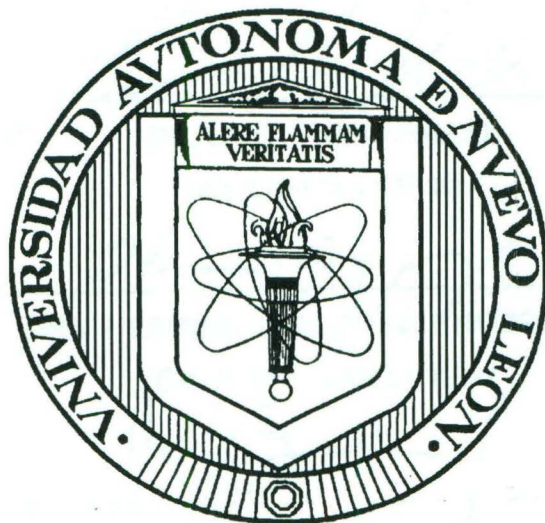


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**“DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y ANALISIS FUNCIONAL DE
VECTORES ADENOVIRALES”**

POR:

FELIPA CASTRO PERALTA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**



NOVIEMBRE DEL 2001

TESIS

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BILOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA EN IRVINE CA., Y EN LA UNIDAD DE LABORATORIOS DE INGENIERÍA Y EXPRESIÓN GENÉTICAS DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN EN MONTERREY NL, BAJO LA ASESORÍA DEL DR. LUIS P. VILLARREAL Y LA DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis P. Villarreal, primero por haberme aceptado como Estudiante en su Laboratorio y segundo, por haber tenido la paciencia de enseñarme y contagiarme de su entusiasmo por la CIENCIA, en especial por la Virología. Gracias por interesarse en mi formación y hacer grata mi estancia en UCI.

A la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez por su asesoría, interés y su comprensión a lo largo de todos estos años.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña por haberme aceptado en la ULIEG hace ya algunos años y haberme permitido aprender sobre el fascinante mundo de la Biología Molecular.

A la Comisión de Tesis: Dra. Agnes Revol y Dr. Gerardo Velazco, por sus sugerencias y su ayuda en la terminación de este Trabajo.

A Ana Ma. Sifuentes e Irma Alicia Martínez por 13 años de amistad!!!!.

A todos los miembros del Villarreal's Lab por hacer agradable mi vida en UCI.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca para la realización del Doctorado.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	i
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix

CAPÍTULO 1	PAGINA
INTRODUCCION	1
1.1 Adenovirus como agente viral	1
1.1.1 Aislamiento y clasificación	1
1.1.2 Estructura del virus	1
1.1.3 Ciclo infectivo	2
1.1.4 Biología Molecular	3
1.1.4.1 Genoma adenoviral	3
1.1.4.2 Proteínas virales	5
1.1.4.3 Replicación viral	6
1.2 Adenovirus como vector en la transferencia de genes	8
1.2.1 Terapia génica (vías, vectores y métodos)	8
1.2.2 Métodos no virales	8
1.2.3 Vectores virales	9
1.2.3.1 Características de los vectores virales	9
1.2.3.2 Vectores basados en virus de DNA	9
1.2.3.2.1 Adenovirus	10
1.2.3.2.2 Tipos de Adenovirus recombinantes	11
1.2.3.2.3 Tipos de ayudadores en el proceso de producción y propagación de Adenovirus recombinantes	12
1.3 Antecedentes directos	14
1.3.1 Baja eficiencia de la replicación de los plásmidos ayudadores	14
1.3.2 Requisitos del templado para la replicación y transcripción del genoma adenoviral	16
1.3.3 El Uso de un origen de replicación heterólogo para amplificar el número de copias y el uso de un promotor genérico para transcribir la región de genes tardíos en forma independiente al mecanismo de replicación	17
1.4 Justificación	18
1.5 Hipótesis	18
1.6 Objetivo general	18
1.6.1 Objetivos particulares	18

