional mediada por el atenuador *nasF*. Por último, conviene destacar que, aunque en trabajos con células en cultivo o animales no se pueda usar nitrato sódico para la máxima inducción de la expresión, este no es realmente esencial para obtener unos valores óptimos, aún en presencia de *nasF* y NasR. Como se observa en la Figura 13, en estas condiciones, la inducción sin nitrato sódico alcanza unos niveles de expresión que corresponden al 69,4% de los resultados obtenidos añadiendo dicho compuesto.

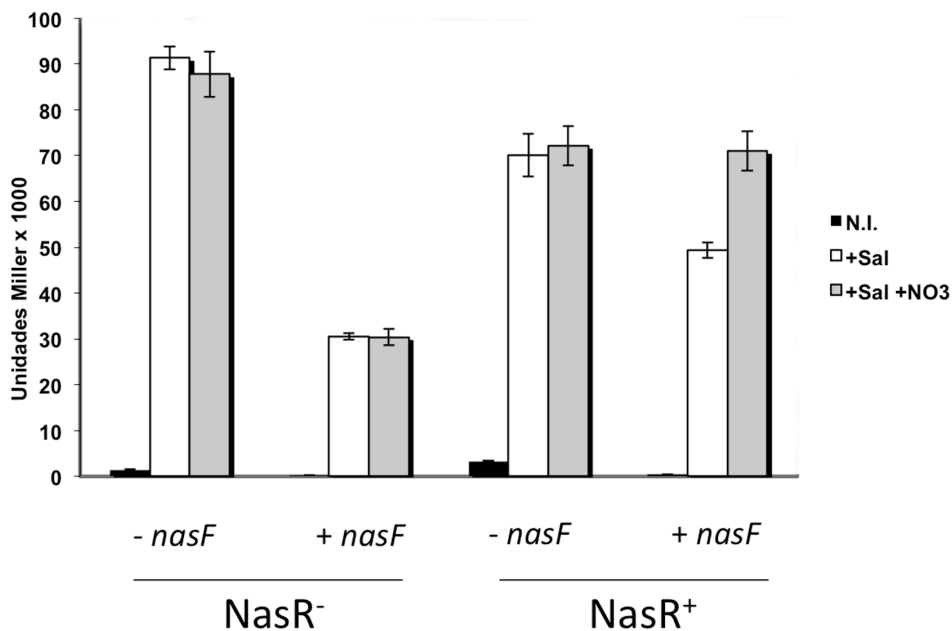


Figura 13. Actividad β -galactosidasa de estirpes de *S. Typhimurium* con o sin *nasR* en el módulo regulador. Las estirpes portan los plásmidos pMPO1006 y pMPO1008, sin y con atenuador *nasF*, respectivamente. Barras negras, no inducidos; blancas, inducidos con salicilato; grises, inducción con salicilato más nitrato. Las barras muestran la media de tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos.

En conjunto, estos resultados indican que, usando las mismas condiciones de inducción, se pueden obtener diferentes cantidades de proteína dependiendo de las características del vector utilizado y de la estirpe seleccionada.

3. SECRECIÓN DIRIGIDA DE PROTEÍNAS AL CITOPLASMA EUCARIÓTICO.

Para utilizar *Salmonella* como vector productor de agentes terapéuticos hay que considerar que las proteínas expresadas pueden quedar en el interior de la bacteria o de la vacuola que la contiene en la célula eucariótica. Con el fin de secretar proteínas desde la bacteria al citosol eucariótico, se modificaron los vectores que portan la secuencia SD T7 de alto número copias, pMPO52 (sin atenuador *nasF*) y pMPO58 (con atenuador *nasF*), y los de bajo número de copias, pMPO55 (sin atenuador *nasF*) y pMPO61 (con atenuador *nasF*), añadiendo los 450 nucleótidos del extremo 5' del gen *sspH2*, generando así los plásmidos pMPO53, pMPO59, pMPO56 y pMPO62, respectivamente. SspH2 es una proteína efectora de *Salmonella* secretada al citoplasma eucariótico a través del TTSS de la isla de patogenicidad 2 (SPI-2). Se ha descrito que la fusión a este péptido señal N-terminal es suficiente para dirigir la secreción de proteínas producidas por *Salmonella* al citosol de células eucarióticas (Miao y Miller, 2000; Panthel *et al.*, 2005). Para comprobar la capacidad del péptido líder SspH2, clonado en los vectores anteriormente descritos, de dirigir la secreción de proteínas de fusión desde *Salmonella* al citosol eucariótico, se fusionaron a este dos secuencias en tándem del epítipo HA. Para ello se asociaron los oligonucleótidos Sal-HA-Hind+ y Sal-HA-Hind- y se clonaron en el vector de alto número de copias sin atenuador *nasF* pMPO53 (Pm- SD T7- *sspH2*) digerido con las enzimas de restricción *SalI* y *HindIII*, generando el plásmido pMPO1004. El vector se transfirió a la estirpe MPO94, que porta el módulo regulador del sistema de expresión inducible por salicilato (*nahR/Psal-xylS2/Ptac-gfp*) integrado en el locus *trg*, y se infectaron células tumorales HeLa como se ha descrito en Materiales y Métodos (apartado 9.1). Las muestras no inducidas e inducidas con salicilato sódico 2 mM fueron analizadas tras 4 horas de inducción mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las células infectadas se fijaron, permeabilizaron y se marcaron con el

anticuerpo primario anti-HA. En la Figura 14A se observa que el péptido SspH2-2HA producido por la bacteria intracelularmente en condiciones de inducción es secretado al citoplasma eucariótico, mientras que en ausencia de inductor, no se detecta secreción (Figura 14C).

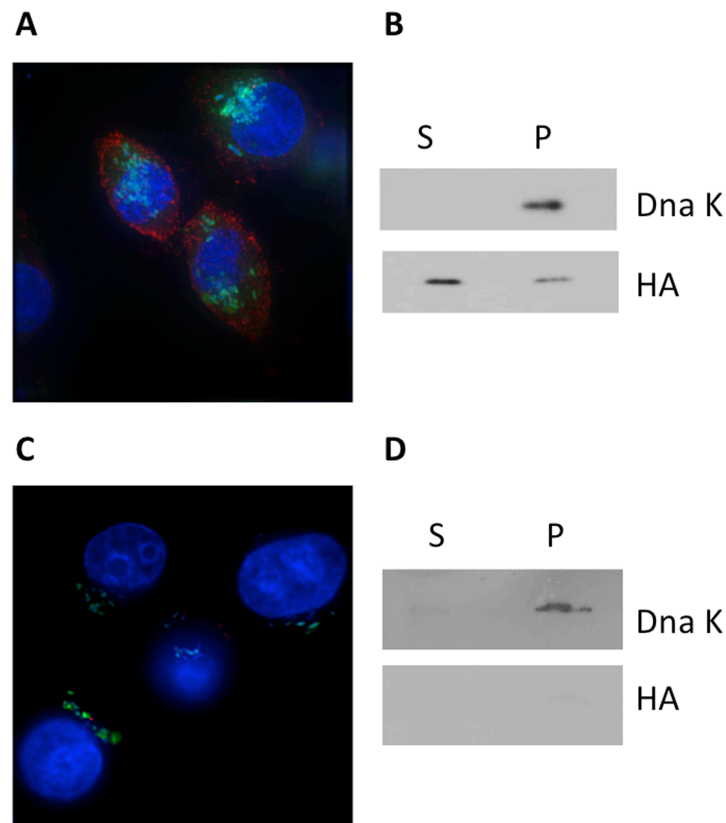


Figura 14. Secreción regulada de sspH2-HA en *S. Typhimurium* a través del sistema de secreción tipo III. Secreción de HA en células HeLa infectadas con la estirpe MPO94 portando el plásmido pMPO1004 en presencia (A) y en ausencia de salicilato sódico (C). Las células fueron fijadas, permeabilizadas y marcadas con el anticuerpo primario anti-HA, detectado con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG conjugado con Alexa 555 (rojo). Los núcleos de las células se tiñeron con Hoechst (azul). La bacteria que expresa constitutivamente GFP se muestra en verde. Las imágenes (1000x) corresponden al solapamiento de los 3 canales visualizados por un microscopio Deltavision. (B) 20 μ g de proteína del precipitado celular (P) y el volumen equivalente del sobrenadante de la fracción citoplasmática (S) obtenida de los lisados de células infectadas con MPO94 portando pMPO1004 tras 4 horas en presencia de salicilato o en ausencia (D) fueron sometidas a SDS-PAGE al 12,5% y analizadas por Western blot usando los anticuerpos anti-HA y anti-DnaK. DnaK es usado para confirmar la ausencia de la bacteria en el sobrenadante.

Para estimar la eficiencia de la secreción, se recogieron células infectadas no inducidas e inducidas durante 4 horas, se lisaron suavemente para no afectar la integridad de la bacteria y se analizaron las proteínas del sobrenadante (fracción

citoplasmática) y del precipitado celular (bacterias y restos celulares) con los anticuerpos anti-HA y anti-DnaK mediante Western blot. La proteína DnaK es una chaperona bacteriana usada como control, ya que sólo se encuentra en la fracción citoplasmática si durante el proceso se ha lisado la bacteria. En este caso, las proteínas producidas por la bacteria presentes en esta fracción son consecuencia de la lisis bacteriana y no de la secreción. En la Figura 14B se observa que, en condiciones de inducción, la mayor parte de la producción de SspH2-2HA (en torno a un 75%) está siendo secretado al citoplasma eucariótico, mientras que en las muestras no inducidas (Figura 14D) no se detecta ni producción ni secreción aunque las células están infectadas, como indica la presencia de la chaperona bacteriana DnaK en el precipitado celular.

4. PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS DE INTERÉS.

Una vez comprobado que los vectores construidos permiten la síntesis y secreción controlada al citosol eucariótico, el siguiente paso fue producir y secretar proteínas que pudieran ser de utilidad en terapia antitumoral.

La mayoría de los cánceres humanos están asociados a mutaciones en el gen *p53* o alteraciones en su ruta de acción (Soussi *et al.*, 2000). La proteína p53 es un factor de transcripción formado por dos dominios de transactivación en el extremo amino-terminal, seguido por un dominio rico en prolinas, un dominio central de unión a ADN (aa 102-292), el dominio C-terminal de tetramerización y un dominio básico (Essmann y Schulze-Osthoff, 2012). La mayoría de estas mutaciones se localizan en el dominio de unión a ADN (Walker *et al.*, 1999), afectando a la interacción con sus dianas transcripcionales que median la parada del ciclo celular, la reparación del ADN o la inducción de la apoptosis entre otras funciones, en respuesta a estrés celular (Senatus *et al.*, 2006).

Dado que la superproducción de esta proteína en células tumorales podría inducir apoptosis en dichas células, se están desarrollando distintas estrategias para expresar p53 como terapia antitumoral (Fisher y Schulze-Osthoff, 2005; Essmann y Schulze-Osthoff, 2012). Por otra parte, se ha descrito que el péptido derivado del C-

terminal de p53 (aa 361-380) es capaz de inducir apoptosis en células tumorales que sobreexpresan p53 o que tienen p53 mutado, a diferencia de las células normales que no se ven afectadas (Rosal *et al.*, 2005).

Debido a la importancia de la proteína p53, clonamos las secuencias codificantes de la proteína p53 completa y el péptido C-terminal de p53 acopladas a la secuencia señal de *sspH2* en el vector pMPO53 (Pm-SD T7-*sspH2*), generando los vectores de alto número de copias pMPO72 y pMPO73, respectivamente.

A partir de estos plásmidos construimos las fusiones *sspH2*-2HA-p53 completo (pMPO1016) y *sspH2*-2HA-Cp53 (pMPO1017) para determinar si la estirpe MPO95 de *S. Typhimurium*, que porta el módulo regulador del sistema de expresión inducible por salicilato ($\Delta trg::(nahR/Psal-xylS2/Ptac-gfp)$), era capaz de producir y secretar estas proteínas al citoplasma eucariótico. La estirpe MPO95 es isogénica de la estirpe MPO94, usada previamente, a la que se le ha eliminado el gen de resistencia al antibiótico. Con esta estirpe se infectaron las líneas de adenocarcinoma mamario humanas MCF-7 (p53 wt) y MDA-MB-231 (p53 mutado en el aa 280), a una m.o.i de 1:100, con esta estirpe portando el plásmido vacío pMPO53 (*SspH2*), el control de secreción pMPO1004 (*SspH2*-2HA), el plásmido productor de p53 pMPO1016 (*SspH2*-2HA-p53) y el plásmido productor del péptido Cp53 pMPO1017 (*SspH2*-2HA-Cp53). Tras 4 horas de inducción, las células fueron fijadas, permeabilizadas y marcadas con el anticuerpo anti-HA para analizar la presencia de las fusiones en el citoplasma de las células tumorales. Como se indica en la Figura 15, sólo el péptido C-terminal se secreta eficientemente al citoplasma eucariótico (rojo).

Estos resultados indican que péptidos como Cp53 pueden ser secretados utilizando el TTSS aunque aún queda por determinar si la cantidad secretada es suficiente para inducir apoptosis en la célula tumoral y si el péptido translocado es funcional, ya que los primeros ensayos realizados mediante citometría de flujo no muestran cambios en la distribución de las fases del ciclo celular cuando se superproduce Cp53 (datos no mostrados). Por otra parte, como ocurre en el caso de la proteína p53 completa, no todas las proteínas producidas pueden ser secretadas a través

de este sistema, siendo necesario desarrollar nuevas estrategias para liberarlas al citosol eucariótico.

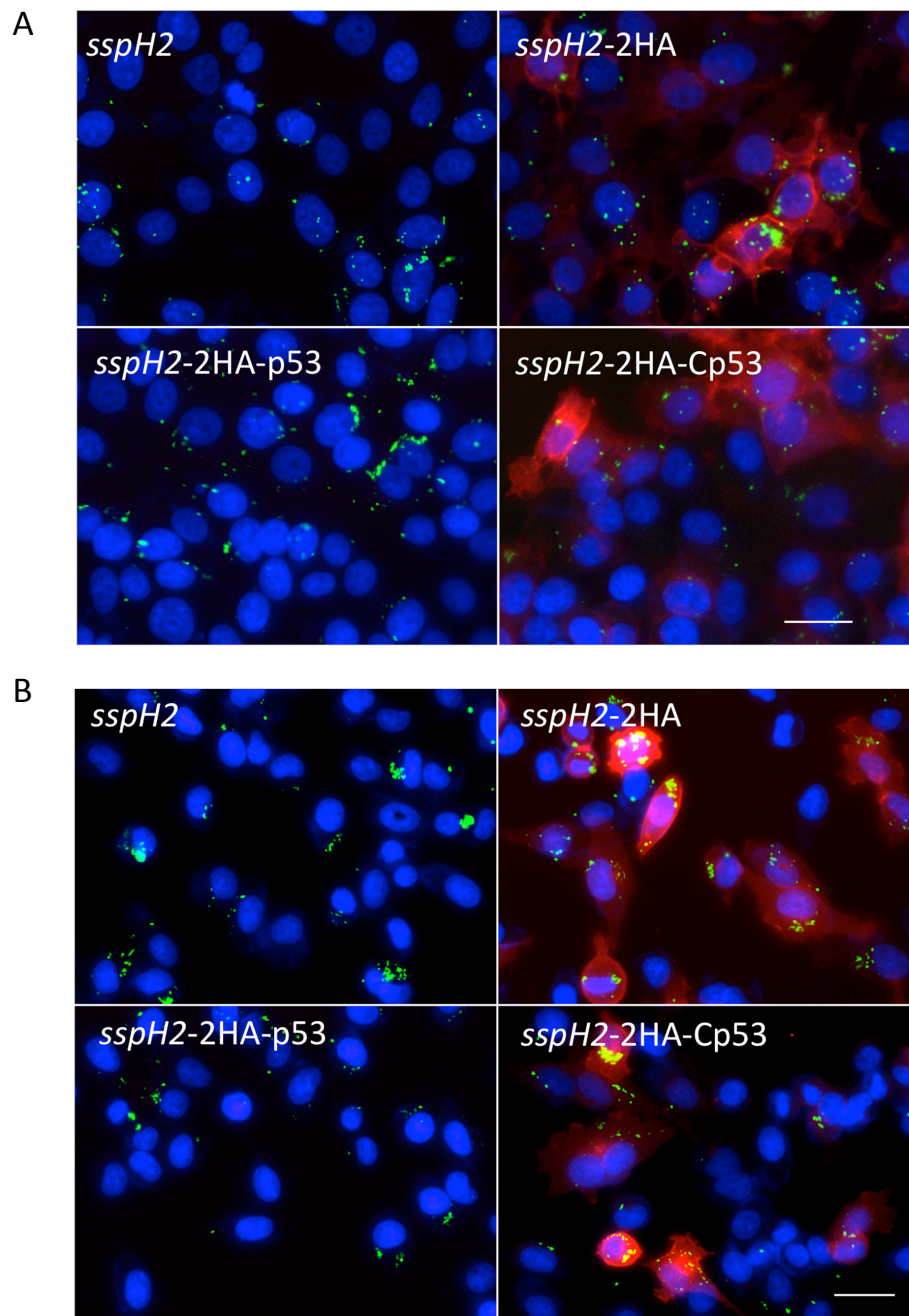


Figura 15. Secreción regulada de p53 y Cp53 en *S. Typhimurium* a través del sistema de secreción tipo III al citoplasma de células tumorales. Células MCF-7 (A) y MDA-MB-231 (B) infectadas con la estirpe MPO95 portando los plásmidos controles vacío (*sspH2*) y de secreción (*sspH2-2HA*), y aquellos que expresan las fusiones *sspH2-HA-p53* y *sspH2-2HA-Cp53*, se observaron tras 4 horas de inducción mediante microscopía de fluorescencia (320x). Las imágenes representan la superposición de los marcajes con el anticuerpo anti-HA (rojo), la tinción de los núcleos con Hoechst (azul) y la expresión constitutiva de GFP por parte de la bacteria (verde). Escala: 25 μ m.

Capítulo 2

Optimización de la producción de citosina deaminasa.

1. SISTEMA CITOSINA DEAMINASA/5-FC.

El circuito transcripcional en cascada inducible por salicilato sódico ha sido validado por nuestro grupo en ratones con tumores implantados que fueron infectados con cepas de *S. Typhimurium* expresando la enzima citosina deaminasa. La inducción de la expresión con salicilato produjo una reducción significativa del crecimiento tumoral (Royo *et al.*, 2007). La enzima citosina deaminasa (CD; EC 3.5.4.1), presente solo en algunas bacterias y hongos, cataliza la conversión de citosina a uracilo y del análogo exógeno 5-Fluorocitosina (5-FC) a 5-Fluorouracilo (5-FU), un metabolito muy tóxico para las células en crecimiento usado habitualmente como agente quimioterapéutico ya que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos (Mullen *et al.*, 1992).

El metabolismo del 5-FU y las vías de citotoxicidad se detallan en la Figura 16. El 5-FU es metabolizado intracelularmente a sus formas activas 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (5-FdUMP), 5-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (5-FdUTP) y 5-fluoridina-5'-trifosfato (5-FUTP). El 5-FdUMP se une irreversiblemente a la enzima timidilato sintasa, que convierte el desoxiuridilato (dUMP) en timidilato (dTMP). Como la timidilato sintasa es la única fuente disponible para la síntesis de dTTP *de novo*, una célula tratada con 5-FU no puede reparar ni replicar su ADN. Por otro lado, el producto 5-FUTP se incorpora al ARN en lugar del UTP, impidiendo la poliadenilación del ARNm, la metilación de los ARNt y el procesamiento de los precursores de los ARNr (Grem, 1996).

Como uno de los objetivos principales de esta tesis, nos propusimos optimizar la producción de citosina deaminasa por *S. Typhimurium* mediante dos estrategias distintas. Por un lado, utilizando los vectores de expresión mejorados descritos previamente, lo que se traduciría en un aumento del 5-FU producido. Por otro lado, y dado que este metabolito es también tóxico para la propia *Salmonella*, construyendo un mutante resistente a 5-FU que nos permitiera producir el agente citotóxico durante más tiempo, sin afectar a la bacteria productora de citosina deaminasa.

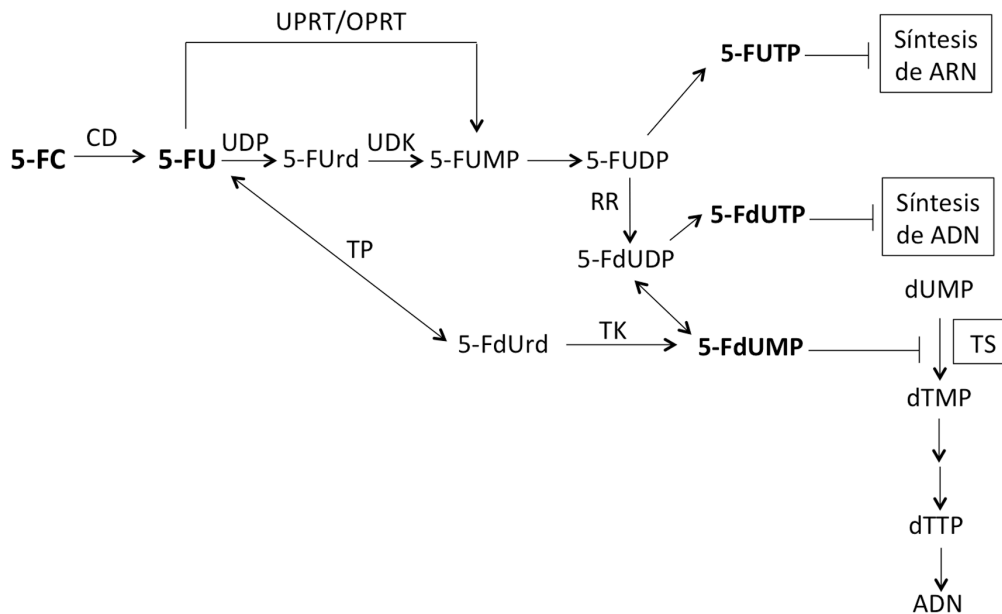


Figura 16. Metabolismo del 5-FU y citotoxicidad. La conversión del 5-FU a 5-fluoridina 5'-monofosfato (5-FUMP) puede realizarse directamente a través de la orotato fosforribosil transferasa (OPRT) o la uracil fosforribosil transferasa (UPRT), o indirectamente vía 5-fluorouridina (5-FUrd) a través de la uridina fosforilasa (UDP) y uridina quinasa (UDK). La fosforilación del 5-FUMP da lugar a 5-FUrd 5'-difosfato (5-FUDP) que puede fosforilarse formando 5-FUrd 5'-trifosfato (5-FUTP), sustrato de la ARN polimerasa, o convertirse mediante la ribonucleótido reductasa (RR) en 5-fluorodesoxiuridina 5'- difosfato (5-FdUDP). que puede ser fosforilado generando 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato (5-FdUTP), sustrato de la ADN polimerasa, o desfosforilado produciendo 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (5-FdUMP) que inhibe a la timidilato sintasa (TS). Alternativamente, el 5-FdUMP se puede formar a partir del 5-FU mediante la acción de la timidina fosforilasa (TP) cuyo producto, la 5-fluoro-2'-desoxiuridina (5-FdUrd), es fosforilado por la timidina quinasa (TK) (Figura adaptada de Meyers *et al.*, 2003).

2. DESCRIPCIÓN DE PLÁSMIDOS Y ESTIRPES UTILIZADAS.

Con el fin de incrementar la producción de citosina deaminasa se construyó el vector de alto número de copias pMPO88, que porta la secuencia del sitio de unión del ribosoma del bacteriófago T7 (SD T7) y el gen *codA* de *E. coli*, que codifica la citosina deaminasa. A este gen se le modificó el codón de inicio, sustituyendo el primer nucleótido guanina por adenina, para aumentar la eficiencia de la traducción. Para ello, se amplificó la secuencia del gen *codA* de *E. coli* con los oligonucleótidos F-CID-TG y R-CID, y se clonó en el plásmido pMPO52 (Pm- SD T7) digerido con *NdeI* y tratado con

Klenow. Esto supone una doble mejora con respecto al vector pMPO16 utilizado por Royo *et al.* (Royo *et al.*, 2007) en la validación del sistema de expresión *in vivo*, ya que este lleva la secuencia original del gen *codA* de *E. coli* con su propia SD.

Los módulos de expresión de pMPO88 y pMPO16 digeridos con las enzimas *NotI* y *HindIII* se clonaron en pMPO20, digerido con las mismas enzimas, para obtener los plásmidos equivalentes de bajo número de copias pMPO90 y pMPO1088, respectivamente.

En los distintos experimentos realizados se comparó el vector vacío como control (pMPO20) y los vectores con las dos versiones de CodA: la equivalente a la de *E. coli* del vector pMPO1088, a la que llamamos CD, y la que incluía las mejoras en el vector pMPO90, denominada CDmod. La estirpe productora de *S. Typhimurium* fue la estirpe MPO95, que lleva integrado el módulo regulador del sistema de expresión en cascada transcripcional en *trg*.

El vector con la versión modificada de la citosina deaminasa CDmod se probó además en un mutante de delección del gen *upp* (MPO323). El gen *upp* codifica la uracil fosforribosil transferasa, que cataliza la conversión de uracilo a uracilo monofosfato, o su análogo 5-FU a su forma activa 5-FUMP. La delección de este gen confiere resistencia a 5-FU (Glaab *et al.*, 2005) por lo que las bacterias que expresen la citosina deaminasa portando esta delección podrían producir el enzima durante más tiempo. El gen *upp* se sustituyó en la estirpe MPO95 por el gen de resistencia a cloranfenicol amplificado a partir del plásmido pKD3 con los oligonucleótidos F-*upp*-P1 y R-*upp*-P2, siguiendo el método descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000).

3. SUPERPRODUCCIÓN DE CITOSINA DEAMINASA EN RESPUESTA A LA INDUCCIÓN CON SALICILATO SÓDICO.

Para comparar la producción de citosina deaminasa de los vectores de bajo número de copias que expresan CD y CDmod, se recogieron cultivos bacterianos en condiciones de no inducción e inducción con salicilato sódico durante 4 horas para obtener extractos totales y comparar las proteínas producidas. La Figura 17 muestra el

análisis de los extractos tras ser sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% y teñidos con *EzBlue*. Como puede observarse, la banda de 47,52 kDa correspondiente a la citosina deaminasa solo está presente en condiciones de inducción cuando se utilizan los plásmidos que expresan el gen *codA*, aunque existen diferencias en cuanto a los niveles de producción obtenidos según el vector utilizado. Los resultados muestran que la modificación del codón inicial junto con la incorporación de la secuencia SD del fago T7 (CDmod), aumenta la expresión de la citosina deaminasa cuando se comparan con la versión original (CD). Curiosamente, el hecho de usar una estirpe Δupp también influye en la cantidad de proteína producida, siendo mayor en esta que en un fondo *upp* silvestre.

