



Universidad
Zaragoza



UTILIZACIÓN DEL CANDIDATO A VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS MTBVAC COMO VECTOR DE EXPRESIÓN DE GRANZIMA B

Trabajo Fin de Grado
Biotecnología, Facultad de Ciencias

Autora:

Elena Mata Lozano

Directores:

Juan Ignacio Aguiló Anento

Carlos Martín Montañés

Grupo de Genética de Micobacterias
Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina

2014

ÍNDICE

1. RESUMEN / ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. BCG. La actual vacuna contra la tuberculosis	3
2.2 Otras aplicaciones de BCG	3
2.2.1 BCG en el tratamiento del cáncer de vejiga	3
2.2.2 BCG como vector de expresión de proteínas recombinantes	4
2.3 Nuevas vacunas contra la tuberculosis: MTBVAC	4
2.4 La granzima B y su papel en la apoptosis	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 Cepas	7
3.2 Extracción de RNA	7
3.3 PCR cuantitativa real time	8
3.4 Extracción proteica y análisis por Western blot	9
3.5 Ensayo enzimático	10
4. RESULTADOS	11
4.1 Extracción de RNA y análisis por RTq-PCR	11
4.2 Análisis de la expresión y secreción proteica por Western blot	13
4.3 Análisis de la actividad de la granzima B secretada	19
5. DISCUSIÓN	21
6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	23
7. BIBLIOGRAFÍA	25

1. RESUMEN

La actual vacuna contra la tuberculosis, el bacilo de Calmette-Guérin o BCG, es una vacuna viva atenuada derivada de una cepa de *M. bovis*, y constituye también el tratamiento inmunoterápico de primera línea contra el carcinoma de vejiga. BCG se ha mostrado además como un candidato adecuado para el desarrollo de vacunas recombinantes que permitan la expresión simultánea de múltiples antígenos protectores de diferentes patógenos, habiendo conseguido con éxito la expresión de diversas proteínas recombinantes.

El nuevo candidato a vacuna contra la tuberculosis –MTBVAC-, creado en la Universidad de Zaragoza, y producido por la empresa biotecnológica Biofabri, ha sido la primera vacuna viva atenuada basada en *M. tuberculosis* en entrar en fases de ensayos clínicos.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo consiste en la utilización de MTBVAC y BCG como vectores de expresión de granzima B, proteína conocida por su papel iniciador en el proceso de apoptosis. Se espera que las vacunas recombinantes BCG o MTVAC que expresen granzima B sean capaces de inducir apoptosis de forma eficaz en las células tumorales que infectan, mejorando su eficacia frente al tratamiento del cáncer de vejiga.

El trabajo realizado se basa en la caracterización de la expresión, secreción y funcionalidad de la granzima B clonada en cepas de BCG y MTBVAC en su forma activa e inactiva. En ellas se ha caracterizado la expresión de la proteína desde la transcripción del gen codificante de la granzima B a través de extracción de RNA y PCR cuantitativa real time, hasta la expresión proteica mediante técnicas de extracción de proteína y análisis por Western blot. Finalmente se ha analizado la actividad de la granzima B recombinante secretada a través de un ensayo enzimático de actividad.

ABSTRACT

The current tuberculosis vaccine, bacillus Calmette-Guérin or BCG, is a live, attenuated vaccine isolated from a *M. bovis* strain, and it is also the current immunotherapy treatment of first choice against bladder carcinoma. BCG is also a useful vector for the development of recombinant vaccines vehicles which allow simultaneous expression of multiple protective antigens of different pathogens, and several recombinant proteins have been cloned and expressed successfully in recombinant BCG.

The new vaccine candidate against tuberculosis –MTBVAC-, created at the University of Zaragoza and produced by the biotechnological company Biofabri, has been the first live-attenuated *M.tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials.

In this context, the goal of this work is the utilization of MTBVAC and BCG as expression vectors of granzyme B, protein known for its starting role in the apoptotic process. It is expected that recombinant BCG or MTBVAC vaccines expressing granzyme B are able to efficiently induce apoptosis in infected tumor cells, enhancing their efficacy in bladder cancer treatment.

The work carried out is based on the characterization of expression, secretion and functionality of granzyme B cloned in BCG and MTBVAC strains in its active and inactive form. Protein expression has been characterized from granzyme B gene transcription by RNA extraction and real time quantitative PCR, to protein synthesis and secretion by protein extraction techniques and Western blot analysis. Finally, the activity of the secreted recombinant granzyme B has been analyzed through an enzymatic assay.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. BCG. La actual vacuna contra la tuberculosis

La actual vacuna en uso contra la tuberculosis conocida como bacilo de Calmette-Guérin o BCG es una cepa viva atenuada de *Mycobacterium bovis* obtenida a partir de un cultivo de la bacteria aislada de una vaca en 1904 y cultivada durante un periodo de 13 años con un total de 231 pasajes hasta la obtención de la actual vacuna. La primera vacunación tuvo lugar en 1921 y desde 1974 la vacunación con BCG en niños está incluida en el programa de inmunización (EPI) de la organización mundial de la salud, dando como resultado unas 100 millones de vacunaciones por año [1].

BCG ha demostrado efectividad en reducir la incidencia de formas severas de tuberculosis en niños (meningitis tuberculosa y tuberculosis miliar), pero su efectividad se reduce en la prevención de la expansión de la forma pulmonar, la manifestación más común de la enfermedad en adolescentes y adultos y principal fuente de expansión de la tuberculosis [1].

Por otra parte, la distribución mundial de BCG y los repetidos subcultivos en condiciones no estandarizadas han dado lugar a diversas cepas bacterianas y a la acumulación de múltiples cambios moleculares, lo que hace que la respuesta inmune y la protección varíe entre las distintas cepas, incluso pudiendo llevar a la sobreatenuación de algunas de ellas, y reduciendo por tanto su inmunogenicidad [1,2].

2.2. Otras aplicaciones de BCG

Además de su uso principal en la vacunación y protección contra la tuberculosis existen otras aplicaciones para las que BCG se ha mostrado útil, como su utilización en el tratamiento del cáncer de vejiga y la expresión de proteínas recombinantes.

2.2.1. BCG en el tratamiento del cáncer de vejiga

BCG es ampliamente utilizada en el tratamiento de tumores superficiales no invasivos en cáncer de vejiga desde hace más de 30 años, constituyendo una de las inmunoterapias más exitosas en uso en cáncer.

El mecanismo de su acción terapéutica se encuentra aún en investigación, pero se sugiere que tanto las células uroteliales cancerígenas, como las células del sistema inmune tienen papeles cruciales en el efecto antitumoral de BCG. La implicación de las células cancerígenas incluye adhesión e internalización de BCG, secreción de citoquinas y quimioquinas y presentación de BCG y/o antígenos celulares tumorales a las células del sistema inmune. Las células del

sistema inmune con papel potencial en la terapia con BCG incluyen linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, células NK, granulocitos, macrófagos y células dendríticas. Las células tumorales mueren a través de citotoxicidad directa de estas células, secreción de factores solubles y en cierto grado la acción directa de BCG [3].

2.2.2. BCG como vector de expresión de proteínas recombinantes

BCG constituye además un potencial candidato como vector de expresión de proteínas recombinantes.

En este contexto BCG ha sido utilizada con éxito para la expresión de forma simultánea de múltiples antígenos frente a tétanos, tosferina y difteria, con el fin de utilizarla como vacuna polivalente [4]. Igualmente, con el objetivo de aumentar la capacidad inmunogénica de la vacuna, se han clonado con éxito distintas citoquinas, las cuales se ha visto que conservan su actividad tras ser expresadas por la micobacteria [5].