2.2.2 Análisis de la replicación, expresión de proteínas tardías y transcripción de los plásmidos ayudadores	32
2.2.2.1 Análisis de la replicación por Southern blot	32
2.2.2.1.1 Transfección transitoria de los plásmidos en células 293 y 293T	32
2.2.2.1.2 Extracción del DNA por el método de Hirt	32
2.2.2.1.3 Análisis de la replicación por Southern blot	32
2.2.2.2 Detección de proteínas adenovirales tardías por inmunofluorescencia	33
2.2.2.3 Detección de dos transcritos adenovirales (hexón y proteína terminal) por Northern Blot	34
2.2.2.3.1 Transfección transitoria de los plásmidos en células 293T	34
2.2.2.3.2 Extracción de RNA	34
2.2.2.3.3 Producción de las sondas para Northern blot	34
2.2.2.3.4 Northern blot	35
2.2.3 Construcción de pRFP (proteína roja fluorescente) y producción del recombinante adenoviral de tipo I	35
2.2.3.1 Construcción de pRFP	35
2.2.3.2 Producción del recombinante por co-transfección en células en cultivo	36
2.2.3.2.1 Co-transfección en células 293T	36
2.2.3.2.2 Ensayo en placa	36
2.2.3.2.3 Aislamiento y propagación de placas de lisis	36
2.2.3.2.3.1 Aislamiento	36
2.2.3.2.3.2 Determinación de la multiplicidad de la infección	37
2.2.3.2.3.3 Producción del primer stock viral	37
2.2.3.2.4 Identificación del recombinante adenoviral y análisis funcional	37
2.2.3.3 Producción del recombinante adenoviral pAdRFP por RH en <i>E. coli</i>	38
2.2.3.3.1 Producción del plásmido pAdRFP en <i>E. coli</i>	38
2.2.3.4 Propagación del Recombinante adenoviral	38
2.2.3.5 Purificación de los recombinantes por doble gradiente de cloruro de cesio	39

CAPITULO 3
RESULTADOS

3.1 Construcción de los plásmidos adenovirales ayudadores	40
3.1.1 pJM17ori+	40
3.1.1.1 La replicación genómica y subgenómica de pJM17ori+	40
3.1.1.2 El incremento en la replicación de pJM17ori+ activa la transcripción de los genes tardíos	43
3.1.2 Método D-loop/RH y estandarización de parámetros	45
3.1.2.1 D-loop: Alineamiento del oligo con el vector y digestión con nucleasa S1	45
3.1.2.2 Estandarización de las condiciones de transformación	48
3.1.2.2.1 Elección de la cepa bacteriana	48
3.1.2.2.2 Elección del método de transformación	48
3.1.3 Construcción de pAd520 y plásmidos intermediarios	50
3.1.3.1 Clonación del genoma de Ad5 en un plásmido de bajo número de copias: pAd520	50
3.1.3.2 Plásmidos intermediarios	52
3.1.3.2.1 pAd5HSV40 y pAd5HCMV	52
3.1.3.2.2 pUC3.4CMV	52
3.1.4 Construcción de cuatro vectores adenovirales ayudadores por RH	54
3.1.4.1 Plásmido pSV4057: inserción del origen SV40 en la región E3 de Adenovirus 5	54
3.1.4.2 Plásmidos pE13, pMLP31 y p13/31: inserción del promotor CMV en la región MLP y región E3 de Adenovirus 5	56
3.2 Replicación, expresión de proteínas tardías y detección de transcritos del hexón y la proteína terminal	60
3.2.1 Replicación: templado circular vs linearizado	60
3.2.2 Expresión de los genes tardíos: efecto del origen SV40 y el promotor CMV	63
3.2.3 Transcritos del hexón y la proteína terminal	65

