

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE MEDICINA**

**DESARROLLO DE UNA VACUNA PREVENTIVA  
CONTRA EL VIH, BASADA EN BCG  
RECOMBINANTE**

**TESIS DOCTORAL: ELIAS B. PEZZAT SAID  
21 DE JUNIO DE 2005**

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

### III-1 Diseño del estudio:

En una primera fase del proyecto, se desarrollaron las cepas BCG recombinantes, salvaje. Construimos mediante ingeniería genética los diferentes vectores de expresión micobacteriano, a partir de los vectores parentales pMV261 y pMV361. Se desarrollaron 3 cepas BCG recombinantes expresando la proteína completa gp120 de la envuelta del VIH, cepa (HXBC2). Se evaluaron diferentes promotores de BCG para inducir la expresión de la proteína heteróloga del VIH. Inicialmente usamos el promotor hsp60 de BCG, un promotor fuerte que ha demostrado ser uno de los más eficaces y posteriormente, se probó con un promotor débil denominado  $\alpha$  - antígeno. Una vez obtenidas las diferentes cepas BCG recombinantes se evaluó la expresión *in vitro* de la proteína mediante la técnica de Western blot.

En una segunda fase evaluamos *in vivo* la respuesta inmune celular específica, en un modelo animal murino. Se inmunizaron ratones con las cepas BCGr: 222VIHA, BCGr: 223VIHA y virus vaccinia modificado cepa Ankara (VAM), expresando el inmunogeno del VIHA correspondiente a la proteína entera gag y envuelta del subtipo A predominante en África del este, más diferentes epítomos CTL de nef, pol. La respuesta específica de células T CD8+, se detectó por la tinción de los tetrámeros y por la tinción intracelular de interferón- $\gamma$ .

### III-2 Ámbito del Estudio

La fase experimental de este trabajo, se desarrolló en el Laboratorio del grupo de investigación y desarrollo de vacunas frente al VIH, de la Unidad de Estudio del VIH/SIDA del Hospital Clínic de Barcelona, en estrecha colaboración con el Laboratorio de vacunas contra el VIH SIDA del **Dr. Thomas Hanke** de la Unidad de Inmunología Humana de la Universidad de **Oxford, R.U.**

### III-3 Cepas bacterianas y medios de cultivo.

Las cepas bacterianas y los medios de cultivos usados en este estudio se encuentran en el listado de la tabla 1. Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio de cultivo líquido LB caldo de Miller (Difco) o en placas de LB agar Miller (Difco) a 37° C. El medio LB fue suplementado con kanamicina (40 µg/ml). Las cepas BCG salvaje y lisina auxotrófica se transformaron con el vector de expresión micobacteriano plasmídico mediante electroporación. Para la transformación, tomamos 100 µl de suspensión de BCG y se mezclaron con 1 µl del ADN plasmídico en una cubeta de electroporación mantenida a 4° C y se transformaron utilizando el electroporador (Biorad Gene Pulser electroporator) a 2.5 kV. Después de la electroporación, añadimos 1ml de medio 7H9 Middlebrook (Difco) suplementado con Glicerol 0,17%, Tween 80 0,05% y albumina-dextrosa-catalasa (ADC) y el cultivo se incubó a 37° C durante la noche. La selección de cepas BCG transformantes positivas se realizó en placas con medio 7H10 agar Middlebrook de (Difco) suplementadas con Glicerol al 0,17 % Tween 80 al 0,05 %, albúmina – dextrosa - catalasa (ADC, Difco) y Kanamicina (25 µg/ml). Las cepas de BCG Lys A (-) recombinantes se cultivaron en medio líquido 7H9, caldo Middlebrook (Difco) también suplementado con Glicerol 0,17 %, ADC (Difco), Tween 80 0,05 % y Kanamicina (25 µg/mL) a 37° C.

## Material y Métodos

Tabla 1. Lista de cepas y plásmidos usados en este proyecto

Cepas y plásmidos	Características importantes	Referencia
<b>Cepas bacterianas</b>		
<i>Mycobacteria bovis</i> , BCGwt o Salvaje	1173 P2 cepa Pasteur	Gheoghiu M. , et al (1988)
<i>Mycobacteria bovis</i> , BCG lisina auxotrófica	Pasteur $\Delta$ lysA5::res	Jacobs W., et al (1999)
<i>E. coli</i> JM109		Innogenetics
<b>Plasmados</b>		
pMV261	Km <sup>r</sup> ; E.coli-Micobacteria vector puente; vector replicativo y extracromosomal.	Stover et al.,(1991)
pJH222	Vector replicativo y extracromosomal, resistencia a kanamicina, complementado con el gen para lisina. Derivado de pMV261	Bloom B. y Jacobs W.
PJH223	Vector Integrativo, resistencia a kanamicina, complementado con el gen de lisina. Derivado de pMV306	Bloom B. y Jacobs W.
<b>pMV261::HIV-1gp120</b>		<b>Este trabajo</b>
<b>pJH222::HIV-1gp120</b>		<b>Este trabajo</b>
<b>PJH223::HIV-1gp120</b>		<b>Este trabajo</b>