Es importante remarcar que para que la proteína recombinante expresada por la micobacteria desempeñe su papel fisiológico, debe ser secretada por ésta. Para ello, la estrategia abordada por distintos autores consiste en el clonaje de la proteína de interés detrás de una secuencia señal del Antígeno 85B (Ag85B), un antígeno mayor de 32 kDa secretado por las micobacterias. Éste posee una secuencia señal de 39 aminoácidos en el extremo N-terminal, la cual es reconocida por los sistemas de secreción de la bacteria cuando la proteína se traduce en su interior. Al alcanzar la pared celular, una proteasa corta dicha secuencia y la proteína madura es secretada [6].

2.3. Nuevas vacunas contra la tuberculosis: MTBVAC

A pesar de su extendido uso, la falta de eficacia de BCG en algunos aspectos, principalmente en la protección contra la forma respiratoria de la enfermedad, ha hecho necesario el desarrollo de nuevas vacunas más eficaces contra la tuberculosis que permitan mayor prevención de la transmisión y control de la enfermedad.

MTBVAC es un candidato a vacuna viva atenuada contra la tuberculosis obtenida de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* modificada por ingeniería genética con el objetivo de cumplir los requerimientos del consenso de Ginebra para entrar en ensayos clínicos humanos. En su desarrollo se seleccionó una cepa de *M. tuberculosis* aislada en clínica para generar dos deleciones independientes sin marcadores de resistencia a antibióticos en los genes *phoP*, codificante para un factor de transcripción clave en la regulación de la virulencia de *M. tuberculosis*, y *fadD26*, esencial en la síntesis del lípido complejo ftiocerol dimicocerosato (DIM), uno de los mayores factores de virulencia de la micobacteria. La cepa resultante MTBVAC muestra seguridad y perfiles de biodistribución similares a BCG y ha demostrado protección superior

en los estudios preclínicos, convirtiéndose en la primera vacuna viva atenuada basada en *M. tuberculosis* en entrar en ensayos clínicos [2].

De la misma forma que BCG, MTBVAC puede ser utilizado como potencial vector para el clonaje y expresión de proteínas recombinantes.

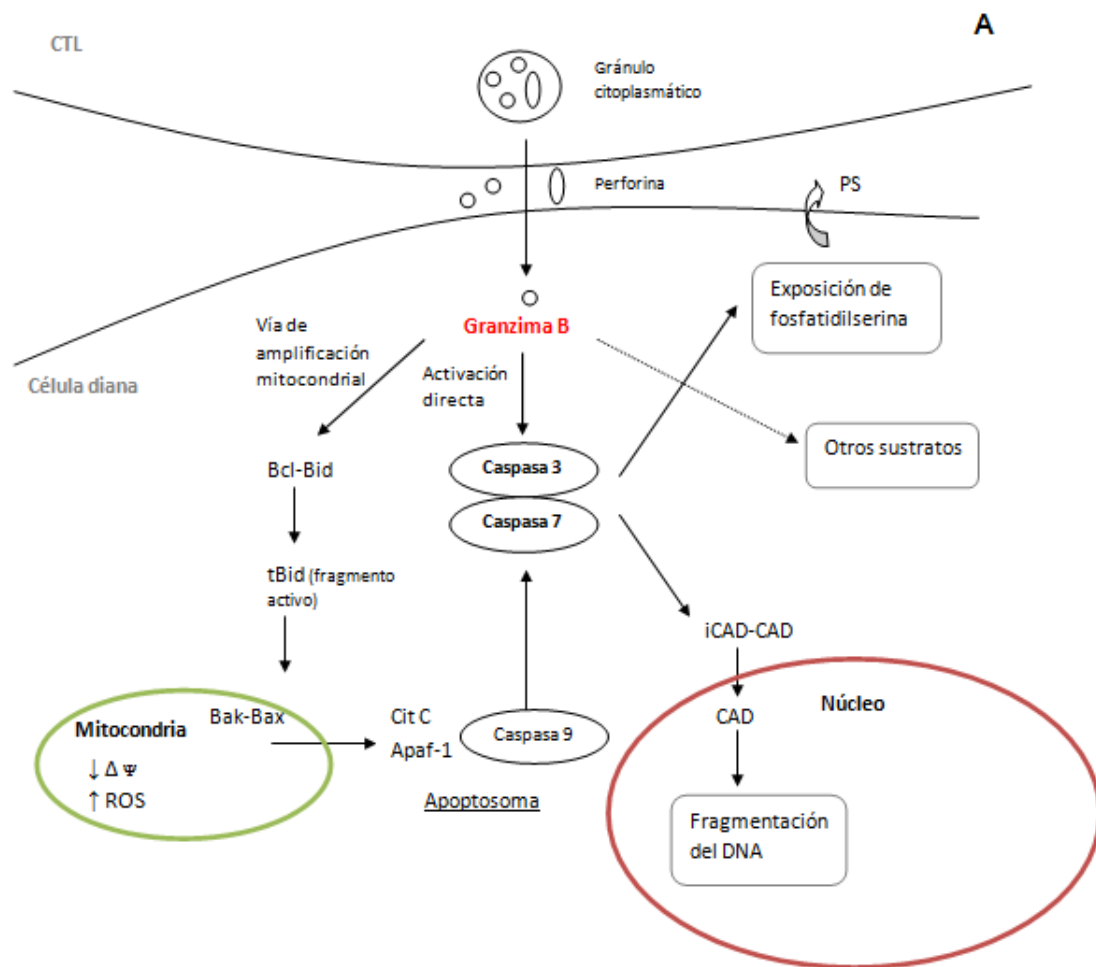
2.4. La granzima B y su papel en la apoptosis

La granzima B es una proteína de 32 kDa con actividad proteasa caracterizada por su papel iniciador en la muerte celular por apoptosis. En condiciones fisiológicas se encuentra localizada en el interior de gránulos citoplasmáticos en los linfocitos T citotóxicos (CTLs) y las células “asesinas naturales” (NKs). Cuando estas células reconocen células tumorales o infectadas por patógenos intracelulares, la granzima B penetra en la célula diana mediante un mecanismo dependiente de la perforina, desempeñando un papel crucial en la inducción de apoptosis y citotoxicidad.

Su mecanismo de acción comprende la activación de diversas vías apoptóticas. La granzima B activa las caspasas efectoras, directamente o a través de la vía de amplificación mitocondrial. De esta forma, es responsable de la inducción de diversos fenómenos y rasgos apoptóticos como la fragmentación del DNA en la célula diana o la exposición de fosfatidilserina, a través de la activación de las caspasas efectoras 3 y 7. Además, induce la caída del potencial mitocondrial y activa la vía apoptótica intrínseca proteolizando la proteína de la familia Bcl-2 Bid, que finalmente permite la salida del espacio intermembrana mitocondrial de factores apoptóticos como el citocromo c, que mediante la formación del apoptosoma llevan a la activación de las caspasas 9 y 3.

Por otra parte, se ha observado que la granzima B es también capaz de activar vías apoptóticas independientes de caspasas así como activar o inhibir rutas que pueden conducir a la muerte de la célula a través de la acción sobre diversos sustratos implicados en diferentes procesos celulares (Fig.1A) [7].

La granzima B posee una secuencia de 247 aminoácidos, siendo los 18 primeros un péptido señal. Los aminoácidos 19 y 20 constituyen un péptido de activación que mantiene la proteína inactiva en el interior de los gránulos citoplasmáticos, el cual es escindido durante el procesamiento molecular de la proteína, de manera que la forma activa de la granzima B comprende los aminoácidos 21-247 (Fig.1B) [8].