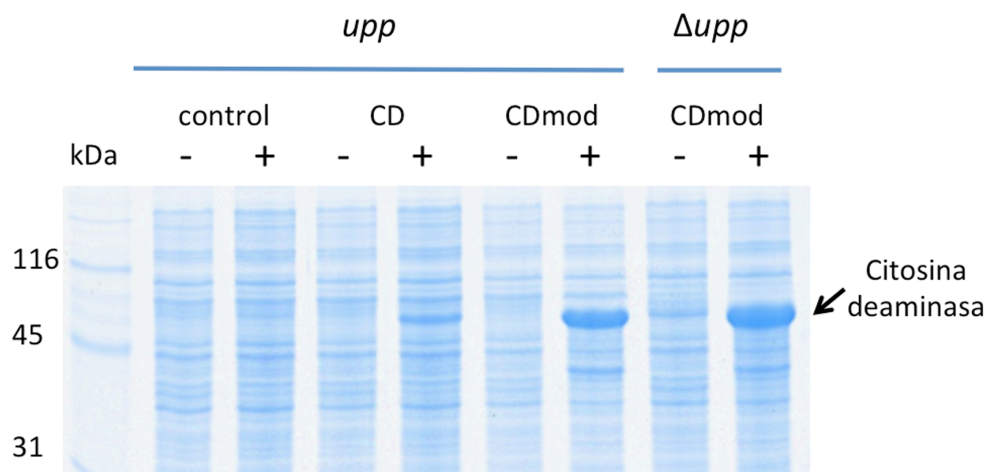


Figura 17. Análisis mediante SDS-PAGE de la superproducción de citosina deaminasa en condiciones de no inducción (-) e inducción con salicilato (+). El carril 1 muestra el marcador de peso molecular. Los carriles 2-7 muestran el patrón de proteínas de la estirpe *upp* con el plásmido pMPO20 (control, carriles 2 y 3), el plásmido pMPO1088 conteniendo la secuencia de *codA* original (CD, carriles 4 y 5) y el vector pMPO90 con la SDT7 y la secuencia de *codA* modificada (CDmod, carriles 6 y 7). Los carriles 8 y 9 muestran el patrón de proteínas del vector pMPO90 en un fondo Δupp .

4. SENSIBILIDAD A 5-FLUOROURACILO.

Las bacterias productoras de citosina deaminasa convierten el 5-FC disponible en 5-FU, metabolito tóxico para células en crecimiento. Para comprobar que la enzima producida era funcional se realizó un test de sensibilidad a 5-FU en gotas. Este test

consistió en analizar el crecimiento en placas de medio mínimo selectivo con 0.5, 1, 1.5, 3 y 5 μM de 5-FC de diluciones de cultivos, no inducidos o inducidos previamente con salicilato sódico durante 4h.

En la Figura 18, se muestra el crecimiento tras incubar 24 h diluciones de los cultivos desde 10^2 hasta 10^6 en placas de medio mínimo sin 5-FC o suplementado con 1 y 3 μM de este compuesto. Como puede observarse, la presencia de 1 μM de 5-FC no afecta al crecimiento de los cultivos no inducidos (fila superior de la figura) mientras que, en presencia del inductor (fila inferior de la figura), existen diferencias según la estirpe y el plásmido utilizado. En un fondo *upp* silvestre, solo aquella que expresa CDmod se ve afectada en el crecimiento, sin embargo, esto no ocurre con dicho vector transformado en una estirpe Δupp , dado que esta es resistente al 5-FU producido.

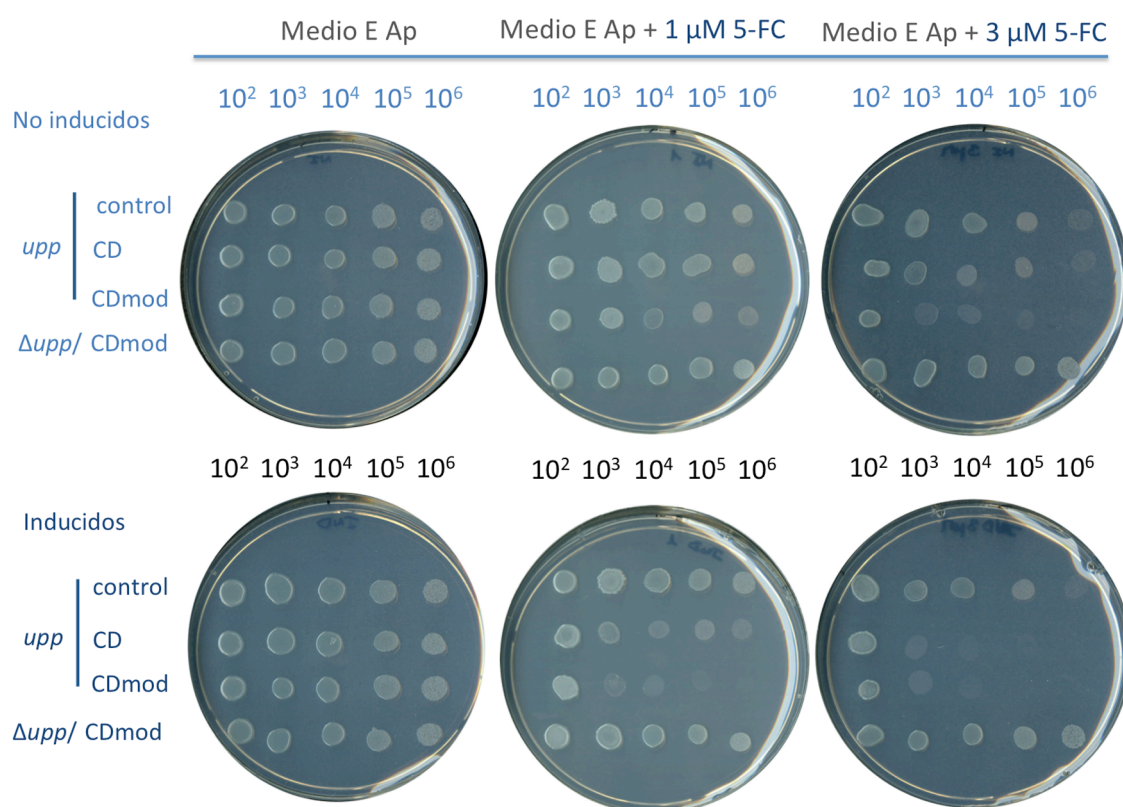


Figura 18. Test de sensibilidad al 5-FU en gotas. Se representa el crecimiento de las diluciones 10^2 - 10^6 de los cultivos no inducidos (parte superior) e inducidos (parte inferior) tras 24 h en placas de medio mínimo E con ampicilina sin sustrato 5-FC (columna 1), con 5-FC 1 μM (columna 2) ó 5-FC 3 μM (columna 3).

A concentraciones superiores de 5-FC (3 μ M) el crecimiento de la estirpe Δupp no se vió afectado por el 5-FU producido, mientras que las bacterias *upp* silvestres productoras de citosina deaminasa en condiciones de inducción solo crecieron en las primeras diluciones, mostrando igual sensibilidad al 5-FU independientemente del plásmido utilizado. Cabe destacar que la bacteria productora de CDmod en un fondo *upp* silvestre es sensible incluso en condiciones de no inducción, lo que indica que el nivel de expresión basal de CDmod es superior al obtenido con la versión CD.

5. ACTIVIDAD CITOSINA DEAMINASA.

El incremento de la producción de citosina deaminasa, cuando usamos el vector mejorado en una estirpe *upp* silvestre, conlleva un aumento de la sensibilidad al 5-FU, lo que nos permite afirmar que la proteína producida es funcional, sin embargo, de esta forma no podemos cuantificar ni comparar la producción obtenida por diferentes estirpes debido a la resistencia al 5-FU que presenta el mutante en este gen.

Para comparar la actividad citosina deaminasa de los diferentes plásmidos y del vector mejorado en las distintas estirpes, analizamos las cinéticas de desaparición del sustrato 5-FC a partir de los extractos obtenidos, como se describe en el apartado 8.2 (Materiales y Métodos). El máximo de absorción de la 5-fluorocitosina en el espectro se sitúa a 290 nm. A medida que se produce la conversión del 5-FC a 5-FU por acción de la citosina deaminasa, se observa una disminución de la absorción del sustrato a lo largo del tiempo hasta que no queda 5-FC disponible en el medio. A partir de las concentraciones calculadas aplicando la ley de Lambert- Beer, teniendo en cuenta la absorbancia medida en las cinéticas de desaparición del sustrato, y considerando la cantidad de proteína total que usamos en la reacción, calculamos la actividad citosina deaminasa de cada extracto.

La siguiente gráfica (Figura 19) muestra la actividad citosina deaminasa máxima alcanzada en cada extracto en condiciones de no inducción y tras 4 h de inducción. En ausencia del inductor, la actividad citosina deaminasa es muy baja y prácticamente la misma en todos los casos mientras que, en condiciones de inducción, se observan

diferencias importantes dependiendo del vector y la estirpe utilizada. En un fondo *upp* silvestre, la actividad citosina deaminasa del extracto en presencia del inductor es 3,40 veces superior al basal, diferencia que se incrementa hasta 12,75 veces en el caso de la versión CDmod.

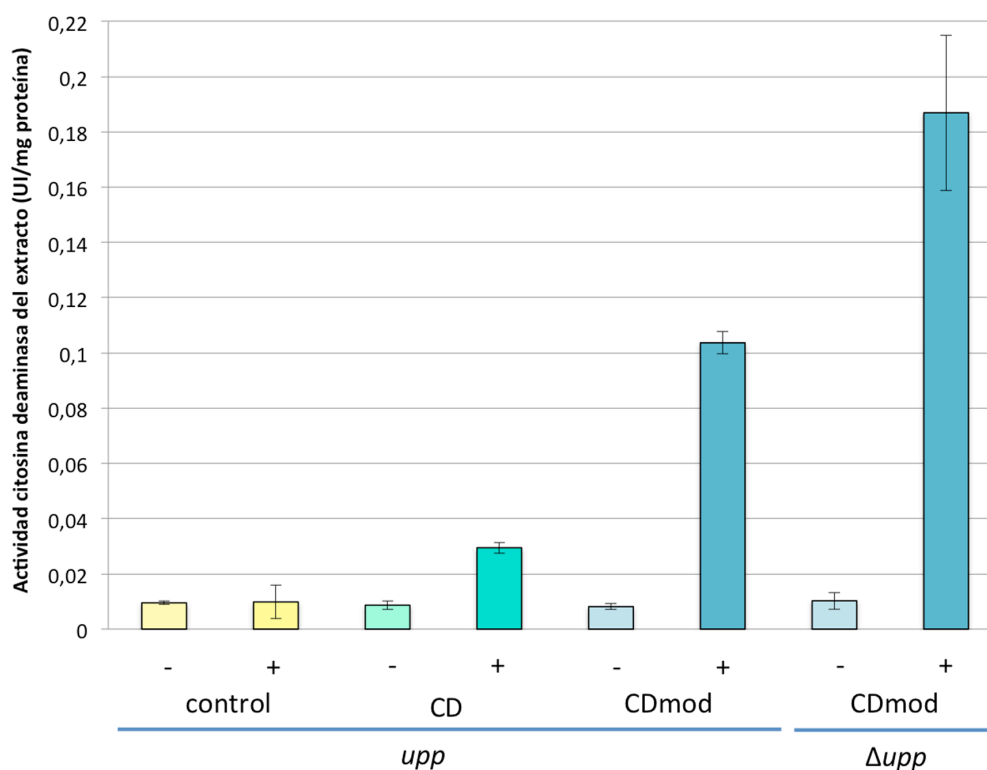


Figura 19. Representación gráfica de la actividad citosina deaminasa de los extractos, en condiciones de no inducción (-) e inducción (+), de las estirpes *upp* silvestre y mutante con los plásmidos control, el plásmido que expresa la citosina deaminasa original (CD) y el vector mejorado de la citosina deaminasa (CDmod). Las dos últimas columnas corresponden a la estirpe Δupp portando el plásmido pMPO90 (CDmod). Los valores representados son la media de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos.

Por consiguiente, podemos afirmar que la actividad de la versión modificada de CodA es superior (3,75 veces) a la obtenida con la secuencia original de *E. coli*. Por otra parte, la gráfica muestra que con dicho vector y en un fondo Δupp , la actividad citosina deaminasa puede verse incrementada en 1,8 veces con respecto a la obtenida en un fondo *upp* silvestre, por lo que la utilización del vector CDmod junto con la estirpe resistente a 5-FU supone un incremento de la actividad citosina deaminasa de aproximadamente 6 veces.

Capítulo 3

Superproducción del factor de virulencia de *Salmonella* SpvB.

1. EL FACTOR DE VIRULENCIA SpvB.

La proteína SpvB es uno de los cuatro efectores codificados en el locus *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) que está formado por el operón *spvABCD* y el gen regulador *spvR* (Fang *et al.*, 1991; Krause *et al.*, 1992). Este locus, presente solo en estirpes de *Salmonella enterica* no tifoideas como *S. Typhimurium* (Guiney *et al.*, 1994), se localiza en el plásmido de virulencia (Gulig *et al.*, 1993; Guiney *et al.*, 1994) o en el cromosoma bacteriano (Boyd y Hartl, 1998; Libby *et al.*, 2002), y es en gran parte, el responsable de la virulencia en animales y humanos (Fierer *et al.*, 1992 ; Libby *et al.*, 2000; Matsui *et al.*, 2001; Browne *et al.*, 2002).

La proteína SpvB de 65,6 KDa contiene los dominios amino y carboxi-terminal separados por un puente de siete prolinas. La función del dominio N-terminal es desconocida y existe controversia en cuanto al mecanismo de translocación de la proteína al citosol eucariótico. Algunos estudios sugieren el sistema de secreción tipo III SPI-2 (Browne *et al.* 2002; Browne *et al.*, 2008) como la vía más probable, mientras que otros aseguran que la secreción de SpvB es independiente de este sistema (Gotoh *et al.*, 2003). Por el contrario, el dominio C-terminal se encuentra bien caracterizado. Este dominio confiere actividad ADP-ribosil transferasa a la proteína SpvB (Otto *et al.*, 2000; Lesnick *et al.*, 2001; Tezcan-Merdol *et al.*, 2001), uniendo de forma covalente ADP-ribosa a la arginina-177 de los monómeros de G-actina (Hochmann *et al.*, 2006). Esta modificación evita su incorporación a los polímeros de actina que se encuentran en continua formación y despolimerización dentro de la célula, dando lugar a la pérdida de los filamentos de F-actina (Lesnick *et al.*, 2001; Browne *et al.*, 2002; Tezcan-Merdol *et al.*, 2005) e induciendo la apoptosis de las células epiteliales y macrófagos (Paesold *et al.*, 2002; Kurita *et al.*, 2003; Libby *et al.*, 2000).

En los últimos años, se están estudiando una serie de compuestos que interfieren en la dinámica del citoesqueleto con el fin de ser usados como posibles agentes quimioterapéuticos (Senderowicz *et al.*, 1995; Udagawa *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2011). Por esta razón, nos planteamos explorar la posibilidad de utilizar SpvB como agente antitumoral. Con este objetivo hemos usado *S. Typhimurium* para superproducir SpvB

de forma controlada en el interior de células tumorales mediante el sistema de expresión en cascada transcripcional inducible por salicilato junto con los vectores de expresión mejorados.

2. PRODUCCIÓN CONTROLADA EN CÉLULAS TUMORALES.

Para la síntesis intracelular de la proteína SpvB en células tumorales, se construyó el vector de expresión pMPO1036, que porta el gen *spvB* bajo el control del promotor Pm y la SD del bacteriófago T7. Para ello, se amplificó el gen *spvB* de la estirpe de *Salmonella* 14028 con los oligonucleótidos spvB F1 y spvB R1 y el producto digerido con las enzimas *NdeI* y *EcoRV* se clonó en el vector de expresión de alto número de copias pMPO52 (Pm-SD T7). Los experimentos se realizaron en la estirpe atenuada Δ *spvB* MPO302. Esta se obtuvo por escisión de la resistencia a kanamicina de la estirpe Δ *spvB*::Kan^r (MPO98) obtenida de la transducción de la estirpe MPO95 con un lisado de P22 obtenido sobre la estirpe MPO36 (Δ *spvB*::Kan^r). Para generar esta estirpe, se amplificó mediante PCR la secuencia del gen de resistencia a kanamicina del plásmido pKD4 (Datsenko y Wanner, 2000) con los oligonucleótidos SpvBprin-P2 y antispvBfin-P1, y siguiendo el método descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000) se sustituyó el gen *spvB* de la estirpe 14028.

Con el fin de determinar si la expresión intracelular controlada de SpvB utilizando *S. Typhimurium* como vector produce algún efecto sobre las células tumorales, se infectaron las líneas HeLa y MCF-7 a una m.o.i de 1:100 con la estirpe atenuada Δ *spvB* (MPO302) portando el vector vacío control (pMPO52) o *spvB* (pMPO1036). Las imágenes tomadas al microscopio invertido con contraste de fases tras 20 horas de inducción (Figura 20) muestran cambios en la morfología de las células MCF-7 infectadas con estirpes Δ *spvB* productoras de SpvB. Estas células adquieren una forma esférica que no se corresponde con la morfología habitual que presentan las células no infectadas o incluso las infectadas con el plásmido control. El mismo efecto se observa en la línea tumoral HeLa (imagen no mostrada).

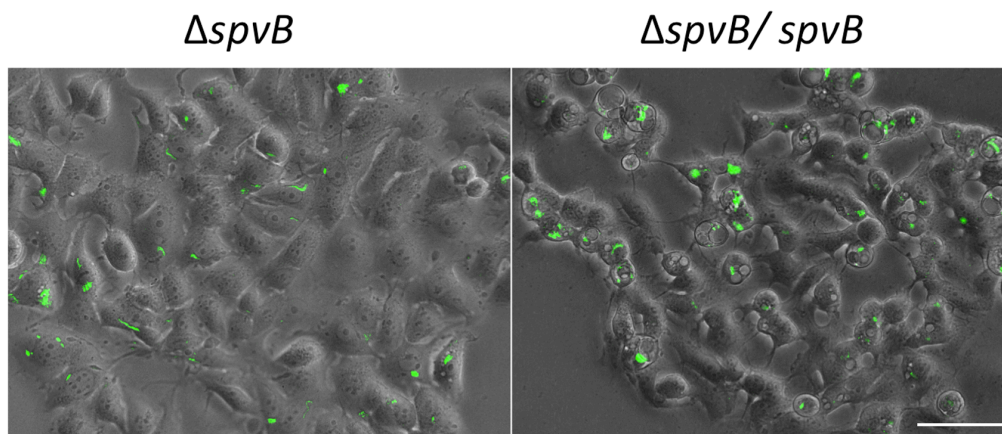


Figura 20. Cambio morfológico producido por la expresión intracelular de SpvB en células MCF-7 infectadas tras 20 horas de inducción. Las imágenes corresponden a la superposición de la visualización (320x) con contraste de fases de la morfología celular y con microscopía de fluorescencia de la proteína GFP expresada constitutivamente por la bacteria *S. Typhimurium* MPO302 ($\Delta spvB$) (verde) portando los plásmidos de alto número de copias pMPO52 (control) y pMPO1036 (*spvB*). Escala: 25 μ m.

Para comprobar si estos cambios se deben a la pérdida de los filamentos de actina, las muestras sin inducir e inducidas tras 4 y 20 horas con salicilato sódico fueron fijadas, permeabilizadas y marcadas con faloidina acoplada a rodamina para visualizar el estado de los filamentos de F-actina al microscopio de fluorescencia. Como se muestra en la Figura 21, las células infectadas con la estirpe $\Delta spvB$ produciendo SpvB tras 4 horas de inducción, no presentan tinción de los filamentos de actina, a diferencia de las infectadas con bacterias no productoras de SpvB (plásmido control) y las no infectadas, que mantienen la actina intacta (rojo). A partir de las imágenes tomadas al microscopio de fluorescencia de las muestras inducidas produciendo SpvB, se determinó el número de células infectadas que habían perdido los filamentos de actina. Como se indica en la Tabla 7, el 73% y 85% de las células MCF-7 y HeLa infectadas respectivamente, no presentan filamentos de actina tras 4 horas de inducción. Esta frecuencia aumenta ligeramente en las MCF-7 tras 20 horas de inducción, mientras en HeLa se incrementa hasta alcanzar el 99% de la población infectada. La presencia de células sin filamentos de actina tras 20 horas de inducción se correlaciona además con una drástica parada en la proliferación de los cultivos (datos no mostrados).

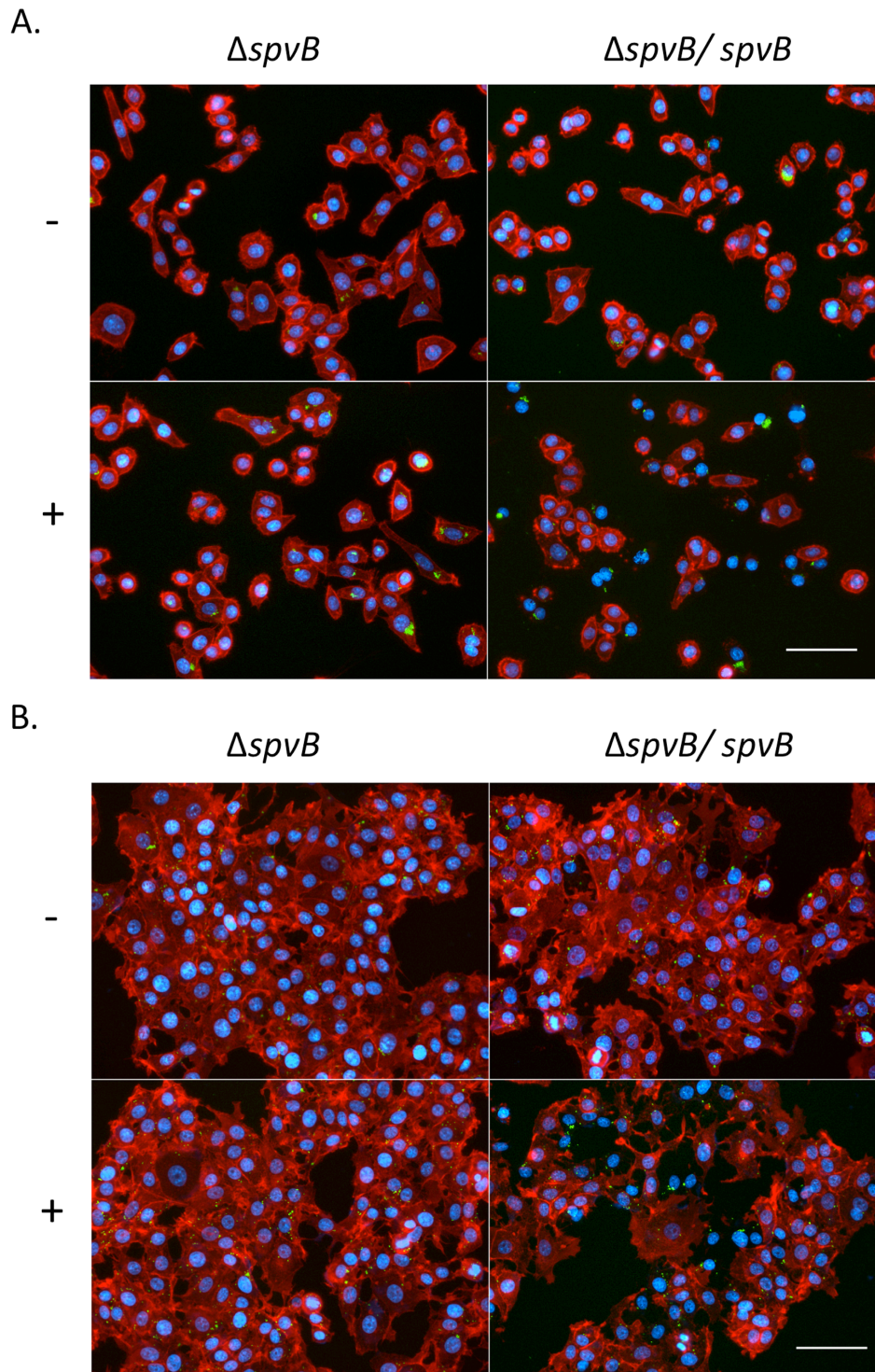


Figura 21. Efecto de la expresión intracelular de SpvB en células tumorales tras 4 horas en ausencia (-) o presencia (+) del inductor salicilato sódico. Análisis mediante microscopía de fluorescencia (320x) de células HeLa (A) o MCF-7 (B) infectadas con *S. Typhimurium* MPO302 ($\Delta spvB$) portando los plásmidos de alto número de copias pMPO52 (control) y pMPO1036 (*spvB*). Las imágenes corresponden a la superposición de la tinción de los filamentos de actina con faloidina-rodamina (rojo), la tinción de los núcleos y el ADN bacteriano con Hoechst, y la proteína GFP (verde) expresada constitutivamente por la bacteria MPO302. Escala: 25 μ m.

Tabla.7. Porcentaje de células infectadas y binucleadas sin filamentos de actina.

Línea celular	% células infectadas sin filamentos de actina	% células infectadas sin filamentos de actina y binucleadas
HeLa 4 h	85,41 ± 7,11	9,17 ± 3,39
HeLa 20 h	98,99 ± 2,11	48,01 ± 13,16
MCF-7 4 h	72,75 ± 9,98	3,33 ± 1,14
MCF-7 20 h	75,96 ± 9,69	57,94 ± 9,34

Los datos representados son la media de 5 campos independientes (~ 100 células/ campo) tras 4 y 20 horas de inducción. El error mostrado corresponde a la desviación estándar de los datos.

