



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**LIBERACIÓN DE UN PLÁSMIDO QUE CODIFICA PARA UN  
PÉPTIDO ANTAGÓNICO A LA ACTIVIDAD DE LAS  
PROTEÍNAS ANTI-APOPTÓTICAS DE LA FAMILIA DE BCL-  
2 A TRAVÉS DE *SALMONELLA ENTERICA SEROVAR  
TYPHIMURIUM* EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**RICARDO DÍAZ DE LEÓN ORTEGA**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ  
**VOCAL:** Profesor: MÓNICA BERENICE HERAS CHAVARRÍA  
**SECRETARIO:** Profesor: MARCO ANTONIO HERNÁNDEZ LUNA  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: GONZALO CASTILLO ROJAS  
**2º SUPLENTE:** Profesor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS DEL HOSPITAL INFANTIL  
DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**ASESOR DEL TEMA:**

**M EN C. MARCO ANTONIO HERNÁNDEZ LUNA**

---

**SUSTENTANTE:**

**RICARDO DÍAZ DE LEÓN ORTEGA**

---

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación de Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Este trabajo recibió financiamiento mediante los proyectos CONACYT-2008-CO1-88004 y HIM/2009/008 Ssa. 829 de Fondos Federales. Ambos aprobados por el comité de investigación local del Hospital Infantil de México Federico Gómez bajo los números de proyectos HIM/2009/025 y HIM/2009/008 respectivamente.

Se reconoce a los programas de becas PRONABES y PROBEI, por el apoyo financiero otorgado a RDO para la elaboración de este trabajo.



Se agradece a la Dra. Alejandra Contreras del departamento de Biología del Desarrollo por su colaboración con la microscopia confocal.

## **Abreviaturas principales**

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
h	hora
IAP's	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
min	Minuto
MOI	Multiplicidad de infección
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
RPM	Revoluciones por minuto
SOC	Caldo Súper Óptimo
TAE	Tris – acetato-EDTA

## Índice

1. Resumen	1
2. Antecedentes	3
2.1 Cáncer	3
2.2 Estadísticas	4
2.3 Terapia antitumoral	6
2.4 Resistencia al tratamiento por quimioterapia	8
2.5 La alteración en la apoptosis en la resistencia a la quimioterapia	9
2.5.1 Principales vías de inducción de apoptosis	10
2.6 La familia de Bcl-2	11
2.6.1 Activación de las proteínas de la familia de Bcl-2	11
2.7. Participación de la familia de proteínas de Bcl-2 en cáncer	13
2.8. Apoptosis inducida por péptidos antagónicos a la actividad de la familia Bcl-2	14
2.9 Vectores bacterianos como vehículos para agentes antitumorales	16
2.10. <i>Salmonella enterica</i> y su selectividad por tejido tumoral	18
2.11. <i>Salmonella enterica</i> en la terapia antitumoral	19
2.12. Transferencia de material genético realizado por <i>Salmonella enterica</i>	21
3. Planteamiento del problema	23
4. Hipótesis	24
5. Objetivo	25
5.1 General	25
5.2 Específicos	25
6. Materiales y métodos	26
6.1 Cepas bacterianas	26
6.2 Oligonucleótidos	26
6.3 Plásmidos	27
6.4 Líneas celulares	28
6.5 Enzimas empleadas para ingeniería genética	28

6.6 Técnicas de ingeniería genética	29
6.6.1 Acoplamientos	29
6.6.2 Construcción de plásmidos	30
6.6.3 Transformación de bacterias <i>Escherichia coli</i> DH5α competentes mediante choque térmico	31
6.6.4 Selección de clonas BaxGFP y BaxεGFP	31
6.6.5 Análisis de clonas positivas	33
6.6.6. Purificación del plásmido por columna para ensayos de transfección	33
6.6.7. Ensayos de transfección	33
6.6.8. Expresión de las proteínas recombinantes BaxGFP y BaxεGFP	34
6.7. Ensayos de apoptosis por TUNEL	35
6.8. Transformación de bacterias por electroporación	36
6.9. Infección de las células THP-1 y PC3 con <i>Salmonella enterica</i> SL3261	37
6.10 Expresión de las proteínas EGFP y BaxGFP después de la infección con <i>Salmonella enterica</i> SL3261	38
6.11 Análisis estadístico	39
7. Resultados	40
7.1 Construcción de los plásmidos	40
7.2 Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes	44
7.3 Evaluación de la funcionalidad de las proteínas recombinantes	46
7.4 Infección en células tumorales con <i>Salmonella enterica</i> que acarrea los plásmidos pEGFP-N1 o BaxGFP	48
8. Discusión de resultados	51
9. Conclusiones	57
10. Referencias	58



## 1. Resumen

Uno de los mecanismos implicados en la resistencia a la quimioterapia es la sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2. Bloquear su actividad puede resultar en la sensibilización de la célula tumoral a morir por apoptosis. Se han empleado péptidos sintéticos de la región BH3 de las proteínas pro-apoptóticas para este fin. Aunque esta estrategia ha resultado exitosa, se requieren altas concentraciones de péptido para asegurar el efecto deseado. Además, hace falta una herramienta que nos permita llevar estos péptidos al tejido tumoral *in vivo*. Para resolver este problema, nuestro objetivo fue diseñar un sistema para expresar el péptido BH3 de Bax (fusionado a la proteína reportera EGFP) mediante un plásmido, éste será transportado al tumor por *Salmonella enterica*; ya que se ha reportado que tiene una alta afinidad por el tejido tumoral así como la capacidad de transferir material genético a una célula eucariota.

Nuestros resultados muestran que la proteína BaxGFP es capaz de colocalizar con la mitocondria e inducir apoptosis en células PC3.

Por último, se mostró la capacidad de *Salmonella enterica* de liberar el plásmido que codifica para el péptido antagónico en células tumorales.

Con estos resultados, mostramos que ahora contamos con un sistema de liberación de plásmidos que codifican para una proteína recombinante, que contiene el péptido antagónico a la actividad de las proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2, en células tumorales.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Cáncer.**

La Organización Mundial de la Salud define el cáncer como un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células y que puede aparecer prácticamente en cualquier parte del cuerpo. Se origina a partir de la transformación de una sola célula en maligna y se caracteriza por la rapidez con la que ésta se replica. Una vez que las células han formado el tejido tumoral, éstas también tienen la capacidad de invadir los tejidos circundantes y extenderse a otros órganos del cuerpo. Este último proceso se conoce como metástasis.

Tumores malignos y neoplasias son otros términos empleados para nombrar el cáncer [1].

La transformación de la célula en maligna es un proceso que consiste en múltiples etapas, el cual es el resultado de la interacción entre la genética del individuo y tres categorías de factores externos:

- a) carcinógenos físicos como la luz UV y la radiación ionizante;
- b) carcinógenos químicos como los asbestos, los componentes del humo del tabaco, arsénico, etc.;
- c) carcinógenos biológicos como infecciones por algunos virus, bacterias o parásitos [1].

## 2.2 Estadísticas

A nivel mundial el cáncer es la primer causa de muerte y se le atribuye, aproximadamente, el 13% de las defunciones ocurridas en 2008 [2]. Entre las neoplasias de mayor incidencia se encuentran el cáncer de mama en las mujeres y el cáncer de próstata en los hombres, como se muestra en la figura 1.

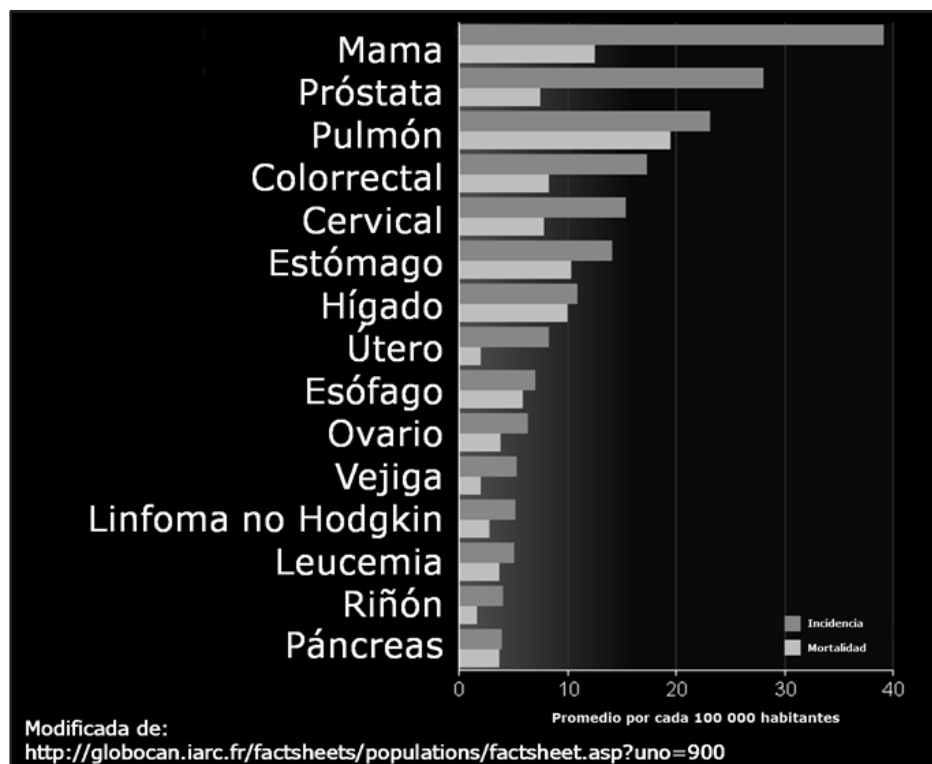
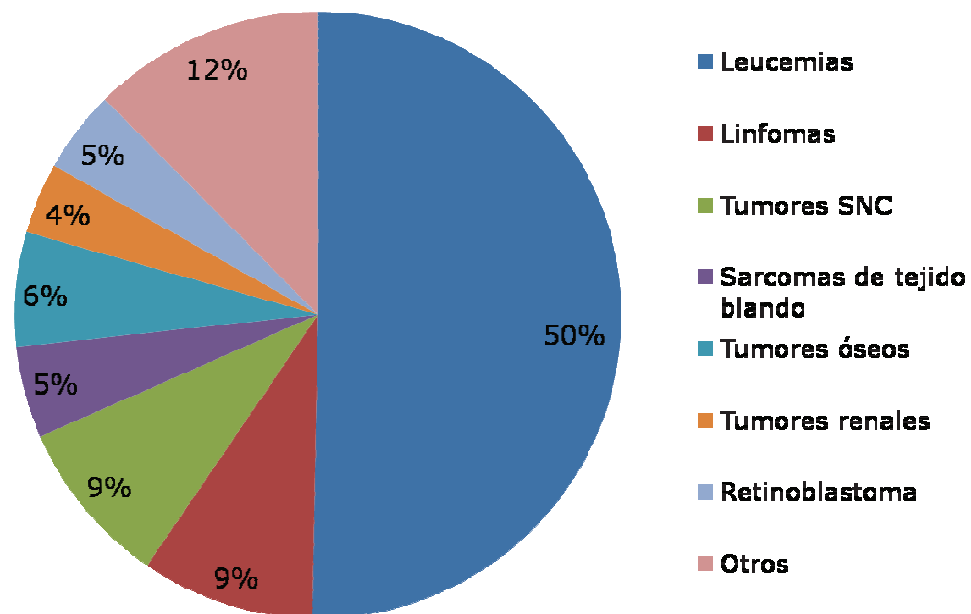


Figura 1. Estadísticas mundiales sobre incidencia y mortalidad del cáncer para el año 2008.

En México, el cáncer es la tercer causa de muerte en adultos. En la población masculina el cáncer más frecuente es la leucemia; en la femenina, el de mama [3].

En la población infantil de México, el cáncer es la segunda causa de mortalidad en el grupo de edad de 5 a 14 años, y la quinta en los niños de 1 a 4 años. La edad de mayor incidencia de cáncer se encuentra en la primera década de la vida y lo padecen en su mayoría los varones [4]. En la figura 2 se indican las neoplasias de mayor incidencia en la población infantil.



**MODIFICADO DE:** [http://censia.salud.gob.mx/opencms/opencms/contenidos/cancer/descargas/principales\\_tipos\\_cancer\\_2007\\_2008.pdf](http://censia.salud.gob.mx/opencms/opencms/contenidos/cancer/descargas/principales_tipos_cancer_2007_2008.pdf)  
Figura 2. Tipos de cáncer diagnosticados en la población infantil. Información obtenida de Unidades Médicas Acreditadas de la Secretaría de Salud para la atención de niños y adolescentes con cáncer en 2007 y 2008.

### **2.3. Terapia antitumoral**

El objetivo de la terapia contra el cáncer es eliminar todas las células tumorales causando el mínimo de daño en el tejido normal. El tratamiento de elección se basa de en las características moleculares específicas del tumor, su localización, el estadio del cáncer y el estado de salud del paciente (si cuenta con enfermedades concomitantes) [5].

Existen diversos tratamientos en contra del cáncer y son los siguientes:

- **La cirugía.** Es el método más empleado para aquellos tumores delimitados. La elección de la cirugía como tratamiento depende del tamaño, lugar y etapa de desarrollo de la enfermedad. Para que la cirugía sea completamente eficaz, es preciso extirpar parte del tejido que rodea el tumor para así asegurar que todas las células tumorales hayan sido removidas. Si el cáncer se ha extendido a otras zonas, habrá que realizar otros tratamientos adicionales a la cirugía, como la quimioterapia [6].