B

10	20	30	40	50	60
MQPILLLLAF	LLLPRADAGE	IIGGHEAKPH	SRPYMAYLMI	WDQKSLKRCG	GFLIRDDPVL
70	80	90	100	110	120
TAHCWVGSSI	NVTLGAHNIK	EQEPTQQFIP	VKRPIHPAY	NPKNFSNDIM	LLQLERKAKR
130	140	150	160	170	180
TRAVQPLRLP	SNKAQVKPGQ	TCSVAGWGQT	APLGKHSHTL	QEVKMTVQED	RKCESDLRHY
190	200	210	220	230	240
YDSTIELCVG	DPEIKKTSFK	GDSGGPLVCN	KVAQGIVSYG	RNNGMPPRAC	TKVSSFVHWI
KKTMKRY					

Péptido señal	1-18		_____
Péptido de activación	19-20		_____
Granzima B activa	21-247		_____

Fig.1. (A) Vías apoptóticas inducidas por la granzima B
 (B) Secuencia aminoacídica de la granzima B

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo son BCG Pasteur y MTBVAC, en las cuales fue previamente clonada la secuencia correspondiente a la forma activa (aminoácidos 21-247) e inactiva (aminoácidos 19-247) de la granzima B para su expresión como proteína recombinante. La secuencia de la granzima B activa o inactiva se clonó en todos los casos detrás la secuencia codificante de los 39 primeros aminoácidos del Ag85B, correspondientes a la secuencia señal de secreción de esta proteína, y precedida a su vez del promotor de *hsp60* de *M. tuberculosis*, promotor comúnmente utilizado para sobreexpresión en micobacterias. La construcción completa se clonó en el plásmido integrativo pMV361, con el que se transformaron las cepas de BCG y MTBVAC. Las diversas cepas fueron cultivadas a 37°C en medio de cultivo líquido TH9 suplementado con albúmina, dextrosa y catalasa (ADC) y tween20 0.05% (v/v).

De esta manera, en la realización de los experimentos llevados a cabo se ha partido de cuatro cultivos de micobacterias: BCG con granzima B inactiva (BCGi), BCG con granzima B activa (BCGa), MTBVAC con granzima B inactiva (VACi) y MTBVAC con granzima B activa (VACa).

3. 2. Extracción de RNA

Los cultivos de las cepas de partida BCG y MTBVAC crecidos en medio líquido 7H9-ADC-Tween20 0.05% y llevados hasta una fase exponencial de crecimiento, fueron centrifugados a 4000rpm y temperatura ambiente, descartado el sobrenadante y resuspendido el pellet en buffer de lavado (H₂O DEPC, NaCl 8% y tween 80) y RNA protect reagent. El pellet obtenido por centrifugación durante 5 min a 14000rpm y temperatura ambiente fue resuspendido en buffer de lisis (H₂O DEPC, acetato de sodio 3M pH 5,5, SDS 10%, EDTA 0,2M) y fenol-ácido:cloroformo (5/1) y sometido a lisis mecánica con perlas de vidrio mediante Fast-Prep. La fase acuosa obtenida por centrifugación durante 5min a 14000rpm y 4°C fue separada y suspendida en cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) preincubado en hielo. Tras una nueva centrifugación de 5min a 14000rpm y 4°C, el sobrenadante obtenido fue suspendido en acetato de sodio 3M pH 5,5 e incubado una noche a -20°C. Tras este periodo, las muestras fueron centrifugadas a 14000rpm y 4°C durante 30 minutos y el pellet obtenido se lavó con etanol 70%. El pellet resultante de una nueva centrifugación a 14000rpm y 4°C durante 5 minutos se secó y se resuspendió en H₂O DEPC, tras lo cual fue tratado con DNAsa I 10%, precipitado con fenol-cloroformo e incubado durante una noche a -20°C. El

pellet obtenido por centrifugación a 4°C durante 30 minutos fue suspendido en etanol 70%. Tras una nueva centrifugación, se dejó secar el pellet resultante.

Una vez finalizado el proceso de extracción se realizaron varias pruebas como control de calidad del RNA obtenido.

Para cuantificar y determinar la pureza del RNA se analizaron las muestras en un espectrofotómetro NanoDrop mediante la medida del máximo de absorbancia a 260nm y de la relación 260/280 nm.

Con el objetivo de comprobar la integridad del RNA obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

Finalmente, mediante la técnica de PCR se comprobó la ausencia de contaminación de DNA en las muestras de RNA obtenidas. En ella se utilizaron dos oligos BCG2A y BCG2B (oligos estándar utilizados en laboratorio para detección de DNA micobacteriano). Como control positivo se utilizó DNA de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv y agua destilada como control negativo. Las muestras de PCR obtenidas fueron cargadas en un gel de agarosa con bromuro de etidio.

Una vez evaluada la calidad de las muestras y la ausencia de contaminación, se procedió a la obtención del cDNA correspondiente mediante retrotranscripción utilizando una transcriptasa reversa (Invitrogen), para lo que se utilizaron 1,5ug de RNA de cada muestra. El resto del RNA fue conservado a -80°C.

3.3. PCR cuantitativa real time

Para amplificar y cuantificar la secuencia de nucleótidos correspondiente al gen de la granzima B mediante RTq-PCR se utilizaron dos primers (SIGMA) diseñados a partir de la secuencia del gen codificante de la proteína (Tabla 1).

Primer	Secuencia (5'-3')	μg	nmol	Tm (°C)
GZMB-fw	CCCAGGCGCAATGTCAAT	490.1	89.5	67.1
GZMB-rv	CCCCAACCAGCCACATAGC	406.9	71.7	67.7

Tabla 1. Secuencia y características de los primers de la Granzima B utilizados en RTq-PCR.

Como control endógeno se utilizaron dos primers presentes en laboratorio de SigA, un gen endógeno de expresión constitutiva. Para cada par de primers se preparó una mezcla de reacción con 5μl de master mix, 0,5μl de primers a concentración 5 μM, 1,5μl de muestra y 3μl de agua.

Como control negativo se utilizó un cDNA de micobacterias sin granzima B y como blanco una solución de los primers en ausencia de muestra. Todas las muestras se midieron por triplicado.

3.4. Extracción de proteína y análisis por Western blot

Extracción de proteína intracelular. Cultivos de las cepas de partida de BCG y MTBVAC en medio líquido 7H9 suplementado con dextrosa (sin albúmina) y en medio 7H9 completo (con ADC) llevados a una fase de crecimiento exponencial fueron centrifugados, el pellet fue resuspendido en tampón TE (TRIS, EDTA) y sometido a lisis mecánica con perlas de vidrio mediante Fast-Prep, tras lo cual fue centrifugado y se recogió el sobrenadante obtenido.

Extracción de proteína secretada. Cultivos de las cepas de partida de BCG y MTBVAC en medio líquido 7H9 suplementado con dextrosa (sin albúmina) llevados a una fase de crecimiento exponencial fueron centrifugados y el sobrenadante resultante fue separado y filtrado con filtros de 0.22 µm. Se precipitaron las proteínas mediante incubación con ácido tricloroacético (TCA) al 10%(v/v) durante 1h a 4°C. Tras centrifugación a 4°C durante 30 minutos el pellet resultante fue lavado con acetona fría y posteriormente a otra centrifugación resuspendido en tampón TRIS/HCl 150 mM pH=8,8.

Las concentraciones de proteína de las distintas extracciones fueron cuantificadas utilizando el ensayo de cuantificación de proteínas RC DC (BioRad).

En geles de poliacrilamida del 15% se cargaron 10µg de proteína por pocillo previamente diluidos con tampón de carga 4x (SDS 3% (p/v), 2-mercaptoetanol 15% (v/v), glicerol 30% (v/v) y azul de bromofenol 0,1% (p/v)), y se separaron mediante SDS-PAGE. Como control negativo se utilizaron preparados de proteína intra o extracelular de cepas de MTBVAC o BCG en las que no está clonada la Granzima B. Como control positivo se utilizó una solución de granzima B purificada.

Los geles fueron transferidos mediante electrotransferencia a una membrana PVDF, previamente activada con metanol. La membrana con las proteínas transferidas se bloqueó durante 30 minutos con una solución de leche en polvo al 5% (p/v) con el objetivo de bloquear los sitios de la membrana sin proteína unida para reducir las uniones inespecíficas en los siguientes pasos del ensayo.