Km<sup>r</sup> : resistente a la kanamicina.

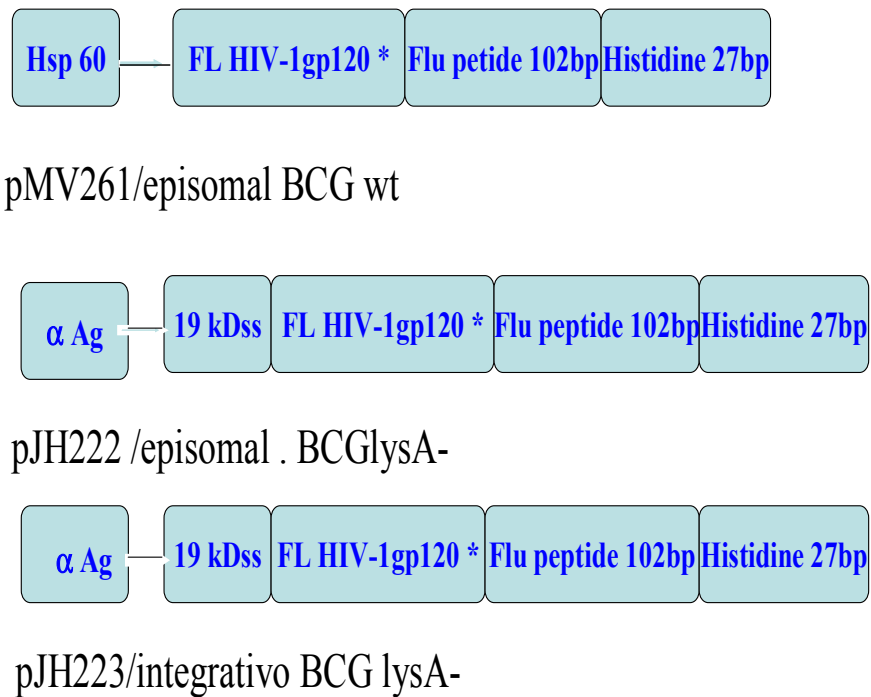
### III-4 Construcción de los vectores de expresión micobacterianos

Los vectores de expresión micobacteriano pMV261 y pMV361 fueron usados como plásmidos templados para la construcción de todos los vectores de expresión en BCG (**tabla 1**). Se utilizó la técnica de PCR para sintetizar la secuencia nucleotídica completa codificante de gp120 del VIH-1 cepa HXBC2 (número de acceso en gene bank : AF 041850), cedida por Nortman Letvin. Para ello, usamos el iniciador (primer) específico del gen correspondiente generando sitios de restricción enzimática específicos para clonarlo en los vectores extracromosomales y multicopia (**pMV261** y **pJH222**) bajo el control de los promotores hsp 60 y  $\alpha$ -antígeno de BCG, respectivamente y el vector integrativo monocopia (**pJH223**) también bajo el control del promotor  $\alpha$ -antígeno. Las secuencias para los vectores pJH222 y pJH223 las clonamos, fusionadas a la secuencia de ADN correspondiente a la secuencia señal de la lipoproteína 19 kD de *Mycobacterium tuberculosis* (**tabla 2**), proteína anclada en la pared celular, con el objetivo de que la proteína sintetizada en BCG fuera secretada y facilitar así la presentación del antígeno vía HLA-clase 1, para inducir la respuesta de células T CD8+ citotóxicas. Con el propósito de poder detectar la expresión de la proteína del VIH mediante Western blot, fusionamos a continuación de la secuencia del VIH, la secuencia correspondiente al epítipo hemaglutinina del virus influenza (**figura 1**).