El análisis detallado de los núcleos teñidos con Hoechst revela un defecto en citocinesis relacionado con la pérdida del citoesqueleto de F-actina, ya que parte de esta población celular sin actina, presenta núcleos dobles (indicado con flechas Figura 22), alcanzando una frecuencia del 50% tras 20 horas de inducción en ambas líneas tumorales, como se indica en la Tabla 7. La tinción con Hoechst muestra además la presencia de células con núcleos fragmentados (cuadro amarillo en la Figura 22), sugiriendo que la pérdida de los filamentos de actina y el defecto en la citocinesis podrían conducir a la inducción de la apoptosis.

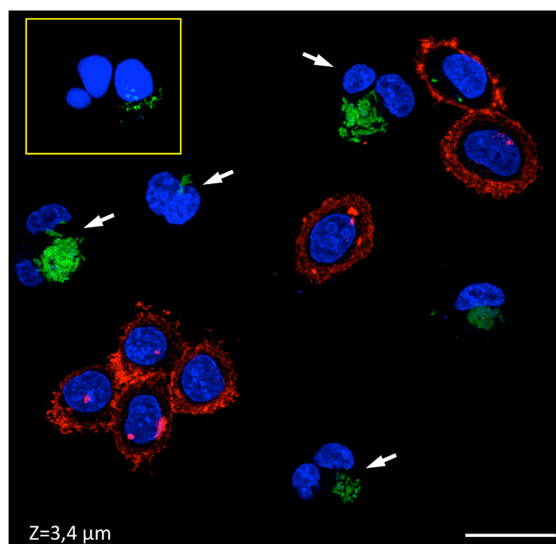


Figura 22. Microscopía confocal SPE (630x) de células HeLa infectadas con *S. Typhimurium* $\Delta spvB$ produciendo SpvB durante 20 horas en presencia del inductor salicilato sódico. La imagen de 3,4 μm corresponde a la superposición de los canales rojo (actina), verde (bacteria) y azul (núcleos de las células y ADN bacteriano). Muchas células muestran dos núcleos (flechas) y algunas presentan núcleos fragmentados (cuadro amarillo). Escala: 25 μM .

3. UTILIZACIÓN DEL MUTANTE $\Delta purD$ PARA EL ANÁLISIS DEL EFECTO DE SpvB EN CÉLULAS EUCARIÓTICAS.

La pérdida de los filamentos de actina, componente esencial del citoesqueleto, la disminución de la proliferación y el defecto en citocinesis tras 20 horas de inducción sugieren que la producción intracelular de SpvB puede afectar en último término a la viabilidad de las células infectadas.

La infección con *Salmonella* induce la apoptosis de células epiteliales no fagocíticas tras 12-18 horas, debido al efecto de ciertas proteínas sintetizadas por la bacteria durante las primeras 7-8 horas de infección (Kim *et al.*, 1998; Paesoldet *et al.*, 2002; Knodler *et al.*, 2001; Fink *et al.*, 2007). Este hecho supone un inconveniente a la hora de analizar la posible muerte celular debida a la sobreproducción de SpvB, ya que el efecto de esta proteína quedaría enmascarado por el inducido en respuesta a la infección. Para solucionar este problema, generamos una mutación *purD* en la estirpe de *S. Typhimurium* MPO302 ($\Delta spvB$) utilizada anteriormente, mediante transducción con un lisado P22 obtenido sobre la estirpe MPO39 ($\Delta purD::Kan^r$), para obtener la estirpe MPO325 ($\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$). La estirpe atenuada MPO39 se generó sustituyendo el gen *purD* de la estirpe 14028 por el gen de resistencia a kanamicina del plásmido pKD4 amplificado con los oligonucleótidos *purD*prin-P2 y *antifinpurD*-P1, mediante el método descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000). El gen *purD* codifica la 5'-fosforribosil-glicinamida sintetasa, una de las enzimas implicadas en la biosíntesis de purinas (Chopra *et al.*, 1991). Un mutante $\Delta purD$ es capaz de invadir una célula eucariótica pero no puede replicarse en el interior de esta, sin embargo, el fenotipo puede suprimirse por la adición de adenina al medio de cultivo (Leung y Finlay, 1991).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, modificamos el protocolo de infección-inducción ajustando la concentración de adenina en el medio de cultivo y el tiempo en el que esta está disponible durante la infección para controlar la proliferación de la bacteria en el interior de la célula eucariótica y por tanto, la síntesis proteica que induce la muerte celular por la infección. El protocolo optimizado permite la invasión y establecimiento de la infección de *Salmonella* durante una hora (medio suplementado con adenina),

seguido de la proliferación y la inducción de la proteína de interés durante otra hora (medio suplementado con adenina y el inductor salicilato sódico). A partir de este momento, las células infectadas se mantuvieron durante el resto del experimento en medio que contenía el inductor y una concentración reducida de adenina (9,15 μM) insuficiente para permitir la proliferación de la bacteria. En estas condiciones se evita la producción de proteínas bacterianas que provocan la muerte celular intrínseca del cultivo infectado.

Previo al análisis de los efectos de SpvB a largo plazo, se determinó la capacidad de infección, la inducción de muerte celular intrínseca y la capacidad de producción de proteínas de la estirpe MPO325 ($\Delta\text{spvB } \Delta\text{purD}::\text{Kan}^r$) utilizando el protocolo optimizado descrito anteriormente para comprobar así si esta estirpe se adecuaba a nuestros requerimientos.

3.1. Eficiencia de infección de la estirpe MPO325.

Para determinar la capacidad de infección de la estirpe PurD⁻ (MPO325, $\Delta\text{spvB } \Delta\text{purD}::\text{Kan}^r$) con respecto a la estirpe isogénica PurD⁺ (MPO302, ΔspvB), se infectaron con ellas las líneas celulares tumorales humanas de cáncer cervical (HeLa), de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), pancreática (PANC-1) y colorrectal (HCT116) y se analizó la eficiencia de infección mediante citometría de flujo.

Los datos obtenidos, mostrados en la Tabla 8, indican que ambas estirpes poseen una eficiencia de infección similar que depende de la línea tumoral utilizada, observándose el mayor porcentaje de infección en las células HCT116 y el más bajo en las MDA-MB-231.

Tabla 8. Eficiencia de invasión y replicación intracelular de las estirpes de *S. Typhimurium* MPO302 y MPO325 en distintas líneas tumorales.

Línea celular	MPO302 $\Delta spvB$	MPO325 $\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$
HeLa	65,06 \pm 3,32	61,73 \pm 1,35
MCF-7	77,90 \pm 1,64	72,72 \pm 2,32
HCT116	81,68 \pm 2,25	78,88 \pm 1,35
PANC-1	72,49 \pm 0,24	65,71 \pm 3,00
MDA-MB-231	46,31 \pm 1,85	40,18 \pm 4,82

Las células infectadas a una m.o.i de 1:100 fueron recogidas tras 4 horas de infección y se analizaron 10.000 eventos por citometría de flujo. Los datos representan el porcentaje de células infectadas (GFP positivas) y corresponden a las medias de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar de los datos.

3.2. Capacidad de inducción de muerte celular por la estirpe MPO325.

La capacidad intrínseca del mutante $\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$ de inducir la muerte celular en las condiciones de cultivo diseñadas, se determinó midiendo la liberación de la lactato deshidrogenasa citosólica (LDH) en cultivos de células HeLa tras 24 horas de infección con distintas estirpes $PurD^-$ y $PurD^+$ a una m.o.i de 1:100, como se describe en Materiales y Métodos (apartado 9.4).

Las células infectadas se mantuvieron durante 2 horas en medio suplementado con adenina para permitir la invasión y la producción de proteínas bacterianas. El resto del tiempo hasta su análisis, los cultivos se mantuvieron en medio con una concentración baja de adenina para evitar la proliferación de la bacteria, excepto el control de proliferación de la estirpe MPO325 que se mantuvo con adenina normal durante todo el ensayo. Como se observa en la Figura 23, cuando se reduce la concentración de adenina del medio tras 2 horas de incubación, la estirpe silvestre 14028 (wt) y el mutante $\Delta spvB$ inducen la muerte de las células infectadas, mientras que los mutantes $PurD^-$ ($\Delta purD$ o $\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$) son incapaces de hacerlo en las mismas condiciones. Por el contrario, si se utiliza medio suplementado con una concentración normal de adenina durante 24 horas, el porcentaje de muerte celular inducido por $PurD^-$ ($\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$) es

equivalente al producido por la estirpe isogénica $PurD^+$ ($\Delta spvB$). Este comportamiento del mutante $\Delta purD$ es independiente de la presencia o ausencia del alelo $\Delta spvB$.

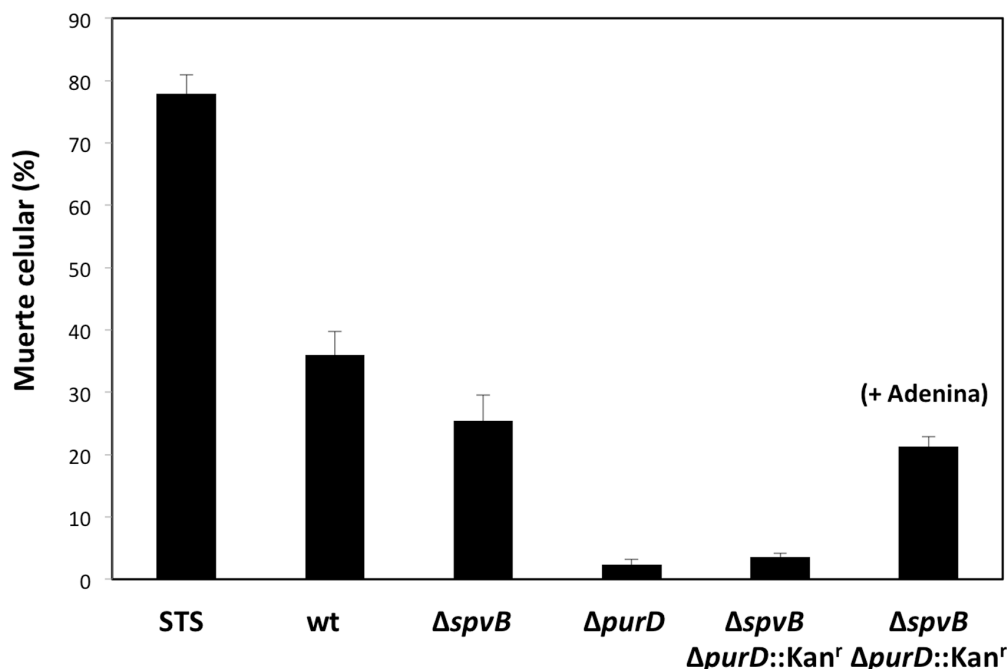


Figura 23. Citotoxicidad del mutante $\Delta spvB \Delta purD:: Kan^r$ en células HeLa tras 24 horas de infección. El porcentaje de muerte celular por infección de las distintas estirpes 14028 (wt), MPO302 ($\Delta spvB$), MPO305 ($\Delta purD$) y MPO325 ($\Delta spvB \Delta purD:: Kan^r$) se determinó midiendo la liberación de LDH con respecto a la liberada espontáneamente por un cultivo sin infectar. La estaurosporina (STS) se usó como control de muerte celular. Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes. El medio de cultivo fue suplementado durante 2 horas con adenina a concentración normal. El resto del tiempo, los cultivos se mantuvieron en medio con concentración de adenina reducida. Como control de la muerte intrínseca por proliferación de la estirpe MPO325, el medio fue suplementado con una concentración normal de adenina durante 24 horas (+Adenina).

Estos resultados confirman que la producción de determinadas proteínas durante las fases iniciales de la infección son críticas para inducir la muerte celular debida a la infección. Utilizando el mutante $\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$ en las condiciones descritas anteriormente, se evita la muerte inducida por la propia infección y de esta forma podemos analizar la citotoxicidad debido a la superproducción de SpvB.

3.3. Capacidad de producción y secreción de la estirpe MPO325.

Además de comprobar la eficiencia de infección de la estirpe, es necesario examinar su capacidad para producir y translocar proteínas al citosol eucariótico bajo las condiciones de crecimiento limitado y de inducción establecidas anteriormente.

Con este fin, se infectaron células HeLa con estirpes PurD⁺ y PurD⁻ que portaban el vector de expresión pMPO1004, como se describe en Materiales y Métodos (apartado 9.1.1) suplementando el medio con distintas concentraciones de adenina. El plásmido pMPO1004, que lleva el péptido señal de *sspH2* fusionado al epítipo HA bajo el control del promotor P_m, permite la expresión y translocación de la fusión SspH2-2HA mediante el TTSS SPI-2 de *Salmonella* en presencia del inductor salicilato sódico (Medina *et al.*, 2011).

A partir de lisados de las células infectadas, se analizó la presencia de la fusión SspH2-2HA en el citosol mediante *immunoblot* con el anticuerpo HA, como se muestra en la Figura 24 (página siguiente). Los mutantes $\Delta purD$ necesitan adenina a concentración normal para obtener una secreción equivalente a la observada con las estirpe PurD⁺ (carriles 5 y 6), siendo incapaces de producir y secretar (carril 1) cuando la adenina está ausente.

Por el contrario, la presencia de adenina en el medio durante las dos primeras horas de la infección es suficiente para detectar la producción inducida con salicilato sódico y la secreción de la fusión SspH2-2HA en el citosol (carril 2). Por otro lado, como se observa en el carril 3, la presencia del alelo $\Delta spvB$ no afecta a la producción ni secreción de SspH2-2HA.

En conjunto, estos resultados muestran que la estirpe MPO325 es adecuada para analizar el efecto citotóxico producido por SpvB a largo plazo ya que permite evitar la muerte celular inducida por la propia infección gracias a la presencia de la mutación $\Delta purD$ y el ajuste de la concentración de adenina en el medio, a la vez que es capaz de responder a la inducción por salicilato produciendo y translocando la proteína de interés.

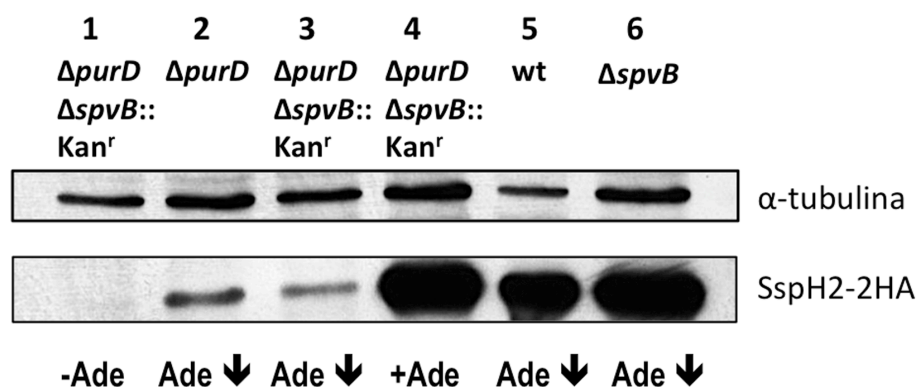


Figura 24. Producción y secreción de SspH2-2HA de las estirpes wt, $\Delta purD$ o/y $\Delta spvB$ en presencia o ausencia de adenina. Las células HeLa se infectaron con las distintas estirpes de *S. Typhimurium* durante 24 horas. El medio de los cultivos de los carriles del 2 al 6 fue suplementado durante 2 horas con adenina a concentración normal. El resto del tiempo, los cultivos de los carriles 2, 3, 5 y 6 se mantuvieron en medio con concentración de adenina reducida mientras el carril 4 se mantuvo con una concentración normal durante todo el ensayo. Al medio de cultivo del carril 1 no se le añadió adenina en ningún momento. Las muestras se lisaron y la fracción citoplasmática (30 μ g) de cada muestra fue analizada en geles de acrilamida del 12,5%, transferida a una membrana PVDF y reveladas usando los anticuerpos anti-HA.11 y α -tubulina. Carriles 1: MPO325 (sin adenina); 2: MPO305 (adenina reducida); 3: MPO325 (adenina reducida); 4: MPO325 (concentración normal de adenina); 5: 14028 (adenina reducida); 6: MPO302 (adenina reducida). La α -tubulina se usó como control de carga de la fracción citosólica eucariótica.

4. PRODUCCIÓN DE SpvB EN DISTINTAS LÍNEAS TUMORALES USANDO LA ESTIRPE MPO325.

Una vez obtenida la estirpe adecuada y establecidas las condiciones de cultivo, comprobamos la capacidad de la estirpe MPO325 para reproducir los efectos de la superproducción de SpvB en condiciones de crecimiento limitado. Con este fin, se infectaron las líneas tumorales HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, PANC-1 y HCT116 con la estirpe MPO325 ($\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$) portando el plásmido productor de SpvB (pMPO1036) o el plásmido control (pMPO52) a una multiplicidad de infección de 1:100. Las células fueron fijadas, permeabilizadas, y teñidas con Hoechst y faloidina-rodamina 24 horas después de la infección e inducción en las condiciones descritas anteriormente.

El análisis mediante microscopía de fluorescencia muestra que la estirpe PurD⁻ ($\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$) productora de SpvB, con sólo una hora de producción, es capaz de reproducir los efectos que se consiguen con la estirpe PurD⁺ ($\Delta spvB$) (Figura 21), observándose una disminución del crecimiento celular, la pérdida de los filamentos y citoesqueleto de actina y la acumulación de células binucleadas en todas las líneas tumorales ensayadas (Figura 25).

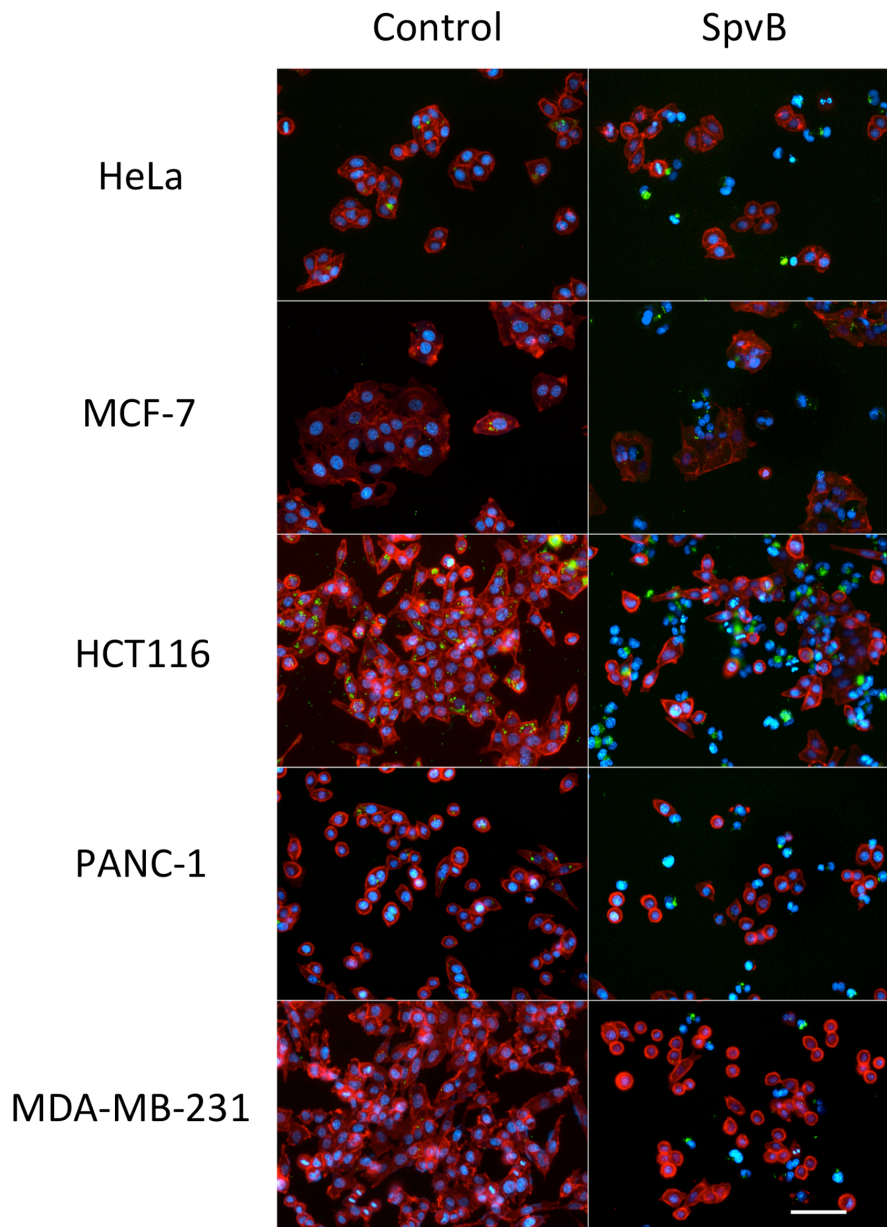


Figura 25. Efecto de la expresión intracelular de SpvB en distintas líneas tumorales utilizando la estirpe MPO325 tras 24 horas de infección. Análisis mediante microscopía de fluorescencia (320x) de células HeLa, MCF-7, HCT116, PANC-1 y MDA-MB-231 infectadas con *S. Typhimurium* MPO325 ($\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$) portando los plásmidos pMPO52 (control) y pMPO1036 (SpvB). Los filamentos de actina se muestran en rojo, los núcleos de las células en azul y la bacteria en verde. Escala: 50 μ m.

La visualización de la tinción con Hoechst de las células infectadas a mayor aumento en un microscopio confocal (Figura 26), muestra la existencia de núcleos dobles y en algunos casos, núcleos fragmentados (flechas amarillas y blancas, respectivamente) característicos de la muerte inducida por apoptosis. Este dato sugiere, por tanto, que la pérdida del citoesqueleto y el defecto en citocinesis podrían desencadenar este tipo de muerte celular.

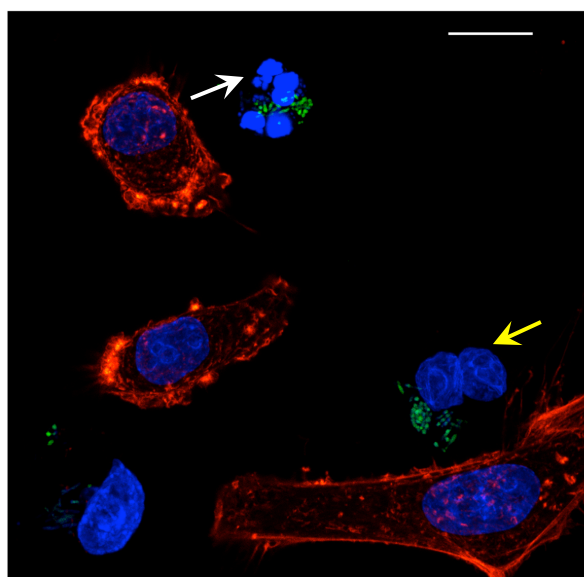


Figura 26. Microscopía confocal SPE (630x) de células HeLa infectadas con *S. Typhimurium* $\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$ produciendo SpvB durante 24 horas. La imagen de 9,8 μm corresponde al solapamiento de la tinción de núcleos con Hoechst (azul), tinción de los filamentos de actina con faloidina-rodamina (rojo) y la expresión constitutiva de GFP (bacterias en verde). Células binucleadas (flecha amarilla) y núcleos fragmentados (flecha blanca). Escala: 15 μM .

Dado que las infecciones se realizaron en condiciones de limitación de proliferación bacteriana, podemos afirmar que los efectos observados se deben a la producción intracelular de SpvB y no a la expresión de otras proteínas bacterianas que inducen la muerte celular. Por tanto, estas condiciones nos permitirán estudiar el posible papel de SpvB en la muerte celular y en la inducción de la apoptosis.

5. EFECTO DE LA PRODUCCIÓN CONTROLADA DE SpvB SOBRE EL CICLO CELULAR.

La presencia de células binucleadas tras la infección con salmonellas productoras de SpvB es un indicador de un defecto en citocinesis y por tanto, de una alteración del ciclo celular. Para caracterizar en mayor profundidad el efecto de la sobreexpresión de SpvB en la progresión del ciclo celular y la viabilidad de las células infectadas se analizaron los ciclos de distintas líneas tumorales infectadas.

Para analizar el ciclo celular, la capacidad de *Salmonella* de infectar una determinada línea celular es un factor limitante debido a que las células no infectadas continúan dividiéndose y pueden enmascarar los efectos obtenidos en las células infectadas. Para obtener un número suficiente de células infectadas, incrementamos la multiplicidad de infección hasta 1:250 en todas las líneas tumorales, alcanzando porcentajes de infección de entre 80-90% en la mayoría de los casos (Tabla 9).

Tabla 9. Eficiencia de invasión y replicación intracelular de la estirpe de *S. Typhimurium* MPO325 en distintas líneas tumorales utilizando una m.o.i de 1:250.

Línea celular	MPO325 $\Delta spvB \Delta purD:: Kan^r$	Las células infectadas fueron recogidas tras 4 horas de infección y se analizaron 10.000 eventos por citometría de flujo. Los datos representan el porcentaje de células infectadas (GFP positivas) y corresponden a las medias de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar.
HeLa	91,27 \pm 1,26	
MCF-7	93,28 \pm 2,19	
HCT116	87,59 \pm 1,19	
PANC-1	80,44 \pm 0,75	
MDA-MB-231	62,58 \pm 2,58	

Para analizar las distintas fases del ciclo celular, las células sin infectar y las infectadas con la estirpe MPO325 que porta los plásmidos pMPO52 (control) o pMPO1036 (productor de SpvB) se recogieron tras 0, 12, 24 y 48 horas post-inducción. Las muestras se fijaron, se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo como se ha descrito en Materiales y Métodos (apartado 9.5).

El yoduro de propidio proporciona información sobre el contenido de ADN permitiendo clasificar las células en las distintas fases del ciclo celular. Las células viables presentarán dos picos en el histograma, 2N y 4N. El pico 2N corresponde a las células en fase G₀ y G₁, que aún no han replicado su ADN, mientras que las células en fase G₂ y M poseerán el doble de contenido debido a su paso por la fase de síntesis de ADN (fase S), formando el pico 4N. Tras la citocinesis, el contenido se reduce hasta 2N. Las células apoptóticas, debido a la fragmentación del ADN por activación de endonucleasas, aparecerán como un pico correspondiente a un contenido en ADN inferior a 2N (SubG₁) delante de G₁ (Figura 27).