La inmunodetección se llevó a cabo utilizando como anticuerpos primarios un antisuero de conejo inmunizado con granzima B (cedido por el Dr. Julián Pardo), anticuerpo anti-GroEL (AbCAM), anti-Ag85B (AbCAM), y anti-Granzima B (Cell Signalling). El anticuerpo primario fue incubado durante una noche en agitación suave a 4°C, seguido de una hora de incubación con el correspondiente anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón unido a peroxidasa (Sigma). Tanto los anticuerpos primarios como secundarios se diluyeron en una solución con leche en polvo al 2,5% (p/v) disuelta en tampón de lavado (Tris/Hcl 100 mM pH 7,5, NaCl 9% (p/v), Tween 80 1 % (v/v)). Tras cada incubación las membranas fueron lavadas repetidamente con

tampón de lavado. El revelado de las mismas se llevó a cabo con un kit de revelado por luminiscencia (GE Healthcare).

Con el objetivo de comprobar la calidad de las extracciones de proteína, uno de los geles de poliacrilamida fue teñido paralelamente con azul de Coomassie. Para ello, el gel se sumergió durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave en una solución de azul de Coomassie 0,25% (p/v) disuelto en una solución de metanol, ácido acético y agua (45%/10%/45%(v/v)). A continuación fue transferido e incubado durante dos horas a temperatura ambiente y en agitación suave con una solución decolorante (metanol, ácido acético y agua (45%/10%/45%(v/v))) y finalmente se lavó con agua en agitación suave durante un día.

3.5. Ensayo enzimático

Con objeto de determinar la actividad enzimática de la granzima B expresada y secretada por las cepas de BCG y MTBVAC recombinantes, se llevó a cabo un ensayo enzimático en el cual se midió la capacidad de los sobrenadantes de cultivos de BCG y MTBVAC de proteolizar un sustrato consistente en una secuencia aminoacídica específica de corte de la granzima B unida a la sonda colorimétrica p-nitroanilida (IEPD-pNA). La actividad enzimática se manifiesta como un aumento de la absorbancia a 405nm debido al corte del sustrato por parte de la granzima B, lo que conlleva la separación de la sonda, emisión y aumento de la lectura de la absorbancia.

El ensayo se llevó a cabo con concentrados de proteína secretada provenientes de cultivos de las cepas de BCG y MTBVAC de partida. Para concentrar los sobrenadantes de estos cultivos manteniendo la conformación nativa de las proteínas se utilizaron tubos de centrifugación Amicon (Millipore), que contienen una membrana con un tamaño de poro que permite el paso de proteínas menores de 10 kDa, de forma que al centrifugarlos, las proteínas menores de este peso molecular se eluyen, y las mayores, entre ellas la granzima B (32 kDa), quedan retenidas en la membrana, concentrándose.

Se utilizó un lisado de células 1.3×10^6 (linfocitos T citotóxicos) como control positivo y buffer de ensayo (NaCl 50mM TRIS/HCl 50mM pH=7.4) como control negativo y se tomaron medidas de absorbancia cada 15 minutos durante 8 horas.

4. RESULTADOS

4.1 Extracción de RNA y análisis por RTq-PCR

Para analizar la transcripción del gen codificante de la Granzima B y cuantificar la síntesis de su RNA en las cepas transformadas, se llevó a cabo la extracción de RNA total en los cultivos de BCG y MTBVAC recombinantes para la posterior caracterización mediante RTq-PCR de los niveles de expresión del gen de la Granzima B.

La concentración de RNA en las muestras resultantes del proceso de extracción descrito (2.3) se cuantificó mediante la medida del máximo de absorbancia a 260nm (Tabla 2).

Cepa	RNA (ng/μl)
BCGa	78
BCGi	202
MTBVACa	850
MTBVACi	653

Tabla 2. Concentraciones de RNA en cada una de las cepas obtenidas a través de la medida del máximo de absorbancia a 260nm en espectrofotómetro NanoDrop.

Para comprobar la ausencia de contaminación por DNA en el RNA resultante de la extracción, se realizó una PCR y las muestras obtenidas se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. La visualización del gel con las muestras de PCR no mostró contaminación en las muestras de MTBVAC mientras que se detectó contaminación positiva de DNA en las dos muestras correspondientes a los cultivos de BCG (datos no mostrados), en las cuales se repitió el tratamiento con DNAasa seguido de una nueva PCR. El gel de agarosa cargado con las muestras de BCG con contaminación inicial resultantes de la segunda PCR no muestra ninguna banda (Fig.2, pocillos 5-8), lo que indica que ésta ha sido eliminada con éxito mediante el segundo tratamiento con DNAasa.

Con el objetivo de comprobar la integridad del RNA extraído se cargaron en un gel de agarosa las muestras de RNA resultantes de las 4 extracciones. En la visualización del gel se observan de forma clara las bandas correspondientes a los rRNA en todas las muestras, lo que indica ausencia de degradación y adecuada integridad del RNA obtenido (Fig.2, pocillos 1-4). La menor intensidad de las bandas de RNA en las muestras de BCG respecto a las de MTBVAC concuerda con la medida de la concentración de RNA obtenido en la extracción, inferior en estas muestras (Tabla 2).

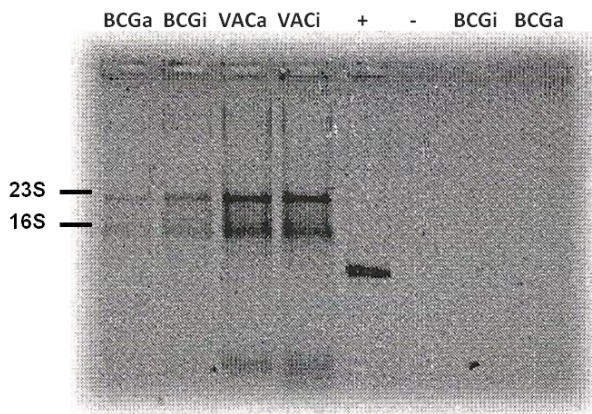


Fig.2. Electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa de las muestras de RNA extraído (pocillos 1-4) y las muestras de PCR correspondientes a BCG (pocillos 5-8).

Las muestras de RNA así obtenidas fueron sometidas a RTq-PCR para identificar el transcrito del gen codificante de la granzima B y cuantificar su nivel de expresión en las cepas de partida, utilizando dos primers diseñados a partir del gen de la granzima B y dos primers del gen SigA como control endógeno. La expresión del gen de interés se manifiesta por la medida del aumento de emisión de fluorescencia en el ciclo en que el DNA comienza a amplificar (C_T), y los resultados se expresan de forma relativa a través del valor RQ como la relación entre la expresión del gen de la granzima B y la del gen endógeno de expresión constitutiva, tomando como referencia BCGi ($RQ=1$).

Los resultados obtenidos evidencian expresión significativa del gen de la granzima B en todas las cepas estudiadas respecto al control negativo, con una tendencia de expresión más elevada en las cepas de MTBVAC (Fig.3).

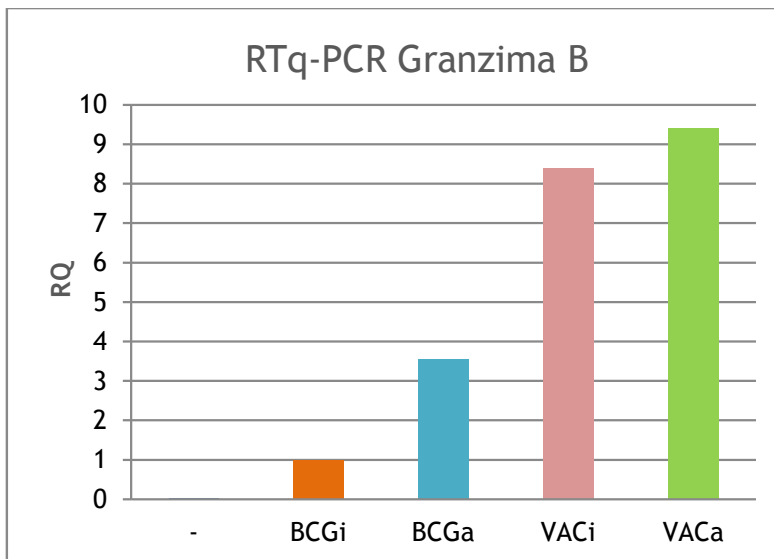


Fig.3. Niveles de la expresión relativa de granzima B en las cepas estudiadas.