\*(Cedidos por el Laboratorio de W. Jacobs, a nuestra unidad)

**Tabla 2. Características de los vectores usados**

VECTOR SHUTTLE	PROMOTOR	SECUENCIA -SEÑAL
pMV261*	Hsp 60	-----
pJH222*	$\alpha$ -antígeno	lipoproteína 19KDa
pJH223*	$\alpha$ -antígeno	lipoproteína 19KDa



**Figura 1.** Construcción de los vectores de expresión

### III-5 Evaluación de la expresión de la proteína por la técnica de Western blot .

Las cepas transformadas de BCG se cultivaron en medio líquido de cultivo 7H9 (Difco) hasta alcanzar una densidad óptica de 0,8 - 1,00 (600 nm). El medio fue suplementado con kanamicina (25  $\mu$ g/mL). Los cultivos de BCGr se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a 4<sup>0</sup> C. Las células sedimentadas fueron lavadas dos veces con suero fisiológico salino (PBS) más Tween-80 al 0.02 % y resuspendidas en 1ml de tampón de extracción de proteínas: 50mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM EDTA, 0.6 % de sodium dodecyl sulfate (SDS) y 5  $\mu$ l de cocktail inhibidor de proteasas (1mg/ml aprotinin, 1mg/ml E-64, 1mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepstatin A, 50mg/ml pefabloc SC, and 10 ml DMSO).

## Material y Métodos

---

Las células se sonicaron durante 4 periodos de 1 minuto cada uno, en frío (sonicador Branson). Los extractos celulares fueron centrifugados a 14000 rpm durante 10 minutos a 4° C y los sobrenadantes se conservaron a -80° C. Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 15 %. Después se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con el anticuerpo primario-monoclonal de ratón antiépítipo (YPYDVPDYA) de la hemaglutinina HA11 del virus influenza. El anticuerpo secundario fue un antiratón conjugado con peroxidasa.

### III-6 Procedimientos para la inmunización

Se inmunizaron ratones de 7 semanas de edad de la cepa BALB/c (H-2<sup>d</sup>), inyectando por vía subcutánea 10<sup>7</sup> u.f.c. (unidades formadoras de colonia) de BCGr (cepa +) expresando el inmunógeno VIHA correspondiente a la proteína entera gag más diferentes epítipos CTL de nef, pol y env del subtipo A, predominante en África del Este. También incluye el epítipo CTL inmunodominante p11 C del gen gag del VIS y el epítipo CTL p18 H<sub>2</sub>d HLA murino restringido (figura 1). Incluimos un grupo control de ratones a los que se inyectó BCG (cepa -) sin contener el fragmento de ADN correspondiente a la secuencia del VIH. A otro grupo de ratones se les inyectó la misma cepa de BCGr (cepa +) y a las 2 semanas del tiempo cero se volvieron a inmunizar con el virus vaccinia modificado cepa Ankara (VAM) expresando el mismo inmunógeno, con el régimen de inmunización de inducción-refuerzo (priming-boost). Se evaluó la respuesta celular T CD8<sup>+</sup> específica frente al VIH, por la técnica de tetrámeros y mediante la detección de IFN- $\gamma$  por tinción intracelular, en la semana 2 y 4, después de las respectivas inmunizaciones.



## Inmunógeno VIH1A

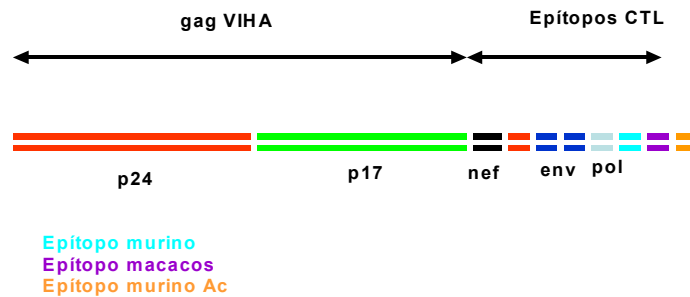


Figura 1. Inmunógeno VIH1A

### Evaluación de respuesta específica de linfocitos T CD8+, marcados con tetrámeros y leídos por citometría de flujo:

Usamos los tetrámeros, donados por el Dr. Thomas Hanke. Estos complejos se preparan como ha descrito previamente por Altman J.D. et al. 1998 y se caracterizan por contener moléculas de HLA con cuatro péptidos p18. Incubamos cien mil células provenientes del bazo, con anticuerpos anti Cd16/CD32, a continuación los esplenocitos se lavaron y se marcaron fluorescentemente con tetrámeros antiCD8 y anti CD3. Las células se fijaron y se pasaron por el FACScan Becton Dickenson. Esto nos permitió detectar a los linfocitos CD8+ citotóxicos específicos contra el péptido correspondiente en los cultivos de esplenocitos incubados a 37°C por 5 días.