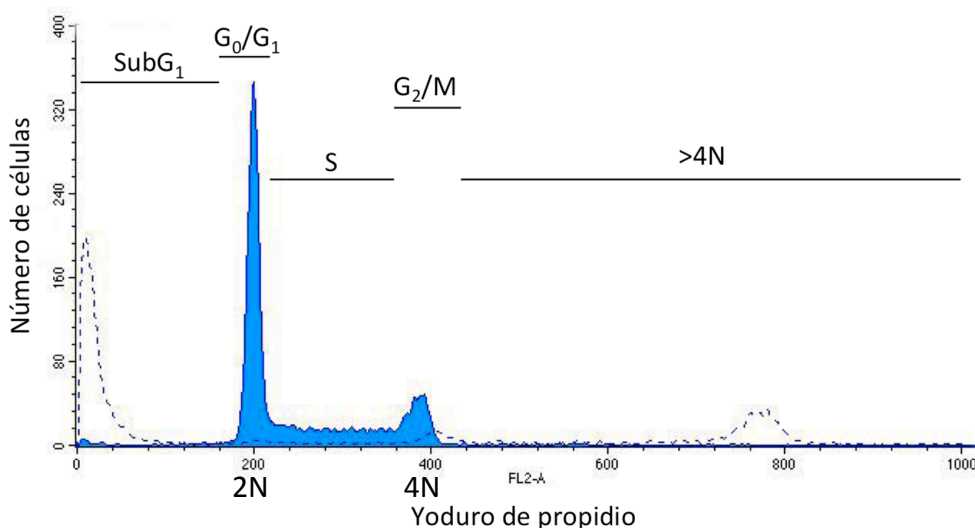


Figura 27. Distribución de células HeLa en las distintas fases del ciclo celular según su contenido de ADN. Se representa el análisis por citometría de flujo de células sin tratar (línea continua) o tratadas con el agente despolimerizante de la actina latrunculin A 4 μ M (línea discontinua), que induce la apoptosis de las células (aparición del pico SubG₁) durante 48 horas, tras la tinción con yoduro de propidio.

Los resultados obtenidos con la línea tumoral HeLa se presentan en la Figura 28. Tras 12 horas de inducción, la sobreexpresión de SpvB en el interior de las células tumorales produce un aumento del pico correspondiente a la población de células con un contenido 4N, acompañado de una disminución del número de células en fase G₁ (pico 2N) y un ligero descenso de las células en fase S. El bloqueo de las células en 4N, que alcanza casi un 50% de la población total, se mantiene tras 24 horas de inducción.

Este pico se desplaza hacia SubG₁ al cabo de las 48 horas, indicando la muerte celular del 30% de la población, mientras que el bloqueo desaparece (Tabla 10). Los picos correspondientes a células en fase G₀/G₁ y S que se mantienen o incrementan, podrían asociarse a la población de células no infectadas.

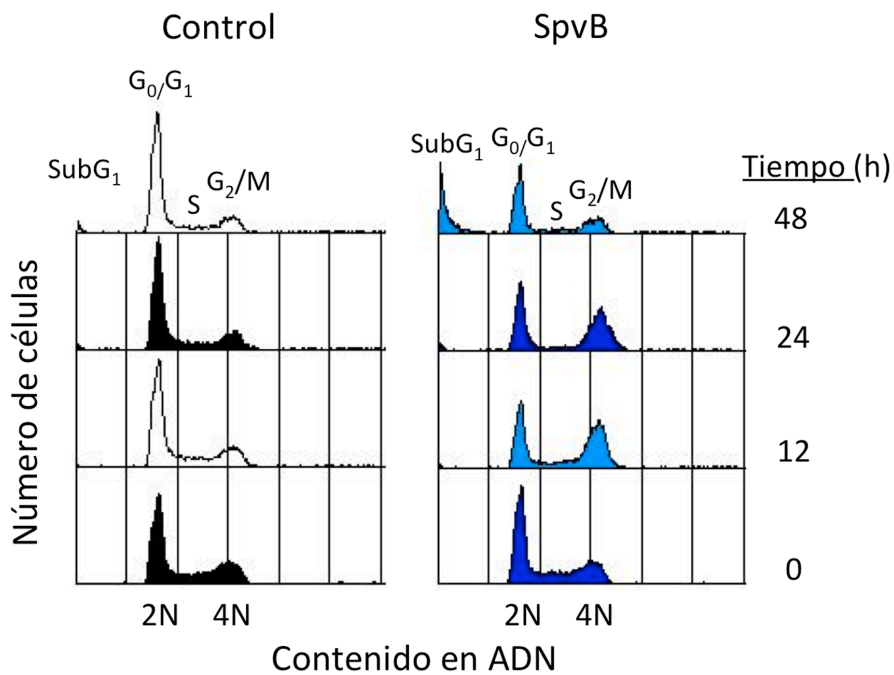


Figura 28. Representación de la distribución de células HeLa en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo. 10.000 células de la población infectada con *S. Typhimurium* MPO325 portando el plásmido pMPO52 (control) o pMPO1036 (productor de SpvB) fueron analizadas tras 0, 12, 24 y 48 horas post-inducción.

Tabla 10. Porcentaje de células HeLa en cada fase del ciclo celular.

HeLa no infectadas	Porcentaje de células en cada fase				
	Tiempo (h)	SubG ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	0,36 ± 0,08	54,14 ± 0,44	23,38 ± 0,15	21,35 ± 0,53	1,31 ± 0,09
12	0,74 ± 0,06	59,09 ± 0,63	20,37 ± 0,31	18,70 ± 0,74	1,53 ± 0,11
24	1,10 ± 0,03	65,82 ± 1,01	16,41 ± 0,60	16,04 ± 0,36	1,04 ± 0,05
48	1,78 ± 0,07	65,50 ± 0,67	16,33 ± 0,67	16,20 ± 0,18	0,63 ± 0,13

Control	Porcentaje de células en cada fase				
	Tiempo (h)	SubG ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	0,37 ± 0,08	51,78 ± 0,57	23,67 ± 0,55	23,37 ± 0,08	1,30 ± 0,24
12	1,59 ± 0,31	56,00 ± 0,30	19,87 ± 0,58	20,91 ± 0,11	2,15 ± 0,16
24	3,16 ± 0,40	56,67 ± 0,62	17,35 ± 0,28	20,69 ± 0,27	2,56 ± 0,07
48	4,68 ± 0,91	61,64 ± 1,21	14,62 ± 0,72	17,40 ± 0,97	2,11 ± 0,38

SpvB	Porcentaje de células en cada fase				
	Tiempo (h)	SubG ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	0,37 ± 0,09	52,06 ± 0,88	24,21 ± 0,14	22,70 ± 0,99	1,19 ± 0,09
12	1,75 ± 0,02	34,00 ± 1,57	15,70 ± 0,19	46,71 ± 1,21	2,19 ± 0,26
24	5,02 ± 0,58	36,02 ± 0,34	10,99 ± 0,27	44,69 ± 0,49	3,63 ± 0,27
48	30,88 ± 1,39	37,41 ± 0,94	11,12 ± 0,50	17,34 ± 1,26	3,55 ± 0,11

Se analizaron 10.000 eventos de la población celular mediante citometría de flujo a los tiempos indicados. Los datos representan el porcentaje de las muestras infectadas con MPO325 portando el plásmido control o SpvB y corresponden a las medias de 3 experimentos independientes ± la desviación estándar. En rojo se muestran los datos más significativos.

Resultados similares se obtuvieron con las células MCF-7 (Figura 29 y Tabla 11).

En ambas líneas celulares la propia infección (control en Tablas 10 y 11 para HeLa y MCF-7, respectivamente) no parece influir en la distribución de células en las distintas fases del ciclo celular, ya que los valores de cada fase son equivalentes en las células no infectadas y en la infección control con el vector que no expresa SpvB.

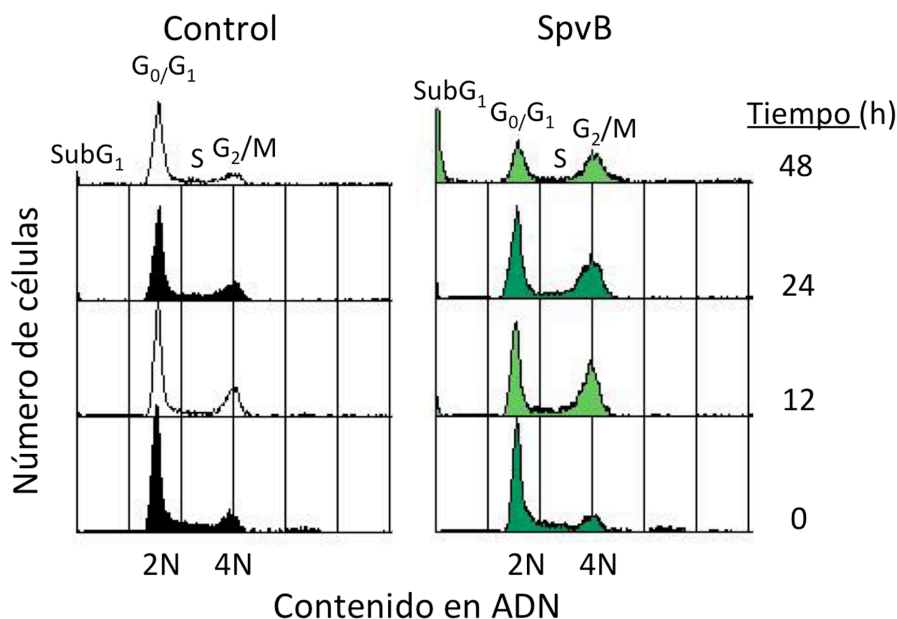


Figura 29. Representación de la distribución de células MCF-7 en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo. 10.000 células de la población infectada con *S. Typhimurium* MPO325 portando el plásmido pMPO52 (control) o pMPO1036 (productor de SpvB) fueron analizadas tras 0, 12, 24 y 48 horas post-inducción.

Tabla 11. Porcentaje de células MCF-7 en cada fase del ciclo celular.

MCF-7 no infectadas	Porcentaje de células en cada fase					
	Tiempo (h)	SubG ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	>4N
	0	0,73 ± 0,10	65,43 ± 0,46	19,18 ± 0,36	14,29 ± 0,33	0,82 ± 0,11
	12	1,31 ± 0,21	61,59 ± 0,83	11,62 ± 0,04	24,09 ± 0,69	1,69 ± 0,13
	24	2,39 ± 0,90	57,78 ± 2,55	16,56 ± 0,86	18,25 ± 2,13	5,51 ± 0,50
	48	3,29 ± 1,41	60,45 ± 1,19	14,09 ± 0,66	17,82 ± 0,89	4,72 ± 0,06

Control	Porcentaje de células en cada fase					
	Tiempo (h)	SubG ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	>4N
	0	0,70 ± 0,20	68,54 ± 2,71	17,20 ± 1,28	12,00 ± 1,36	1,92 ± 0,39
	12	1,55 ± 0,22	59,99 ± 0,68	12,32 ± 0,45	24,36 ± 0,40	2,08 ± 0,39
	24	1,74 ± 0,36	58,12 ± 1,03	15,89 ± 0,36	20,70 ± 0,08	3,96 ± 0,39
	48	3,90 ± 0,63	57,67 ± 1,21	14,31 ± 0,46	18,58 ± 0,69	5,94 ± 0,54

SpvB	Porcentaje de células en cada fase					
	Tiempo (h)	SubG ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	>4N
	0	0,96 ± 0,23	68,76 ± 0,32	17,49 ± 0,30	11,17 ± 0,34	2,07 ± 0,19
	12	3,44 ± 0,71	44,04 ± 1,15	12,21 ± 0,59	37,99 ± 2,30	2,68 ± 0,10
	24	2,78 ± 0,25	45,63 ± 2,29	11,49 ± 1,36	34,97 ± 2,89	5,55 ± 0,74
	48	31,20 ± 2,72	24,08 ± 2,16	7,38 ± 0,20	26,92 ± 0,26	10,69 ± 1,75

Se analizaron 10.000 eventos de la población celular mediante citometría de flujo a los tiempos indicados. Los datos representan el porcentaje de las muestras infectadas con MPO325 portando el plásmido control o SpvB y corresponden a las medias de 3 experimentos independientes ± la desviación estándar. En rojo se muestran los datos más significativos.

En el caso de las células HCT116 (Figura 30), el efecto de la síntesis de SpvB sobre la viabilidad celular se observa 12 horas después de la inducción, alcanzándose en este punto un 34% de muerte celular (Tabla 12). Este incremento en la población SubG₁ se corresponde con la disminución de las células en fase G₀/G₁ y S durante las primeras 12 horas. Por otro lado, se observa un aumento del pico correspondiente a la población 4N como en los casos anteriores. Tras 24 horas de inducción, el descenso de la población 4N, junto con la disminución de células en fase G₀/G₁ y S, contribuyen al incremento de la población apoptótica/necrótica, que alcanza un 58% del total de la población analizada.

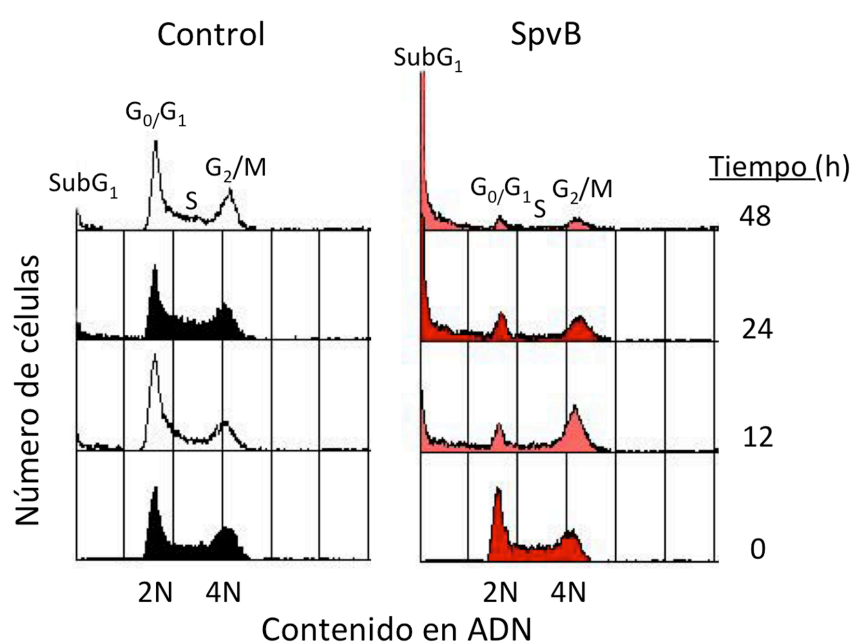


Figura 30. Representación de la distribución de células HCT116 en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo. 10.000 células de la población infectada con *S. Typhimurium* MPO325 portando el plásmido pMPO52 (control) o pMPO1036 (productor de SpvB) fueron analizadas tras 0, 12, 24 y 48 horas post-inducción.

Por otra parte, cabe destacar que la propia infección de las células HCT116 induce la muerte celular del 16% de la población analizada a las 48 horas (compárese control y HCT116 no infectadas en Tabla 12). A pesar de que este dato es sensiblemente superior al obtenido con otras líneas celulares el efecto de la producción de SpvB sigue siendo claramente apreciable, ya que su presencia incrementa este porcentaje hasta un 78% tras 48 horas de inducción (SpvB, Tabla 12).

Tabla 12. Porcentaje de células HCT116 en cada fase del ciclo celular.

HCT116 no infectadas		Porcentaje de células en cada fase				
Tiempo (h)	SubG ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	>4N	
0	1,54 ± 0,34	42,81 ± 1,52	18,24 ± 0,91	35,95 ± 0,87	2,10 ± 0,08	
12	1,69 ± 0,12	44,12 ± 1,06	20,93 ± 0,80	31,11 ± 0,07	2,89 ± 0,15	
24	2,28 ± 0,25	53,65 ± 0,71	18,42 ± 0,38	23,61 ± 0,70	2,70 ± 0,20	
48	3,64 ± 0,65	52,59 ± 1,07	16,42 ± 1,61	21,76 ± 0,88	6,10 ± 1,46	

Control		Porcentaje de células en cada fase				
Tiempo (h)	SubG ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	>4N	
0	1,40 ± 0,56	38,23 ± 0,88	21,57 ± 0,48	37,07 ± 0,57	2,55 ± 0,31	
12	10,81 ± 1,44	42,72 ± 0,81	19,20 ± 0,67	25,18 ± 0,87	2,84 ± 0,30	
24	16,22 ± 1,47	29,71 ± 0,72	22,28 ± 0,42	29,44 ± 0,95	3,07 ± 0,13	
48	16,15 ± 1,98	32,48 ± 2,08	17,98 ± 0,59	29,79 ± 1,03	4,17 ± 0,15	

SpvB		Porcentaje de células en cada fase				
Tiempo (h)	SubG ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	>4N	
0	0,75 ± 0,28	40,21 ± 0,40	21,73 ± 0,54	35,58 ± 1,12	2,42 ± 0,64	
12	34,31 ± 2,17	14,92 ± 0,91	8,56 ± 0,72	37,97 ± 1,73	4,62 ± 0,49	
24	58,65 ± 3,32	10,21 ± 0,94	5,33 ± 0,55	22,50 ± 3,68	3,60 ± 0,65	
48	78,35 ± 3,30	4,43 ± 0,96	3,01 ± 0,62	7,79 ± 1,68	6,57 ± 0,39	

Se analizaron 10.000 eventos de la población celular mediante citometría de flujo a los tiempos indicados. Los datos representan el porcentaje de las muestras infectadas con MPO325 portando el plásmido control o SpvB y corresponden a las medias de 3 experimentos independientes ± la desviación estándar. En rojo y en azul se muestran los datos más significativos.

En la Figura 31 se muestra la distribución de las células PANC-1. Con estas células los datos no son tan concluyentes aunque siguen mostrando los mismos efectos. Se observa un ligero incremento de la población 4N tras 12 horas en todos los casos, y este aumento se mantiene 24-48 horas después de la inducción en el caso de la población afectada por la producción de SpvB. El incremento del pico SubG₁ observado tras 48 horas parece corresponder con la suma de la proporción de muerte celular inducida por la propia infección junto con el efecto causado por la producción de SpvB.

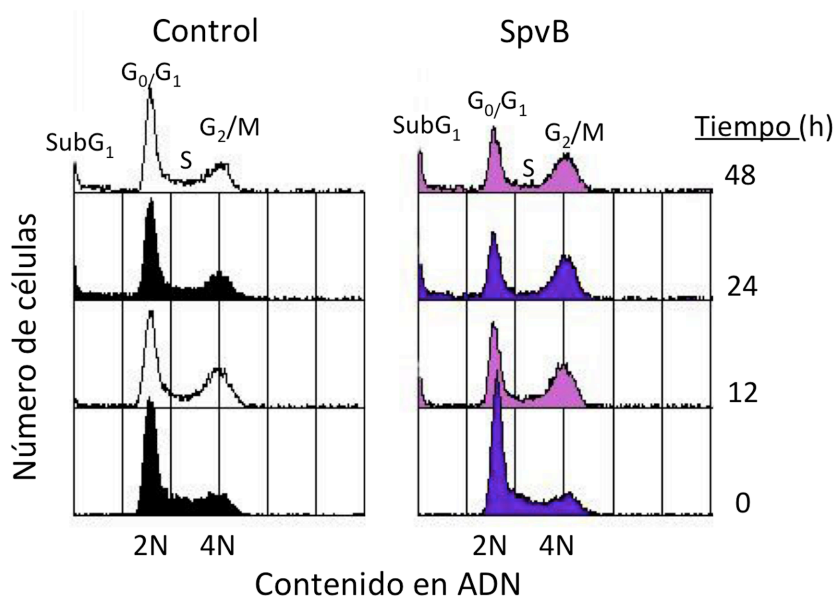


Figura 31. Representación de la distribución de células PANC-1 en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo. 10.000 células de la población infectada con *S. Typhimurium* MPO325 portando el plásmido pMPO52 (control) o pMPO1036 (productor de SpvB) fueron analizadas tras 0, 12, 24 y 48 horas post-inducción.

Tabla 13. Porcentaje de células PANC-1 en cada fase del ciclo celular.

PANC-1 no infectadas					
Tiempo (h)	Porcentaje de células en cada fase				
	SubG ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	>4N
0	2,99 ± 0,95	55,19 ± 0,99	20,11 ± 0,47	19,11 ± 0,89	3,20 ± 0,49
12	2,90 ± 0,08	52,18 ± 0,21	12,59 ± 0,53	28,70 ± 0,07	3,64 ± 0,22
24	4,68 ± 0,43	52,45 ± 0,85	17,74 ± 0,51	20,83 ± 0,22	4,06 ± 0,31
48	7,43 ± 0,86	54,15 ± 1,84	13,60 ± 1,10	20,18 ± 0,74	4,60 ± 0,59

Control					
Tiempo (h)	Porcentaje de células en cada fase				
	SubG ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	>4N
0	1,54 ± 0,20	52,56 ± 2,04	19,75 ± 0,25	22,49 ± 1,62	4,24 ± 0,53
12	5,81 ± 0,37	43,11 ± 1,97	11,73 ± 0,40	34,71 ± 1,65	4,45 ± 0,47
24	13,56 ± 3,32	42,70 ± 1,95	13,85 ± 0,93	24,13 ± 1,87	5,51 ± 0,54
48	14,06 ± 3,66	41,93 ± 1,42	14,03 ± 0,69	24,47 ± 1,15	5,27 ± 0,38

SpvB					
Tiempo (h)	Porcentaje de células en cada fase				
	SubG ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	>4N
0	1,24 ± 0,20	55,21 ± 0,14	18,75 ± 0,65	21,54 ± 0,68	3,75 ± 0,22
12	16,21 ± 3,94	30,99 ± 2,48	9,25 ± 0,49	38,46 ± 5,00	5,05 ± 0,38
24	27,21 ± 1,85	29,47 ± 2,25	8,43 ± 0,62	30,40 ± 2,61	4,55 ± 0,29
48	28,44 ± 1,65	27,09 ± 0,67	8,83 ± 0,30	29,46 ± 1,32	6,09 ± 0,14

Se analizaron 10.000 eventos de la población celular mediante citometría de flujo a los tiempos indicados. Los datos representan el porcentaje de las muestras infectadas con MPO325 portando el plásmido control o SpvB y corresponden a las medias de 3 experimentos independientes ± la desviación estándar. En rojo y en azul se muestran los datos más significativos.

Al igual que ocurre en la línea HCT116, la línea PANC-1 parece ser más sensible a la infección por *Salmonella*, ya que esta induce por sí mismo la muerte celular a un 14% de la población tras 48 horas (Tabla 13). En este caso, la producción de SpvB también produce un incremento de la población apoptótica/necrótica tras 48 horas de inducción con respecto a las células infectadas con *Salmonella* portadoras del plásmido vacío (control), aunque el aumento es de solo 2 veces en el tiempo máximo analizado de 48 horas.

Los resultados para las células MDA-MB-231 se muestran en la Figura 32 y Tabla 14. Aunque la síntesis de SpvB en el interior de estas células produce un incremento del pico de células con un contenido 4N tras 12 horas de inducción, estas no evolucionan hacia SubG₁ en el tiempo máximo analizado, como observamos en el resto de las líneas celulares probadas anteriormente. En este caso, estas células siguen replicando su ADN, lo que origina un aumento de la población celular con contenido de ADN superior a 4N (endorreduplicación), siendo esta población el 25% del total tras 24 horas de inducción.

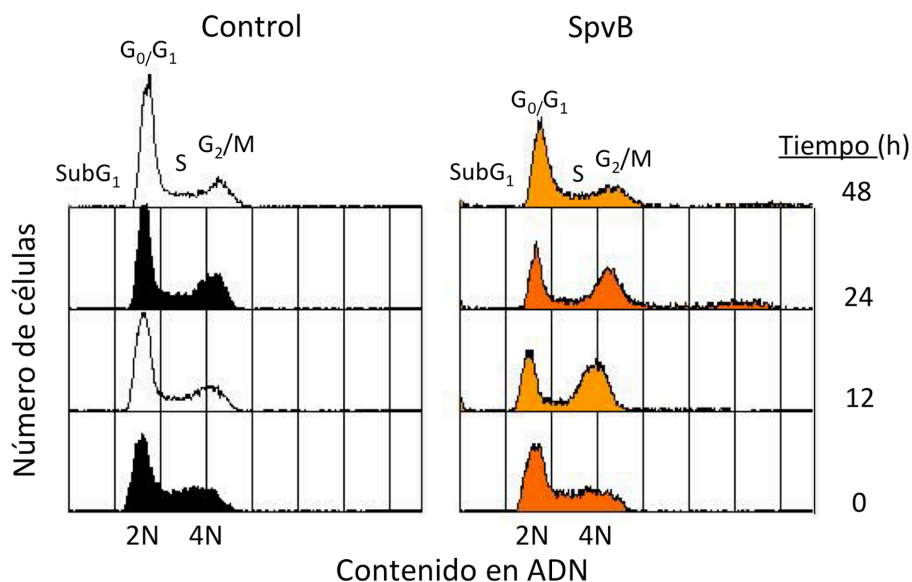


Figura 32. Representación de la distribución de células MDA-MB-231 en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo. 10.000 células de la población infectada con *S. Typhimurium* MPO325 portando el plásmido pMPO52 (control) o pMPO1036 (productor de SpvB) fueron analizadas tras 0, 12, 24 y 48 horas post-inducción.

Tabla 14. Porcentaje de células MDA-MB-231 en cada fase del ciclo celular.