3.3 Nuevo sistema adenoviral: pSV4057-293T	70
3.3.1 pSV4057c complementa la producción del recombinante pAdRFP (células en cultivo)	70
3.3.2 pSV4057I recombinado en <i>E. coli</i> , origina el recombinante pAdRFP en células 293T	72
CAPITULO 4	
DISCUSION	76
4.1 Resultados preliminares: pJM17 no replica en células 293	77
4.2 La Replicación genómica y subgenómica de pJM17ori	78
4.3 Método D-loop/RH y construcción de cuatro vectores ayudadores	79
4.4 Inestabilidad de pJM17 para los ensayos de RH	79
4.5 Análisis funcional de los plásmidos ayudadores	80
4.5.1 pE13, pMLP31 y p13/31 y el promotor CMV	80
4.5.2 pSV4057 y el origen SV40	81
4.6 Nuevo sistema adenoviral: pSV4057/293T	83
4.6.1 pSV4057c y la recombinación en células en cultivo y pSV4057I y la recombinación en <i>E. coli</i>	83
CAPITULO 5	
CONCLUSIONES	84
CAPITULO 6	
BIBLIOGRAFIA	86

LISTA DE FIGURAS

	PAGINA	
1	Micrografía Electrónica de AdENOVIRUS	2
2	Ciclo Infeccioso de Adenovirus	3
3	Genoma adenoviral	4
4	Mecanismo de replicación adenoviral	7
5	Tipos de recombinantes	12
6	Análisis de la replicación de tres vectores ayudadores por Southern blot	15
7	Estrategia general de trabajo	22
8	Construcción de pJM17 ^{ori+}	23
9	Mecanismo de D-loop/recombinación homóloga	24
10	Construcción de pAd520	26
11	Construcción de 3 plásmidos intermediarios	28
12	Producción de pSV4057	29
13	Producción de los plásmidos pE13	30
14	Producción de los plásmidos pMLP31	30
15	Producción de p13-31	31
16	Construcción de pJM17 ^{ori+}	41
17	Análisis de pJM17 ^{ori+} por Southern blot	42
18	Detección de proteínas tardías de Adenovirus por inmunofluorescencia	44
19	Estandarización del método D-loop para plásmidos de 40 kb	46
20	Linearización sitio-específica por D-loop	47
21	Homología mínima requerida para recombinación homóloga en la cepa BJ5183	49
22	Inestabilidad de pJM17 para los ensayos de RH en <i>E. coli</i>	50
23	Producción del plásmido pAd520 por RH en <i>E. coli</i>	51
24	Construcción de los plásmidos intermediarios pAd5HSV40 y pAd5HCMV	53
25	Construcción del plásmido intermediario pUC3.4CMV	54
26	Producción de pSV4057	55y56
27	Producción de pE13 y pMLP31	57
28	Identificación de pE13, pMLP31 y p13/31 por PCR y Southern blot	58
29	Vectores adenovirales	59
30	Análisis de la Replicación de los plásmidos mediante digestión con DpnI/BamHI y Southern blot	61
31	Análisis de la replicación de pSV4057c por Southern blot	62
32	Detección de proteínas tardías de Adenovirus por Inmunofluorescencia (IF) : templados lineales	64
33	Detección de proteínas tardías de adenovirus transcritas a partir de pSV4057c: templado circular	65
34	Análisis de los plásmidos ayudadores por Northern blot	66

35	Detección de transcritos del hexón por Northern blot	68
36	Detección de transcritos de la proteína terminal por Northern blot	69
37	Producción del recombinante pAdRFP por co-transfección en células en cultivo	71
38	Producción de pAdRFP por RH en BJ5183	73
39	Producción de AdRFP en células 293T	74
40	Purificación de pAdRFP por doble gradiente de cloruro de cesio	75

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 ADENOVIRUS COMO AGENTE VIRAL.

1.1.1 AISLAMIENTO Y CLASIFICACIÓN.

Adenovirus (Ad) fue establecido como agente viral en 1953 por Rowe y cols. cuando intentaban cultivar células epiteliales de adenoides; tejido a partir del cual se derivó el nombre del virus (Rowe *et al.*, 1959). Adenovirus pertenece a la familia *Adenoviridae* y los Adenovirus capaces de infectar humanos están clasificados dentro del género *Mastadenovirus* (Fields *et al.*, 1996).