- **La quimioterapia.** Es el uso de fármacos que, preferencial pero no exclusivamente, dañan a las células que se replican rápidamente, por lo cual actúan bloqueando el ciclo celular [5].

Los agentes quimioterapéuticos pueden dividirse en 3 grupos de acuerdo a su mecanismo de acción: antimetabolitos, agentes genotóxicos y los inhibidores del huso mitótico [7].

*Antimetabolitos.* En este grupo se encuentran los antagonistas de folatos y los de purinas y pirimidinas.

Los antagonistas de folatos inhiben la dihidrofolato reductasa. El tetrahidrofolato proporciona grupos metilo para la síntesis de purinas. El tetrahidrofolato es formado a partir del dihidrofolato por la acción de la dihidrofolato reductasa.

Los antagonistas de purinas y pirimidinas bloquean la síntesis de estos nucleótidos o se pueden insertar en el DNA recién sintetizado. Ejemplos: metrotexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, 5-fluorouracilo, gemcitabina [6].

*Agentes genotóxicos.* Estos fármacos pueden unirse directamente al DNA, lo que afecta su replicación, o bien, inhiben enzimas que participan en su proceso de síntesis [6].

Los agentes genotóxicos pueden subdividirse en 3 grupos:

- Los agentes alquilantes que modifican las bases de DNA; interfiriendo con la replicación y transcripción. Ejemplos: cisplatino, ciclofosfamida, clorambucilo.
- Los agentes intercalantes se unen en los surcos del DNA, evitando la actividad de las DNA polimerasas. Ejemplos: epirubicina, doxorubicina.
- Los inhibidores enzimáticos bloquean la actividad de la topoisomerasa. Ejemplos: etopósido, topotecan [6].

*Inhibidores del huso mitótico.* La división celular puede ser atacada directamente con fármacos que inhiben la polimerización de los monómeros de tubulina, lo que evita el alineamiento de los cromosomas. Ejemplos: paclitaxel, docetaxel [6].

- **La radioterapia.** También llamada terapia con rayos X o irradiación, es el uso de radiación ionizante para destruir las células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. La radioterapia lesiona las células tumorales al dañar su material genético y hacer imposible que se repliquen. Por lo general, se usa en tratamiento concomitante con la cirugía [8].

#### **2.4. Resistencia al tratamiento por quimioterapia**

Aunque la quimioterapia es un método eficaz para el tratamiento del cáncer, algunas veces no es completamente efectiva. El desarrollo de resistencia es uno de los principales obstáculos durante su uso [9].

Esta resistencia puede deberse a distintos mecanismos, tales como:

a) Reducción de la acumulación de fármacos dentro de la célula por la activación de proteínas transmembranales de expulsión. Ejemplo de estas proteínas es la glicoproteína P (gp-170), una proteína fosforilada y glicosilada de 170kD y 1280 aminoácidos, codificada por el gen *mdr1*. La glicoproteína P puede translocar una gran variedad de compuestos, en especial moléculas con características hidrofóbicas. Se ha reportado



que los tumores donde la gp-170 se encuentra sobre-expresada, muestran resistencia a fármacos como la doxorrubicina, la vinblastina, el paclitaxel y el etopósido [6].

b) Destoxificación celular mediante el sistema de la glutatión transferasa (GST). La GST cataliza la reacción entre el glutatión y los fármacos, lo cual resulta en un conjugado del fármaco con el glutatión. Este conjugado es menos activo y más polar (aumenta su solubilidad en agua), por lo tanto es fácilmente expulsado de la célula. Se han reportado niveles altos de glutatión en células tumorales resistentes a agentes alquilantes como ciclofosfamida y clorambucilo [9].

c) Desregulación de los genes que codifican las proteínas que controlan la apoptosis, como la proteína p53, la familia de las IAP's y la familia de Bcl-2. Esta última ha sido la más estudiadas en cáncer [9].

## **2.5. La alteración en la apoptosis en la resistencia a la quimioterapia**

La apoptosis es una forma de muerte celular programada, ejecutada por la propia célula, que elimina células mutadas, dañadas y desarrolladas en exceso. La apoptosis se difiere de otras formas de muerte celular porque elimina células sin causar una respuesta inflamatoria. Puede ser iniciada por inductores extrínsecos o intrínsecos [10]. Debido a que la apoptosis es un proceso de eliminación de células defectuosas, la

desregulación de los genes que codifican las proteínas que la controlan, puede ser la causa del desarrollo de diversos tumores. La proliferación neoplásica se ha asociado a la sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas por los efectos inhibitorios que tienen sobre las vías de apoptosis. Esto permite la supervivencia de la célula transformada a pesar de el tratamiento con quimioterapia [11].

### **2.5.1 Principales vías de inducción de apoptosis**

Se conocen dos vías principales de inducción de apoptosis. Éstas involucran la activación de las caspasas (las cuales se expresan como zimógenos que son activados mediante procesamiento proteolítico): la extrínseca y la intrínseca [12].

La vía extrínseca se inicia a través de la unión de los ligandos de muerte (CD95L, TRAIL) a sus receptores (CD95, DR4/DR5 respectivamente). Esta unión induce la activación de la caspasa 8, la cual procesa y activa a la caspasa efectora 3 que fragmentará el DNA [12].

La vía intrínseca requiere de la permeabilización de la membrana mitocondrial, que está regulada por la interacción de las proteínas de la familia de Bcl-2.

La desestabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de proteínas pro-apoptóticas que incluyen a Smac/DIABLO y citocromo c. Cuando el citocromo c interacciona con Apaf-1, induce la activación de la

caspasa 9, se forma el apoptosoma, y éste activa la caspasa 3. Mientras que Smac/DIABLO se une y antagoniza a las IAPs [13].

## **2.6 La familia de Bcl-2**

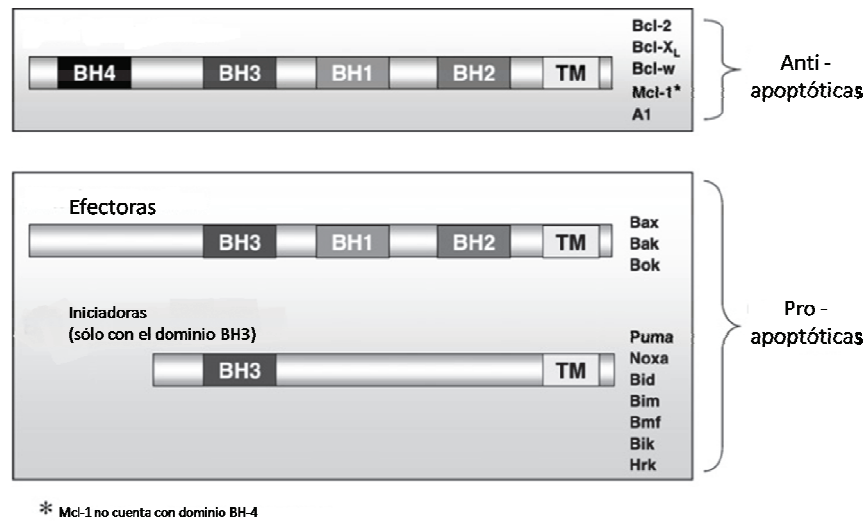
En el humano, la familia de Bcl-2 cuenta con 17 miembros [14]. La familia funciona como un 'switch de vida o muerte' que depende de la interacción de 2 subfamilias. La subfamilia de las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y A1) y la subfamilia de las proteínas pro-apoptóticas, que a su vez se subdivide en las proteínas efectoras (Bax, Bak y Bok) y las proteínas iniciadoras denominadas 'BH3-only' (Bik, Bad, Bid, Bim, Bmf, Hrk, Noxa y Puma) [14].

Las proteínas de la familia de Bcl-2 tienen 4 regiones homólogas BH (BH1, BH2, BH3, BH4). Cabe resaltar que el dominio BH3 se encuentra presente en todos los miembros de la familia. Las proteínas iniciadoras o 'BH3 only', como su nombre lo indica, sólo contienen el dominio BH3. Se ha reportado que por este dominio se lleva a cabo la interacción entre las proteínas de esta familia (figura 3) [15].

### **2.6.1 Activación de las proteínas de la familia de Bcl-2**

El inicio de la vía intrínseca de la apoptosis requiere de la acción de las proteínas 'BH3 only' y las efectoras, en donde las proteínas 'BH3 only'

actúan como sensores de daño y como antagonistas directos de las proteínas anti-apoptóticas [16].



Modificado de:  
 Karst, A.M., *BH3-only proteins in tumorigenesis and malignant melanoma. Cell Mol Life Sci, 2007. 64(3): p. 318-30.*

Figura 3. Homología de las proteínas de la familia de Bcl-2. Se observa que el dominio BH3 es el único presente en los tres grupos de la familia.

Tras un proceso de daño celular, las proteínas efectoras Bax y Bak que se encuentran en el citosol en estado inactivo, son activadas por las proteínas iniciadoras (Bid, Bim), sufren un cambio conformacional que despliega y expone su dominio BH3; esto les permite insertarse en la membrana exterior de la mitocondria y formar un oligómero por el cual se liberarán factores mitocondriales pro-apoptóticos (Figura 4) [17].

Estudios estructurales han revelado que los dominios BH1, BH2 y BH3, en cada una de las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1), se pliegan para formar un dominio globular que contiene un surco

hidrofóbico en la superficie, al cual, el dominio BH3 de las proteínas pro-apoptóticas se pueden unir, neutralizando de esta forma su función [18].

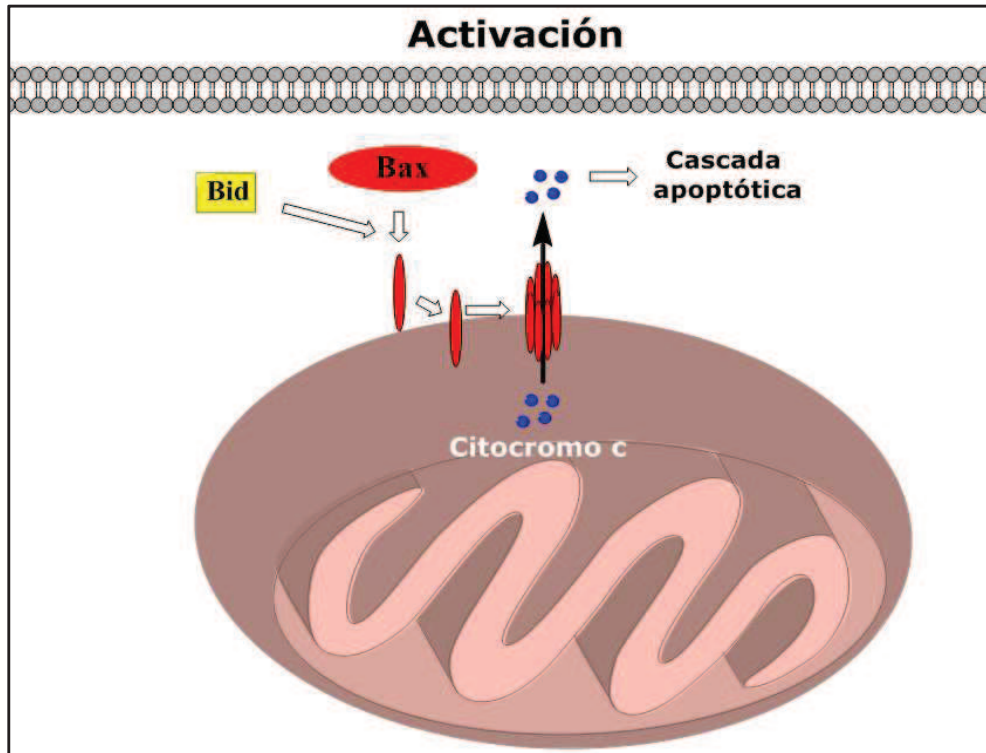


Figura 4. Activación de la apoptosis por la vía intrínseca. Posteriormente a un estímulo, Bax se inserta en la membrana exterior de la mitocondria, se oligomeriza y forma un poro, por el cual saldrán factores pro-apoptóticos como el citocromo C y se activará la vía intrínseca de la apoptosis.

## 2.7. Participación de la familia de proteínas de Bcl-2 en cáncer

Se ha observado que la sobre-expresión de proteínas como Bcl-2 y Bcl-xL está asociada a resistencia a la quimioterapia en nefroblastomas [19], carcinoma de ovario [20], leucemias monocíticas [21], carcinoma de células escamosas [22] y en leucemia aguda de células T [23].

La sobre-expresión de estas proteínas bloquea la oligomerización de Bax y Bak, y así evitan la despolarización de la membrana mitocondrial y por tanto la liberación de factores pro-apoptóticos (Figura 5) [15, 24].