MDA-MB-231 no infectadas		Porcentaje de células en fase				
Tiempo (h)	<i>SubG₁</i>	<i>G₀/G₁</i>	<i>S</i>	<i>G₂/M</i>	<i>>4N</i>	
0	0,96 ± 0,06	44,90 ± 1,60	17,85 ± 0,64	34,14 ± 1,42	2,72 ± 0,28	
12	0,89 ± 0,15	51,97 ± 1,47	14,89 ± 0,38	29,69 ± 0,42	3,06 ± 0,65	
24	0,75 ± 0,11	56,50 ± 0,66	11,98 ± 0,30	27,10 ± 0,40	4,06 ± 0,72	
48	0,67 ± 0,10	60,86 ± 1,94	12,35 ± 0,58	23,92 ± 1,26	2,59 ± 0,45	

Control		Porcentaje de células en fase				
Tiempo (h)	<i>SubG₁</i>	<i>G₀/G₁</i>	<i>S</i>	<i>G₂/M</i>	<i>>4N</i>	
0	1,00 ± 0,41	47,19 ± 0,68	19,61 ± 0,63	30,05 ± 1,18	2,78 ± 0,27	
12	1,20 ± 0,21	51,01 ± 0,45	14,66 ± 0,42	29,87 ± 0,49	3,74 ± 0,41	
24	0,73 ± 0,22	44,64 ± 0,81	14,32 ± 0,75	36,58 ± 1,31	4,20 ± 0,25	
48	0,83 ± 0,25	50,58 ± 0,21	18,86 ± 0,41	26,84 ± 0,71	3,68 ± 0,40	

SpvB		Porcentaje de células en fase del ciclo				
Tiempo (h)	<i>SubG₁</i>	<i>G₀/G₁</i>	<i>S</i>	<i>G₂/M</i>	<i>>4N</i>	
0	1,05 ± 0,16	44,97 ± 0,67	19,69 ± 0,54	31,55 ± 0,67	3,35 ± 0,55	
12	4,12 ± 1,17	30,96 ± 0,62	9,17 ± 0,47	47,73 ± 1,12	8,50 ± 0,70	
24	2,48 ± 0,36	23,31 ± 1,03	9,19 ± 0,46	39,63 ± 1,03	25,75 ± 0,60	
48	2,60 ± 0,54	39,37 ± 3,72	20,43 ± 3,42	26,07 ± 1,06	12,34 ± 1,24	

Se analizaron 10.000 eventos de la población celular mediante citometría de flujo a los tiempos indicados. Los datos representan el porcentaje de las muestras infectadas con MPO325 portando el plásmido control o SpvB y corresponden a las medias de 3 experimentos independientes ± la desviación estándar. En rojo se muestran los datos más significativos.

La endorreduplicación es característica de otras toxinas que modifican la actina (Moon *et al.*, 2008), sin embargo, la síntesis de SpvB solo produce un aumento considerable del porcentaje de células poliploides en el caso de las células MDA-MB-231. Esto podría deberse a que estas células superan el control *G₁/S* del ciclo celular debido a la sobreexpresión de las ciclinas A y E (Kronenwett *et al.*, 2003), y continúan duplicando su ADN.

En conjunto, el análisis de los ciclos celulares de las líneas tumorales infectadas indica que la pérdida de los filamentos de actina y el defecto en citocinesis debido a la sobreexpresión de SpvB originan un bloqueo en el ciclo y finalmente conducen a la muerte celular, aunque el porcentaje de células que inducen apoptosis/necrosis depende de la línea celular y de su respuesta a la infección bacteriana.

6. SEGUIMIENTO *in vivo* DEL EFECTO DE LA PRODUCCIÓN CONTROLADA DE SpvB EN EL INTERIOR DE CÉLULAS TUMORALES.

El análisis por citometría de flujo reveló que la síntesis intracelular de SpvB produce un incremento de la población 4N tras 12 horas de inducción. En todos los casos, excepto en las células MDA-MB-231, esta población se redujo tras 24-48 horas de inducción coincidiendo con un aumento de la población SubG₁, lo que muestra que la pérdida de los filamentos de actina y el bloqueo del ciclo conducen a la muerte celular. Las células con contenido de ADN 4N pueden corresponder a células binucleadas que han completado la mitosis pero son incapaces de llevar a cabo la citocinesis en ausencia de actina (bloqueadas en G₁/S) pero también puede ser células mononucleadas que tras replicar su ADN no pueden entrar en mitosis y segregar las cromátidas por la misma razón (bloqueadas en G₂/M).

Para determinar si la muerte celular se induce por el bloqueo solo en una de estas etapas del ciclo celular o en cualquiera de ellas, se utilizaron células HeLa que expresan establemente la histona H2B marcada con mCherry y la α -tubulina con mEGFP para seguir la progresión del ciclo celular *in vivo*. La infección con *S. Typhimurium* MPO325 portando el plásmido vacío pMPO52 (control) y pMPO1036 (productor de SpvB), se realizó como se ha descrito en Materiales y Métodos (apartado 9.3.3). Las imágenes de los cultivos tomadas cada 30 minutos durante 20 horas por un microscopio Deltavision (Applied Precision) se muestran en la Figura 33. En la muestra control se observa que la infección no afecta a la viabilidad de las células, en concordancia con experimentos previos. Por el contrario, cuando analizamos las imágenes correspondientes a la infección con salmonellas productoras de SpvB, las células cambian de morfología a lo largo del tiempo (véanse imágenes con contraste de fases), observándose la contracción de las células, la formación de burbujas (*blebbing*) en la membrana plasmática y la fragmentación del ADN. Todos estos cambios son característicos de la apoptosis. Podemos encontrar distintos tipos de células cuyos núcleos acaban fragmentándose. Por un lado, se pueden observar células mononucleadas que replican su ADN y culminan la mitosis. A partir de aquí, la ausencia de actina les impide realizar la citocinesis y permanecen como células binucleadas bloqueadas en G₁/S (véase imagen SpvB-células

binucleadas). Por otro lado encontramos células mononucleadas que han conseguido terminar un ciclo de mitosis y citocinesis. Estas células pueden replicar sus ADN, pero la falta de actina les impediría culminar el ciclo y, tras bloquearse en la fase G₂/M, inducen la muerte celular por apoptosis (véase imagen SpvB-células mononucleadas). Para visualizar el proceso completo véanse los vídeos 1, 2 y 3 del material suplementario. Los datos permiten concluir, por tanto, que el efecto de SpvB induce la muerte celular en ambos tipos de células bloqueadas por la ausencia de actina.

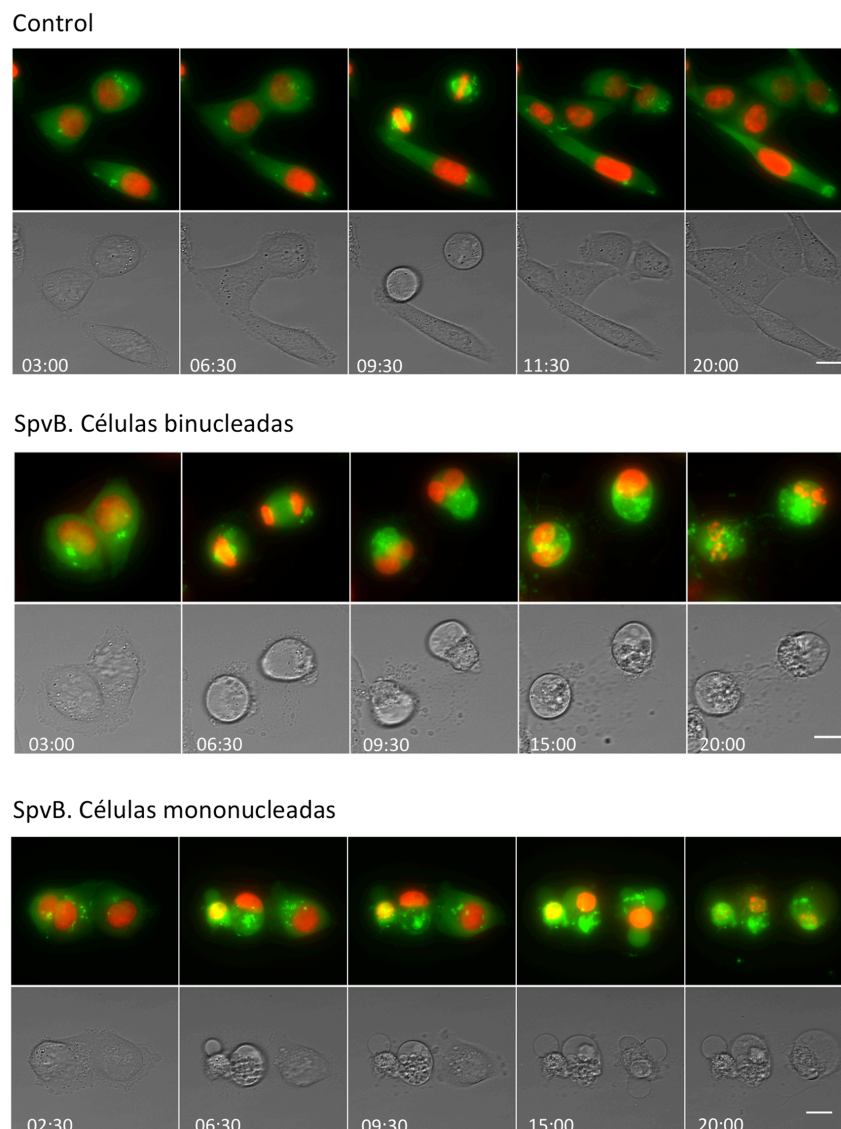


Figura 33. Microscopía confocal *time-lapse* de un cultivo infectado con *S. Typhimurium* MPO325 portando el vector vacío (control) o vector SpvB (SpvB) durante 20 horas de inducción. Se muestra las imágenes tomadas con fluorescencia (fila superior) y con contraste de fases (fila inferior) en cada caso. Las células HeLa expresan de forma estable H2B-mCherry (rojo) y α -tubulina-mEGFP (verde). Las bacterias expresan constitutivamente la proteína GFP (puntos verdes). Tiempo en horas. Proyección de la intensidad máxima de 16 planos. Escala: 15 μ m.

7. SpvB INDUCE APOPTOSIS MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-3 Y -7.

Los datos de citometría indican que la producción de SpvB, en condiciones en las que se limita la proliferación de la bacteria y la síntesis de otras proteínas relacionadas con el proceso de infección, induce la muerte celular en la mayoría de las líneas tumorales infectadas. Aunque no podemos distinguir células apoptóticas de necróticas mediante esta técnica, los cambios morfológicos observados en cultivos *in vivo* sugieren la apoptosis como mecanismo de muerte celular. Para determinar si la muerte celular producida por la sobreexpresión de SpvB es debida a la inducción de apoptosis, se seleccionaron dos de las líneas tumorales utilizadas hasta el momento, HeLa y MCF-7, con las que se realizaron los experimentos descritos a continuación para intentar detectar marcadores de este tipo de muerte celular en las células afectadas.

Uno de los indicadores de la muerte celular por apoptosis es la proteólisis de la poli-ADP-ribosa-polimerasa 1 (PARP-1). Esta enzima nuclear de 116 kDa está implicada en la reparación del ADN. En una fase temprana de la apoptosis las caspasas fragmentan la PARP-1, separando el dominio de unión a ADN (24 kDa) del dominio catalítico (89 kDa), inactivando la enzima (Kauffmann *et al.*, 1993). La fragmentación de la PARP-1 también puede producirse durante la necrosis pero de forma diferente, obteniéndose fragmentos de tamaños distintos a los producidos durante la apoptosis (Shah *et al.*, 1996).

Células HeLa y MCF-7 infectadas con MPO325 portando el plásmido control y el que expresa *spvB* fueron recogidas tras 24 y 48 horas de inducción. A partir de los extractos totales, obtenidos como se ha descrito en Materiales y Métodos (apartado 6.2.1), se analizó la presencia de p89 mediante Western blot. Como se muestra en la Figura 34 (página siguiente), solo en las células infectadas con salmonellas productoras de SpvB, se detecta una banda de 89 kDa correspondiente a la fragmentación del sustrato PARP-1 (116 kDa), indicando que la síntesis intracelular de SpvB induce apoptosis en estas células.

Está descrito que SpvB es una de las proteínas de *Salmonella* implicadas en la inducción de apoptosis dependiente de caspasa-3 en células eucariotas (Paesold *et al.*, 2002; Libby *et al.*, 2000), sin embargo, las células MCF-7 carentes de caspasa-3 (Janicke *et al.*, 1998) sufren apoptosis en presencia de SpvB, como puede observarse en la figura anterior, sugiriendo que este proceso podría ser dependiente de otras caspasas. *In vitro* todas las caspasas son capaces de fragmentar PARP-1, mientras *in vivo* es probable que solo las caspasas-3 y -7 puedan hacerlo (Salvensen y Dixit, 1997).

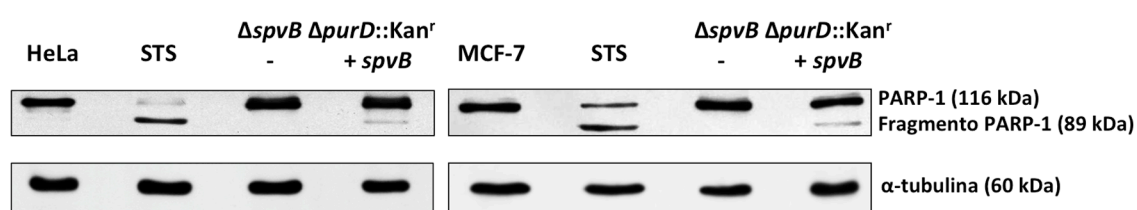


Figura 34. Estudio de la proteólisis de PARP-1 por superproducción de SpvB. Células HeLa (izquierda) y MCF-7 (derecha) fueron infectadas con MPO325 ($\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$) portando el plásmido control (-) o productor de SpvB (+*spvB*) a una m.o.i de 1:250, y recogidas tras 24 y 48 horas post-inducción. Los extractos totales (50 μ g) fueron resueltos en geles de acrilamida al 10%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF y se revelaron usando los anticuerpos anti-PARP (paneles superiores) y anti- α -tubulina (paneles inferiores). Los primeros carriles de cada imagen corresponden al control de células sin infectar. La estaurosporina 1 μ M (STS) se utilizó como control de inducción de apoptosis. La α -tubulina sirvió como control de carga.

Para determinar si la expresión de SpvB induce apoptosis dependiente de caspasa-3, caspasa-7 o ambas, analizamos la proteólisis de ambas procaspasas en los lisados de células HeLa y MCF-7 infectadas con MPO325 portando el plásmido vacío o el productor de SpvB mediante Western blot. Como puede observarse en la Figura 35A, la superproducción de SpvB produce un aumento de la caspasa-7 activa en ambas líneas celulares y la inducción de la caspasa-3 en el caso de las células HeLa (Figura 35B).

Estos resultados sugieren que ambas caspasas son activadas en ausencia de actina, y que, al menos en MCF-7, la apoptosis inducida por producción de SpvB es independiente de la caspasa-3.

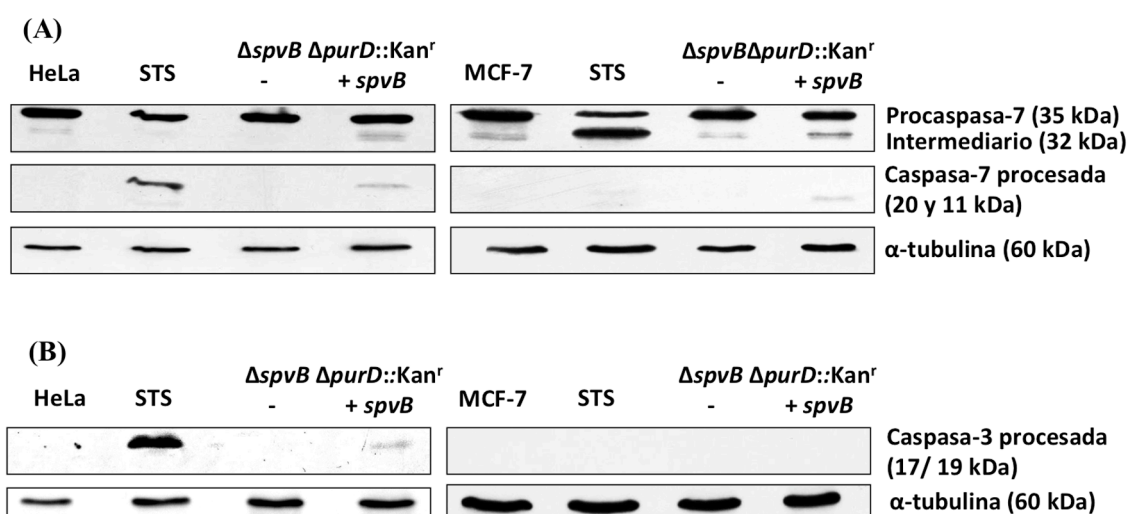


Figura 35. Estudio de la proteólisis de las caspasas 3 y 7. Células HeLa (izquierda) y MCF-7 (derecha) fueron infectadas con MPO325 ($\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$) portando el plásmido control (-) o productor de SpvB (+*spvB*) a una m.o.i de 1:250, y recogidas tras 24 y 48 horas post-inducción. Los extractos totales (75-100 μ g) fueron resueltos en geles de acrilamida al 12,5%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF y se revelaron usando los anticuerpos anti-caspasa-7 (A), anti-caspasa-3 procesada (B) y anti- α -tubulina. Los primeros carriles de cada imagen corresponden al control de células sin infectar. La estaurosporina 1 μ M (STS) se utilizó como inductor de apoptosis. La α -tubulina sirvió como control de carga.

8. EXPRESIÓN CONTROLADA DE SpvB EN ANIMALES INFECTADOS.

Una vez demostrado que la expresión controlada de SpvB produce la muerte celular de la mayoría de las líneas tumorales ensayadas en trabajos con cultivos celulares, decidimos explorar su posible utilización como agente antitumoral en modelos animales. Para ello, se construyeron vectores y estirpes adecuadas para la expresión de SpvB inducible por salicilato por *S. Typhimurium* en ratones con tumores implantados.

8.1. Construcción de vectores de bajo número de copias.

Para la realización de los ensayos en ratones, se necesita un vector estable de bajo número de copias con niveles de expresión reducidos que impidan la producción de la proteína de interés antes de la inducción. Con este fin se construyeron los vectores de bajo número de copias pMPO1044 y pMPO1045 en los que la secuencia del gen *spvB* se traduce desde el sitio de unión al ribosoma del bacteriófago T7 (SD T7) o el propio de

SpvB, respectivamente (*SDspvB*). Para reducir el nivel basal de transcripción, estos vectores portan el atenuador *nasF* entre el promotor P_m y el sitio de unión de ribosomas. Para la construcción de pMPO1044 (Pm-atenuador de *nasF*-SD T7-*spvB*), se digirió el vector pMPO1036 (Pm-SD T7-*spvB*) con las enzimas *SmaI* y *SallI*, y el fragmento se clonó en el vector de bajo número de copias pMPO60, que lleva el atenuador de *nasF* bajo el control del promotor P_m . Para la obtención de pMPO1045 (Pm-atenuador de *nasF*-*SDspvB* -*spvB*), se amplificó por PCR recurrente una secuencia de 100 pb de *Salmonella* 14028 conteniendo el inicio del marco de lectura de *spvB* y un fragmento de la secuencia aguas arriba de este gen que incluye el sitio de unión a ribosoma *SDspvB*. Para ello se usaron los oligonucleótidos *SDspvB* F2 y *SDspvB* R2. El producto de la PCR se digirió con las enzimas *SmaI*-*BclI* y se clonó en pMPO1044.

Como se observa en la Figura 36, la producción de SpvB utilizando los vectores pMPO1044 y pMPO1045 es suficiente en ambos casos para observar el efecto de esta proteína en células HeLa y MCF-7, tras 4 horas de inducción, mediante microscopía de fluorescencia. Los conteos realizados de 5 campos independientes (100 células/campo) tras teñir las muestras con Hoechst y faloidina-rodamina, muestran que en la línea tumoral HeLa, la frecuencia de células infectadas sin filamentos de actina alcanza el $76,06\% \pm 15,52$ y $62,22\% \pm 13,15$ para pMPO1044 y pMPO1045, respectivamente, mientras en las MCF-7 los porcentajes son del $55,23\% \pm 11,78$ y $33,51 \pm 13,56$, con los mismos vectores.

A partir de estos resultados y teniendo en cuenta que la frecuencia de células sin filamentos de actina es similar en ambos vectores, seleccionamos el vector pMPO1044 para los estudios en modelos animales. Este plásmido, con atenuador *nasF* y SD del bacteriófago T7, deriva del plásmido de alto número de copias pMPO1036, utilizado anteriormente en el estudio de los efectos de la superproducción de SpvB en células tumorales en cultivo.

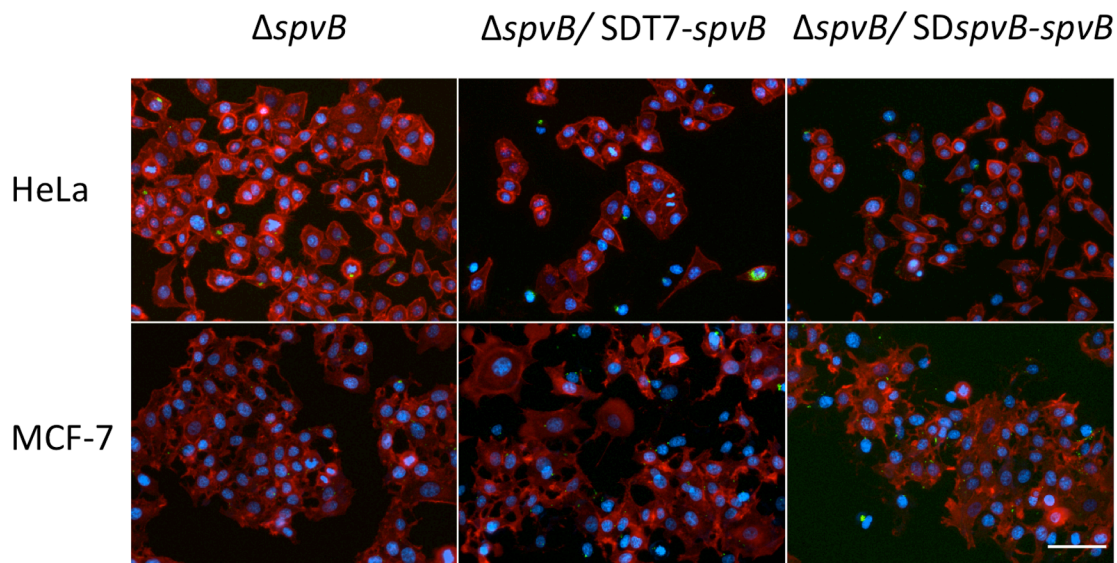


Figura 36. Efecto de la expresión intracelular de SpvB utilizando los vectores de expresión de bajo número de copias con atenuador *nasF*. Imágenes tomadas al microscopio de fluorescencia (320x) de células HeLa y MCF-7 infectadas con *S. Typhimurium* MPO302 ($\Delta spvB$) portando los plásmidos de bajo número de copias pMPO60 (control vacío), pMPO1044 (SDT7-*spvB*) y pMPO1045 (SD*spvB-spvB*) tras 4 horas de inducción con salicilato sódico. Las imágenes corresponden a la superposición de los canales rojo (actina), verde (bacteria) y azul (núcleos de las células y ADN bacteriano). Escala: 50 μ m.

8.2. Construcción de la estirpe.

Dado que utilizaremos los vectores con el atenuador *nasF* para reducir al máximo los niveles basales de transcripción en ausencia del inductor, la estirpe utilizada debe portar el gen *nasR*, que codifica la proteína antiterminadora que evita la terminación transcripcional ejercida por el atenuador *nasF*.

Partimos por tanto de la estirpe MPO97, que porta este gen incluido en el módulo regulador del circuito de expresión en cascada. El módulo, *nahR/Psal-xyIS2-nasR/Ptac-gfp*, se encuentra integrado en el locus *trg*. A esta estirpe se le deletionó además el extremo 5' del gen *siiE* para evitar el contagio a animales no infectados. La proteína SiiE, codificada por la Isla de Patogenicidad 4 (SPI-4), es una adhesina de gran tamaño necesaria para el contacto de *Salmonella* con las microvellosidades de la membrana apical de las células epiteliales intestinales y la invasión celular (Gerlach *et al.*, 2007; Gerlach *et al.*, 2008). Mutantes en este gen son incapaces de adherirse e infectar el epitelio intestinal,

que es la vía de entrada natural de *Salmonella* (Morgan *et al.*, 2004), siendo necesaria una inyección intravenosa o intraperitoneal para conseguir la infección. Para generar la mutación, se amplificó mediante PCR la secuencia del gen de resistencia a kanamicina del plásmido pKD4 (Datsenko y Wanner, 2000) con los oligonucleótidos F-siiE-FRT-P2 y R-siiE-FRT-P1 y, siguiendo el método descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000), se sustituyó un fragmento del extremo 5' del gen *siiE* por el casete de resistencia a kanamicina en la estirpe MPO97, obteniendo la estirpe MPO346.

Por otra parte, es necesario disponer de un mutante atenuado para administrarlo de forma segura a los ratones. En cultivos celulares utilizamos el mutante atenuado *purD*, pero ensayos preliminares realizados infectando ratones BALB/c con esta estirpe nos hicieron descartar su uso en modelos animales, debido a que los ratones morían tras 4 días de infección. Por este motivo, decidimos construir un mutante auxótrofo *aroA*, afectado en la síntesis de aminoácidos aromáticos y que provoca la atenuación de *S. Typhimurium* (Hoiseth y Stocker, 1981). Para ello, obtuvimos en primer lugar la estirpe MPO370 resultado de la eliminación del gen de resistencia a kanamicina inserto en el locus *siiE* de la estirpe MPO346 descrita anteriormente. Por último, se transdujo esta estirpe con un lisado de P22 obtenido sobre la estirpe MPO37 (Δ *aroA*::Kan^r) para obtener la estirpe definitiva MPO372 (MPO97 Δ *siiE* Δ *aroA*:: Kan^r).

A diferencia de los ensayos realizados en cultivos celulares, en los que la estirpe utilizada era un mutante *spvB*, en el estudio en modelos animales utilizamos el alelo *spvB* silvestre para evitar posibles problemas en el establecimiento de la infección. Está descrito que un mutante *spvB* coloniza peor el tracto intestinal, el hígado, el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos (Buckner *et al.*, 2011).

8.3. Expresión controlada de SpvB intratumoral en ratones BALB/c.

Teniendo en cuenta el tropismo hacia las zonas tumorales descrito para estirpes atenuadas de *Salmonella* y los resultados obtenidos en cultivos celulares, consideramos explorar el potencial antitumoral de la sobreexpresión controlada de SpvB en ratones hembras BALB/c de 8 semanas con tumores implantados.