En la actualidad se conocen alrededor de 47 serotipos (los cuales fueron agrupados de acuerdo a su capacidad de formar tumores en hamsters recién nacidos, aunque no existe ningún reporte de oncogenicidad en humanos) y más de 93 variedades. La mayor parte de estos serotipos se caracterizan por infectar el epitelio respiratorio, ocular y gastrointestinal (Fields *et al.*, 1996).

1.1.2 ESTRUCTURA DEL VIRUS.

Las partículas virales tienen forma de icosaedro (20 superficies triangulares con 12 vértices), miden entre 60-80 nm de diámetro y no tienen cubierta lipídica ó membrana (Horne, 1959) La cubierta proteica ó cápside está formada por 252 subunidades ó capsómeros, de los cuales 240 son "hexones" (conjunto geométrico de 6 capsómeros) y 12 son "pentones" , cada uno de los cuales está rodeado por 5 hexones (Norrby 1969; Ginsberg *et al.*, 1973). Unida a cada uno de los pentones se encuentra la estructura llamada "fibra" (cuya longitud varía de acuerdo al serotipo), la cual media la unión del virus con la célula blanco (Norrby *et al.*, 1972)(Fig. 1).

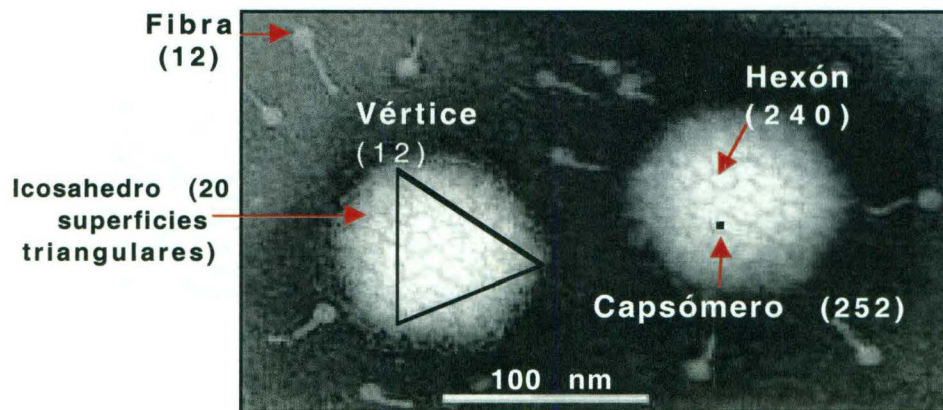


Figura 1. Micrografía electrónica de Adenovirus. Micrografía electrónica de dos partículas adenovirales, indicando una de las 20 superficies triangulares que le dan la forma característica de icosaedro. El punto negro representa un capsómero ó subunidad de un total de 252, de los cuales 240 son hexones y 12 son pentones. Estos dos tipos de proteínas junto con las 12 fibras (una de las cuales se indica en la figura), son los principales componentes de la cápside.

1.1.3 CICLO INFECTIVO.

Adenovirus infecta las células blanco en dos etapas secuenciales (**Fig. 2**). Primero, el extremo carboxilo terminal de la fibra ("Knob") se pone en contacto con los receptores primarios celulares. Para la mayoría de los serotipos adenovirales, estos receptores celulares son los denominados Coxsackievirus B ó Adenovirus (CAR) (Bergelson *et al.*, 1997; Bergelson y Cunningham, 1997; Tomko *et al.*, 1997). El dominio $\alpha 2$ del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) también ha sido descrito como receptor primario al cual se ancla Adenovirus (Hong *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha demostrado que los receptores CAR tienen prevalencia sobre MHC I (Davidson *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 1999).

El segundo paso consiste en la internalización de la partícula viral por endocitosis (vesículas cubiertas de clatrina), proceso que es potenciado por la interacción entre el dominio RGD (Arg-Gli-Asp) del pentón con receptores celulares secundarios tales como, integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ (Varga *et al.*, 1991; Mathias *et al.*, 1994; Wickham *et al.*, 1994). El DNA viral escapa del endosoma y es transportado a través del citoplasma hasta el núcleo mediante el sistema de microtúbulos (Dales y Chardonnet, 1973; Luftig y Weihing, 1975; Weatherbe *et al.*, 1977). Una vez que el virión se pone en contacto con los poros nucleares, pierde la mayor parte de las proteínas virales, permaneciendo solamente lo que conforma el DNA-core (DNA, V, VIII, pT y μ), el cual es translocado al interior del núcleo (Phillipson *et al.*, 1968). Una vez dentro, el genoma viral empieza su replicación y transcripción.