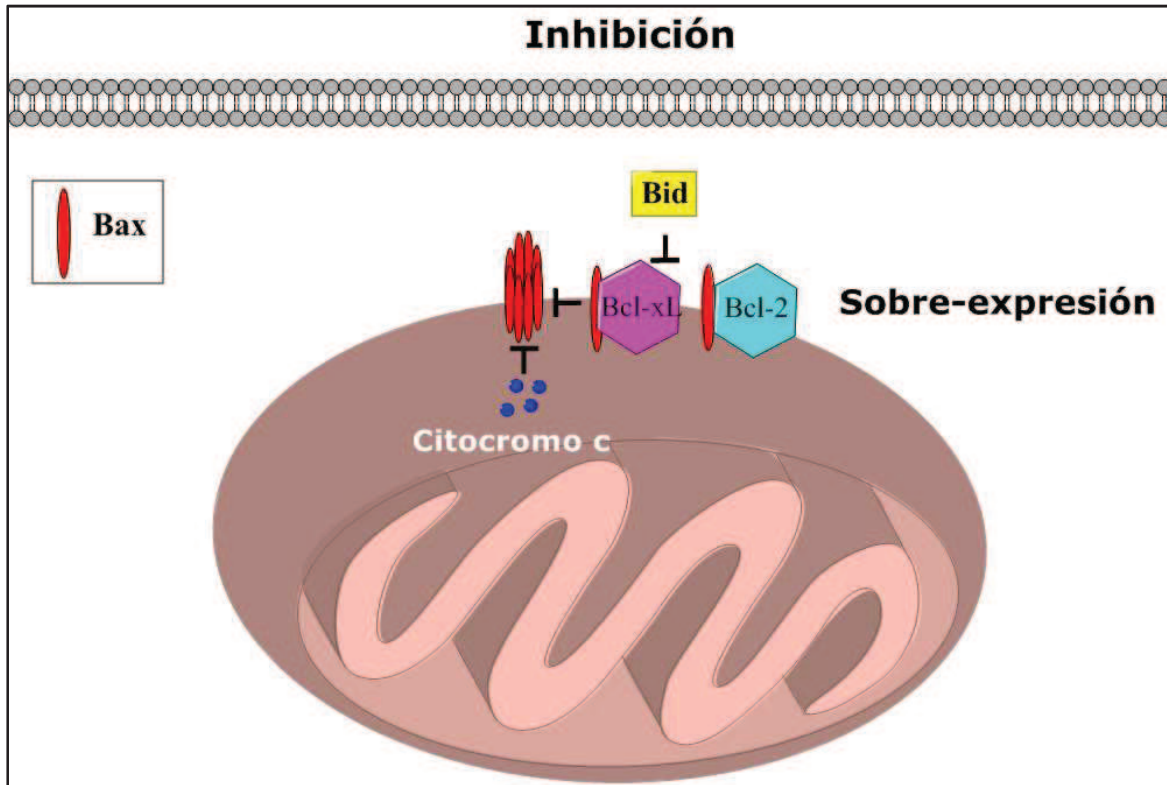


Figura 5. Inhibición de la cascada apoptótica por la sobre-expresión de Bcl-xL o Bcl-2. Estas proteínas anti-apoptóticas secuestran a Bax, impidiéndole llevar a cabo su función.

## 2.8. Apoptosis inducida por péptidos antagónicos a la actividad de la familia Bcl-2

Las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 tienen un surco hidrofóbico en la superficie, con el cual interactúan con la región BH3 de las proteínas pro-apoptóticas. Estos estudios han permitido diseñar péptidos sintéticos derivados de la región BH3 de las proteínas Bak, Bax

y Bad para unirse a dicho surco y así bloquear su actividad. Shangary y cols. [13] mostraron que la adición de péptidos sintéticos derivados de la región BH3 de Bax bloquean la unión Bax/Bcl-2 y Bax/Bcl-xL e inducen la liberación de citocromo c en la línea celular Jurkat, la cual sobre-expresa las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL.

Estudios posteriores en fibroblastos de ratón que se les micro-inyectaron los péptidos del dominio BH3 de las proteínas Bax y Bad, antagonizaron la función de las proteínas anti-apoptóticas y promovieron la muerte celular [25].

Estos péptidos antagónicos se han acoplado al péptido fusogénico de Antennapedia para facilitar su incorporación a la célula tumoral, y así poder bloquear la actividad de Bcl-2 y Bcl-xL, e inducir la apoptosis de las líneas celulares de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [26]. Asimismo el péptido BH3 de Bak induce apoptosis en la línea celular HeLa [27].

Estos estudios demuestran que los péptidos antagónicos provenientes del dominio BH3 de las proteínas pro-apoptóticas, inhiben de manera eficiente la actividad de Bcl-xL, lo cual constituye una alternativa prometedora en la terapia contra el cáncer.

Las desventajas que presenta la utilización de péptidos antagónicos en los ensayos anteriores son la alta probabilidad de proteólisis y la baja eficiencia del transporte al interior de la célula; por lo tanto se requiere

de concentraciones muy elevadas de los péptidos para lograr un efecto biológico.

Es necesario evaluar nuevas y mejores estrategias que permitan transportar de manera eficiente los péptidos antagónicos al interior de la célula. Una estrategia muy empleada del transporte de péptidos al interior de las células, en la que nuestro grupo de trabajo tiene amplia experiencia, la constituye el uso de vectores bacterianos vivos atenuados.

## **2.9. Vectores bacterianos como vehículos para agentes antitumorales**

La creciente necesidad de contar con vehículos especializados para la liberación de moléculas heterólogas en microambientes selectivos, ha permitido considerar a los vectores bacterianos vivos como alternativas eficientes para la liberación selectiva de moléculas con fines profilácticos o terapéuticos.

Bacterias como *Salmonella enterica serovar Typhi* Ty21a, *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR y *Mycobacterium bovis* BCG se han aprobado como vacunas para su uso en humanos y actualmente son investigadas como potenciales acarreadores de moléculas heterólogas, entre los que figuran agentes citotóxicos, citocinas, anticuerpos y antígenos pertenecientes a otros microorganismos [28].



Desde que Coley y cols. en 1898 observaron que pacientes con sarcoma que presentaban un proceso de erisipela reducían hasta en un 50% en tamaño del tumor, se han realizado numerosas investigaciones que han permitido proponer a las bacterias como posibles alternativas terapéuticas en contra del cáncer [29].

A la fecha se han clasificado en tres grupos a las bacterias evaluadas como agentes anti tumorales:

a) Grupo I, bacterias que producen ácido láctico. En este grupo encontramos bacterias del género *Bifidobacterium* como: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium infantis*.

b) Grupo II, bacterias intracelulares: bacterias del género *Salmonella* (*Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*) y *Listeria* (*Listeria monocytogenes*) que son anaerobias facultativas.

c) Grupo III, bacterias anaerobias estrictas del género *Clostridium*: *Clostridium sporogenes*, *Clostridium oncolyticum*, *Clostridium nouyi*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutyricum* [30].

El empleo de bacterias anaerobias estrictas se ve limitado debido a que colonizan el tejido tumoral, siempre y cuando sea de un tamaño considerable, y tienen la desventaja de que no colonizan las metástasis [30].

Las bacterias anaerobias facultativas, en cambio, colonizan con mayor afinidad el tumor con respecto al tejido sano, no necesitan de una gran masa tumoral para llegar a ella, además de también poder migrar a tejidos metastásicos [30]. Ejemplo de ellas es el género *Salmonella*, del cual se ha creado una gran variedad de cepas atenuadas, que la han hecho el vector ideal para la terapia en contra del cáncer.

*Salmonella enterica* ha recibido una atención especial por su capacidad de acarrear moléculas heterólogas a las células presentadoras de antígenos (APC) y a la existencia de un modelo murino, en el cual *Salmonella enterica serovar typhimurium* (*Salmonella typhimurium*) simula el proceso de invasividad e infección que *Salmonella enterica serovar Typhi* (*Salmonella typhi*) tiene en humanos [31].

## **2.10. *Salmonella enterica* y su selectividad por tejido tumoral**

*Salmonella enterica* es el vector bacteriano más utilizado en los modelos murinos de cáncer. Aunque a la fecha no se conoce por completo la causa por la que la bacteria presenta gran selectividad por el tejido tumoral; se ha propuesto que las características del microambiente generado por la fisiopatología del tumor, caracterizado por hipoxia, acidez y necrosis (restos celulares), sumado a la ausencia de células del sistema inmune, resulta propicio para la proliferación bacteriana [30].

Estudios realizados por Kasinskas y cols. [32, 33] en un modelo tumoral *in vitro*, mostraron que *Salmonella enterica* es atraída al tejido tumoral por diversas moléculas como ácido aspártico, serina, ribosa y galactosa. Estas moléculas estarían funcionando como agentes quimiotácticos al unirse a los receptores en la bacteria; se ha propuesto que el receptor de ácido aspártico participaría en el proceso de quimiotaxis hacia el tumor, el receptor de serina en el proceso de penetración al tumor y los receptores de ribosa y galactosa estarían encargados de dirigir a la bacteria hacia las áreas de necrosis.

Adicionalmente a estos estudios, Stritzker y cols [34] observaron que empleando un modelo murino de cáncer de mama, que cepas atenuadas de *Escherichia coli* y de *Salmonella typhimurum* deficientes en la vías metabólicas de la síntesis de aminoácidos aromáticos, colonizaban en mayor proporción el tejido tumoral comparado con las cepas silvestres de estas mismas bacterias.

Estos estudios sugieren que *Salmonella enterica* migra al tejido tumoral por la presencia de nutrientes, producto de la liberación de células en proceso de destrucción por necrosis.

### **2.11. *Salmonella enterica* en la terapia antitumoral**

Desde que en 1997 Pawelek y cols. [29] describieron por primera vez que *Salmonella enterica* infecta y se replica en los tumores implantados

en ratones en una relación de 1000:1 con respecto al tejido normal; diversos reportes han demostrado que el empleo de cepas atenuadas de *Salmonella enterica* tienen la capacidad de disminuir el tamaño del tumor en modelos murinos de xenotrasplantes con líneas celulares de cáncer de mama y próstata [35-37].

Asimismo, otros grupos de trabajo han desarrollado cepas de *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* auxotróficas para leucina y arginina, las cuales al ser administradas por vía intravenosa o intratumoral disminuyeron el crecimiento tumoral en modelos murinos de xenotrasplantes de carcinomas de cáncer de próstata [35], cáncer de mama [37] y metástasis de cáncer de pulmón [38].

Otros grupos se han enfocado en la obtención de cepas atenuadas de *Salmonella enterica* para ser empleadas, de forma segura, en estudios clínicos. Ejemplo de ellas es la cepa VNP20009 que tiene una mutación tanto en el gen *msbB*, implicado en la formación de lípido A, y otra en el gen *pur I*, lo que la hace dependiente de una fuente externa de purinas [39].

Esta cepa fue empleada en un estudio de fase clínica I en pacientes con melanoma. Los pacientes no mostraron reacciones adversas y se observó colonización de *Salmonella enterica* en el tejido tumoral; sin embargo, no se observó algún efecto anti-tumoral significativo [39].

Para potenciar dicho efecto, diversos grupos de trabajo han acoplado a esta cepa, por técnicas de ingeniería genética, diversas moléculas heterólogas con actividad profiláctica o terapéutica. Ejemplo de ellos son los estudios en los que se ha empleado a *Salmonella enterica* para expresar antígenos asociados al cáncer, como el antígeno específico prostático y utilizarlo a manera de vacuna. Su efecto fue estudiado en modelos murinos para prevenir el desarrollo de cáncer de próstata [40]. También se ha utilizado *Salmonella enterica* para acarrear y expresar moléculas como lo son las citocinas IL-2 [41], IL-18 [42], TRAIL [43], CCL21[41-44] a fin de potenciar la respuesta inmune antitumoral y en consecuencia una regresión del tumor.

## **2.12. Transferencia de material genético realizado por *Salmonella enterica***

En 1980 Schaffner y cols. [45] demostraron que la transferencia de material genético de una bacteria a una célula eucarionte era posible.

Emplearon *Escherichia coli* para infectar células de riñón de mono y así transferir un plásmido que codificaba para el virus del simio 40 (SV40) [45].

Apartir de este estudio, diversos grupos de trabajo han empleado distintos géneros bacterianos, incluido *Salmonella enterica*, para llevar a cabo la transferencia de material genético de la bacteria hacia la célula

eucariota, para que ésta sea la encargada de la traducción del material genético. En modelos murinos se han probado distintas estirpes bacterianas que permitan transferir material genético. Tal es el caso de *Salmonella typhimurium* SL7207 en un modelo de colitis [46], *Escherichia coli* en un modelo de isquemia intestinal [47] y *Listeria monocytogenes* que se empleó para inducir una respuesta inmunológica en contra de la oncoproteína E7 de cáncer cervical [48].

En el tratamiento contra el cáncer, diversos grupos de trabajo han aprovechado la selectividad de *Salmonella enterica* para infectar tumores y su capacidad para acarrear y liberar plásmidos; que codifiquen para proteínas y RNA's de interferencia (siRNA) que induzcan la regresión tumoral.

En estos estudios se ha observado que *Salmonella enterica* transfiere los plásmidos que codifican para el siRNA a distintas líneas celulares de cáncer (próstata, melanoma, colon). Ejemplo de ello, es el silenciamiento del factor transcripcional STAT-3 en una línea celular de cáncer de próstata [49], el de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en melanoma [50] y el del gen MDR en una línea celular de carcinoma de células escamosas de lengua [51]. Asimismo, se ha utilizado *Salmonella enterica* para transferir plásmidos que codifican para proteínas tales como la IL-4 ó IL-8 en modelos de melanoma murino [52].

### **3. Planteamiento del problema**

Aunque en los últimos años se ha probado que los péptidos pertenecientes a la región BH3 de las proteínas pro-apoptóticas inducen la muerte de la célula tumoral por apoptosis en ensayos *in vitro*; en un modelo *in vivo* se requeriría que grandes concentraciones de péptido logren llegar al tumor para asegurar el efecto deseado. Por lo que es necesaria una estrategia que permita llevar estos péptidos antagónicos de manera más eficiente al tejido tumoral en modelos *in vivo*.

Una estrategia que se ha estudiado recientemente para transferir plásmidos a las células eucariontes, es el uso de vectores bacterianos vivos atenuados.

Con base en estos antecedentes, nuestro grupo de trabajo se ha planteado el uso de vectores bacterianos para llevar plásmidos que codifiquen para un péptido antagónico a la actividad de las proteína anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2 a las células tumorales y sean ellas las que lo expresen.