4.2 Análisis de la expresión y secreción proteica por Western blot

Para caracterizar la expresión de la proteína recombinante en las cepas transformadas, se llevaron a cabo extracciones de proteína intracelular de los cultivos de BCG y MTBVAC de partida para su posterior análisis por Western blot, así como extracciones de proteína extracelular con el objetivo de elucidar en qué medida la granzima B es o no secretada. Puesto que el medio de cultivo normal de micobacterias contiene altas concentraciones de albúmina, las extracciones se llevaron a cabo en un medio específico en ausencia de ésta, de modo que su presencia no interfiera en la detección de las proteínas de interés.

La concentración de proteína total en las muestras resultantes de las extracciones proteicas realizadas fue determinada mediante un ensayo de cuantificación de proteínas y se muestra en la Tabla 3.

Extracción		Muestra	Concentración proteica ($\mu\text{g/ml}$)
1	Proteína intracelular en medio 7H9 sin albúmina	BCGi	1559,9
		BCGa	830,7
		MTBVACi	1130,2
		MTBVACa	1820,3
	Proteína secretada en medio 7H9 sin albúmina	BCGi	804,7
		BCGa	1195,3
		MTBVACi	622,4
		MTBVACa	1416,6
2	Proteína secretada en medio 7H9 sin albúmina	BCGi	1096,7
		BCGa	1596,7
		MTBVACi	854,1
		MTBVACa	1596,7

Tabla 3. Concentraciones proteicas medidas en las muestras resultantes de los procesos de extracción en medio sin albúmina mediante el ensayo de cuantificación de proteínas RC DC (BioRad).

Para comprobar la calidad de las extracciones, las muestras de proteína intracelular y secretada (extracción 1) se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida que fue teñido con azul de Coomassie. El gel con las muestras de los lisados correspondientes a MTBVAC (Fig.4) y BCG (no mostrado) muestra un patrón de bandas similar para todas las muestras y aproximadamente acorde a las concentraciones obtenidas en la cuantificación proteica de las mismas (Tabla 3). La ausencia de una banda enriquecida en torno a 65 kDa sugiere que no hay una cantidad significativa de albúmina en el cultivo. Además, el patrón claro de proteínas observado indica el resultado de un buen procedimiento de extracción al no existir degradación masiva de las muestras.

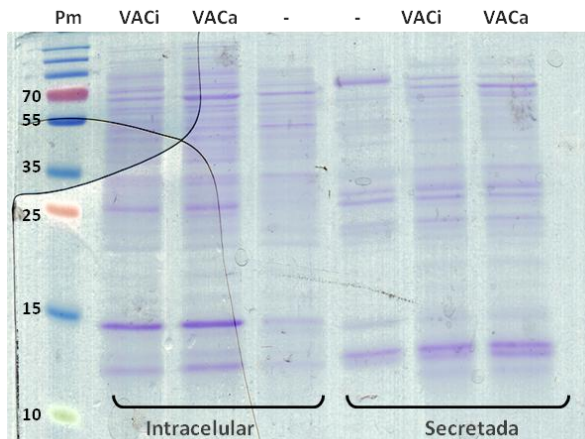


Fig.4. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie cargado con muestras de proteína intracelular y secretada de MTBVAC (extracción 1).

Para detectar la presencia de granzima B, las muestras proteicas fueron separadas en geles de poliacrilamida y sometidas a Western blot.

El análisis por Western blot utilizando un antisuero no comercial de conejo inmunizado con granzima B como anticuerpo primario dio como resultado una gran cantidad de uniones inespecíficas, observadas también en los controles negativos, que enmascaran la posición donde debería aparecer la banda correspondiente a la Granzima B. Ésta se observa débilmente en el carril correspondiente al control positivo (Fig.5).

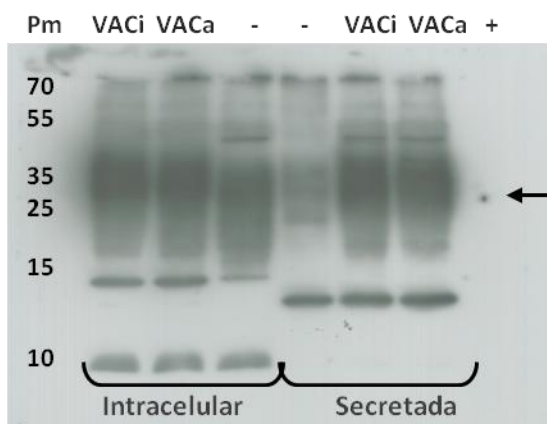


Fig.5. Análisis por Western blot de muestras de proteína intracelular y secretada (extracción 1) utilizando antisuero de conejo como anticuerpo primario. Se indica con flecha la posición correspondiente a la Granzima B.

Ante este resultado se sustituyó el antisuero de conejo por un anticuerpo policlonal comercial anti-Granzima B como anticuerpo primario para el análisis por Western blot. La sustitución del antisuero dio como resultado la disminución en gran medida de las uniones inespecíficas previamente observadas (Fig.6).

El Western blot de las muestras de proteína intracelular (extracción 1) muestra una banda débil en torno a 30KDa en las cuatro muestras, más intensa en el caso de MTBVAC con Granzima B activa, que podría corresponder con la posición de la Granzima B, además de otra banda entre 10 y 15KDa, ambas ausentes en el control negativo. En este caso no se puede diferenciar con exactitud la posición correspondiente a la granzima B en el carril del control positivo debido a una carga excesiva de muestra (Fig.6A).

En el caso del análisis de las muestras de proteína secretada correspondientes a dos extracciones consecutivas (extracción 1 y 2) se observan menos uniones inespecíficas y aparece una banda situada entre 10 y 15KDa que parece coincidir con la observada a la misma altura en las muestras intracelulares, y que no aparece en el control negativo. Sin embargo, en este caso no hay ninguna banda apreciable en la posición correspondiente al peso molecular de la granzima B (Fig.6B).

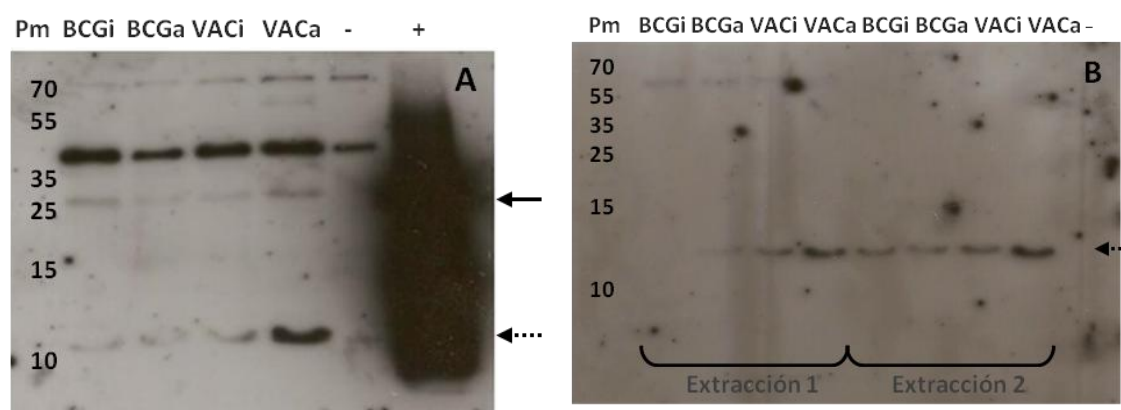


Fig.6. Análisis por Western blot de muestras de proteína intracelular y secretada procedentes de extracciones de cultivos en medio 7H9 sin albúmina utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo comercial anti-granzima B.