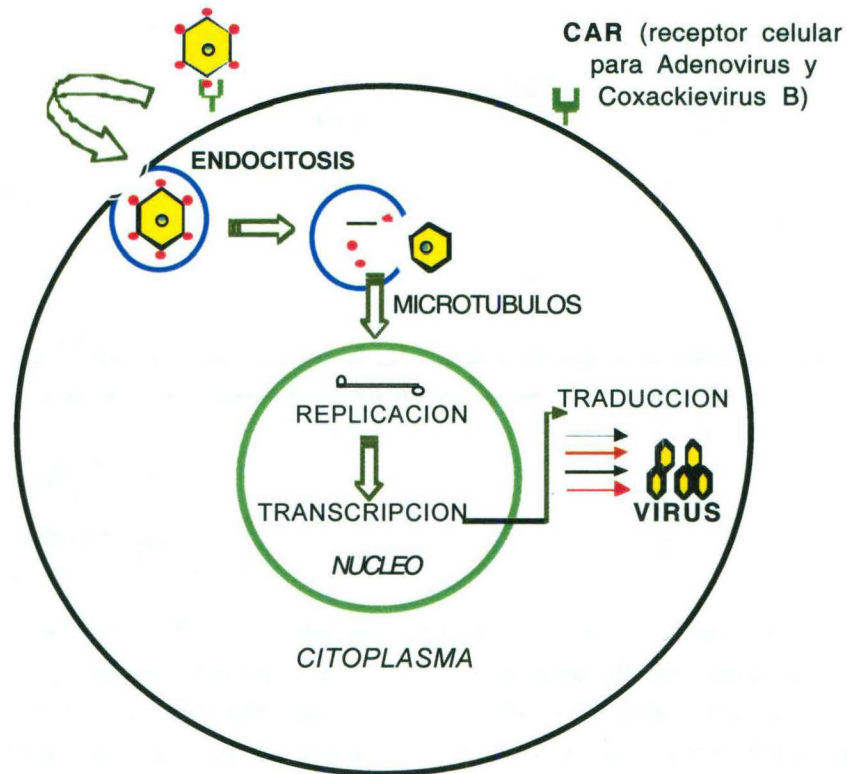


Figura 2. Ciclo infeccioso de Adenovirus. El ciclo infeccioso inicia con la unión de Adenovirus a los receptores CAR, haciendo uso de la fibra. La partícula viral es internalizada por endocitosis en vesículas de clatrina, gracias a la unión del dominio RGD del pentón con los receptores celulares para las integrinas. El virión abandona el endosoma y es transportado hasta el núcleo por el sistema de microtúbulos. Una vez que el genoma viral es translocado al interior del núcleo, el genoma empieza a replicar y expresar las proteínas virales que serán usadas para la producción de la nueva progenie viral.

1.1.4 BIOLOGÍA MOLECULAR.

1.1.4.1 GENOMA ADENOVIRAL.

El DNA viral pesa 23.85×10^6 daltons, aunque existen pequeñas diferencias en tamaño de acuerdo al serotipo (Green *et al.*, 1967). El genoma de Ad es una molécula lineal de DNA de doble cadena que se caracteriza por tener una proteína de 55 kDa unida al extremo 5' de cada hebra (Robinson *et al.*, 1973; Rekosh *et al.*, 1977) y por presentar secuencias redundantes ó repeticiones terminales invertidas (ITRs) en ambos extremos que actúan como orígenes de replicación (Horwitz *et al.*, 1984) y cuya longitud varía entre 100 y 140 pb dependiendo del serotipo (Wolfson y Dressler, 1972; Garon *et al.*, 1972; Tooze, 1981). Las unidades de transcripción y sus genes han sido

divididas en dos grandes regiones en base al momento en que son transcritas durante el ciclo de replicación viral (**Fig. 3**).