#### **4. Hipótesis**

*Salmonella enterica serovar typhimurium* acarreará y liberará en líneas celulares tumorales, un plásmido que contiene la secuencia para codificar un péptido antagónico a la actividad de las proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2.



## **5. Objetivo**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar la capacidad de *Salmonella enterica serovar typhimurium* de liberar plásmidos que codifican para un péptido antagónico a la actividad de las proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2 en líneas celulares tumorales.

### **5.2 Objetivos específicos**

- Construir un plásmido que codifique para el péptido de la región BH3 de Bax acoplado a EGFP (BaxGFP) y un plásmido que codifique para el péptido de la región BH3 de Bax pero con una mutación (Bax $\epsilon$ GFP).
- Evaluar la expresión del péptido antagónico mediante transfección en la línea celular PC3.
- Evaluar la funcionalidad del péptido antagónico mediante ensayos de apoptosis.
- Evaluar la expresión del péptido antagónico en las líneas celulares después de la infección con *Salmonella enterica*.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1. Tabla 1. Cepas bacterianas

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>Sup E44 <math>\Delta</math>lac 169 <math>\phi</math>lacZ<math>\Delta</math>M15 hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Gibco BRL
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> SL3261	Aro a <sup>-</sup>	[53]

### 6.2. Tabla 2. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Características
Bax 1	5' <u>CTAGAAGCACCAAAAACTGAGCG</u> AATGCCTGAAACGCATTGGCGATGA ACTGGATAGCAACATGGCTAGCCTC <u>GAGG3'</u>	Oligonucleótido sentido. Contiene la secuencia que codifica para el péptido de la región BH3 de Bax. Se encuentra flanqueado por los sitios de restricción para la enzima <i>Xba</i> I en la posición 5' y los sitios de restricción para las enzimas <i>Nhe</i> I, <i>Xho</i> I y <i>BamH</i> I en el extremo 3' (subrayados).
Bax 2	5' <u>GATCCCTCGAGGCTAGCCATGTTG</u> CTATCCAGTTCATCGCCAATGCGTTT CAGGCATTCGCTCAGTTTTTTGGTGC <u>TT3'</u>	Oligonucleótido antisentido. Contiene la secuencia complementaria para el péptido de la región BH3 de Bax. Se encuentra flanqueado por los sitios de restricción para la enzima <i>Xba</i> I en la posición 5', y los sitios de restricción para las enzimas <i>Nhe</i> I, <i>Xho</i> I y <i>BamH</i> I en el extremo 3' (subrayados).

Baxε1	5'CTAGAAGCACCAAAAACTGAGCG AATGCG <b>AAA</b> AACGCATTGGCGATGA ACTGGATAGCAACATGGCTAGCCTC <u>GAGG</u> 3'	Oligonucleótido sentido. Contiene la secuencia que codifica para el péptido mutado de la región BH3 de Bax. Se encuentra flanqueado por los sitios de restricción para la enzima <i>Xba</i> I en la posición 5' y los sitios de restricción para las enzimas <i>Nhe</i> I, <i>Xho</i> I y <i>BamH</i> I en el extremo 3' (subrayados).
Baxε2	5' <u>GATCCCTCGAGGCTAGCC</u> ATGTTG CTATCCAGTTCATCGCCAATGCGTTT <b>TT</b> CGCATTGCTCAGTTTTTTGGTGC <u>TT</u> 3'	Oligonucleótido antisentido. Contiene la secuencia complementaria para el péptido mutado de la región BH3 de Bax. Se encuentra flanqueado por los sitios de restricción para la enzima <i>Xba</i> I en la posición 5', y los sitios de restricción para las enzimas <i>Nhe</i> I, <i>Xho</i> I y <i>BamH</i> I en el extremo 3' (subrayados).

\* La mutación de las secuencias Baxε se encuentra marcada en negritas.

**Tabla 3. Péptidos**

Péptido	Secuencia
Bax	STKKSECLKRIGDELDSNMEL
Baxε	STKKSE <b>E</b> KRIGDELDSNMEL

El péptido Baxε tiene un ácido glutámico en vez de la leucina de la posición 8 (L8E). Esta mutación le hace perder afinidad por las proteínas anti-apotóticas.

### 6.3. Tabla 4. Plásmidos

NOMBRE	Tamaño	Características
pEGFP-N1	4.7 kb	Plásmido reportero de clonación que expresa la proteína verde fluorescente (EGFP). Obtenido de Clonotech.

BaxGFP	4.7 kb	Se construyó el plásmido que contiene la secuencia para la expresión del péptido de la región BH3 de Bax acoplado a la EGFP.
BaxεGFP	4.7 kb	Se construyó el plásmido que contiene la secuencia para la expresión del péptido mutado de la región BH3 de Bax acoplado a la EGFP.

#### 6.4. Tabla 5. Líneas celulares

Línea celular	Características
<b>PC3</b>	Línea celular obtenida a partir de adenocarcinoma de próstata, estadio IV. Con crecimiento adherente. Obtenida de ATCC: CRL-1435.
<b>THP-1</b>	Línea celular de leucemia monocítica aguda de humano con crecimiento en suspensión. Obtenida de ATCC: TIB-202.

- Condiciones de cultivo

Las líneas celulares PC3 y THP-1 fueron cultivadas en medio RPMI Advanced (GIBCO, Invitrogen USA) suplementado con L-glutamina, piruvato, antibióticos-antimicótico y suero fetal bovino (SFB) al 3%, a 37°C en un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5%.

#### 6.5. Tabla 6. Enzimas empleadas para la ingeniería genética.

Enzima	Sitio de corte	Marca
Nhe I	5'... GCTAGC... 3' 3'... CGATCG... 5'	New England BioLabs. NE, EU.
BamH I	5'... GGATCC... 3' 3'... CCTAGG... 5'	Promega. Madison, WI, EU.
Xho I	5'... CTCGAG... 3' 3'... GAGCTC... 5'	Invitrogen. Carisbad, CA, EU.
Pst I	5'... CTGCAG... 3' 3'... GACGTC... 5'	Promega. Madison, WI, EU.
Hind III	5'... AAGCTT... 3' 3'... TTCGAA... 5'	Promega. Madison, WI, EU.
T4 ligasa		Invitrogen. Carisbad, CA, EU.

## **6.6. Técnicas de ingeniería genética.**

La preparación del DNA, la manipulación genética, la transformación bacteriana, las transfecciones y la electroforesis en geles de agarosa se realizaron de acuerdo a las especificaciones y protocolos del Manual de Laboratorio de Clonación Molecular Sambrook [54] y según las recomendaciones de los kits empleados.

### **6.6.1 Acoplamiento**

- Acoplamiento de insertos

Las secuencias sentido y antisentido empleadas de los oligonucleótidos se mezclaron en cantidades de 25  $\mu$ L cada uno a partir de una solución stock 5 nM. Se añadieron 50  $\mu$ L de agua inyectable y las mezclas se calentaron a 94°C durante 15 min. La mezcla se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente.

El análisis del acoplamiento de los oligonucleótidos se realizó en geles de agarosa al 3% en buffer TAE 1X (Tris-acetato de potasio 0.04 M, EDTA 0.001 M) como buffer de corrimiento, a 90 Volts por 35 min. El gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 0.03  $\mu$ L/mL.

Al terminar la electroforesis, se fotodocumentó el gel con un transiluminador de luz UV (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0).

- Purificación de los insertos

Se hizo una electroforesis del acoplamiento en geles de agarosa al 3% con buffer TAE 1 X a 90 Volts por 35 min. Se cortó la banda del DNA y se purificó con el PureLink™ Quick gel extraction kit (Invitrogen, Poststraße, Löhne, Alemania). Brevemente, se solubilizó la agarosa y se purificó el DNA por medio de una columna de sílica. El producto recuperado se resuspendió en 40 µL de agua inyectable.

### **6.6.2 Construcción de plásmidos**

- Digestiones

A partir del plásmido comercial pEGFP-N1 se realizaron las construcciones de los plásmidos BaxGFP y BaxεGFP. Brevemente, se realizó una doble digestión de 3 µg del plásmido con las enzimas BamH I y Nhe I a 37°C durante toda la noche. El plásmido digerido se purificó a partir de la agarosa con el PureLink™ Quick gel extraction kit (vector).

- Ligaciones

Una vez obtenidos los productos purificados (vector e insertos), el siguiente paso fue realizar la clonación de los fragmentos de Bax o Baxε en el vector pEGFP-N1 para lo cual se mezcló el vector purificado en proporción de 1:3 con los insertos y se añadió 1 U de la enzima T4 DNA ligasa. La reacción se incubó durante una noche a 4°C.

### **6.6.3 Transformación de bacterias *Escherichia coli* DH5α competentes mediante choque térmico**

Se utilizaron bacterias *Escherichia coli* DH5α competentes por CaCl<sub>2</sub> para realizar la transformación de los productos de ligación.

Brevemente, las bacterias mantenidas en congelación a -80°C se descongelaron en hielo y se les agregó el producto de la ligación. La mezcla de las bacterias con la ligación se incubó en hielo por 30 min. Posteriormente, se colocaron en baño de agua a 42 °C durante 1 min; terminado el minuto se pasaron a hielo y se incubaron durante 3 min. Al finalizar, las bacterias se resuspendieron en 1.5 mL de medio SOC, se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL, y se incubaron a 37°C durante 90 min con agitación a 200 rpm. Después de la incubación, las bacterias se vertieron en una placa de agar BHI con kanamicina [100 µg/mL] y se dejó secar la placa. Ésta se incubó toda la noche a 37°C.

### **6.6.4 Selección de clones BaxGFP y BaxεGFP**

Las clonas se seleccionaron 18 horas después de realizada la transformación. Se seleccionaron las colonias que crecieron en las placas de agar BHI con kanamicina [100 µg/mL], las cuales se sembraron en 5 mL de caldo BHI con kanamicina [100 µg/mL] y se incubaron a 37°C durante toda la noche con agitación a 200 rpm. A partir de este cultivo se procedió a purificar el plásmido por lisis alcalina.

También de este cultivo se tomó una asada para sembrar en medio sólido BHI con kanamicina [100 µg/mL]

- Purificación de plásmido por lisis alcalina

Las bacterias transformadas, que fueron cultivadas durante toda la noche en medio líquido, se concentraron en un tubo de 1.5 mL por centrifugación a 12500 rpm por 1 min.

Las bacterias se resuspendieron en 200 µL de buffer de resuspensión (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH = 8) con RNAasa [20 µg/mL], después se agregaron 200 µL de buffer de lisis (SDS 1%, NaOH 0.2 M), se agitó fuertemente y se incubó por 5 min. Posteriormente, se añadieron 200 µL de buffer de neutralización (CH<sub>3</sub>COOK 3 M, pH = 5.5) y se centrifugó a 13500 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Después se recuperó el sobrenadante, al cual se le se agregaron 600 µL de isopropanol para precipitar el DNA, se mezcló y se centrifugó a 13500 rpm por 15 min. Por último, se eliminó el sobrenadante y el botón se lavó 2 veces con 1 mL de etanol al 70% en cada ocasión, centrifugando a 13500 rpm por 10 min.

El DNA se secó en un Speed-Vac por 20 min y al finalizar se resuspendió en 40 µL de agua inyectable.



### **6.6.5 Análisis de clonas positivas**

A partir de los plásmidos obtenidos por lisis alcalina, se realizó el análisis de restricción para determinar las clonas que insertaron los fragmentos de Bax o Baxe. Los plásmidos se digirieron con 10 U de cada una de las enzimas de restricción Nhe I, BamH I, Xho I, Pst I o Hind III; a 37°C toda la noche.

El análisis de las digestiones se realizó en geles de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X por 35 min a 90 Volts.

El análisis del gel se realizó en el fotodocumentador Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0.

### **6.6.6. Purificación del plásmido por columna para ensayos de transfección**

A partir de las clonas que insertaron los fragmentos de Bax y Baxe se realizó la purificación de plásmido con el kit Plasmid Midi Kit (Qiagen. Hilden, Alemania) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El producto de la purificación se resuspendió en 100 µL de agua inyectable y se cuantificó en el equipo Gene Quant (Amershan, Biosciences).

### **6.6.7. Ensayos de transfección**

Para los ensayos de transfección se utilizó el método de Lipofectamina 2000 (Invitrogen. Carisbad, CA, EU) de acuerdo a las especificaciones

del fabricante. Brevemente, en placas de 24 pozos (Costar. NY, EU) se colocaron  $10^5$  células PC3 por pozo en un volumen de 1mL. Después de 24 horas, se adicionó a los cultivos una mezcla de 0.5  $\mu$ g DNA plasmídico (pEGFP-N1, BaxGFP o Bax $\epsilon$ GFP) con 1  $\mu$ L de lipofectamina 2000 en 200  $\mu$ L de medio RPMI advanced 1640 y se incubó por 30 min. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio que tenían las células y se añadió por goteo suave la mezcla de DNA con lipofectamina sobre las células PC3 en toda la superficie del pozo. Al final, la placa se agitó suavemente y se incubó por 4 h a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>. Por último, se eliminó el medio y se añadió medio RPMI advanced suplementado y las células se incubaron toda la noche a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **6.6.8. Expresión de las proteínas recombinantes BaxGFP y Bax $\epsilon$ GFP**

Los ensayos de expresión de las proteínas BaxGFP y Bax $\epsilon$ GFP se realizaron 24 h después de la transfección en las células PC3 por microscopia confocal. Brevemente, las células PC3 transfectadas se trataron con el marcador de mitocondrias Mitotracker (Invitrogen. Eugene, Oregon, EU) a una concentración de 1  $\mu$ M y se incubaron por 30 min a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Después, las células se lavaron con medio RPMI advanced. Posteriormente, las células PC3 se tripsinizaron y se recolectaron en tubos de 1.5 mL. Se lavaron 2 veces con PBS

centrifugando en cada ocasión a 6000 rpm. Al final se colocaron  $10^5$  células en un cubreobjetos de 20x20 mm, tratados previamente con Poli-L-lisina por 20 min. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 min y se montaron sobre portaobjetos con 15  $\mu$ L de medio de montaje "Vectashield" (Vector. Burlingame, CA, EU). Los cubreobjetos se sellaron con barniz y las preparaciones se observaron al microscopio confocal.