(A) Western blot de muestras de lisados intracelulares (extracción 1).

(B) Western blot de muestras de proteína secretada correspondientes a dos extracciones proteicas (extracción 1 y 2).

Se indica con flecha continua la posición correspondiente a la granzima B y con flecha discontinua la correspondiente a la banda adicional observada.

Como control del proceso y calidad de las extracciones estas membranas se incubaron con anticuerpos para la detección inmune de GroEL, una proteína intracelular y Ag85B, proteína secretada. Para comprobar la presencia de estas proteínas en las membranas previamente utilizadas para detectar la granzima B, éstas se sometieron a un procedimiento de stripping. Para ello, se incubaron en una solución específica (Millipore) que elimina los anticuerpos unidos a la membrana, permitiendo reincubarlas con nuevos anticuerpos primarios.

En el caso de las muestras de proteína intracelular (Fig.7A) GroEL fue detectada en todas ellas en torno a 60KDa, lo que indica que la ausencia de las bandas que podrían corresponder a la granzima B en el control negativo del Western blot (Fig.6A), no se debe a una mala calidad del mismo. En cuanto al análisis de proteína secretada (Fig.7B), GroEL fue detectado en tres de las muestras procedentes de la primera extracción (BCGi, VACi y VACa). Al tratarse de una proteína intracelular, esta no debería detectarse en las muestras de proteína secretada, por lo que su presencia en ellas indica contaminación intracelular, que puede haberse producido durante el desarrollo

del proceso de extracción. Sin embargo, la detección de GroEL resultó negativa en todas las muestras de la extracción 2.

Por otra parte, el Ag85B se ha detectado en todas las muestras de las dos extracciones de proteína secretada, incluyendo el control negativo, indicando nuevamente que la ausencia de las bandas que podrían corresponder a la granzima B en el control negativo del Western blot (Fig.6B), no se debe a una mala calidad del mismo.

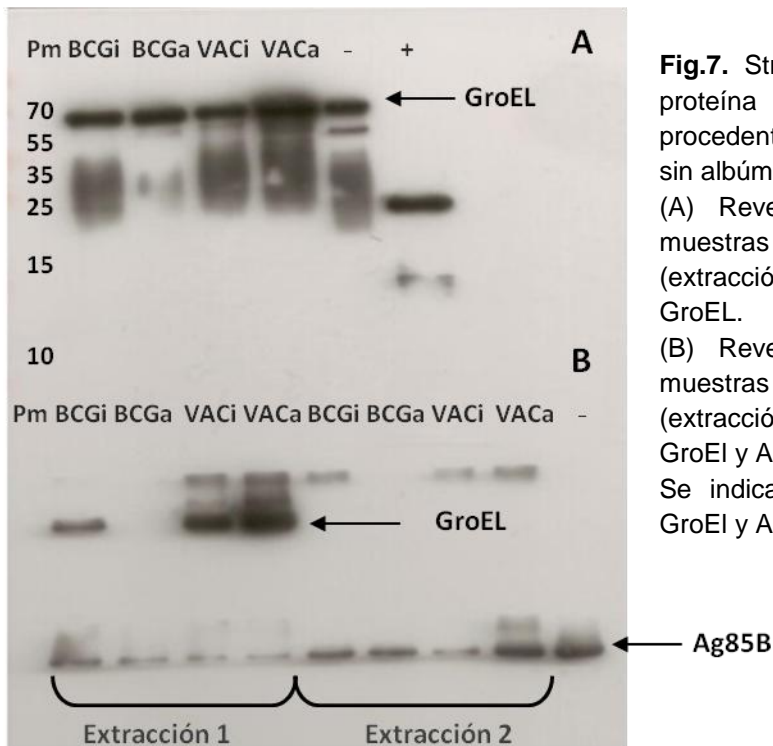


Fig.7. Stripping de las membranas de proteína intracelular y secretada procedentes de cultivos en medio 7H9 sin albúmina (Fig.6.A y 6.B).

(A) Revelado de la membrana con muestras de proteína intracelular (extracción 1) y detección inmune de GroEL.

(B) Revelado de la membrana con muestras de proteína secretada (extracción 1 y 2) y detección inmune de GroEL y Ag85B.

Se indica con flechas la posición de GroEL y Ag85B.

El resultado del Western blot con la presencia de una banda específica entre 10 y 15 KDa en ambas muestras de proteína intracelular y secretada y la ausencia de la banda correspondiente a la granzima B en el caso de la proteína extracelular (Fig.6), llevan a la hipótesis de la existencia de un posible corte proteolítico de la proteína por parte de la maquinaria enzimática de la bacteria, que explicaría la detección de una banda específica a un peso molecular menor y la ausencia de banda en torno a 30KDa en las extracciones de proteína extracelular, donde la granzima B podría estar cortada.

Una de las hipótesis propuestas como explicación a este planteamiento reside en el medio de cultivo mínimo (7H9 sin albúmina) utilizado para el crecimiento de las bacterias en las que se llevaron a cabo las extracciones. Al utilizar un medio con baja cantidad de proteína sería posible que las bacterias se encontrasen en una situación de escasez de aminoácidos necesarios para su crecimiento normal. Como consecuencia podrían utilizar para su desarrollo

otras proteínas como fuentes de aminoácidos, entre las cuales podría encontrarse la granzima B recombinante.

En base a esta hipótesis se planteó el estudio de la expresión de granzima B en cultivos de BCG y MTBVAC en medio completo con objeto de evitar una posible situación de escasez de aminoácidos. Para ello, se lanzaron cultivos de todas las cepas de partida en medio TH9 completo (con ADC). En el caso de las extracciones de proteína intracelular, las bacterias se lavaron varias veces con PBS para tratar de eliminar la albúmina residual que pudiera quedar presente. Para eliminar la albúmina de la fracción secretada, los sobrenadantes se filtraron con un sistema de tubos de centrifuga Amicon con una membrana de un tamaño de poro que permite el paso de proteínas menores de 50 kDa, de modo que la albúmina (67kDa) quedaría en la parte no filtrada y la granzima B (32 kDa) en la fracción eluída. A continuación se concentró el filtrado por precipitación con ácido tricloroacético siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos (3.4).

Las concentraciones de proteína obtenidas como resultado de las extracciones en medio completo se especifican en la tabla 4.

Extracción		Muestra	Concentración proteica ($\mu\text{g/ml}$)
3	Proteína intracelular en medio 7H9 completo	BCGi	434,8
		BCGa	568,2
		MTBVACi	932,8
		MTBVACa	797,4
4	Proteína secretada en medio 7H9 completo	BCGi	1428,6
		BCGa	2439
		MTBVACi	3333,3
		MTBVACa	3333,3

Tabla 4. Concentraciones proteicas medidas en las muestras resultantes de los procesos de extracción en medio completo mediante el ensayo de cuantificación de proteínas RC DC (BioRad).

El western blot de las muestras de proteína intracelular procedentes de cultivos en medio completo (extracción 3) se realizó utilizando un anticuerpo anti-GroEL y anti-Granzima B como anticuerpos primarios y dio como resultado la detección positiva de GroEL en todas las muestras y ninguna banda observable en la posición correspondiente a la Granzima B. Sin embargo, se detectó nuevamente una banda entre 10 y 15 KDa coincidente con la observada en los revelados anteriores (Fig.8). En este caso dicha banda aparece también en el carril del control negativo y las bandas inespecíficas se han extendido a otros carriles en los que originalmente no se cargó muestra, lo que puede deberse a un probable paso de muestra de un pocillo a otro durante la carga (Fig.8A).