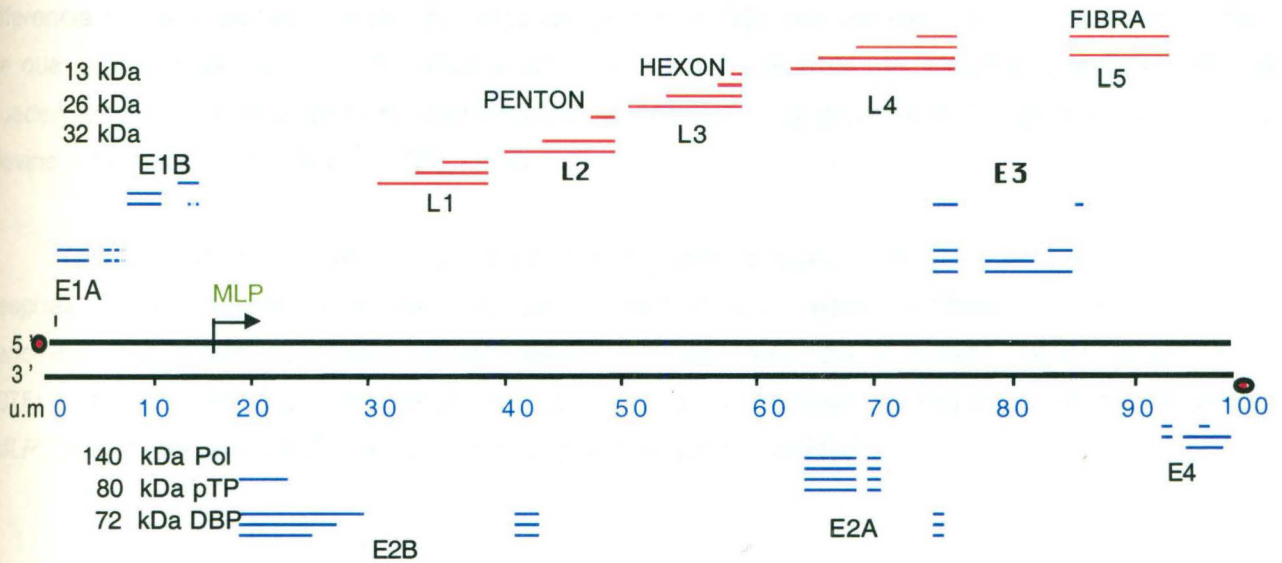


Figura 3. Genoma adenoviral. El genoma de 36 kb (100 unidades de mapa u.m. 1 u.m. = 360 pb) está dividido en dos grandes regiones: La región de los genes tempranos, denominados con la letra E "early" (la línea azul indica cada uno de los transcritos producidos a partir de: E1A y B, E3, E4, E2A y B) y la región de los genes tardíos, denominados con la letra L "late" (la línea roja indica cada uno de los transcritos producidos a partir de: L1 a L5). El círculo rojo indica la molécula de proteína terminal unida al extremo 5' de cada hebra. La flecha negra indica la posición del promotor de genes tardíos (MLP) dentro del genoma de Ad5, aproximadamente a 17 u.m.

REGIÓN TEMPRANA. Los genes que conforman la región temprana se denominan con la letra E ("Early"), fueron numerados en orden ascendente de E1 a E4 (Chow 1979; Stillman *et al.*, 1981) y su transcripción es controlada por promotores independientes (Berk y Sharp, 1977; Wilson *et al.*, 1979), aunque el promotor E1 se encarga de transactivar a todos los genes en conjunto (Jones 1979; Berk 1979; Lewis 1980). E1 y E3 son transcritos a partir de la cadena *r*, mientras que E2A-B y E4 son transcritos a partir de la cadena complementaria ó *l*.