### **6.7. Ensayos de apoptosis por TUNEL**

El ensayo de TUNEL (De sus siglas en inglés: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) se realizó a partir de células PC3 transfectadas con los plásmidos pEGFP-N1, BaxGFP o Bax $\epsilon$ GFP.

Las células PC3 se tripsinizaron y recolectaron en tubos de 1.5 mL, se lavaron con PBS a 6000 rpm. Las células se resuspendieron en un volumen de 100  $\mu$ L de PBS, se transfirieron a una placa de 96 pozos con fondo en V (NY, EU. Costar) y se centrifugó por 8 min a 2000 rpm a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se fijaron por una hora con 100  $\mu$ L de paraformaldehído al 4%. Finalizado el tiempo, se lavaron con PBS centrifugando por 8 min a 2000 rpm a 4°C. Posteriormente, las células se permeabilizaron con 50  $\mu$ L de una solución de 0.01% de citrato de sodio y 0.01% tritón X-100, por 2 min en hielo y se tiñeron con el *In Situ* Cell Death Detection Kit TMR red (Roche. Mannheim, Alemania) de

acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, se mezcló el buffer con la enzima (terminal deoxinucleotidil transferasa) hasta el momento de usarse y se añadieron 25  $\mu$ L de la mezcla a cada pozo. Se utilizó el buffer sin enzima como control. Se incubaron durante 1 h a 37°C en la oscuridad. Por último, las células se lavaron 2 veces con PBS, se transfirieron a un tubo de citómetro en un volumen de 300  $\mu$ L de PBS y se leyeron en el citómetro (FACSCALIBUR, Becton).

### **6.8. Transformación de bacterias por electroporación**

La transformación de la cepa *Salmonella enterica serovar typhimurium* SL3261 se realizó por electroporación en un MicroPulser Electroporator de BioRad.

Brevemente, las bacterias electrocompetentes se mezclaron con 0.5  $\mu$ g del DNA plasmídico (BaxGFP o pEGFP-N1) y se colocaron en la celda del equipo. Se les aplicó un pulso eléctrico de 2.5 kVolts y se resuspendieron en medio SOC.

Las bacterias se vertieron en una placa de agar BHI con kanamicina [100  $\mu$ g/mL].

Se seleccionaron las colonias que crecieron y se sembraron en medio líquido, con el cual se sembró por estría en una placa de agar BHI con kanamicina [100  $\mu$ g/mL].

## **6.9. Infección de las células THP-1 y PC3 con *Salmonella enterica* SL3261**

### - Cuantificación de bacterias

Las bacterias que contienen los plásmidos BaxGFP o pEGFP-N1, se sembraron en 5 mL de caldo BHI con kanamicina [100 µg/mL], y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. Al día siguiente se hizo un subcultivo a una dilución 1:50 en 5 mL de caldo BHI con kanamicina [100 µg/mL] y se incubó durante 4 h bajo las mismas condiciones. Después del tiempo de incubación, se tomó 1 mL del cultivo, se centrifugó a 12500 rpm durante 1 min y se eliminó el sobrenadante. El botón celular se lavó 2 veces con PBS estéril. Posteriormente, las bacterias se resuspendieron en 1 mL de PBS estéril y se determinó su concentración por su densidad óptica a 540 nm. Se ajustó a  $10^9$  bacterias/mL.

### - Cultivos celulares

En placas de 24 pozos se sembraron  $10^5$  células/pozo de las líneas celulares THP-1 o PC3 en medio RPMI advanced suplementado sin antibióticos/antimicóticos. La suspensión de bacterias se agregó a una MOI de 100. La placa se centrifugó por 3 min a 1250 rpm y se incubó durante 30 min a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, las bacterias que no infectaron se removieron lavando 2 veces las células con 500 µL de medio medio RPMI con gentamicina [200 µg/mL]

centrifugando por 3 min a 1250 rpm para las células THP-1; las células PC3, por ser adherentes, se lavaron directamente.

Después de los lavados se añadió 1 mL/pozo de medio RPMI advanced con gentamicina [200 µg/mL] y se incubó durante 30 min. Por último, se retiró este medio con gentamicina y se agregó 1 mL de medio RPMI advanced suplementado y se incubó a 37°C durante 72 h.

### **6.10 Expresión de las proteínas BaxGFP y EGFP después de la infección con *Salmonella enterica* SL3261**

Los ensayos de expresión de las proteínas BaxGFP y EGFP en las células THP-1 y PC3, se realizaron 72 h después de la infección. Las células PC3 se tripsinizaron y las THP-1 sólo se recolectaron en tubos de 1.5 mL. Se lavaron 2 veces con PBS centrifugando en cada ocasión a 6000 rpm. Al final, se colocaron  $10^5$  células en un cubreobjetos de 20x20 mm, tratados previamente con Poli-L-lisina por 20 min. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se montaron sobre portaobjetos con 15 µL de medio de montaje "Vectashield". Los cubreobjetos se sellaron con barniz y las preparaciones se observaron al microscopio confocal (THP-1) y de fluorescencia (PC3).

### **6.11 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 5.

Para comparar la media de 2 grupos se utilizó una prueba *t* de Student.

Se muestra en las gráficas la media de 3 ensayos independientes con el error estándar.

Los porcentajes de apoptosis para las proteínas BaxGFP y Bax $\epsilon$ eGFP se normalizaron restando la apoptosis causada por el vector pEGFP-N1 (el porcentaje de apoptosis causado por la transfección).

## 7. Resultados

### 7.1 Construcción de los plásmidos

Para construir los plásmidos que expresan las proteínas recombinantes BaxGFP y BaxεGFP, se partió del plásmido comercial pEGFP-N1 (Figura 6).

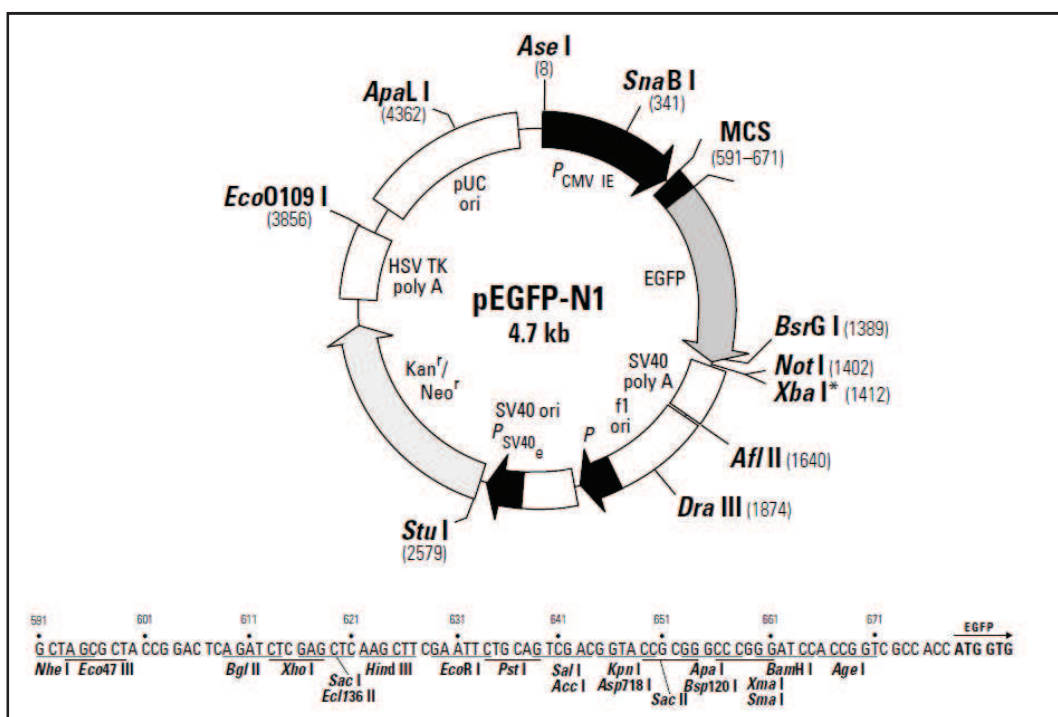


Figura 6. Mapa del plásmido pEGFP-N1.

El primer paso fue comprobar que el plásmido tuviera los sitios de restricción para las enzimas Nhe I y BamH I, para poder clonar los fragmentos que codifican para los péptidos antagónicos. Adicionalmente, como control, se realizó el análisis con las enzimas Xho I, Pst I, Hind III.



En la figura 7 se observa que el plásmido pEGFP-N1 cuenta con los sitios de restricción para las enzimas probadas, ya que se observa una banda alrededor de 4.7 kb, correspondiente al plásmido linealizado. Como control se muestra el plásmido sin digerir que presenta las 3 bandas características de los plásmidos circulares.

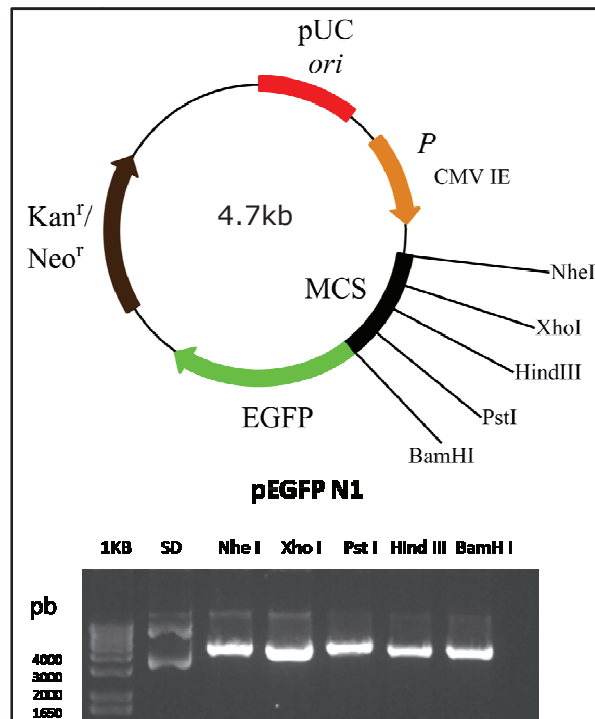


Figura 7. Mapa de restricción para el plásmido pEGFP-N1. Carril 1: Marcador de 1kb; carril 2: SD, plásmido sin digerir. Carriles del 3 al 7: digestión del plásmido con la enzima indicada en la figura.

Una vez comprobado que el plásmido pEGFP-N1 contaba con los sitios de restricción, se procedió a hacer una doble digestión con las enzimas Nhe I y BamH I. En la figura 8A se muestra el producto purificado de la doble digestión (4.7 kb). Este producto se nombró 'vector'.

La figura 8B muestra el producto purificado de los acoplamientos Bax y Baxε (78 pb). Estos fragmentos están flanqueados por el sitio de restricción Xba I en el extremo 5', que es un isocaudámero de la enzima Nhe I (que al ligarse, el sitio Nhe I se pierde); mientras que en el extremo 3' los fragmentos se encuentran flanqueados por los sitios de restricción para las enzimas Nhe I, Xho I y BamH I.

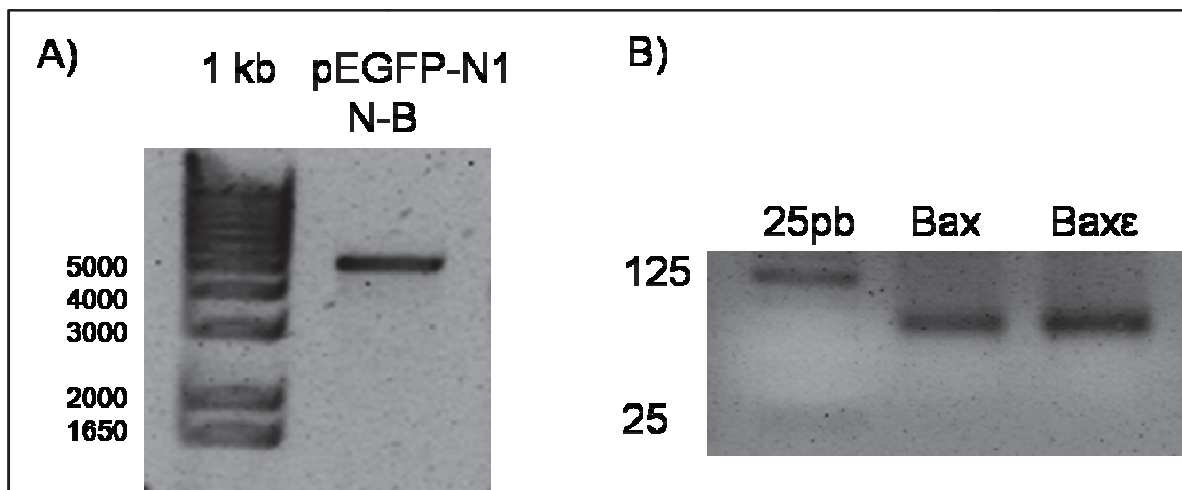


Figura 8. A) Plásmido pEGFP-N1 digerido con una doble digestión de Nhe I y BamH I. Carril 1: marcador de 1 kb; carril 2: plásmido linealizado. B) Fragmentos de DNA que codifican para los péptidos Bax y Baxε. Carril 1: marcador de 25 pb; carril 2 y 3: Bax y Baxε.