Los tumores se generaron mediante una inyección subcutánea de 100 μ l de PBS 1x, conteniendo aproximadamente 10^5 células viables de la línea celular F1.A11 (derivada de un fibrosarcoma de ratón) en el flanco inferior derecho del ratón previamente depilado. Cuando los tumores fueron palpables (1-1,5 mm de diámetro), los ratones se dividieron en distintos grupos, un grupo control sin infectar y 3 grupos infectados. Para el establecimiento de la infección se administraron intraperitonealmente 10^6 unidades formadoras de colonias de la estirpe MPO372 (MPO97 Δ siiE Δ aroA::Kan^r) que portaba el vector de bajo número de copias pMPO1044 (Pm-atenuador de *nasF*-SD T7-*spvB*) en dos de los grupos, que denominamos “*spvB* inducido” y “*spvB* no inducido”, y su correspondiente control con el vector vacío pMPO61 (Pm-atenuador de *nasF*-SD T7) en otro grupo de ratones que denominamos “vector vacío”. Al quinto día de la infección, los ratones de los grupos “*spvB* inducidos” y “vector vacío” fueron tratados con 150 μ l de salicilato sódico 0,1 M para inducir la expresión de *spvB* en el primer caso. La dosis se administró intraperitonealmente cada 48 horas. El resto de los grupos (“no infectado” y “*spvB* no inducido”) se trataron con PBS 1x. Todos los grupos de ratones estaban formados por 5 individuos excepto el grupo “*spvB* inducido”, constituido por 10 ratones. Los tumores se midieron con un calibre para estudiar su evolución durante 9 días desde el inicio de la infección.

En la Figura 37 se muestra la relación del tamaño tumoral medido en los distintos días post-infección e inducción con respecto al tamaño inicial correspondiente al segundo día de la infección. Mientras en el grupo control no infectado la progresión del tumor es exponencial, siendo 60 veces superior al inicio del experimento, en los grupos infectados la relación aumenta ligeramente durante los primeros días de infección pero se mantiene en los días siguientes independientemente del vector que porte *Salmonella* o si se ha inducido o no la expresión de *spvB*. Por tanto, los datos obtenidos de este único ensayo realizado en ratones con tumores implantados en las condiciones descritas muestran que la infección por *S. Typhimurium* afecta al crecimiento de los tumores pero la expresión intratumoral de *SpvB* no consigue una reducción adicional de su tamaño.

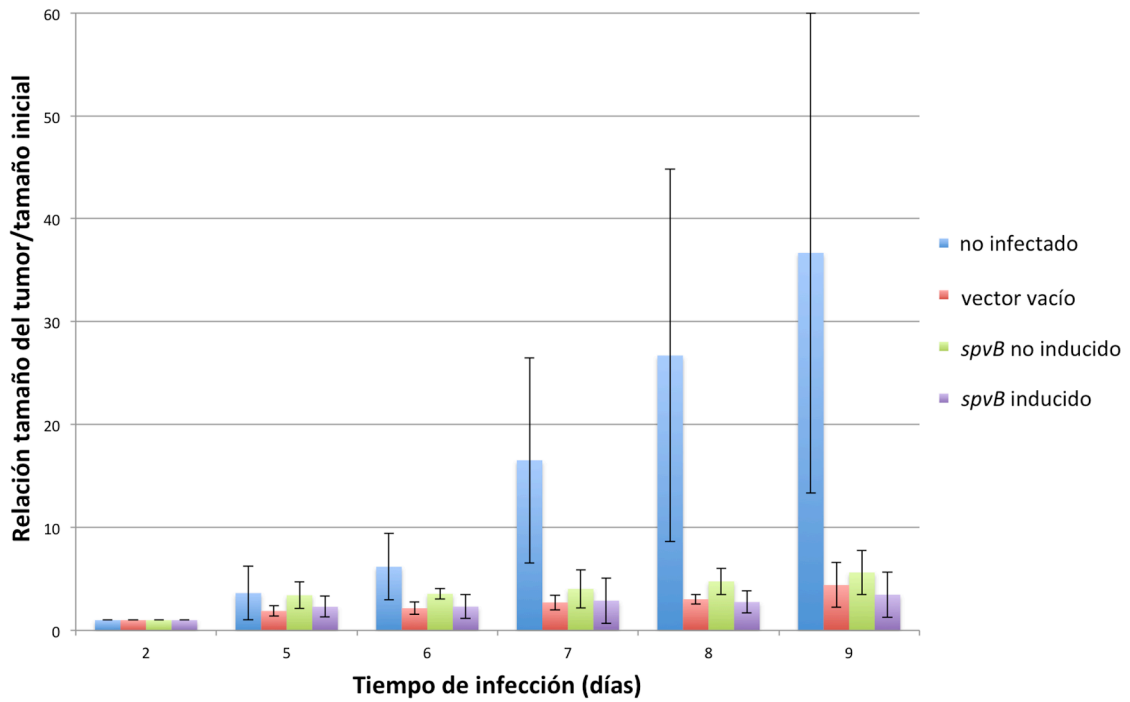


Figura 37. Representación gráfica de la progresión tumoral durante 9 días de infección. La progresión tumoral se muestra como la relación del tamaño medido en los días indicados con respecto al tamaño inicial medido el segundo día de la infección. Las columnas azules pertenecen al grupo control no infectado; las rojas, al grupo infectado con MPO372 portando el plásmido vacío; las verdes, portando el plásmido productor de SpvB en condiciones de no inducción y las moradas en condiciones de inducción. Los valores representados son la media de los ratones de cada grupo y las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos.

DISCUSIÓN

La utilización de bacterias patógenas como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium con fines terapéuticos ha generado un gran interés en las últimas décadas debido a su extraordinario potencial. Esta bacteria es capaz de colonizar las regiones hipóxicas del tumor que son inaccesibles para los agentes antitumorales convencionales e inhibir el crecimiento de tumores y metástasis en modelos animales (Pawelek *et al.*, 1997; Low *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2006; Yam *et al.*, 2010). Sin embargo, para su aplicación clínica en humanos es necesario realizar una serie de modificaciones que permitan administrarla de forma segura y eficaz, entre las que se incluyen reducir la toxicidad, aumentar la selectividad por los tumores y potenciar el efecto antitumoral. En la discusión de esta tesis se tratará, en primer lugar, la mejora del módulo de expresión del sistema inducible por salicilato (Royo *et al.*, 2007) para la utilización de *S. Typhimurium* como vector de producción de agentes anticancerígenos. Además de tratar las mejoras obtenidas con respecto a los rangos de niveles de inducción, se analizará la posibilidad de translocar al citoplasma eucariótico de proteínas de interés en terapia antitumoral, como p53, mediante el acoplamiento de la producción al TTSS. En segundo lugar, se valorará si las mejoras del sistema incrementan la producción de enzimas utilizadas anteriormente, como la citosina deaminasa. Por último, se discutirá la conveniencia del sistema desarrollado para el estudio del efecto en células eucarióticas de distintas proteínas citotóxicas, incluyendo efectores bacterianos y tratará la posibilidad de utilizar el efector SpvB de la propia bacteria como nuevo agente terapéutico.

1. MEJORA DEL VECTOR DE EXPRESIÓN.

1.1. El control de la expresión génica.

El control de la expresión génica es fundamental para producir de forma localizada y eficaz el agente antitumoral. La incorporación de promotores específicos, aguas arriba de los genes que codifican proteínas terapéuticas permiten la activación y el control por señales externas o del ambiente tumoral. En *Salmonella* se han desarrollado distintos sistemas que cumplen estos requisitos.

Salmonella expresa un factor de transcripción, el regulador de fumarato y reducción de nitratos (FNR), que activa la expresión de genes en condiciones anaerobias (Green *et al.*, 1996). Se han desarrollado dos promotores de hipoxia artificiales, HIP1 y FF+20*, que contienen sitios de unión a FNR (Mengesha *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2009) y se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la expresión de la citolisina HlyE, utilizando el promotor FF+20*, mejora el efecto antitumoral (Ryan *et al.*, 2009). Por tanto, la utilización de promotores que solo se activen en los tumores, permite potenciar el efecto antitumoral a la vez que se minimiza la toxicidad sistémica. Recientemente, se han identificado promotores específicos de tumores en *S. Typhimurium* que podrían ser de gran utilidad para la expresión de agentes antitumorales (Arrach *et al.*, 2010; Leschner *et al.*, 2012).

Por otra parte, se han desarrollado distintos sistemas de expresión que responden a señales externas. Uno de ellos es el sistema de expresión P_{BAD} inducible por L-arabinosa que consta de la proteína reguladora AraC y el promotor P_{BAD} . La proteína AraC actúa como represor en ausencia de inductor o como activador de la transcripción desde P_{BAD} en presencia del mismo (Guzman *et al.*, 1995). La administración intravenosa de L-arabinosa puede activar la expresión génica en tumores colonizados por *S. Typhimurium* (Loessner *et al.*, 2007). De hecho se ha demostrado que la expresión de la proteína citotóxica citolisina A (ClyA) bajo el control del promotor inducible por arabinosa utilizando esta bacteria como vector, suprime el crecimiento de tumores primarios y metástasis de cáncer de colon en ratones (Nguyen *et al.*, 2010). Otro de los sistemas utilizados es el sistema RecA, que se activa por el daño generado en el ADN por irradiación- γ . La activación de RecA promueve la autoproteólisis de LexA, represor del promotor *recA*, induciendo la expresión génica. El sistema se amplifica por retroalimentación de RecA cuando LexA se proteoliza (Anderson y Kowalczykowski, 1998). Se ha demostrado que la expresión del ligando inductor de apoptosis TRAIL acoplado a este promotor utilizando *S. Typhimurium* como vector, reduce el crecimiento tumoral en modelos murinos infectados (Ganai *et al.*, 2009).

Además de los sistemas descritos anteriormente, el sistema de expresión en cascada inducible por salicilato se ha utilizado con éxito en *S. Typhimurium* para la

producción controlada de la citosina deaminasa en ratones con tumores implantados, produciendo una reducción significativa del crecimiento tumoral (Royo *et al.*, 2007). Este sistema consta de un módulo regulador, que controla y amplifica la señal, y un módulo de expresión en el que se clona el gen de interés. Recientemente, el sistema ha sido mejorado mediante la integración del módulo regulador en el locus *trg* de *S. Typhimurium*, cuyos mutantes no parecen estar afectados en virulencia (Segura *et al.*, 2004) y podrían favorecer la acumulación preferencial en la zona del tumor resistente a otras terapias (Kasinskas y Forbes, 2007). Además, el módulo regulador se ha modificado introduciendo el gen *gfp* bajo el control del promotor constitutivo *Ptac* para seguir la infección y analizar la proliferación bacteriana en el interior de las células eucarióticas. Por otra parte, se han construido dos versiones de este módulo, con o sin NasR, dependiendo de la necesidad de reducir los niveles de expresión basales (Medina *et al.*, 2011).

1.2. Mejoras en el vector de expresión.

Para completar la mejora del sistema de expresión inducible por salicilato, durante el desarrollo de esta tesis se han construido una colección de vectores de alto y bajo número de copias que portan nuevas versiones del módulo de expresión. Entre las modificaciones se incluye un sitio de clonación múltiple más versátil y diferentes combinaciones de los siguientes elementos: el atenuador transcripcional *nasF* para reducir los niveles basales de expresión; el sitio de unión a ribosomas del bacteriófago T7 que permite niveles altos de traducción y la secuencia codificante del péptido señal de la proteína efectora de *Salmonella* SspH2 para liberar proteínas a través del TTSS directamente al interior de la célula eucariótica infectada.

Las diferentes versiones del módulo de expresión permiten obtener un amplio rango de niveles de producción de proteínas, tanto fuera como dentro de la célula eucariótica, como muestran los resultados de la Tabla 6. Esto es esencial para el uso de *S. Typhimurium* como vector de producción de agentes antitumorales ya que podemos producir diferentes cantidades de los agentes terapéuticos, según las necesidades, dependiendo de la combinación elegida. Además, si la proteína de interés fuese

citotóxica para la bacteria, la utilización de las versiones del módulo de expresión con el atenuador *nasF* junto con el módulo regulador, que produce la proteína antiterminadora NasR, permitiría controlar los niveles basales sin reducir la eficiencia de producción cuando el inductor esté presente, como indican los resultados de la Figura 13. De hecho, el uso de este sistema ha permitido expresar colicina E3 y mantener la estabilidad de los vectores de baja copia sin que la bacteria productora necesitara portar la correspondiente proteína de inmunidad (Medina *et al.*, 2011).

1.3. Acoplamiento de la producción al sistema de secreción tipo III.

La utilización de *S. Typhimurium* como factoría intracelular de agentes antitumorales requiere el diseño de sistemas eficientes que transporten las proteínas producidas desde la bacteria al citosol de la célula tumoral. En el capítulo 1 se ha acoplado con éxito la producción de proteínas de interés, como el péptido del extremo carboxilo terminal de la proteína p53, a la secreción por el sistema TTSS codificado en la isla de patogenicidad 2 que se induce en la fase intracelular de la infección (Fass y Groisman, 2009). Aunque se cree que la sobreexpresión de la proteína quimérica SspH2 podría saturar la maquinaria de translocación (Galan y Collmer, 1999), los resultados indican que la capacidad de translocación del sistema es elevada y permite secretar en torno a un 75% del producto generado por el sistema de expresión en las células infectadas. Sin embargo, la eficiencia de translocación depende en gran medida de la proteína a translocar. A diferencia de péptido Cp53, de 193 aminoácidos, no hemos detectado la proteína p53 completa en el citoplasma eucariótico tras ser producida con el mismo sistema de expresión. Por lo tanto, según la proteína y, posiblemente según su tamaño, serán necesarios sistemas adicionales que permitan la liberación al citosol de la célula tumoral. Por otro lado, hay que considerar que una translocación eficiente a través de estos sistemas, que requieren el desplegamiento y posterior plegamiento de la proteína en el citosol eucariótico, no asegura la funcionalidad de esta, por lo que los subsecuentes análisis en cultivos celulares determinarán la utilidad de este sistema con cada proteína.

2. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOSINA DEAMINASA.

El 5-FU es uno de los agentes quimioterapéuticos más utilizados en el tratamiento de cánceres colorrectales, gástricos, de cabeza y cuello, de mama y pancreáticos (Longley *et al.*, 2003). Sin embargo, la eficacia del tratamiento sistémico está limitada por su toxicidad gastrointestinal y hematológica (Vauthey *et al.*, 1996). Como alternativa se ha desarrollado el sistema enzima prodroga citosina deaminasa/5-FC que permite producir 5-FU localmente para tratar los tumores de forma específica y reducir la toxicidad en los tejidos sanos.

La eficacia de la combinación citosina deaminasa/5-FC ha sido demostrada en tumores implantados en modelos animales (Huber *et al.*, 1994; Ohwada *et al.*, 1996; Lee *et al.*; 2001), sin embargo, existen una serie de limitaciones para su aplicación clínica. En el año 2003 se realizó el primer ensayo en pacientes con cáncer en estado avanzado. Dos de los tres pacientes que recibieron la inyección intratumoral de la estirpe de *S. Typhimurium* TAPET-CD recombinante expresando la citosina deaminasa de *E.coli* fueron colonizados, y aunque en ellos se detectó la conversión del 5-FC administrado en 5-FU, no se observó regresión tumoral en ninguno de los casos (Nemunaitis *et al.*, 2003). Por tanto, antes de un nuevo ensayo clínico es necesario mejorar el sistema a distintos niveles. Por un lado, se requieren vectores que puedan ser administrados vía intravenosa y sean eficientes en la colonización tumoral para tratar no solo los tumores sólidos sino también las metástasis y por otro, incrementar la eficiencia de conversión de 5-FC a 5-FU, siendo este objetivo el más importante ya que el efecto *bystander* puede suplir en parte la ineficiencia de infección de las bacterias. De hecho, Huber *et al.* (Huber *et al.*, 1994) demostraron que un 2% de células transfectadas con el gen de la citosina deaminasa era suficiente para inhibir el crecimiento de las células tumorales vecinas que no expresaban la enzima.

La vida media del sustrato 5-FC en sangre limita la disponibilidad en el tumor. Este hecho hace que se necesiten dosis más altas de 5-FC que a su vez pueden resultar en efectos indeseados si se administra oralmente debido a que las enterobacterias de la flora intestinal son capaces también de convertir este sustrato en 5-FU (Diasio *et al.*, 1978). Se

han seguido distintas estrategias para reducir la dosis de 5-FC basadas en la mejora de la conversión hacia 5-FU o sus formas activas. El sistema citosina deaminasa/5-FC se desarrolló originalmente utilizando la enzima de *E.coli* (Austin y Huber, 1993) a pesar de su baja afinidad por el sustrato 5-FC. Alternativamente, Kievit *et al.* (Kievit *et al.*, 1999) propusieron la utilización de la citosina deaminasa de levaduras (*yCD*) por ser más eficiente que la bacteriana (*bCD*) aunque su termolabilidad a 37°C limitaba su aplicación terapéutica. Desde entonces, las investigaciones se han centrado en la búsqueda de versiones más eficientes de la *bCD* (Mahan *et al.*, 2004; Fuchita *et al.*, 2009) y más termoestables en el caso de las *yCD* (Stolworthy *et al.*, 2008) mediante mutagénesis dirigida.

El 5-FU es convertido directamente a su forma activa 5-FUMP por la uracil fosforribosil transferasa (UPRT) en *E.coli* o, alternativamente, a través de la uridina fosforilasa (UDP) y la uridina quinasa (UDK) cuando existe una alta concentración de sustratos en el medio (5-FU o ribosa-1-fosfato). Por el contrario, en eucariotas superiores, la falta de actividad UPRT hace que la conversión sea catalizada por la vía UDP y UDK. Se ha demostrado que la coexpresión de la citosina deaminasa (*bCD* o *yCD*) con UPRT potencian la sensibilidad de las células tumorales al 5-FC (Tiraby *et al.*, 1998; Erbs *et al.*, 2000; Koyama *et al.*, 2000), sin embargo, las combinaciones mutadas mejoradas de *bCD* o *yCD* con UPRT influyen negativamente en el efecto *bystander in vivo* lo que disminuiría el efecto terapéutico del sistema (Johnson *et al.*, 2011).

Alternativamente, para reducir la dosis de 5-FC administrada se puede incrementar la síntesis de la enzima. En el capítulo 2 se ha optimizado la producción de citosina deaminasa de forma controlada mediante el circuito inducible por salicilato, utilizando el vector de expresión mejorado que porta la SD T7 y la versión modificada del gen *codA* de *E. coli* en el codón de inicio. El test de sensibilidad a 5-FU que se muestra en la Figura 18, indica que las bacterias que portan esta versión son sensibles a unas bajas concentraciones de 5-FC que no afectan al crecimiento de las bacterias transformadas con la versión original. Por tanto, este vector permitiría reducir la dosis de 5-FC administrada para obtener mayores cantidades de 5-FU en los tumores. Por otro lado, los ensayos de actividad citosina deaminasa presentados en la Figura 19 han

mostrado que el incremento de expresión se relaciona con un aumento de la actividad, que es aproximadamente 13 veces superior a la actividad basal de *S. Typhimurium* y aproximadamente unas 4 veces la actividad obtenida con la secuencia original de *E.coli*.

La actividad antitumoral del 5-FU se relaciona directamente con la concentración en el tumor y el tiempo de exposición (Smith *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1999). Dado que este metabolito es tóxico para la propia bacteria, en esta tesis se propone la utilización del mutante *upp* resistente a 5-FU que permita producir la enzima durante más tiempo. Los ensayos de actividad mostrados en el capítulo 2 indican que, en las mismas condiciones, el mutante presenta aproximadamente el doble de actividad citosina deaminasa que la estirpe silvestre con el mismo vector. De esta forma, con la utilización de la estirpe resistente a 5-FU portando el vector de expresión con la versión modificada de *codA*, esperamos obtener un incremento del 5-FU producido y un aumento del efecto *bystander* que conlleven a la reducción de los tumores en modelos animales más acusada de las obtenidas hasta ahora.

3. ESTUDIO DEL EFECTOR SpvB. EFECTO EN CELULAS EUCARIÓTICAS Y USO EN TERAPIA ANTITUMORAL.

3.1. La actina, diana de los nuevos agentes terapéuticos.

La actina es un componente esencial del citoesqueleto implicado en numerosas funciones celulares como la contracción, la motilidad, el tráfico de vesículas, la organización intracelular, la citocinesis, la endocitosis y la apoptosis (Khaitlina, 2001; Pollard y Cooper, 1986; Franklin-Tong y Gourlay, 2008, Yarar *et al.*, 2005). Además, ciertas mutaciones o alteraciones que afectan a la actina o a proteínas asociadas a esta facilitan la propagación de las células tumorales a otros tejidos, por lo que la actina representa una diana interesante para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos (Jordan y Wilson, 1998; revisado en Van Troys *et al.*, 2008). En la naturaleza, existen compuestos que afectan a la dinámica de la actina inhibiendo la polimerización de los filamentos, como las citocalasinas (Cooper, 1987), las latrunculinas (Spector *et al.*, 1989) y las pectenotoxinas (Hori *et al.*, 1999), o promoviendo la

polimerización o estabilización de los filamentos de actina, como la faloidina (Wieland y Faulstich, 1977) y la jasplaquinolida (Senderowiz *et al.*, 1995).

Las bacterias también producen toxinas y efectores dirigidos al citoesqueleto de actina como es el caso del efector SpvB de *Salmonella enterica*, que ADP-ribosila los monómeros de G-actina impidiendo la polimerización de los filamentos (Aktories *et al.*, 2011; Hochmann *et al.*, 2006). Estudios previos demuestran que la transfección de células CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*) con vectores que expresan SpvB producen la pérdida del citoesqueleto (Lesnick *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado que la producción de SpvB, entre otras proteínas, durante las primeras horas de la infección contribuye a la inducción de la apoptosis (Paesold *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta estos datos, decidimos estudiar el efecto de la producción de SpvB en el interior de las células tumorales utilizando el sistema inducible por salicilato y los vectores de expresión mejorados.

3.2. Sobreexpresión de SpvB de forma controlada.

La infección de las líneas tumorales HeLa y MCF-7 con salmonellas productoras de SpvB en condiciones de inducción, provoca cambios morfológicos en las células infectadas. Estos cambios se asocian con la pérdida de los filamentos de actina, como demuestra la ausencia de tinción con faloidina-rodamina que se observa en la Figura 21. El análisis de los núcleos de esta población tras 20 horas de inducción revela además que el 50% de las células que han perdido los filamentos de actina presentan dobles núcleos y en algunos casos núcleos fragmentados. La presencia de células binucleadas sugiere un defecto de la citocinesis mientras que la fragmentación de los núcleos es una de las características asociadas a la muerte por apoptosis.

3.3. Sistema $\Delta purD$ /adenina.

Para analizar si la producción de SpvB afecta en último término a la viabilidad de las células tumorales es necesario mantener la infección durante más de 24 horas y evitar la muerte del cultivo inducida por la propia infección, que tiene lugar tras 18-24 horas, debido a la expresión de ciertas proteínas bacterianas durante las primeras 7-8 horas de

infección (Kim *et al.*, 1998; Paesold *et al.*, 2002; Knodler y Finlay, 2001; Fink y Cookson, 2007).

Para evitar la muerte debida a la infección, durante el desarrollo de esta tesis se ha puesto a punto un sistema que combina la utilización de un mutante $\Delta purD$ con unas condiciones de cultivo determinadas que evitan la proliferación de *Salmonella*. Este mutante es capaz de invadir las células pero no puede replicarse ni producir proteínas en el interior de estas en ausencia de adenina en el medio. Sin embargo, si se suplementa el medio durante la infección con una concentración normal de adenina durante 2 horas y tras este tiempo se reduce dicha concentración, se evita la producción de otras proteínas que inducen la muerte celular, como demuestra el análisis de los resultados de la liberación de la LDH mostrados en la Figura 23, mientras que se permite la producción y secreción de proteínas al citosol eucariótico en condiciones de inducción (Figura 24).

La utilización del mutante $\Delta purD$ en las condiciones descritas permite regular la producción de factores como SpvB y analizar su efecto en cultivos celulares. Por tanto, este método de control de la proliferación de la bacteria, junto con el sistema de expresión inducible por salicilato, suponen una herramienta muy útil para el estudio del efecto producido en células eucarióticas por otros factores de virulencia de *Salmonella* u otros patógenos, o por proteínas citotóxicas de cualquier otro organismo.

3.4. Efectos de la producción de SpvB a largo plazo.

Previo al análisis de los efectos de SpvB a largo plazo se determinó la capacidad de infección de la nueva estirpe $\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$, en las condiciones establecidas anteriormente, en distintas líneas tumorales humanas de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), colorrectal (HCT116), pancreática (PANC-1/P8.5) y cervical (HeLa). Los datos obtenidos en la Tabla 8 indican que esta estirpe posee una eficiencia de infección similar a la estirpe $\Delta spvB$ utilizada en los primeros ensayos y que las diferencias observadas en la capacidad de infección vienen determinadas por las líneas tumorales más que por las estirpes bacterianas. A pesar de estas diferencias, la estirpe $\Delta spvB \Delta purD::Kan^r$ que porta el plásmido productor de SpvB en condiciones de inducción produce, en todos los casos,

una disminución del crecimiento celular, la pérdida de los filamentos de actina y la acumulación de células binucleadas, como se observa en la Figura 25, reproduciendo los efectos obtenidos anteriormente por la sobreexpresión de SpvB en la estirpe $\Delta spvB$. La existencia de núcleos dobles y la aparición de núcleos fragmentados sugieren de nuevo que la pérdida de los filamentos de actina y el defecto en la citocinesis puede desencadenar la muerte celular por apoptosis, aunque en este caso sí podemos afirmar que estos efectos se deben a la producción intracelular de SpvB y no a la expresión de otras proteínas bacterianas que inducen la muerte celular, ya que las infecciones se realizaron en condiciones de limitación de proliferación bacteriana.

Las toxinas que interfieren con la dinámica de la actina producen la parada del ciclo celular (Lee y Song, 2007; Moulding *et al.*, 2007; Ando *et al.*, 2007; Moon *et al.*, 2008). El análisis de las consecuencias de la sobreexpresión de SpvB en el ciclo de distintas líneas tumorales (apartado 5 del capítulo 3 de esta tesis) muestra que la pérdida de los filamentos de actina tiene un efecto claro sobre la división celular y la viabilidad de la mayoría de las células testadas, lo que indica que esta proteína es interesante como potencial agente citotóxico para casi cualquier tipo de tumor, aunque es cierto que algunas líneas celulares como las PANC-1 responden de forma algo distinta. Posiblemente, en estos casos se requiera un análisis a tiempos más largos para observar un porcentaje mayor de muerte celular.