Ante este resultado, se repitió el análisis por Western blot de las mismas muestras con un pocillo de espacio sin muestra entre los controles positivo y negativo (Fig.8B). En este caso la presencia de GroEL se detectó nuevamente en todas las muestras, incluyendo el control negativo, mientras que la banda previamente detectada entre 10 y 15 kDa se observó en todas las muestras excluyendo al control negativo, tratándose por tanto de una banda específica de las cepas que expresan granzima B. Por el contrario, no es observable ninguna banda en la posición correspondiente al peso molecular de la granzima B.

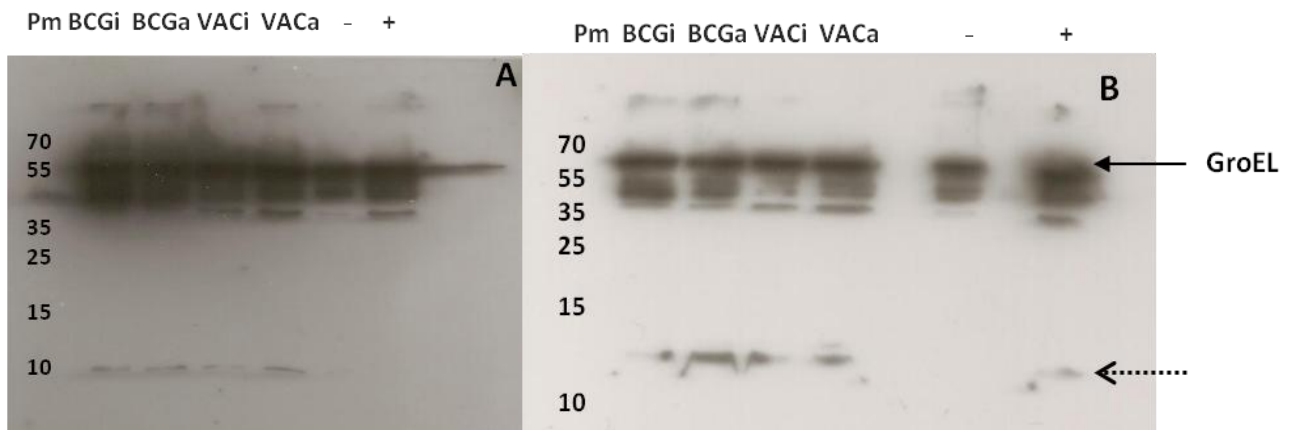


Fig.8. Análisis por Western blot de muestras de proteína intracelular procedentes de extracciones de cultivos en medio completo (extracción 3) y detección de GroEL y Granzima B. Control positivo: lisado intracelular de MTBVAC con Granzima B (extracción 1)
 (A) Western blot de muestras de proteína intracelular con paso de muestra entre pocillos
 (B) Western blot de muestras de proteína intracelular. Se indica con flecha continua la posición correspondiente a GroEL y con flecha discontinúa la posición correspondiente a la banda específica observada.

Por otro lado, el análisis de las muestras de proteína secretada procedentes de cultivos en medio completo (extracción 4) no mostró ninguna banda específica clara entre 10-15 kDa ni en el peso molecular de la granzima B (Fig.9). Dada la mala calidad del ensayo, no es posible determinar la causa de este resultado de forma precisa.

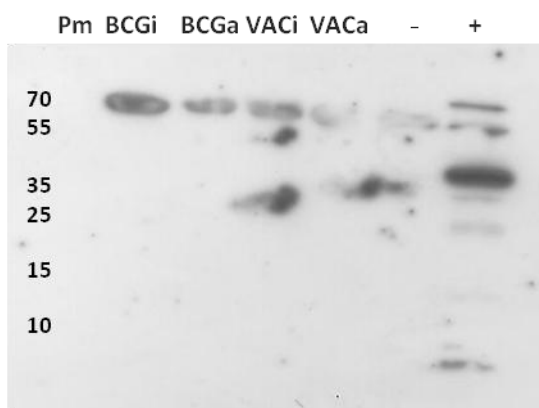


Fig.9. Análisis por Western blot de muestras de proteína secretada procedentes de extracciones de cultivos en medio completo (extracción 4). Control positivo: muestra de proteína extracelular de BCG con Granzima B (extracción 2).

4.3 Análisis de la actividad de la granzima B secretada

A pesar de la hipótesis sugerida por los resultados del análisis por Western blot de un probable corte proteolítico de la granzima B recombinante, se llevó a cabo un ensayo enzimático con el objetivo de determinar la actividad de la granzima B o de su fragmento secretado, que podría mantener intacto el centro activo de la proteína conservando actividad catalítica. Para ello, se utilizaron concentrados de proteína secretada nativa procedente de los sobrenadantes de cultivos de las cepas BCG y MTBVAC de partida, cuyas concentraciones se determinaron mediante un ensayo de cuantificación de proteínas (Tabla 5).

Extracción		Muestra	Concentración proteica ($\mu\text{g/ml}$)
5	Proteína secretada nativa en medio 7H9 sin albúmina	BCGi	758,1
		BCGa	1290,3
		MTBVACi	516,1
		MTBVACa	435,5

Tabla 5. Concentraciones proteicas medidas en las muestras de proteína nativa secretada mediante el ensayo de cuantificación de proteínas RC DC (BioRad).

La actividad de la granzima B en estas muestras se determinó como un aumento en la lectura de la absorbancia a 405nm como consecuencia del corte por parte de la granzima B de un sustrato específico (IEPD) unido a la sonda colorimétrica p-nitroanilida (pNA), lo que conlleva la separación de la misma.

La representación de las medidas de absorbancia en el tiempo del ensayo (Fig.10) muestra un aumento en el control positivo, que alcanza un máximo alrededor de las 5 horas de ensayo. Sin embargo, en ninguna de las muestras se produce un aumento significativo de absorbancia, que se mantiene en valores cercanos a los medidos para el control negativo y con escasas diferencias entre las cepas que expresan la forma activa e inactiva de la proteína, indicando aparentemente la ausencia de actividad enzimática significativa.

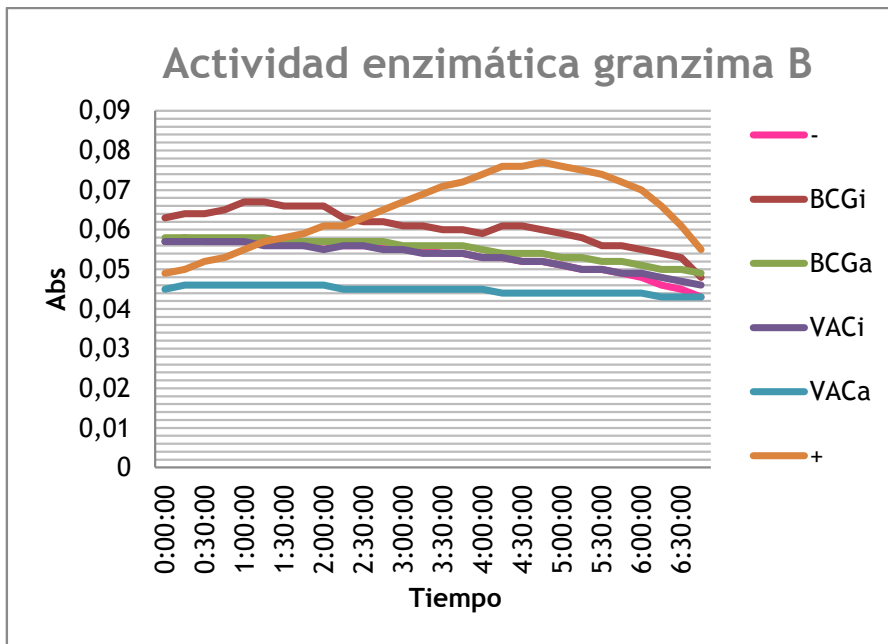


Fig. 10. Representación de la lectura de la absorbancia de cada muestra frente al tiempo del ensayo enzimático. Se tomaron medidas de absorbancia cada 15 minutos durante 8 horas.