Una vez purificados vector e insertos, se realizó la ligación siguiendo la estrategia que se muestra en la figura 9.

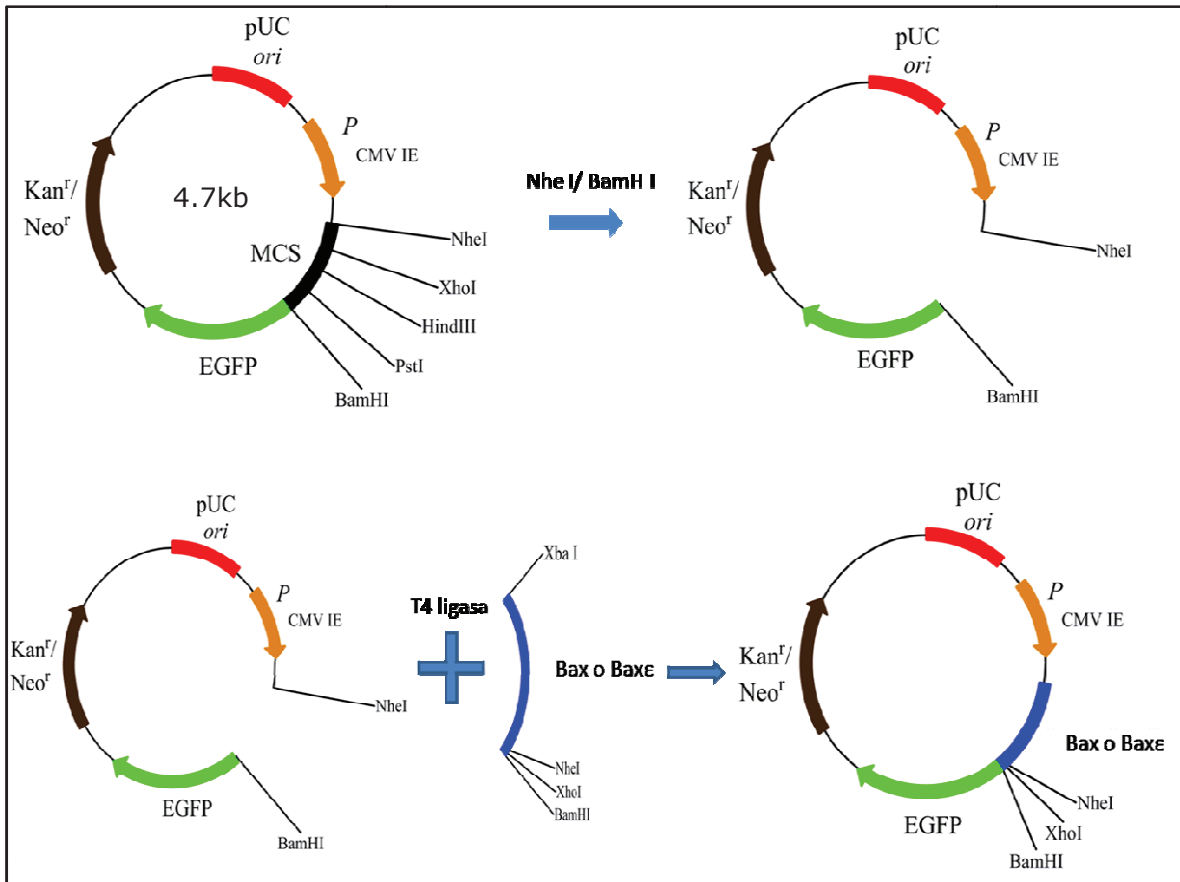


Fig 9. Esquema de clonación. A partir del plásmido pEGFP-N1 se insertó la secuencia de los péptidos Bax y Baxε.

Con el producto de las ligaciones se transformaron bacterias competentes *Escherichia coli* DH5α por choque térmico. De estas bacterias se purificó el plásmido por lisis alcalina para analizar en qué clonas se habían insertado los fragmentos Bax y Baxε.

Los plásmidos purificados se digirieron con las enzimas Nhe I, Xho I, Pst I, Hind III y BamH I para comprobar que se insertaron los fragmentos Bax y Baxε.

Como se muestra en la figura 10, la recuperación de los sitios de restricción para las enzimas Xho I y Nhe I y la pérdida de los sitios Pst I

y Hind III, son indicativos de la inserción de los fragmentos en el vector. De esta forma se obtuvieron los plásmidos BaxGFP y BaxεGFP.

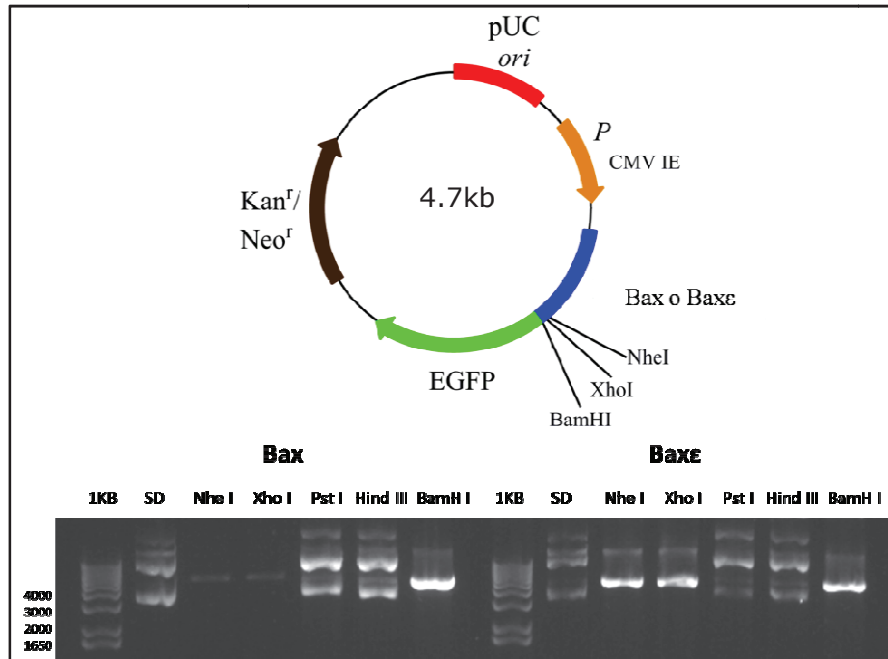


Figura 10. Mapa de restricción para las construcciones BaxGFP y BaxεGFP. La numeración de los carriles es para cada plásmido. Carril 1: Marcador de 1kb, carril 2: SD, plásmido sin digerir. Carriles del 3 al 7: digestión del plásmido con la enzima indicada en la figura.

## 7.2 Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes

Una vez que se obtuvieron los plásmidos BaxGFP y BaxεGFP, el siguiente paso fue evaluar la expresión de las proteínas recombinantes.

Para este ensayo se utilizó la línea celular PC3. Estas células se transfectaron con el plásmido vacío (pEGFP-N1) o las construcciones BaxGFP o BaxεGFP. Se hizo una tinción mitocondrial, 24 h posteriores a la transfección, para observar si existía una colocalización entre la

proteína recombinante y la mitocondria, ya que en esta última se encuentran, principalmente, la proteína anti-apoptótica Bcl-xL.

En la figura 11L se muestra en color amarillo la colocalización (Merge) de la proteína BaxGFP con la mitocondria, no así la proteína BaxεGFP o el vector vacío.

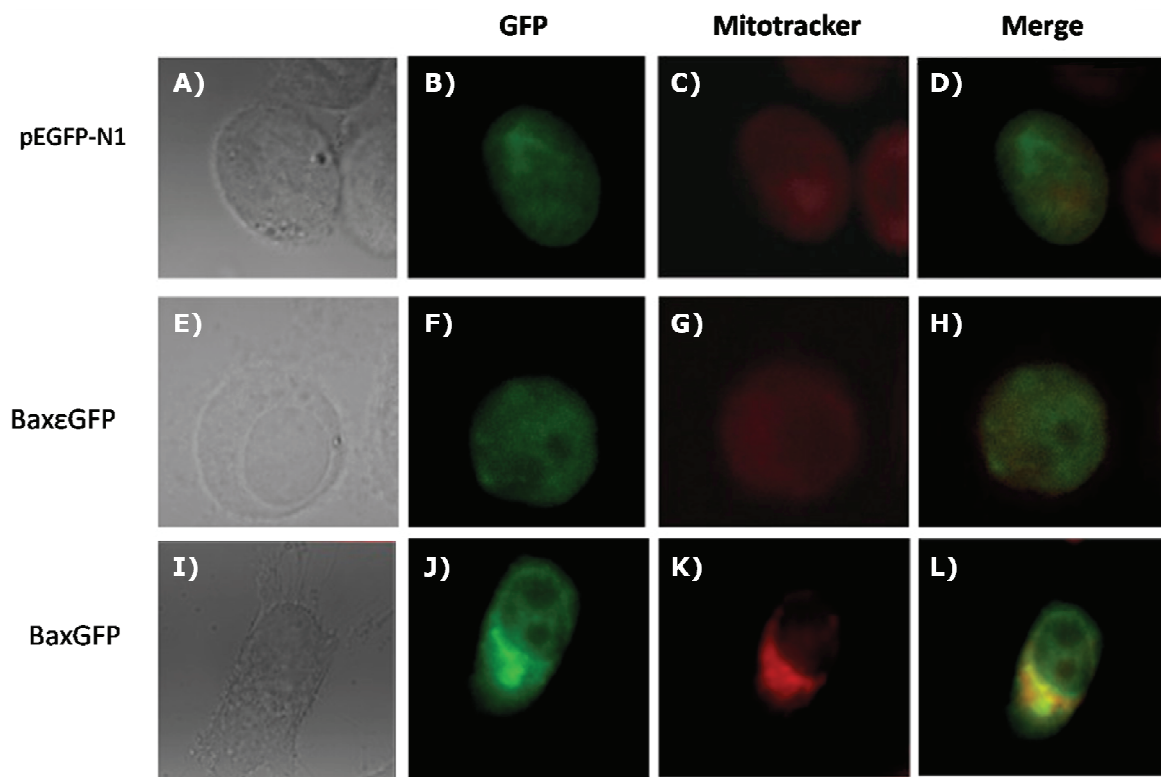


Figura 11. Microfotografías representativas de la expresión de las proteínas recombinantes BaxGFP y BaxεGFP en células PC3 y a las cuales se les realizó una tinción mitocondrial. A), E) e I): células en campo claro; B), F) y J): GFP; C), G) y K): mitotracker (marcador de mitocondria), las mitocondrias se ven de color rojo; D), H) y L): sobreposición de GFP y mitotracker.

### 7.3 Evaluación de la funcionalidad de las proteínas recombinantes

Una vez que se comprobó que la proteína BaxGFP colocalizaba con las mitocondrias, el siguiente paso fue evaluar si esta proteína era capaz de inducir apoptosis en la línea celular PC3. Se determinó el porcentaje de células en apoptosis a través de ensayos de TUNEL por citometría de flujo.

Como se observa en la figura 12, la proteína BaxGFP induce un mayor porcentaje de células en apoptosis en comparación con las proteínas BaxεGFP o EGFP.

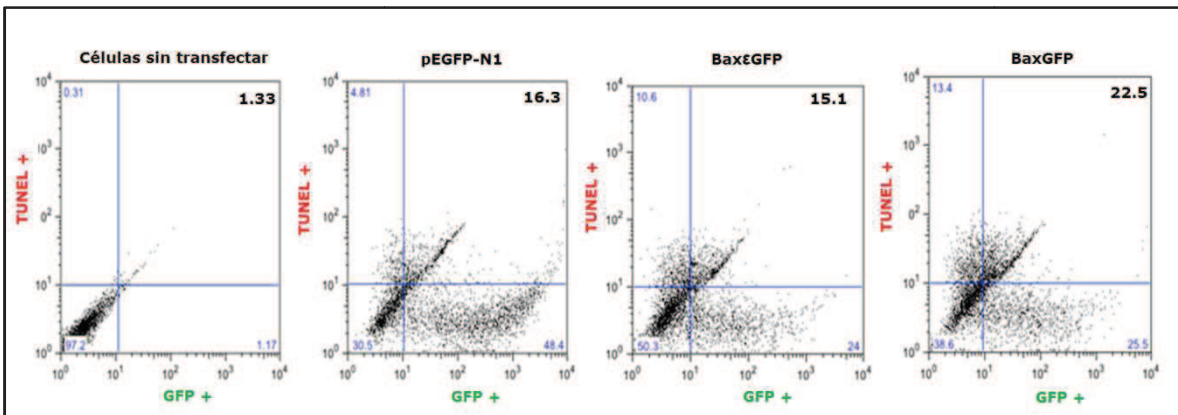


Figura 12. Citometría representativa que muestra la cuantificación de apoptosis de las células PC3 transfectadas con los diferentes plásmidos.

Asimismo, al graficar los resultados se observa que la diferencia de apoptosis causada por la proteína BaxGFP, es estadísticamente significativa en comparación con BaxεGFP ( $p < 0.05$ ). Figura 8.