Un caso aparte es el de la línea tumoral MDA-MB-231, que evoluciona de forma distinta al resto de las líneas ensayadas. Aunque la citocinesis esté bloqueada, las células con contenido 4N siguen replicando su ADN, lo que origina un incremento de la población celular con una carga superior a 4N (25%) generada por endoreduplicación. Esta diferencia en el comportamiento de la línea MDA-MB-231 puede explicarse debido a que estas células sobreexpresan las ciclinas E y A, que son cruciales para el tránsito G₁/S (Kronenwett *et al.*, 2003), por lo que se saltan el control G₁/S del ciclo celular y continúan duplicando su ADN. Aún así, la pérdida de los filamentos de F-actina en estas células debido a la superproducción de SpvB impide la división celular. Por tanto, el porcentaje final de células afectadas va a depender de la línea tumoral y de su respuesta a la infección.

En conjunto los datos obtenidos del análisis del ciclo celular muestran que la pérdida de los filamentos de actina y el defecto en la citocinesis debido a la producción de SpvB originan un bloqueo en 4N que termina originando un aumento de la proporción de células muertas. La infección de células HeLa que expresan establemente histonas H2B marcadas con mCherry y la α -tubulina con mEGFP con *S. Typhimurium* productoras de SpvB (apartado 6) nos permitió determinar como evolucionan las células con un contenido 4N en cultivos *in vivo*. La visualización de estas células durante 20 horas muestra que tanto las células binucleadas, que no pueden llevar a cabo la citocinesis por falta de actina y por tanto están bloqueadas en G₁/S, como las células mononucleadas que tras replicar su ADN no pueden entrar en mitosis y se bloquean en G₂/M, sufren cambios morfológicos como la contracción celular, la formación de protuberancias (“*blebs*”) en la membrana plasmática y la fragmentación del ADN que son características propias de una muerte celular por apoptosis.

La detección de la enzima PARP-1 procesada mediante el análisis por Western blot de los extractos totales de células HeLa y MCF-7 infectadas con salmonellas productoras de SpvB, confirma que la producción de esta proteína induce la apoptosis de las células, como sugerían los cambios morfológicos observados en los cultivos *in vivo*. De hecho, se ha descrito anteriormente que SpvB es una de las proteínas requeridas por *Salmonella* para inducir la apoptosis en células eucariotas y que esta es dependiente de caspasa-3 (Libby *et al.*, 2000; Paesold *et al.*, 2002). Sin embargo, los resultados mostrados en el apartado 7 (capítulo 3) de esta tesis indican que la caspasa-3 no es esencial en este proceso, al menos en el caso de las células MCF-7, dado que la sobreexpresión de SpvB en esta línea celular, que no posee caspasa-3, produce apoptosis. La detección de la caspasa-7 procesada en los extractos de ambas líneas celulares sugiere que sea esta la inductora de apoptosis en MCF-7, por lo que, aun siendo proteasas funcionalmente distintas (Walsh *et al.*, 2008), ambas podrían ser funcionalmente redundantes en la apoptosis inducida por SpvB.

El citoesqueleto de actina, la progresión del ciclo celular y la apoptosis son procesos interconectados, aunque se desconocen los mecanismos que los relacionan. Se ha demostrado que el estado de organización del citoesqueleto es crítico para la

progresión del ciclo celular (Lee y Song, 2007; Moon *et al.*, 2008; They y Bornens, 2006). Por otra parte, la actina está implicada en muchos procesos celulares entre los que se incluye la apoptosis, participando en la contracción de la célula y la aparición de las burbujas (“*blebs*”) en la membrana plasmática, o actuando como iniciador o mediador del proceso apoptótico (revisado en Desouza *et al.*, 2012). De hecho, se ha propuesto que la alteración de la dinámica de la actina en sí mismo, como la tasa de polimerización/despolimerización, puede iniciar o modular la apoptosis (Gourlay y Ayscough, 2005). En definitiva, tanto la pérdida de los filamentos de actina en sí misma debida a la superproducción de SpvB como la alteración de la citocinesis que provoca la falta de actina pueden ser los responsables últimos de la inducción de la apoptosis de la célula.

3.5. Efecto de la sobreexpresión de SpvB en modelos animales.

Dado que la sobreexpresión de SpvB de forma controlada induce la muerte de las células tumorales, parece razonable explorar su posible uso como agente antitumoral en modelos animales. Para ello, en esta tesis se han infectado ratones BALB/c con tumores implantados con la estirpe atenuada $\Delta siiE \Delta aroA::Kan^r$ de *S. Typhimurium* que portaba el plásmido productor de SpvB en bajo número de copias y su correspondiente control para analizar el crecimiento tumoral durante 9 días en los que se indujo con salicilato sódico cada 48 horas. Los resultados obtenidos mostrados en la Figura 37 no son concluyentes. Los controles no infectados presentan un crecimiento exponencial mientras que todos los ratones infectados, independientemente del vector que portara *Salmonella* o si se había inducido o no la expresión de *spvB*, muestra la misma tasa de crecimiento, que aumenta ligeramente los primeros días de la infección pero que se mantiene el resto del tiempo. Por tanto, en las condiciones ensayadas, la producción de SpvB no consigue potenciar el drástico efecto antitumoral generado por la propia infección, aunque los resultados obtenidos en experimentos en cultivo con esta línea tumoral son equivalentes a los del resto de líneas analizadas en esta tesis (datos no mostrados). El efecto antitumoral debido solamente a la infección por *Salmonella* no se obtuvo en experimentos citados previamente, en los que se empleó el sistema inducible por salicilato y la citosina deaminasa (Royo *et al.*, 2007). Aunque en este caso se trataba

de la misma línea celular tumoral y la misma cepa de ratón BALB/c, la estirpe bacteriana productora era totalmente distinta (SL7202-4S2). lo que puede explicar la diferencia observada en la virulencia de la estirpes empleadas, así como en su efecto antitumoral, haciendo que las posibles consecuencias de la sobreexpresión de SpvB queden enmascarados por esta causa. Por otro lado, puede ser que la cantidad de SpvB producido con nuestro sistema no sea suficiente para inducir la muerte de las células debido a que la tasa de proliferación de las células tumorales F1. A11 no infectadas sea más elevada que la de parada y muerte. Quizás, la producción de SpvB podría incrementarse administrando salicilato sódico cada 4 horas en vez de cada 48, ya que la vida media del salicilato sódico es de 2-4 horas. Aún así, el efecto de SpvB dependerá de la línea tumoral y de la respuesta de la propia célula a la infección como hemos demostrado en los cultivos celulares. Por otra parte, se desconoce qué proporción de bacterias invaden las células tumorales en el animal. Se sabe que estas se acumulan preferentemente en las zonas necróticas y en la periferia de estas áreas, aunque rara vez se encuentran dentro de las células tumorales (Pawelek *et al.*, 1997; Agorio *et al.*, 2007; Loessner *et al.*, 2007; Leschner y Weiss, 2010; Crull *et al.*, 2011). Esto haría poco eficaz los tratamientos en los que sea necesario que las bacterias expresen el agente antitumoral directamente en el interior de las células tumorales. Sin embargo, *Salmonella* se ha utilizado como vector para transferir ARN interferente a las células tumorales con éxito por lo que una parte importante de la población debe invadir las células para llevar a cabo esta función (Zhang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008).

Dado los resultados en cultivos celulares, no podemos descartar el potencial de SpvB como agente antitumoral, aunque para ser utilizado en modelos animales se requieren mejoras en la producción o la combinación con otros agentes terapéuticos. Si el resultado obtenido se debe a que realmente son pocas las bacterias que invaden las células tumorales, lo ideal sería utilizar agentes que tengan un efecto *bystander* o diseñar sistemas que puedan introducir proteínas en el interior de las células tumorales al entrar en contacto con estas, sin necesidad de invadirlas.

CONCLUSIONES

1. La utilización de las versiones del módulo de expresión con atenuador *nasF* junto con el módulo regulador que produce la proteína antiterminadora NasR permite reducir los niveles de expresión basales sin afectar la eficiencia de producción.
2. La combinación del atenuador *nasF*, el sitio de unión a ribosomas del bacteriófago T7 y la utilización de vectores de expresión modificados de alto y bajo número de copias permite obtener un amplio rango de niveles de producción de proteínas usando las mismas condiciones de inducción.
3. La introducción del péptido señal de *sppH2* bajo el control de Pm en los vectores de expresión mejorados dirige la translocación de proteínas de interés fusionadas a este, como el péptido Cp53, al citosol eucariótico. La maquinaria de translocación permite exportar la mayoría de la proteína producida por el sistema de expresión.
4. La utilización del vector de expresión mejorado que porta la secuencia del sitio de unión al ribosoma del bacteriófago T7, junto con la modificación del codón inicial del gen *codA* de *E.coli*, suponen un incremento de la producción y, consecuentemente, de la actividad de la enzima citosina deaminasa con respecto al vector con la secuencia original de *codA* con su propia SD.
5. La actividad citosina deaminasa de la versión modificada se puede incrementar adicionalmente mediante el uso de un mutante *upp* resistente a 5-FU.
6. El empleo del mutante $\Delta purD$ y el ajuste de la concentración de adenina en el medio evita la muerte inducida por la propia infección y permite analizar el efecto de la producción y translocación controlada de proteínas citotóxicas, como SpvB, sobre la célula eucariótica.
7. La sobreexpresión controlada de SpvB produce la pérdida de los filamentos de F-actina y un defecto en citocinesis en las líneas tumorales humanas de cáncer cervical

(HeLa), de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), pancreática (PANC-1) y colorrectal (HCT116).

8. La sobreexpresión de SpvB origina un bloqueo del ciclo celular que conduce a la muerte celular, aunque el porcentaje de células afectadas va a depender de la línea tumoral y de su respuesta a la infección bacteriana.

9. La síntesis intracelular de SpvB induce la muerte por apoptosis independiente de caspasa-3 en células MCF-7, aunque tanto la caspasa-7 como la caspasa-3 se activan durante la apoptosis de las células HeLa.

BIBLIOGRAFÍA

- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW** (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell* **9**: 423-432.
- Agorio C, Schreiber F, Sheppard M, Mastroeni P, Fernandez M, Martinez MA et al** (2007). Live attenuated *Salmonella* as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. *The journal of gene medicine* **9**: 416-423.
- Agrawal N, Bettgowda C, Cheong I, Geschwind JF, Drake CG, Hipkiss EL et al** (2004). Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 15172-15177.
- Akaza H** (1995). BCG treatment of existing Ta, T1 tumours or carcinoma *in situ* of the bladder. *European urology* **27 Suppl 1**: 9-12.
- Akeda Y, Galan JE** (2005). Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**: 911-915.
- Aktories K, Lang AE, Schwan C, Mannherz HG** (2011). Actin as target for modification by bacterial protein toxins. *The FEBS journal* **278**: 4526-4543.
- Al-Ramadi BK, Fernandez-Cabezudo MJ, El-Hasasna H, Al-Salam S, Bashir G, Chouaib S** (2009). Potent anti-tumor activity of systemically-administered IL2-expressing *Salmonella* correlates with decreased angiogenesis and enhanced tumor apoptosis. *Clin Immunol* **130**: 89-97.
- Anderson DG, Kowalczykowski SC** (1998). Reconstitution of an SOS response pathway: derepression of transcription in response to DNA breaks. *Cell* **95**: 975-979.
- Ando Y, Yasuda S, Ocegüera-Yanez F, Narumiya S** (2007). Inactivation of Rho GTPases with *Clostridium difficile* toxin B impairs centrosomal activation of Aurora-A in G2/M transition of HeLa cells. *Molecular biology of the cell* **18**: 3752-3763.
- Arrach N, Cheng P, Zhao M, Santiviago CA, Hoffman RM, McClelland M** (2010). High-throughput screening for salmonella avirulent mutants that retain targeting of solid tumors. *Cancer research* **70**: 2165-2170.
- Ashkenazi A, Dixit VM** (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**: 1305-1308.
- Austin EA, Huber BE** (1993). A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing, and expression of *Escherichia coli* cytosine deaminase. *Molecular pharmacology* **43**: 380-387.
- Barak Y, Schreiber F, Thorne SH, Contag CH, Debeer D, Matin A** (2010). Role of nitric oxide in *Salmonella typhimurium*-mediated cancer cell killing. *BMC cancer* **10**: 146.

Barbe S, Van Mellaert L, Anne J (2006). The use of clostridial spores for cancer treatment. *Journal of applied microbiology* **101**: 571-578.

Bellamy R (1999). The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **1**: 23-27.

Bergers G, Benjamin LE (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews Cancer* **3**: 401-410.

Bernier J, Hall EJ, Giaccia A (2004). Radiation oncology: a century of achievements. *Nature reviews Cancer* **4**: 737-747.

Beuzon CR, Meresse S, Unsworth KE, Ruiz-Albert J, Garvis S, Waterman SR et al (2000). *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *The EMBO journal* **19**: 3235-3249.

Blackwell JM, Goswami T, Evans CA, Sibthorpe D, Papo N, White JK et al (2001). SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. *Cellular microbiology* **3**: 773-784.

Bohle A, Jocham D, Bock PR (2003). Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *The Journal of urology* **169**: 90-95.

Boyd EF, Hartl DL (1998). *Salmonella* virulence plasmid. Modular acquisition of the spv virulence region by an F-plasmid in *Salmonella enterica* subspecies I and insertion into the chromosome of subspecies II, IIIa, IV and VII isolates. *Genetics* **149**: 1183-1190.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.

Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR et al (1996). Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer research* **56**: 941-943.

Browne SH, Lesnick ML, Guiney DG (2002). Genetic requirements for salmonella-induced cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Infection and immunity* **70**: 7126-7135.

Browne SH, Hasegawa P, Okamoto S, Fierer J, Guiney DG (2008). Identification of *Salmonella* SPI-2 secretion system components required for SpvB-mediated cytotoxicity in macrophages and virulence in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**: 194-201.

Buckner MM, Croxen MA, Arena ET, Finlay BB (2011). A comprehensive study of the contribution of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SPI2 effectors to bacterial

colonization, survival, and replication in typhoid fever, macrophage, and epithelial cell infection models. *Virulence* **2**: 208-216.

Carmeliet P, Jain RK (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**: 249-257.

Cascales E, Buchanan SK, Duche D, Kleanthous C, Lloubes R, Postle K et al (2007). Colicin biology. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **71**: 158-229.

Cebolla A, Sousa C, de Lorenzo V (2001). Rational design of a bacterial transcriptional cascade for amplifying gene expression capacity. *Nucleic acids research* **29**: 759-766.

Cebolla A, Royo JL, De Lorenzo V, Santero E (2002). Improvement of recombinant protein yield by a combination of transcriptional amplification and stabilization of gene expression. *Applied and environmental microbiology* **68**: 5034-5041.

Chan HSL (2007). *Understanding Cancer Therapies*. University Press of Mississippi: Jackson, MS, USA.

Chen G, Wei DP, Jia LJ, Tang B, Shu L, Zhang K et al (2009). Oral delivery of tumor-targeting *Salmonella* exhibits promising therapeutic efficacy and low toxicity. *Cancer science* **100**: 2437-2443.

Chopra AK, Peterson JW, Prasad R (1991). Nucleotide sequence analysis of *purH* and *purD* genes from *Salmonella typhimurium*. *Biochimica et biophysica acta* **1090**: 351-354.

Cooper JA (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of cell biology* **105**: 1473-1478.

Cornelis GR (2006). The type III secretion injectisome. *Nature reviews Microbiology* **4**: 811-825.

Coussens LM, Werb Z (2002). Inflammation and cancer. *Nature* **420**: 860-867.

Creagh EM, Conroy H, Martin SJ (2003). Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunological reviews* **193**: 10-21.

Critchley RJ, Jezard S, Radford KJ, Goussard S, Lemoine NR, Grillot-Courvalin C et al (2004). Potential therapeutic applications of recombinant, invasive *E. coli*. *Gene therapy* **11**: 1224-1233.

Crull K, Bumann D, Weiss S (2011). Influence of infection route and virulence factors on colonization of solid tumors by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Immunol Med Microbiol* **62**: 75-83.

Dang CV, Semenza GL (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in biochemical sciences* **24**: 68-72.

Dang LH, Bettegowda C, Huso DL, Kinzler KW, Vogelstein B (2001). Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 15155-15160.

Datsenko KA, Wanner BL (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 6640-6645.

Desouza M, Gunning PW, Stehn JR (2012). The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis. *Bioarchitecture* **2**: 75-87.

Diasio RB, Lakings DE, Bennett JE (1978). Evidence for conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in humans: possible factor in 5-fluorocytosine clinical toxicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **14**: 903-908.

Doyle A, Griffiths, J.B., Newell, D.G. (1995). *Cell & Tissue Culture: Laboratory procedures*. John Wiley & sons: New York.

Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **26**: 199-213.

Erbs P, Regulier E, Kintz J, Leroy P, Poitevin Y, Exinger F et al (2000). *In vivo* cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer research* **60**: 3813-3822.

Essmann F, Schulze-Osthoff K (2012). Translational approaches targeting the p53 pathway for anti-cancer therapy. *British journal of pharmacology* **165**: 328-344.

Fang FC, Krause M, Roudier C, Fierer J, Guiney DG (1991). Growth regulation of a *Salmonella* plasmid gene essential for virulence. *Journal of bacteriology* **173**: 6783-6789.

Fass E, Groisman EA (2009). Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Current opinion in microbiology* **12**: 199-204.

Feltis BA, Miller JS, Sahar DA, Kim AS, Saltzman DA, Leonard AS et al (2002). Liver and circulating NK1.1(+)/CD3(-) cells are increased in infection with attenuated *Salmonella typhimurium* and are associated with reduced tumor in murine liver cancer. *The Journal of surgical research* **107**: 101-107.

Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F (1986). Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 5189-5193.

Fierer J, Krause M, Tauxe R, Guiney D (1992). *Salmonella typhimurium* bacteremia: association with the virulence plasmid. *J Infect Dis* **166**: 639-642.

- Fink SL, Cookson BT** (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity* **73**: 1907-1916.
- Fink SL, Cookson BT** (2007). Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cellular microbiology* **9**: 2562-2570.
- Fischer U, Schulze-Osthoff K** (2005). New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacological reviews* **57**: 187-215.
- Forbes NS** (2010). Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nature reviews Cancer* **10**: 785-794.
- Franklin-Tong VE, Gourlay CW** (2008). A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *The Biochemical journal* **413**: 389-404.
- Frantz B, O'Neill EA** (1995). The effect of sodium salicylate and aspirin on NF-kappa B. *Science* **270**: 2017-2019.
- Fu W, Chu L, Han X, Liu X, Ren D** (2008). Synergistic antitumoral effects of human telomerase reverse transcriptase-mediated dual-apoptosis-related gene vector delivered by orally attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in murine tumor models. *The journal of gene medicine* **10**: 690-701.
- Fuchita M, Ardiani A, Zhao L, Serve K, Stoddard BL, Black ME** (2009). Bacterial cytosine deaminase mutants created by molecular engineering show improved 5-fluorocytosine-mediated cell killing in vitro and in vivo. *Cancer research* **69**: 4791-4799.
- Fulda S** (2009). Apoptosis in Cancer Biology and Cancer Therapeutics Essentials of Apoptosis. In: Dong Z, Yin X-M (eds). Humana Press. pp 581-596.
- Galan JE** (1996). Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Molecular microbiology* **20**: 263-271.
- Galan JE, Collmer A** (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**: 1322-1328.
- Galan JE, Wolf-Watz H** (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573.
- Galmbacher K, Heisig M, Hotz C, Wischhusen J, Galmiche A, Bergmann B et al** (2010). *Shigella* mediated depletion of macrophages in a murine breast cancer model is associated with tumor regression. *PloS one* **5**: e9572.
- Galyov EE, Wood MW, Rosqvist R, Mullan PB, Watson PR, Hedges S et al** (1997). A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and

mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Molecular microbiology* **25**: 903-912.

Ganai S, Arenas RB, Forbes NS (2009). Tumour-targeted delivery of TRAIL using *Salmonella typhimurium* enhances breast cancer survival in mice. *British journal of cancer* **101**: 1683-1691.

Ganai S, Arenas RB, Sauer JP, Bentley B, Forbes NS (2011). In tumors *Salmonella* migrate away from vasculature toward the transition zone and induce apoptosis. *Cancer gene therapy* **18**: 457-466.

Garcia-Gonzalez V, Govantes F, Porrua O, Santero E (2005). Regulation of the *Pseudomonas* sp. strain ADP cyanuric acid degradation operon. *Journal of bacteriology* **187**: 155-167.

Gerlach RG, Jackel D, Stecher B, Wagner C, Lupas A, Hardt WD et al (2007). *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cellular microbiology* **9**: 1834-1850.

Gerlach RG, Claudio N, Rohde M, Jackel D, Wagner C, Hensel M (2008). Cooperation of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cellular microbiology* **10**: 2364-2376.

Giono LE, Manfredi JJ (2006). The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *Journal of cellular physiology* **209**: 13-20.

Glaab WE, Mitchell LS, Miller JE, Vlasakova K, Skopek TR (2005). 5-fluorouracil forward mutation assay in *Salmonella*: determination of mutational target and spontaneous mutational spectra. *Mutation research* **578**: 238-246.

Gotoh H, Okada N, Kim YG, Shiraishi K, Hirami N, Haneda T et al (2003). Extracellular secretion of the virulence plasmid-encoded ADP-ribosyltransferase SpvB in *Salmonella*. *Microbial pathogenesis* **34**: 227-238.

Gourlay CW, Ayscough KR (2005). The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? *Nature reviews Molecular cell biology* **6**: 583-589.

Govoni G, Gros P (1998). Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* **47**: 277-284.

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW et al (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* **379**: 88-91.

Green J, Bennett B, Jordan P, Ralph ET, Thomson AJ, Guest JR (1996). Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch in vitro. *The Biochemical journal* **316 (Pt 3)**: 887-892.

Grem JL (1996). *5-Fluoropyrimidines. Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice. 2nd ed.* Philadelphia: Lippincott.

Grimont PA, Weill, F-X. (2007). *Antigenic formulae of the Salmonella serovars. In WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella, 9 edn:* Instituto Pasteur, Paris, Francia.

Guiney DG, Fang FC, Krause M, Libby S (1994). Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid *Salmonella* serovars. *FEMS microbiology letters* **124**: 1-9.

Gulig PA, Danbara H, Guiney DG, Lax AJ, Norel F, Rhen M (1993). Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Molecular microbiology* **7**: 825-830.

Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of bacteriology* **177**: 4121-4130.

Habib NA (2000). *Cancer Gene Therapy : Past Achievements and Future Challenges.* Kluwer Academic Publishers: Hingham, MA, USA.

Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**: 557-580.

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674.

Haraga A, Ohlson MB, Miller SI (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature reviews Microbiology* **6**: 53-66.

Harris AL (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews Cancer* **2**: 38-47.

Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A (2004). High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nature reviews Cancer* **4**: 806-813.

Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK (1997). Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors *in vivo*: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature medicine* **3**: 177-182.

Heng YW, Koh CG (2010). Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**: 1622-1633.

- Hengartner MO** (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.
- Hennekens CH** (2002). Update on aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease. *The American journal of managed care* **8**: S691-700.
- Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A** (1999). The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 2396-2401.
- Hochmann H, Pust S, von Figura G, Aktories K, Barth H** (2006). *Salmonella enterica* SpvB ADP-ribosylates actin at position arginine-177-characterization of the catalytic domain within the SpvB protein and a comparison to binary clostridial actin-ADP-ribosylating toxins. *Biochemistry* **45**: 1271-1277.
- Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P** (1996). Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer research* **56**: 4509-4515.
- Hoffman RM** (2009). Tumor-targeting amino acid auxotrophic *Salmonella typhimurium*. *Amino acids* **37**: 509-521.
- Hoiseth SK, Stocker BA** (1981). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**: 238-239.
- Hopkins SA, Niedergang F, Corthesy-Theulaz IE, Kraehenbuhl JP** (2000). A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cellular microbiology* **2**: 59-68.
- Hori M, Matsuura Y, Yoshimoto R, Ozaki H, Yasumoto T, Karaki H** (1999). [Actin depolymerizing action by marine toxin, pectenotoxin-2]. *Nihon yakurigaku zasshi Folia pharmacologica Japonica* **114 Suppl 1**: 225P-229P.
- Huber BE, Austin EA, Richards CA, Davis ST, Good SS** (1994). Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 8302-8306.
- Ibarra JA, Steele-Mortimer O** (2009). *Salmonella*--the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular microbiology* **11**: 1579-1586.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG** (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **273**: 9357-9360.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* **61**: 69-90.

Ji K, Wang B, Shao YT, Zhang L, Liu YN, Shao C et al (2011). Synergistic suppression of prostatic cancer cells by coexpression of both murine double minute 2 small interfering RNA and wild-type p53 gene *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **338**: 173-183.

Jia LJ, Wei DP, Sun QM, Huang Y, Wu Q, Hua ZC (2007). Oral delivery of tumor-targeting *Salmonella* for cancer therapy in murine tumor models. *Cancer science* **98**: 1107-1112.

Jiang X, Wang X (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *The Journal of biological chemistry* **275**: 31199-31203.

Johnson AJ, Ardiani A, Sanchez-Bonilla M, Black ME (2011). Comparative analysis of enzyme and pathway engineering strategies for 5FC-mediated suicide gene therapy applications. *Cancer gene therapy* **18**: 533-542.

Jordan MA, Wilson L (1998). Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Current opinion in cell biology* **10**: 123-130.

Karavolos MH, Roe AJ, Wilson M, Henderson J, Lee JJ, Gally DL et al (2005). Type III secretion of the *Salmonella* effector protein SopE is mediated via an N-terminal amino acid signal and not an mRNA sequence. *Journal of bacteriology* **187**: 1559-1567.

Kasinskas RW, Forbes NS (2006). *Salmonella typhimurium* specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue *in vitro*. *Biotechnology and bioengineering* **94**: 710-721.

Kasinskas RW, Forbes NS (2007). *Salmonella typhimurium* lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. *Cancer research* **67**: 3201-3209.

Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer research* **53**: 3976-3985.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**: 239-257.

Khaitlina SY (2001). Functional specificity of actin isoforms. *International review of cytology* **202**: 35-98.

Kievit E, Bershad E, Ng E, Sethna P, Dev I, Lawrence TS et al (1999). Superiority of yeast over bacterial cytosine deaminase for enzyme/prodrug gene therapy in colon cancer xenografts. *Cancer research* **59**: 1417-1421.

Kim GY, Kim WJ, Choi YH (2011). Pectenotoxin-2 from marine sponges: a potential anti-cancer agent-a review. *Marine drugs* **9**: 2176-2187.

Kim JM, Eckmann L, Savidge TC, Lowe DC, Witthoft T, Kagnoff MF (1998). Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *The Journal of clinical investigation* **102**: 1815-1823.