### **Tinción intracelular de citocinas**

Analizamos la producción intracelular de IFN- $\gamma$  proveniente de los esplenocitos de cada ratón. Para ello se incubaron cien mil células junto con  $1 \times 10^4$  células P815 y el péptido p18 (2  $\mu\text{g/ml}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  durante una hora y media. Se agregó Brefeldina A (BD), para evitar la exportación de vesículas provenientes del aparato de Golgi a la membrana, se incubaron 6 hrs a  $37^\circ\text{C}$ . Enseguida se lavaron con una solución de lavado (PBS, ácida sódica y BSA), las muestras se tiñeron con anticuerpos antiCD8 y antiCD3 marcados fluorescentemente. Se permeabilizó la membrana con solución Cytofix/Cytoperm (BD) y se tiñó intracelularmente el interferon gamma. Finalmente se lavaron las células dos veces y se fijaron antes de la lectura. Se leyeron en un FACScan Becton Dickinson, para analizar la expresión de citocinas.

### **Aislamiento de ADN plasmídico y secuenciación de ADN.**

Para aislar el ADN plasmídico de las cepas recombinantes de E.coli y BCG, usamos el Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Germany). Para las micobacterias incluimos una modificación en la técnica QIAprep Spin, consistente en agregar lysozima a una concentración de 10  $\text{mg/ml}$ , después de resuspender el pellet de células con el buffer P1. Las muestras se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ , con agitación toda la noche. El plásmido micobacteriano fue nuevamente transformado en E.coli JM109 y posteriormente se realizó extracción. El ADN plasmídico de E.coli se utilizó como templado para el análisis por PCR. Por último el ADN fue purificado para determinar su secuencia de nucleótidos usando el Kit de secuenciación Big Dye Terminator v3.1, en el equipo secuenciador ABI prism 377. Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas se realizaron usando el software CLUSTALW.

### **RT-PCR del ARNm del IFN- $\gamma$**

Para la diferenciación de ARNm de IFN- $\gamma$  se emplearon  $10^7$  células del bazo y ganglios linfáticos de los ratones, en medio R10 (BIOWEST) suplementado con (SFB 10% inactivado, HEPES,  $\beta$ -mercaptoetanol y gentamicina 40  $\mu\text{g/ml}$ ). Se adicionaron con el péptido en estudio p18 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y concanavalina A, como

## Material y Métodos

---

control + (10 ug/ml), respectivamente a los cultivos para inducir el IFN- $\gamma$ , se incubaron 72 hrs a 37 °C.

Para la extracción de ARN los pellet de cada cultivo de células, se lavó con PBS y fueron lisados con 700 ul de trisol cada uno. Se agrego cloroformo e isopropanol para purificar el ARN. El ARN se separo por centrifugación a 14000 rpm a 4°C (fase acuosa). Cuantificamos el ARN por espectrofotometría determinando el volumen que proporcionaba 1 ug del mismo, requerido para el siguiente protocolo.

Transcripción del ARN a ADNc: Transcribimos el ARN en ADN, a partir de un volumen que proporcionaba 1 ug de ARN como templado, adicionado de H<sub>2</sub>O (volumen variable), NTP (2 ul), para un volumen final de 12 ul. La mezcla se incubo a 65° C/5 minutos en el termociclador. Se trató con 1ul de RNAsa, buffer 5x (4 ul), DTT 0,1 M (2 ul) para evitar su degradación y se continuo con la reacción incubando 42°C/2 minutos. Por ultimo se agrego la enzima retrotranscriptasa (1ul), para un volumen final de 20 ul y se termino el programa 42° C/50 minutos ; 70° C/15 minutos y 4°C, para esta reacción se uso el Kit Super Scrit II RNase H', transcriptasa inversa (Invitrogen).

Analisis por PCR de ADNc: Se usaron 2 ul del ADNc, con los primer específicos delantero y reversa específicos (50 pmol/ul) 1 ul de c/u, PCRMix (12.5 ul) y H<sub>2</sub>O (8,5 ul), aplicamos el programa de PCR 35 ciclos: 95° C/5 minutos, 95° C/30 segundos, 58° C/30 segundos, 72° C/60 segundos 72° C/7 minutos y 4° C, en el termociclador. En ambos casos se uso H<sub>2</sub>O y ADNc de células sin estimular, como controles negativos de calidad para estos protocolos.