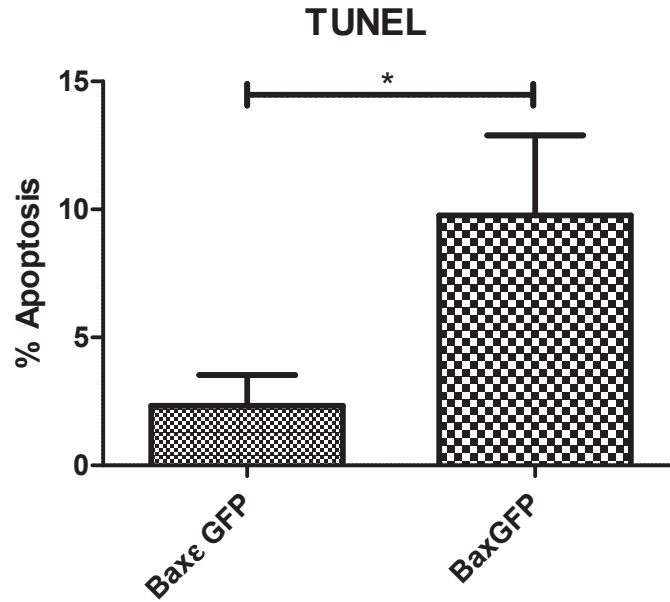


Figura 13. Comparación estadística de la apoptosis causada por el péptido BaxεGFP y el péptido BaxGFP. Se muestra la media de 3 resultados independientes. \*  $p < 0.05$ .

Con estos resultados se demostró que la proteína recombinante BaxGFP, expresada en la célula tumoral a través de un plásmido, no sólo colocaliza con la mitocondria, sino que induce la apoptosis de la célula tumoral.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, hace falta una estrategia que permita llevar el plásmido que codifica para el péptido antagónico en un sistema *in vivo*.

#### **7.4 Infección en células tumorales con *Salmonella enterica* que acarrea los plásmidos pEGFP-N1 o BaxGFP**

Como se mencionó anteriormente, los vectores bacterianos representan una alternativa para el transporte y liberación de plásmidos a la célula tumoral. Una vez que se comprobó la funcionalidad de los plásmidos mediante la transfección, se transformó la cepa *Salmonella enterica* SL3261 con los plásmidos pEGFP-N1 y BaxGFP para emplearla como vehículo de liberación.

Con la cepa SL3261 transformada, se procedió a infectar las líneas celulares THP-1 y PC3 para evaluar si *Salmonella* libera el plásmido que codifica para el péptido antagónico o el vector vacío.

Los resultados muestran que tanto la línea celular THP-1 (figura 14) como la línea celular PC3 (figura 15), expresan la proteína recombinante después de la infección por *Salmonella*.



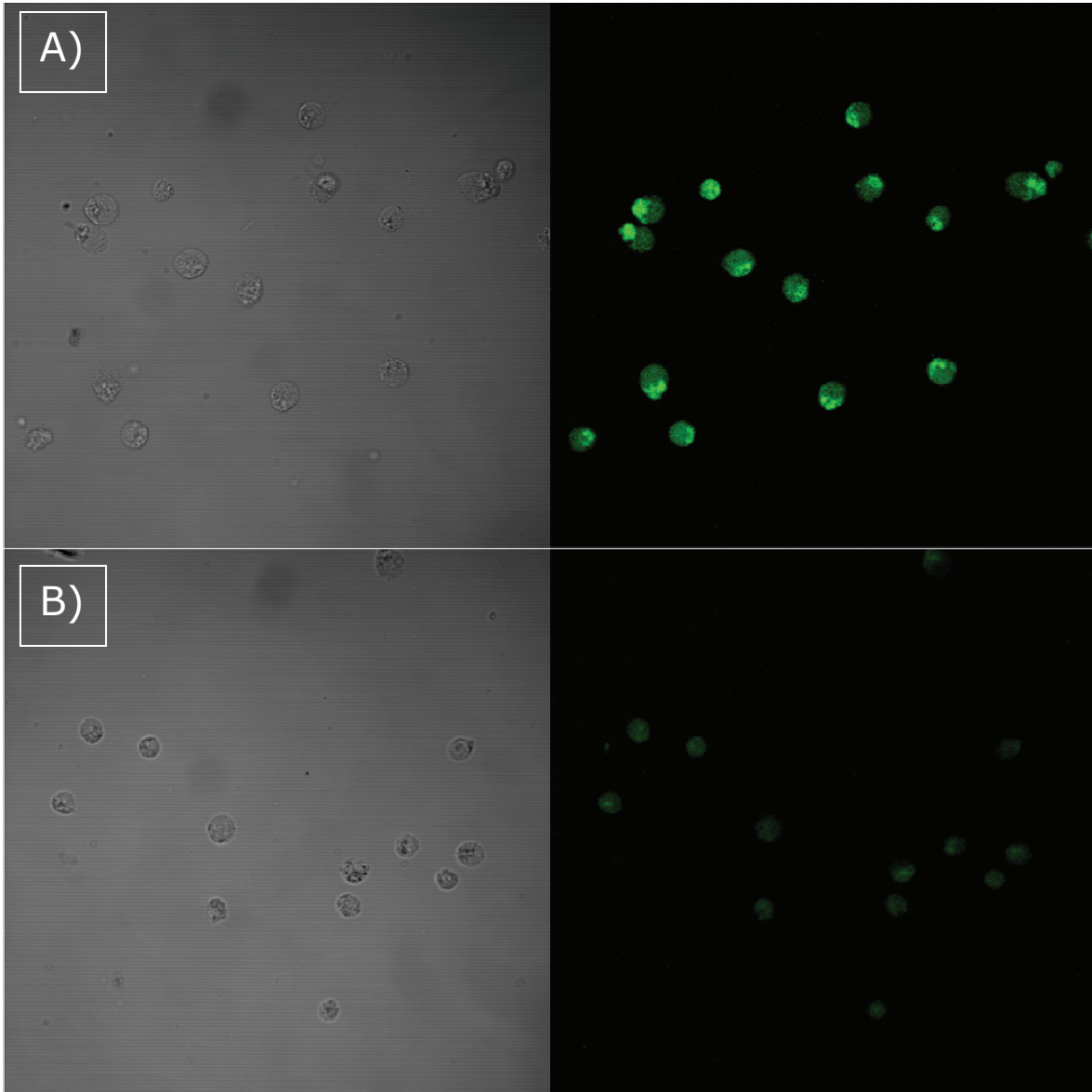


Figura 14. Micrografías representativas de la expresión de la proteína recombinante en células THP-1 a 72 horas de haber sido infectadas con las *Salmonellas* que acarrean los plásmidos A) pEGFP-N1 y B) BaxGFP. Se muestran las células en campo claro y con GFP.

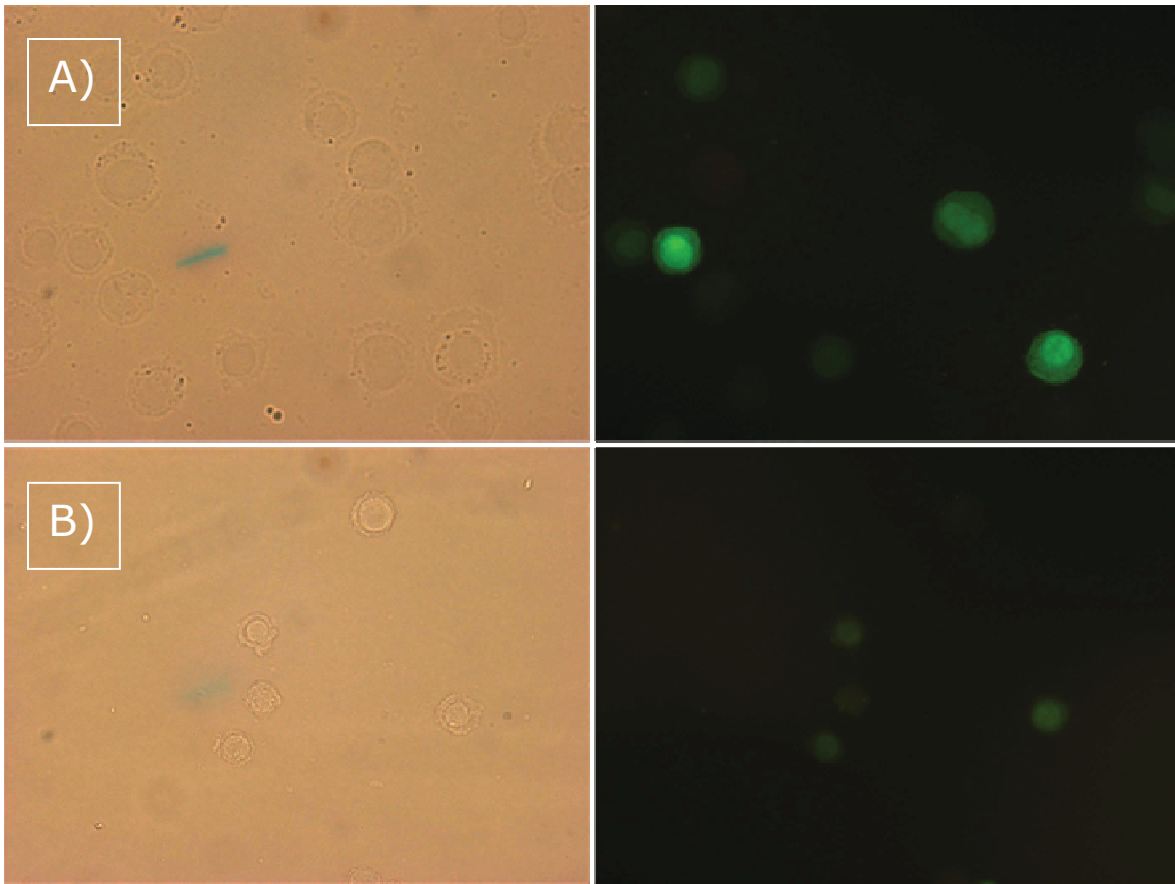


Figura 15. Micrografías representativas de la expresión de la proteína recombinante en células PC3 72 horas después de haber sido infectadas con las *Salmonellas* que acarrean los plásmidos A) pEGFP-N1 y B) BaxGFP. Se muestran las células en campo claro y con GFP.

## 8. Discusión

El cáncer es un problema de salud pública tanto a nivel mundial como a nivel nacional. Aunque existen diversas formas de terapia; entre ellas la quimioterapia, uno de los grandes obstáculos que se presenta en este tratamiento es que la célula tumoral desarrolla de mecanismos de resistencia a los fármacos. Entre estos mecanismos encontramos la sobre-expresión de las proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2 que se ha asociado a la resistencia a la quimioterapia en nefroblastomas, carcinoma de ovario, leucemia monocítica y en leucemia aguda de células T [19-23].

En los últimos años se han probado diversas estrategias para revertir la resistencia causada por las proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2; entre ellas está el uso de fármacos miméticos al dominio BH3 de las proteínas pro-apoptóticas. Un ejemplo de estos fármacos es el ABT737, que es un antagonista Bcl-xL y Bcl-2. Este fármaco mostró inducir un gran efecto apoptótico en cáncer de pulmón; sin embargo, en un modelo de leucemia aguda mieloide no indujo apoptosis debido a que la resistencia a la quimioterapia se ha asociado a la sobre-expresión de la proteína Mcl-1 [55].

Una de las estrategias más novedosas que se han evaluado, es el empleo de péptidos sintéticos de la región BH3 de las proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bak y Bad. Se ha observado que estos péptidos

pueden bloquear la actividad de las diferentes proteínas anti-apoptóticas, incluyendo a Mcl-1 [56] y han demostrado ser efectivos en inducir apoptosis en distintas líneas celulares [13, 26, 27].

Aunque existen reportes contradictorios que indican que la actividad de estos péptidos puede ser bloqueada por una sobre-expresión de Bcl-2 o Bcl-xL [57, 58], cabe resaltar que el sistema de transporte de estos péptidos antagónicos puede ser una limitante debido a la cantidad de péptido que se está internalizando, además del que se pueda perder por degradación, por lo cual no se llegue a observar el efecto deseado.

Recientemente Ko y cols. [59] acoplaron los péptidos antagónicos pertenecientes a la región BH3 de Bak, Bid y Bad a la región carboxilo terminal de la proteína EGFP en el vector pEGFP-C1 y evaluaron su funcionalidad en la línea celular de cáncer cervical HeLa, previamente transfectada con plásmidos que codifican para Bcl-2 o Bcl-xL y así lograr la sobre-expresión de estas proteínas. Sin embargo, sus resultados muestran que la expresión de las proteínas recombinantes Bid, Bad y Bak acopladas a la proteína EGFP, no fueron capaces de inducir apoptosis en esta línea celular.

Este problema podría solucionarse con un sistema que nos garantice una gran cantidad del péptido antagónico dentro de la célula tumoral.

Por lo tanto, nosotros planteamos que un plásmido sea el encargado de codificar para el péptido antagónico, para que sea la propia célula tumoral la encargada de producirlo en grandes cantidades.

Se clonó la secuencia que codifica para el péptido antagónico de la región BH3 de Bax en el sitio de multiclonación del plásmido pEGFP-N1. De esta forma el péptido se encuentra en la región amino terminal de la proteína EGFP, con lo que se asegura su expresión.

En este trabajo, se evaluó la capacidad de la proteína recombinante BaxGFP de inducir apoptosis en la línea celular de cáncer de próstata PC3, que se ha reportado que es resistente a la quimioterapia. Esta resistencia se ha asociado a la sobre-expresión de Bcl-xL [60].