5. DISCUSIÓN

Los resultados de la RTq-PCR confirman la presencia del RNA de la granzima B en el total del RNA extraído en todas las cepas transformadas, tanto en BCG como en MTBVAC, por tanto las bacterias recombinantes transcriben correctamente el gen codificante de la granzima B. Además, este gen se expresa de forma significativa respecto al control endógeno en todas las cepas, con mayores niveles de expresión en MTBVAC.

La detección de la proteína mediante Western blot no proporciona resultados concluyentes respecto a la correcta expresión y secreción al medio extracelular de la granzima B recombinante completa. Si bien en el caso del análisis de proteína intracelular se da una posible detección de la granzima B en torno a 30KDa (Fig.6A), ésta no ha sido detectada en proteína secretada.

Por otra parte, la presencia repetida de forma específica en las muestras intracelulares y secretadas de una banda situada entre 10 y 15KDa sugiere que la proteína pueda sufrir una vez sintetizada un corte proteolítico por parte de las bacterias recombinantes, lo que explicaría la ausencia de banda en la posición de la granzima B en las muestras extracelulares y la observación de una banda a un peso molecular menor, que correspondería a un fragmento de la granzima B cortada. Ante esta posibilidad, la hipótesis planteada referente al medio de cultivo mínimo en que las bacterias han sido cultivadas y que les podría llevar a la utilización de la proteína recombinante como fuente de aminoácidos, no puede probarse con los resultados obtenidos en los análisis llevados a cabo con cultivos en medio completo. El análisis por Western blot de los extractos proteicos obtenidos de cultivos en medio completo continúan mostrando la presencia específica de una banda entre 10 y 15KDa ausente en el control negativo en todas las muestras de proteína intracelular, mientras que no se ha detectado señal en torno al peso molecular de la Granzima B en ninguna de las muestras estudiadas. Estos resultados sostienen la hipótesis de un posible corte de la proteína expresada por las bacterias recombinantes, que daría lugar a su detección a un peso molecular menor al de la proteína completa y que, de acuerdo a los resultados observados, sería independiente del medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las bacterias.

Por otra parte, la determinación de la actividad de la granzima B medida en extractos de proteína secretada nativa mediante ensayo enzimático indica que la granzima B o el fragmento de ella secretado por las cepas de BCG y MTBVAC, no presenta actividad enzimática significativa al no observarse aumento de absorbancia apreciable en ninguna de las muestras estudiadas, ni diferencia entre las correspondientes a Granzima B activa e inactiva, en cuya actividad cabría esperar cambios. Este resultado puede deberse bien a que el fragmento resultante del posible corte proteolítico sea no funcional y por tanto no presente actividad catalítica, o bien a que su actividad no sea detectada con la sensibilidad del ensayo llevado a cabo, dado el escaso aumento de absorbancia observado en el control positivo.

6. CONCLUSIONES

La información proporcionada por los resultados obtenidos en los estudios llevados a cabo ha llevado a plantear las siguientes conclusiones:

El gen de la granzima B se transcribe y su RNA se sintetiza en cantidad significativa en todas las cepas transformadas. El análisis mediante RTq-PCR revela la correcta expresión en todas las cepas de BCG y MTBVAC del gen de la granzima B clonado, tanto en su forma activa como inactiva, siendo los niveles de RNA presentes significativos en todas ellas.

La granzima B es expresada y secretada por las bacterias en forma proteolizada. El análisis por Western blot de proteína intracelular y secretada de los cultivos de BCG y MTBVAC en medio 7H9 sin albúmina indica un posible corte de la granzima B sintetizada por parte de las bacterias recombinantes, que llevaría a la secreción al medio de un fragmento de peso molecular menor detectado de forma específica mediante Western blot.

El corte proteolítico de la granzima B es independiente del medio de cultivo. El análisis por Western blot de proteína intracelular y secretada de cultivos de BCG y MTBVAC en medio 7H9 completo indica que el corte proteolítico se produciría de forma independiente del medio de cultivo con o sin albúmina en que las bacterias se desarrollan, al detectarse igualmente la presencia de un fragmento específico de peso molecular menor en las extracciones de cultivos en medio completo.

La granzima B secretada no presenta actividad significativa según el test de actividad usado en este trabajo. El análisis de la actividad de proteína nativa secretada de los cultivos de las cepas recombinantes no muestra actividad enzimática significativa en ninguna de ellas. La ausencia de actividad enzimática, aunque podría estar influenciada por la baja sensibilidad del ensayo, puede deberse a la pérdida de función de la proteína como consecuencia del corte proteolítico que daría lugar a la secreción de un fragmento menor y no funcional.

CONCLUSIONS

The information provided by the results of the studies carried out leads to the following conclusions:

Granzyme B gene is transcribed and its RNA is synthesized in significant quantity in all the transformed strains. RTq-PCR analysis reveals the correct expression of the granzyme B gene cloned in all BCG and MTBVAC strains in both active and inactive form, with significant RNA levels in all of them.

Granzyme B is expressed and secreted by the bacteria in a proteolyzed form. Western blot analysis of intracellular and secreted protein from BCG and MTBVAC cultures in 7H9 medium without albumin, indicates a possible cleavage of granzyme B synthesized by recombinant bacteria, leading to the secretion into the medium of a lower molecular weight fragment specifically detected by Western blot.

Proteolytic granzyme B cleavage is independent of the culture medium. Western blot analysis of intracellular and secreted protein from BCG and MTBVAC cultures in complete TH9 medium, indicates that proteolytic cleavage would occur independently of the culture medium in which bacteria grow, with or without albumin, evidenced by the presence of a specific fragment of lower molecular weight in extractions of cultures in complete medium.

Secreted granzyme B has no significant activity according to the activity test used in this work. Activity analysis of the secreted native protein from recombinant strains cultures shows no significant enzymatic activity in any of them. The lack of enzymatic activity, even though it may be influenced by the low sensitivity of the assay, may be due to a protein loss of function as a result of proteolytic cleavage, that would result in the secretion of a smaller and non functional fragment.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] WHO. Module 5: Tuberculosis. The immunological basis for immunization series. World Health Organization; 2011.
- [2] Arbues A, Aguilo JI, Gonzalo-Asensio J, Marinova D, Uranga S, et al. *Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated M. tuberculosis-based vaccine to enter clinical trials*. Vaccine 2013; 31: 4867-4873.
- [3] Redelman-Sidi G, S. Glickman M, H. Bochner B. *The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer-a current perspective*. Nature Reviews Urology 4 february 2014; 11: 153-162.
- [4] Stover C.K, de la Cruz V.F, Fruest T.R, Burlein J.E, Benson L.A, et al. *New use of BCG for recombinant vaccines*. Nature 6 june 1991; 351: 456-460.
- [5] O'Donnell MA¹, Aldovini A, Duda RB, Yang H, Szilvasi A, et al. *Recombinant Mycobacterium bovis BCG secreting functional interleukin-2 enhances gamma interferon production by splenocytes*. Infection and Immunity June 1994; 62(6): 2508–2514.
- [6] Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Yamada T. *Cloning and Expression of the Mycobacterium bovis BCG Gene for Extracellular α Antigen*. Journal of Bacteriology Sept 1988; 170 (9): 3847-3854.
- [7] Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, Müllbacher A, et al. *Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis*. Journal Cell Biology 8 Nov 2004; 167(3): 457-468.
- [8] Pham CT, Ley TJ. *Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 20 Jul 1999; 96(15): 8627-32.