King I, Bermudes D, Lin S, Belcourt M, Pike J, Troy K et al (2002). Tumor-targeted *Salmonella* expressing cytosine deaminase as an anticancer agent. *Human gene therapy* **13**: 1225-1233.

King KL, Cidlowski JA (1998). Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual review of physiology* **60**: 601-617.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH et al (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal* **14**: 5579-5588.

Knodler LA, Finlay BB (2001). *Salmonella* and apoptosis: to live or let die? *Microbes and infection / Institut Pasteur* **3**: 1321-1326.

Kohwi Y, Imai K, Tamura Z, Hashimoto Y (1978). Antitumor effect of *Bifidobacterium infantis* in mice. *Gann = Gan* **69**: 613-618.

Koyama F, Sawada H, Hirao T, Fujii H, Hamada H, Nakano H (2000). Combined suicide gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of *Escherichia coli* cytosine deaminase gene and *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Cancer gene therapy* **7**: 1015-1022.

Krause M, Fang FC, Guiney DG (1992). Regulation of plasmid virulence gene expression in *Salmonella dublin* involves an unusual operon structure. *Journal of bacteriology* **174**: 4482-4489.

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P et al (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell death and differentiation* **12 Suppl 2**: 1463-1467.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* **87**: 99-163.

Kronenwett U, Castro J, Roblick UJ, Fujioka K, Ostring C, Faridmoghaddam F et al (2003). Expression of cyclins A, E and topoisomerase II alpha correlates with centrosome amplification and genomic instability and influences the reliability of cytometric S-phase determination. *BMC cell biology* **4**: 8.

- Kuhle V, Hensel M** (2004). Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **61**: 2812-2826.
- Kurita A, Gotoh H, Eguchi M, Okada N, Matsuura S, Matsui H et al** (2003). Intracellular expression of the *Salmonella* plasmid virulence protein, SpvB, causes apoptotic cell death in eukaryotic cells. *Microbial pathogenesis* **35**: 43-48.
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lancaster LE, Wintermeyer W, Rodnina MV** (2007). Colicins and their potential in cancer treatment. *Blood cells, molecules & diseases* **38**: 15-18.
- Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y** (2002). Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* **297**: 1352-1354.
- Lee CH, Wu CL, Shiau AL** (2004). Endostatin gene therapy delivered by *Salmonella choleraesuis* in murine tumor models. *The journal of gene medicine* **6**: 1382-1393.
- Lee CH, Wu CL, Shiau AL** (2005). Systemic administration of attenuated *Salmonella choleraesuis* carrying thrombospondin-1 gene leads to tumor-specific transgene expression, delayed tumor growth and prolonged survival in the murine melanoma model. *Cancer gene therapy* **12**: 175-184.
- Lee CH, Wu CL, Shiau AL** (2008). *Salmonella choleraesuis* as an anticancer agent in a syngeneic model of orthotopic hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* **122**: 930-935.
- Lee K, Song K** (2007). Actin dysfunction activates ERK1/2 and delays entry into mitosis in mammalian cells. *Cell Cycle* **6**: 1487-1495.
- Lee KC, Zheng LM, Margitich D, Almassian B, King I** (2001). Evaluation of the acute and subchronic toxic effects in mice, rats, and monkeys of the genetically engineered and *Escherichia coli* cytosine deaminase gene-incorporated *Salmonella* strain, TAPET-CD, being developed as an antitumor agent. *International journal of toxicology* **20**: 207-217.
- Leschner S, Westphal K, Dietrich N, Viegas N, Jablonska J, Lyszkiewicz M et al** (2009). Tumor invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is accompanied by strong hemorrhage promoted by TNF-alpha. *PLoS one* **4**: e6692.
- Leschner S, Weiss S** (2010). Salmonella-allies in the fight against cancer. *J Mol Med (Berl)* **88**: 763-773.
- Leschner S, Deyneko IV, Lienenklaus S, Wolf K, Bloecker H, Bumann D et al** (2012). Identification of tumor-specific *Salmonella* Typhimurium promoters and their regulatory logic. *Nucleic acids research* **40**: 2984-2994.

Lesnick ML, Reiner NE, Fierer J, Guiney DG (2001). The *Salmonella spvB* virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Molecular microbiology* **39**: 1464-1470.

Leung KY, Finlay BB (1991). Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 11470-11474.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**: 491-501.

Libby SJ, Lesnick M, Hasegawa P, Weidenhammer E, Guiney DG (2000). The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Cellular microbiology* **2**: 49-58.

Libby SJ, Lesnick M, Hasegawa P, Kurth M, Belcher C, Fierer J et al (2002). Characterization of the *spv* locus in *Salmonella enterica* serovar Arizona. *Infection and immunity* **70**: 3290-3294.

Liotta LA, Kohn EC (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* **411**: 375-379.

Lodish H, Berk, A., Zipursky, SL. (2000). *Molecular Cell Biology. 4th edition.*: New York.

Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, Reed JC (2008). Inhibition of tumor growth using salmonella expressing Fas ligand. *Journal of the National Cancer Institute* **100**: 1113-1116.

Loessner H, Endmann A, Leschner S, Westphal K, Rohde M, Miloud T et al (2007). Remote control of tumour-targeted *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by the use of L-arabinose as inducer of bacterial gene expression *in vivo*. *Cellular microbiology* **9**: 1529-1537.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews Cancer* **3**: 330-338.

Low KB, Ittensohn M, Le T, Platt J, Sodi S, Amoss M et al (1999). Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNFalpha induction retain tumor-targeting *in vivo*. *Nature biotechnology* **17**: 37-41.

Mahan SD, Ireton GC, Knoeber C, Stoddard BL, Black ME (2004). Random mutagenesis and selection of *Escherichia coli* cytosine deaminase for cancer gene therapy. *Protein engineering, design & selection : PEDS* **17**: 625-633.

- Malmgren RA, Flanigan CC** (1955). Localization of the vegetative form of *Clostridium tetani* in mouse tumors following intravenous spore administration. *Cancer research* **15**: 473-478.
- Maloy SR** (1990). *Experimental techniques in bacterial genetics*: Boston.
- Malumbres M, Barbacid M** (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews Cancer* **9**: 153-166.
- Marinus MG, Morris NR** (1973). Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* **114**: 1143-1150.
- Mastroeni P, Grant A, Restif O, Maskell D** (2009). A dynamic view of the spread and intracellular distribution of *Salmonella enterica*. *Nature reviews Microbiology* **7**: 73-80.
- Matsui H, Bacot CM, Garlington WA, Doyle TJ, Roberts S, Gulig PA** (2001). Virulence plasmid-borne *spvB* and *spvC* genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *Journal of bacteriology* **183**: 4652-4658.
- McCormick BA, Miller SI, Carnes D, Madara JL** (1995). Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infection and immunity* **63**: 2302-2309.
- McGhie EJ, Brawn LC, Hume PJ, Humphreys D, Koronakis V** (2009). *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Current opinion in microbiology* **12**: 117-124.
- Medina C, Camacho EM, Flores A, Mesa-Pereira B, Santero E** (2011). Improved expression systems for regulated expression in *Salmonella* infecting eukaryotic cells. *PLoS one* **6**: e23055.
- Mellor HR, Callaghan R** (2008). Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response. *Pharmacology* **81**: 275-300.
- Mengesha A, Dubois L, Lambin P, Landuyt W, Chiu RK, Wouters BG et al** (2006). Development of a flexible and potent hypoxia-inducible promoter for tumor-targeted gene expression in attenuated *Salmonella*. *Cancer biology & therapy* **5**: 1120-1128.
- Meyers M, Hwang A, Wagner MW, Bruening AJ, Veigl ML, Sedwick WD et al** (2003). A role for DNA mismatch repair in sensing and responding to fluoropyrimidine damage. *Oncogene* **22**: 7376-7388.
- Miao EA, Miller SI** (2000). A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 7539-7544.

- Miller JH** (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory: N.Y.
- Minchinton AI, Tannock IF** (2006). Drug penetration in solid tumours. *Nature reviews Cancer* **6**: 583-592.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA et al** (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of *bcl-2* and *bax* gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* **9**: 1799-1805.
- Miyashita T, Reed JC** (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell* **80**: 293-299.
- Moon DO, Kim MO, Kang SH, Lee KJ, Heo MS, Choi KS et al** (2008). Induction of G2/M arrest, endoreduplication, and apoptosis by actin depolymerization agent pectenotoxin-2 in human leukemia cells, involving activation of ERK and JNK. *Biochem Pharmacol* **76**: 312-321.
- Morgan E, Campbell JD, Rowe SC, Bispham J, Stevens MP, Bowen AJ et al** (2004). Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology* **54**: 994-1010.
- Moroni MC, Hickman ES, Lazzerini Denchi E, Caprara G, Colli E, Cecconi F et al** (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nature cell biology* **3**: 552-558.
- Moulder JE, Rockwell S** (1987). Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Cancer metastasis reviews* **5**: 313-341.
- Moulding DA, Blundell MP, Spiller DG, White MR, Cory GO, Calle Y et al** (2007). Unregulated actin polymerization by WASp causes defects of mitosis and cytokinesis in X-linked neutropenia. *The Journal of experimental medicine* **204**: 2213-2224.
- Mueller MM, Fusenig NE** (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature reviews Cancer* **4**: 839-849.
- Mullen CA, Kilstrup M, Blaese RM** (1992). Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 33-37.
- Mundt AJ, Roeske, J.C., Chung T.D., Weichselbaum, R.R.** (2003). Biologic Basis of Radiation Therapy. In: Kufe DW, Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Gansler, T.S., Holland J.F., Frei, E. (ed). *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6 edn. BC Decker.
- Muñoz A** (2004). *Cáncer: genes y nuevas terapias*. Editorial Hélice: España.
- Nakano K, Vousden KH** (2001). *PUMA*, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell* **7**: 683-694.

- Nauts HC, Swift WE, Coley BL** (1946). The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research. *Cancer research* **6**: 205-216.
- Nemunaitis J, Cunningham C, Senzer N, Kuhn J, Cramm J, Litz C et al** (2003). Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer gene therapy* **10**: 737-744.
- Nguyen VH, Kim HS, Ha JM, Hong Y, Choy HE, Min JJ** (2010). Genetically engineered *Salmonella typhimurium* as an imageable therapeutic probe for cancer. *Cancer research* **70**: 18-23.
- O'Callaghan D, Maskell D, Liew FY, Easmon CS, Dougan G** (1988). Characterization of aromatic- and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attention, persistence, and ability to induce protective immunity in BALB/c mice. *Infection and immunity* **56**: 419-423.
- Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA** (1996). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 7800-7804.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T et al** (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**: 1053-1058.
- Ohwada A, Hirschowitz EA, Crystal RG** (1996). Regional delivery of an adenovirus vector containing the *Escherichia coli* cytosine deaminase gene to provide local activation of 5-fluorocytosine to suppress the growth of colon carcinoma metastatic to liver. *Human gene therapy* **7**: 1567-1576.
- Oldham RK, Dillman, R.O.** (2009). *Principles of Cancer Biotherapy*. Springer Science.
- Olsson M, Zhivotovsky B** (2011). Caspases and cancer. *Cell death and differentiation* **18**: 1441-1449.
- Otto H, Tezcan-Merdol D, Girisch R, Haag F, Rhen M, Koch-Nolte F** (2000). The *spvB* gene-product of the *Salmonella enterica* virulence plasmid is a mono(ADP-ribosyl)transferase. *Molecular microbiology* **37**: 1106-1115.
- Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T et al** (1995). Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Molecular and cellular biology* **15**: 3032-3040.
- Paesold G, Guiney DG, Eckmann L, Kagnoff MF** (2002). Genes in the *Salmonella* pathogenicity island 2 and the *Salmonella* virulence plasmid are essential for *Salmonella*-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cellular microbiology* **4**: 771-781.

Paglia P, Medina E, Arioli I, Guzman CA, Colombo MP (1998). Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood* **92**: 3172-3176.

Panthel K, Meinel KM, Domenech VE, Retzbach H, Igwe EI, Hardt WD et al (2005). *Salmonella* pathogenicity island 2-mediated overexpression of chimeric SspH2 proteins for simultaneous induction of antigen-specific CD4 and CD8 T cells. *Infection and immunity* **73**: 334-341.

Park HH (2012). Structural features of caspase-activating complexes. *International journal of molecular sciences* **13**: 4807-4818.

Patyar S, Joshi R, Byrav DS, Prakash A, Medhi B, Das BK (2010). Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *Journal of biomedical science* **17**: 21.

Pawelek JM, Low KB, Bermudes D (1997). Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. *Cancer research* **57**: 4537-4544.

Pawelek JM, Low KB, Bermudes D (2003). Bacteria as tumour-targeting vectors. *The lancet oncology* **4**: 548-556.

Pelengaris S, Khan, M (2009). DNA Replication and the Cell Cycle. *Molecular Biology of Cancer*. Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA.

Pollard TD, Cooper JA (1986). Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annual review of biochemistry* **55**: 987-1035.

Prodromou C, Pearl LH (1992). Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein engineering* **5**: 827-829.

Reed JC (1997). Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Seminars in hematology* **34**: 9-19.

Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R et al (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology* **2**: 361-367.

Rosal R, Brandt-Rauf P, Pincus MR, Wang H, Mao Y, Li Y et al (2005). The role of alpha-helical structure in p53 peptides as a determinant for their mechanism of cell death: necrosis versus apoptosis. *Advanced drug delivery reviews* **57**: 653-660.

Royo JL, Manyani H, Cebolla A, Santero E (2005). A new generation of vectors with increased induction ratios by overimposing a second regulatory level by attenuation. *Nucleic acids research* **33**: e169.

- Royo JL, Becker PD, Camacho EM, Cebolla A, Link C, Santero E et al** (2007). *In vivo* gene regulation in *Salmonella* spp. by a salicylate-dependent control circuit. *Nature methods* **4**: 937-942.
- Ryan RM, Green J, Williams PJ, Tazzyman S, Hunt S, Harmey JH et al** (2009). Bacterial delivery of a novel cytolysin to hypoxic areas of solid tumors. *Gene therapy* **16**: 329-339.
- Rytkonen A, Poh J, Garmendia J, Boyle C, Thompson A, Liu M et al** (2007). SseL, a *Salmonella* deubiquitinase required for macrophage killing and virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 3502-3507.
- Saltzman DA, Heise CP, Hasz DE, Zebede M, Kelly SM, Curtiss R et al** (1996). Attenuated *Salmonella typhimurium* containing interleukin-2 decreases MC-38 hepatic metastases: a novel anti-tumor agent. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* **11**: 145-153.
- Salvensen GS, Dixit, V.M.** (1997). Caspases: Intracellular Signaling by Proteolysis. *Cell* **91**: 443-446.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory: New York.
- Sansonetti P** (2002). Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut* **50 Suppl 3**: III2-8.
- Sansonetti PJ** (2004). War and peace at mucosal surfaces. *Nature reviews Immunology* **4**: 953-964.
- Santos RL, Baumler AJ** (2004). Cell tropism of *Salmonella enterica*. *International journal of medical microbiology : IJMM* **294**: 225-233.
- Schmieger H** (1972). Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Molecular & general genetics : MGG* **119**: 75-88.
- Segura I, Casadesus J, Ramos-Morales F** (2004). Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. *Journal of microbiological methods* **56**: 83-91.
- Senatus PB, Li Y, Mandigo C, Nichols G, Moise G, Mao Y et al** (2006). Restoration of p53 function for selective Fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells *in vitro* and *in vivo* by a p53 COOH-terminal peptide. *Molecular cancer therapeutics* **5**: 20-28.
- Senderowicz AM, Kaur G, Sainz E, Laing C, Inman WD, Rodriguez J et al** (1995). Jaspilakinolide's inhibition of the growth of prostate carcinoma cells *in vitro* with disruption of the actin cytoskeleton. *Journal of the National Cancer Institute* **87**: 46-51.

Shah GM, Shah RG, Poirier GG (1996). Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose) polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells. *Biochemical and biophysical research communications* **229**: 838-844.

Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW (1996). Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 2593-2597.

Shen H, Kanoh M, Maruyama S, Matsumoto A, Zhang W, Asano Y (2008). Attenuated *Listeria* infection activates natural killer cell cytotoxicity to regress melanoma growth in vivo. *Microbiology and immunology* **52**: 107-117.

Shiozaki EN, Chai J, Shi Y (2002). Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 4197-4202.

Smith JP, Stock E, Orenberg EK, Yu NY, Kanekal S, Brown DM (1995). Intratumoral chemotherapy with a sustained-release drug delivery system inhibits growth of human pancreatic cancer xenografts. *Anti-cancer drugs* **6**: 717-726.

Smith JP, Kanekal S, Patawaran MB, Chen JY, Jones RE, Orenberg EK et al (1999). Drug retention and distribution after intratumoral chemotherapy with fluorouracil/epinephrine injectable gel in human pancreatic cancer xenografts. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **44**: 267-274.

Sorenson BS, Banton KL, Frykman NL, Leonard AS, Saltzman DA (2008a). Attenuated *Salmonella typhimurium* with interleukin 2 gene prevents the establishment of pulmonary metastases in a model of osteosarcoma. *Journal of pediatric surgery* **43**: 1153-1158.

Sorenson BS, Banton KL, Frykman NL, Leonard AS, Saltzman DA (2008b). Attenuated *Salmonella typhimurium* with IL-2 gene reduces pulmonary metastases in murine osteosarcoma. *Clinical orthopaedics and related research* **466**: 1285-1291.

Soussi T, Dehouche K, Beroud C (2000). p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Human mutation* **15**: 105-113.

Spaink H, Okker, R., Wijffelman, C., Pees, E., Lugtenberg, B. (1987). Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. *Plant Molecular Biology* **9**: 27-39.

Spector I, Shochet NR, Blasberger D, Kashman Y (1989). Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell motility and the cytoskeleton* **13**: 127-144.

St Jean AT, Zhang M, Forbes NS (2008). Bacterial therapies: completing the cancer treatment toolbox. *Current opinion in biotechnology* **19**: 511-517.

- Stephen D, Jones C, Schofield JP** (1990). A rapid method for isolating high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. *Nucleic acids research* **18**: 7463-7464.
- Stohrer M, Boucher Y, Stangassinger M, Jain RK** (2000). Oncotic pressure in solid tumors is elevated. *Cancer research* **60**: 4251-4255.
- Stolworthy TS, Korkegian AM, Willmon CL, Ardiani A, Cundiff J, Stoddard BL et al** (2008). Yeast cytosine deaminase mutants with increased thermostability impart sensitivity to 5-fluorocytosine. *Journal of molecular biology* **377**: 854-869.
- Stritzker J, Weibel S, Hill PJ, Oelschlaeger TA, Goebel W, Szalay AA** (2007). Tumor-specific colonization, tissue distribution, and gene induction by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in live mice. *International journal of medical microbiology : IJMM* **297**: 151-162.
- Sylvester RJ, van der Meijden AP, Witjes JA, Kurth K** (2005). Bacillus calmette-guerin versus chemotherapy for the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *The Journal of urology* **174**: 86-91; discussion 91-82.
- Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A** (2003). Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1010**: 186-194.
- Sznol M, Lin SL, Bermudes D, Zheng LM, King I** (2000). Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer. *The Journal of clinical investigation* **105**: 1027-1030.
- Tannock I** (1978). Cell kinetics and chemotherapy: a critical review. *Cancer treatment reports* **62**: 1117-1133.
- Tannock IF, Rotin D** (1989). Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer research* **49**: 4373-4384.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ** (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 231-241.
- Taylor WR, Stark GR** (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**: 1803-1815.
- Taylor WR, Grabovich A** (2009). Chapter 17 - Targeting the Cell Cycle to Kill Cancer Cells. In: Miles H, William M, Kenneth Bachmann A2 - Miles Hacker WM, Kenneth B (eds). *Pharmacology*. Academic Press: San Diego. pp 429-453.
- Tezcan-Merdol D, Nyman T, Lindberg U, Haag F, Koch-Nolte F, Rhen M** (2001). Actin is ADP-ribosylated by the *Salmonella enterica* virulence-associated protein SpvB. *Molecular microbiology* **39**: 606-619.

Tezcan-Merdol D, Engstrand L, Rhen M (2005). *Salmonella enterica* SpvB-mediated ADP-ribosylation as an activator for host cell actin degradation. *International journal of medical microbiology : IJMM* **295**: 201-212.

They M, Bornens M (2006). Cell shape and cell division. *Current opinion in cell biology* **18**: 648-657.

Thornborrow EC, Patel S, Mastropietro AE, Schwartzfarb EM, Manfredi JJ (2002). A conserved intronic response element mediates direct p53-dependent transcriptional activation of both the human and murine *bax* genes. *Oncogene* **21**: 990-999.

Tian Y, Guo B, Jia H, Ji K, Sun Y, Li Y et al (2012). Targeted therapy via oral administration of attenuated *Salmonella* expression plasmid-vectored Stat3-shRNA cures orthotopically transplanted mouse HCC. *Cancer gene therapy* **19**: 393-401.

Tindall BJ, Grimont PA, Garrity GM, Euzéby JP (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **55**: 521-524.

Tinel A, Tschopp J (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* **304**: 843-846.

Tiraby M, Cazaux C, Baron M, Drocourt D, Reynes JP, Tiraby G (1998). Concomitant expression of *E. coli* cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase improves the cytotoxicity of 5-fluorocytosine. *FEMS microbiology letters* **167**: 41-49.

Toso JF, Gill VJ, Hwu P, Marincola FM, Restifo NP, Schwartzentruber DJ et al (2002). Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **20**: 142-152.

Tredan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute* **99**: 1441-1454.

Udagawa T, Yuan J, Panigrahy D, Chang YH, Shah J, D'Amato RJ (2000). Cytochalasin E, an epoxide containing *Aspergillus*-derived fungal metabolite, inhibits angiogenesis and tumor growth. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **294**: 421-427.

Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, Heidenreich R, Erber R, Wunder A et al (2002). Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *The Journal of clinical investigation* **109**: 777-785.

Van Troys M, Vandekerckhove, J., Ampe, C. (2008). Actin and Actin-Binding Proteins in Cancer Progression and Metastasis. In: Remedios C, Chhabra, D. (ed). *Actin-Binding Proteins and Disease*. Atassi, M. : Australia. pp 229-277.

- Vauthey JN, Marsh Rde W, Cendan JC, Chu NM, Copeland EM (1996). Arterial therapy of hepatic colorectal metastases. *The British journal of surgery* **83**: 447-455.
- Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W *et al* (1999). Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**: 804-808.
- Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, Gauthier S, Sebastiani G, Malo D *et al* (1995). The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *The Journal of experimental medicine* **182**: 655-666.
- Vogel HJ, Bonner DM (1956). Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *The Journal of biological chemistry* **218**: 97-106.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**: 307-310.
- Walker DR, Bond JP, Tarone RE, Harris CC, Makalowski W, Boguski MS *et al* (1999). Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. *Oncogene* **18**: 211-218.
- Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Luthi AU, Gerner C, Martin SJ (2008). Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 12815-12819.
- Wang RF, Kushner SR (1991). Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**: 195-199.
- Ward JF (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **35**: 95-125.
- Watson KG, Holden DW (2010). Dynamics of growth and dissemination of *Salmonella in vivo*. *Cellular microbiology* **12**: 1389-1397.
- Westphal K, Leschner S, Jablonska J, Loessner H, Weiss S (2008). Containment of tumor-colonizing bacteria by host neutrophils. *Cancer research* **68**: 2952-2960.
- Wieland T, Faulstich H (1977). The action of phalloidin. *Current problems in clinical biochemistry* **7**: 11-14.
- Wilson T, Longley B., Johnston, P. (2008). Therapeutic Targeting of Apoptosis in Cancer. In: Bonavida B (ed). *Sensitization of Cancer Cells for Chemo/Immuno/Radio-therapy*. Humana Press: Los Angeles, CA, USA.
- Wong RS (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **30**: 87.

Woodruff MF, McBride WH, Dunbar N (1974). Tumour growth, phagocytic activity and antibody response in *Corynebacterium parvum*-treated mice. *Clinical and experimental immunology* **17**: 509-518.

Wooldridge K (2009). *Bacterial secreted proteins. Secretory mechanisms and role in pathogenesis*: Nottingham, UK.

Wu GS, Burns TF, McDonald ER, 3rd, Jiang W, Meng R, Krantz ID et al (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nature genetics* **17**: 141-143.

Wu SQ, Chai W, Lin JT, Stewart V (1999). General nitrogen regulation of nitrate assimilation regulatory gene *nasR* expression in *Klebsiella oxytoca* M5a1. *Journal of bacteriology* **181**: 7274-7284.

Yam C, Zhao M, Hayashi K, Ma H, Kishimoto H, McElroy M et al (2010). Monotherapy with a tumor-targeting mutant of *S. typhimurium* inhibits liver metastasis in a mouse model of pancreatic cancer. *The Journal of surgical research* **164**: 248-255.

Yang N, Zhu X, Chen L, Li S, Ren D (2008). Oral administration of attenuated *S. typhimurium* carrying shRNA-expressing vectors as a cancer therapeutic. *Cancer biology & therapy* **7**: 145-151.

Yarar D, Waterman-Storer CM, Schmid SL (2005). A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Molecular biology of the cell* **16**: 964-975.

Yu YA, Shabahang S, Timiryasova TM, Zhang Q, Beltz R, Gentschev I et al (2004). Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nature biotechnology* **22**: 313-320.

Zhang L, Gao L, Zhao L, Guo B, Ji K, Tian Y et al (2007). Intratumoral delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium carrying plasmid-based small interfering RNAs. *Cancer research* **67**: 5859-5864.

Zhang L, Gao L, Li Y, Lin G, Shao Y, Ji K et al (2008). Effects of plasmid-based Stat3-specific short hairpin RNA and GRIM-19 on PC-3M tumor cell growth. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**: 559-568.

Zhang Y, Tome Y, Suetsugu A, Zhang L, Zhang N, Hoffman RM et al (2012). Determination of the Optimal Route of Administration of *Salmonella typhimurium* A1-R to Target Breast Cancer in Nude Mice. *Anticancer research* **32**: 2501-2508.

Zhao M, Yang M, Li XM, Jiang P, Baranov E, Li S et al (2005). Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 755-760.

Zhao M, Yang M, Ma H, Li X, Tan X, Li S et al (2006). Targeted therapy with a *Salmonella typhimurium* leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. *Cancer research* **66**: 7647-7652.

Ziegler U, Groscurth P (2004). Morphological features of cell death. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* **19**: 124-128.