Como se muestra en la figura 11 la proteína recombinante BaxGFP puede colocalizar con la mitocondria, que es donde las proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-xL, se encuentran ejerciendo su efecto anti-apoptótico. Lo que podría sugerir una interacción entre la proteína BaxGFP y alguna proteína anti-apoptótica. Esta colocalización no se observa al emplear el vector vacío o la proteína recombinante mutada Bax $\epsilon$ GFP.

Los resultados muestran que la apoptosis causada por la proteína BaxGFP es mayor que la producida por la proteína mutante o el vector vacío (figura 12 y 13).

Aunque los niveles de apoptosis parecieran no ser muy altos, cabe mencionar que la técnica que empleada sólo determina las células que están en apoptosis tardía y se realizó en un periodo de 24 horas, por lo que si también se evaluara a otros periodos de tiempo, ya sea a 48 ó 72 h, es probable que se encuentre un mayor porcentaje de células en apoptosis.

Adicionalmente, este sistema podría ser empleado en conjunto con la quimioterapia en aquellas células que son resistentes debido a la sobre-expresión de las proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2, para que la quimioterapia ahora sí sea efectiva.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, otro de los problemas del empleo de los péptidos sintéticos es la cantidad necesaria para tener una buena inducción de apoptosis en un modelo *in vivo*. Ésta también podría ser una limitante en el empleo del plásmido que codifica para el péptido antagónico, ya que se necesitarían también grandes cantidades y no se sabría que tanto plásmido podría estar ingresando a la célula tumoral. Por lo cual, el uso de vectores bacterianos, como *Salmonella enterica*, representa una estrategia interesante para acarrear estos plásmidos al tejido tumoral en un modelo *in vivo*, ya que se ha observado que tiene una selectividad por el tejido tumoral de 1000:1 con respecto al tejido normal [29]; con lo que se estaría asegurando el transporte del plásmido al tejido tumoral.

Otra ventaja de emplear a *Salmonella enterica* es la capacidad de la bacteria *per se* de inducir una respuesta inmune capaz de retardar el crecimiento tumoral o eliminar el tumor [36, 61].

Nuestros resultados muestran, que efectivamente, *Salmonella enterica* es capaz de transferir el plásmido que codifica para el péptido antagónico en la línea celular THP-1 (figura 14), ya que en una infección por *Salmonella*, estas células asemejarían el nicho natural de la bacteria. También se observó que *Salmonella enterica* es capaz de transferir el material genético en una estirpe celular que no es su nicho natural, como lo es la línea celular de cáncer de próstata PC3 (figura 15).

Con base en estos resultados, mostramos que hemos desarrollado un plásmido que nos garantizará la cantidad suficiente de péptido antagónico a la actividad de las proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2, que puede ser empleado en aquellas neoplasias donde éstas estén sobre-expresadas.

Además se demostró que este plásmido puede ser transportado hacia la célula tumoral a través de un vector bacteriano como *Salmonella enterica*.

Con esta nueva herramienta, se pueden llevar los péptidos antagónicos selectivamente al tejido tumoral y así buscar revertir la resistencia

producida por la sobre-expresión de las proteínas anti-apotóticas de la familia de Bcl-2.



## 9. Conclusiones

- El péptido antagónico de la región BH3 de Bax, que está fusionado a una proteína reportera (BaxGFP), interactúa con las proteínas presentes en la mitocondria, donde la proteína mutada (BaxεGFP) no lo hace.
- La proteína recombinante BaxGFP es capaz de inducir apoptosis en la línea celular de cáncer de próstata PC3, no así la proteína mutante BaxεGFP.
- *Salmonella enterica serovar typhimurium* es capaz de liberar el plásmido que codifica para la proteína recombinante BaxGFP a distintas estirpes celulares.
- Se desarrolló un sistema funcional de liberación de plásmidos que codifican para un péptido antagónico a la actividad de las proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2, a través de un vector bacteriano (*Salmonella enterica*), lo cual nos permitirá llevar estos péptidos al tejido tumoral *in vivo*.

## 10. Referencias

1. OMS, *Cancer. Media center*, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, 2011.
2. GLOBOCAN, *IARC, Section of Cancer Information (17/6/2011)*. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>, 2011.
3. INEGI, *A propósito del día mundial del cáncer*. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2781&ep=51>, 2011.
4. CeNSIA, *15 de febrero, día mundial del cáncer infantil*. <http://www.censia.salud.gob.mx/contenidos/vinculacion/sintesis1.html>, 2011.
5. Helleday, T., et al., *DNA repair pathways as targets for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(3): p. 193-204.
6. Luqmani, Y.A., *Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy*. *Med Princ Pract*, 2005. **14 Suppl 1**: p. 35-48.
7. Zamble, D.B. and S.J. Lippard, *Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy*. *Trends Biochem Sci*, 1995. **20**(10): p. 435-9.
8. NCI, <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento>. 2011.

9. Stavrovskaya, A.A., *Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells*. Biochemistry (Mosc), 2000. **65**(1): p. 95-106.
10. Shamas-Din, A., et al., *BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis*. Biochim Biophys Acta, 2010.
11. Johnstone, R.W., A.A. Ruefli, and S.W. Lowe, *Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy*. Cell, 2002. **108**(2): p. 153-64.
12. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 231-41.
13. Shangary, S. and D.E. Johnson, *Peptides derived from BH3 domains of Bcl-2 family members: a comparative analysis of inhibition of Bcl-2, Bcl-x(L) and Bax oligomerization, induction of cytochrome c release, and activation of cell death*. Biochemistry, 2002. **41**(30): p. 9485-95.
14. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. Oncogene, 2007. **26**(9): p. 1324-37.
15. Chipuk, J.E., et al., *The BCL-2 family reunion*. Mol Cell, 2010. **37**(3): p. 299-310.
16. Degli Esposti, M. and C. Dive, *Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(3): p. 455-61.

17. Semaan, S.J. and R.W. Nickells, *The apoptotic response in HCT116BAX<sup>-/-</sup> cancer cells becomes rapidly saturated with increasing expression of a GFP-BAX fusion protein.* BMC Cancer, 2010. **10**: p. 554.
18. Sattler, M., et al., *Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis.* Science, 1997. **275**(5302): p. 983-6.
19. Ghanem, M.A., et al., *The prognostic significance of apoptosis-associated proteins BCL-2, BAX and BCL-X in clinical nephroblastoma.* Br J Cancer, 2001. **85**(10): p. 1557-63.
20. Williams, J., et al., *Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease.* Gynecol Oncol, 2005. **96**(2): p. 287-95.
21. Schmitt, E., et al., *Bcl-xL modulates apoptosis induced by anticancer drugs and delays DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities.* Exp Cell Res, 1998. **240**(1): p. 107-21.
22. Noutomi, T., et al., *Bcl-x(L) confers multi-drug resistance in several squamous cell carcinoma cell lines.* Oral Oncol, 2002. **38**(1): p. 41-8.
23. Skommer, J., T. Brittain, and S. Raychaudhuri, *Bcl-2 inhibits apoptosis by increasing the time-to-death and intrinsic cell-to-cell*

- variations in the mitochondrial pathway of cell death. Apoptosis, 2010. 15(10): p. 1223-33.*
24. Hacker, G. and A. Weber, *BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? Arch Biochem Biophys, 2007. 462(2): p. 150-5.*
  25. Moreau, C., et al., *Minimal BH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins. J Biol Chem, 2003. 278(21): p. 19426-35.*
  26. Li, R., et al., *Targeting antiapoptotic Bcl-2 family members with cell-permeable BH3 peptides induces apoptosis signaling and death in head and neck squamous cell carcinoma cells. Neoplasia, 2007. 9(10): p. 801-11.*
  27. Holinger, E.P., T. Chittenden, and R.J. Lutz, *Bak BH3 peptides antagonize Bcl-xL function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases. J Biol Chem, 1999. 274(19): p. 13298-304.*
  28. Kotton, C.N. and E.L. Hohmann, *Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. Infect Immun, 2004. 72(10): p. 5535-47.*
  29. Pawelek, J.M., K.B. Low, and D. Bermudes, *Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector. Cancer Res, 1997. 57(20): p. 4537-44.*

30. Wei, M.Q., et al., *Facultative or obligate anaerobic bacteria have the potential for multimodality therapy of solid tumours*. Eur J Cancer, 2007. **43**(3): p. 490-6.
31. Mittrucker, H.W. and S.H. Kaufmann, *Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(4): p. 457-63.
32. Kasinskas, R.W. and N.S. Forbes, *Salmonella typhimurium specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue in vitro*. Biotechnol Bioeng, 2006. **94**(4): p. 710-21.
33. Kasinskas, R.W. and N.S. Forbes, *Salmonella typhimurium lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis*. Cancer Res, 2007. **67**(7): p. 3201-9.
34. Stritzker, J., et al., *Enterobacterial tumor colonization in mice depends on bacterial metabolism and macrophages but is independent of chemotaxis and motility*. Int J Med Microbiol, 2010. **300**(7): p. 449-56.
35. Zhao, M., et al., *Monotherapy with a tumor-targeting mutant of Salmonella typhimurium cures orthotopic metastatic mouse models of human prostate cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10170-4.

36. Zhao, M., et al., *Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 755-60.
37. Zhao, M., et al., *Targeted therapy with a Salmonella typhimurium leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice*. Cancer Res, 2006. **66**(15): p. 7647-52.
38. Hayashi, K., et al., *Systemic targeting of primary bone tumor and lung metastasis of high-grade osteosarcoma in nude mice with a tumor-selective strain of Salmonella typhimurium*. Cell Cycle, 2009. **8**(6): p. 870-5.
39. Toso, J.F., et al., *Phase I study of the intravenous administration of attenuated Salmonella typhimurium to patients with metastatic melanoma*. J Clin Oncol, 2002. **20**(1): p. 142-52.
40. Fensterle, J., et al., *Cancer immunotherapy based on recombinant Salmonella enterica serovar Typhimurium aroA strains secreting prostate-specific antigen and cholera toxin subunit B*. Cancer Gene Ther, 2008. **15**(2): p. 85-93.
41. Sorenson, B.S., et al., *Attenuated Salmonella typhimurium with IL-2 gene reduces pulmonary metastases in murine osteosarcoma*. Clin Orthop Relat Res, 2008. **466**(6): p. 1285-91.
42. Loeffler, M., et al., *IL-18-producing Salmonella inhibit tumor growth*. Cancer Gene Ther, 2008. **15**(12): p. 787-94.

43. Ganai, S., R.B. Arenas, and N.S. Forbes, *Tumour-targeted delivery of TRAIL using Salmonella typhimurium enhances breast cancer survival in mice*. Br J Cancer, 2009. **101**(10): p. 1683-91.
44. Loeffler, M., et al., *Salmonella typhimurium engineered to produce CCL21 inhibit tumor growth*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(5): p. 769-75.
45. Schaffner, W., *Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(4): p. 2163-7.
46. Palffy, R., et al., *Salmonella-mediated gene therapy in experimental colitis in mice*. Exp Biol Med (Maywood). **236**(2): p. 177-83.
47. Gardlik, R., et al., *Effects of orally administered bacteria carrying HIF-1alpha gene in an experimental model of intestinal ischemia*. Arch Med Res. **41**(5): p. 332-7.
48. Souders, N.C., T. Verch, and Y. Paterson, *In vivo bactofection: listeria can function as a DNA-cancer vaccine*. DNA Cell Biol, 2006. **25**(3): p. 142-51.
49. Zhang, L., et al., *Intratumoral delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium carrying plasmid-based small interfering RNAs*. Cancer Res, 2007. **67**(12): p. 5859-64.



50. Yang, N., et al., *Oral administration of attenuated S. typhimurium carrying shRNA-expressing vectors as a cancer therapeutic.* Cancer Biol Ther, 2008. **7**(1): p. 145-51.
51. Jiang, Z., et al., *Using attenuated Salmonella typhi as tumor targeting vector for MDR1 siRNA delivery.* Cancer Biol Ther, 2007. **6**(4): p. 555-60.
52. Agorio, C., et al., *Live attenuated Salmonella as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma.* J Gene Med, 2007. **9**(5): p. 416-23.
53. Hoiseth, S.K. and B.A. Stocker, *Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines.* Nature, 1981. **291**(5812): p. 238-9.
54. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2001: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
55. van Delft, M.F., et al., *The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized.* Cancer Cell, 2006. **10**(5): p. 389-99.
56. Kazi, A., et al., *The BH3 alpha-helical mimic BH3-M6 disrupts Bcl-X(L), Bcl-2, and MCL-1 protein-protein interactions with Bax, Bak, Bad, or Bim and induces apoptosis in a Bax- and Bim-dependent manner.* J Biol Chem. **286**(11): p. 9382-92.

57. Kuwana, T., et al., *BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly*. Mol Cell, 2005. **17**(4): p. 525-35.
58. Letai, A., et al., *Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics*. Cancer Cell, 2002. **2**(3): p. 183-92.
59. Ko, J.K., et al., *Amphipathic tail-anchoring peptide and Bcl-2 homology domain-3 (BH3) peptides from Bcl-2 family proteins induce apoptosis through different mechanisms*. J Biol Chem, 2011. **286**(11): p. 9038-48.
60. Lebedeva, I., et al., *Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity*. Cancer Res, 2000. **60**(21): p. 6052-60.
61. Vendrell, A., et al., *A novel Salmonella Typhi-based immunotherapy promotes tumor killing via an antitumor Th1-type cellular immune response and neutrophil activation in a mouse model of breast cancer*. Vaccine, 2011. **29**(4): p. 728-36.