TRANSICIÓN ENTRE ETAPA TEMPRANA Y ETAPA TARDÍA. En la actualidad no se han establecido el mecanismo y los elementos exactos que regulan la transición entre la etapa temprana y la tardía, pero es evidente que durante este lapso, la transcripción de la mayoría de los genes tempranos disminuye casi a niveles basales, en tanto que la transcripción de los genes tardíos se activa drásticamente. Este cambio en el nivel de expresión de los genes es acompañado por un ciclo de replicación intermedio. Se sabe desde hace años que el DNA viral que no ha pasado por un ciclo de replicación, es incapaz de transcribir los genes tardíos, aún y cuando estén presentes en el medio

todos los elementos necesarios para que replique, sugiriendo que algunos de los elementos reguladores funcionan en *cis* y parecen ser una característica particular del propio DNA (Thomas y Mathews, 1980). Aunque existe una clara diferencia entre un gen temprano y uno tardío, esta diferencia no es absoluta, puesto que algunos genes tardíos son transcritos a bajos niveles antes de que ocurra el primer ciclo de replicación viral y los transcritos de algunos genes tempranos pueden ser detectados cuando el ciclo infeccioso se encuentra ya avanzado (Blanton y Carter, 1979; Nevins y Winkler, 1980; Shaw y Ziff, 1982).

REGIÓN TARDÍA. La región tardía se define como la región del genoma que se transcribe después de que ocurre el primer ciclo de replicación viral, está formada por genes que se denominan con la letra L ("Late"), yendo desde L1 hasta L5 (Chow y Broker, 1978; Berget *et al.*, 1978) y son transcritos a partir de la cadena *r*. Un solo promotor, el promotor de genes tardíos (MLP: "major late promoter"), dirige la transcripción de toda la unidad.

1.1.4.2 PROTEÍNAS VIRALES.

Una vez que el genoma viral es transcrito y después de realizarse todas las modificaciones post-transcripcionales ("splicing alternativo"), es posible identificar más de 30 diferentes RNAm que dan lugar al mismo número de proteínas.

PROTEÍNAS TEMPRANAS. Los genes tempranos codifican para proteínas involucradas en la replicación viral. La región E1A produce 6 proteínas de importancia. Entre ellas, las proteínas codificadas por los RNAs 13S y 12S (Ricciardi *et al.*, 1981) estimulan las células a entrar en la fase S (cuando estas proteínas no están presentes, la replicación del virus se ve severamente afectada), regulan la transcripción de los RNAs virales y celulares, así como la síntesis de DNA celular. La capacidad que tiene Adenovirus para transformar cultivos primarios es conferida por una proteína de 19 kDa codificada por la región E1 (Yoshida *et al.*, 1987), la cual además es responsable de transactivar el resto de los genes tempranos e indirectamente a los genes tardíos.

Las proteínas de la región E1B son necesarias para transportar los RNAs virales desde el núcleo hacia el citoplasma, además de participar activamente inhibiendo apoptosis inducida por E1A (Matsuo *et al.*, 1982; McGlade *et al.*, 1989; White y Stillman, 1987). Las regiones E2A y B codifican para proteínas directamente involucradas en la replicación viral (Friefeld *et al.*, 1984), tales como la DNA polimerasa (*Pol*) de 140 kDa (Friefeld *et al.*, 1983), el precursor de la proteína terminal (*Tp*) de 87 kDa (Smart y Stillman, 1982) y la proteína de unión a DNA (*DBP*) de 72 kDa (Linne *et al.*, 1977; Ginsberg *et al.*, 1977). La región E3 produce 9 proteínas, de las cuales cuatro han sido

caracterizadas parcialmente. Estas proteínas participan en la supresión del sistema inmune cuando el virus infecta las células blanco, especialmente la proteína llamada *gp19* (Burget y Kevist, 1987; Flomenberg *et al.*, 1987). Entre las proteínas codificadas por la región E4 se encuentra un polipéptido de 11 kDa que se une a la matriz nuclear y es una de las proteínas inmunológicamente más conservadas entre los diferentes serogrupos (Sarnow *et al.*, 1982).

PROTEÍNAS TARDÍAS. La transcripción de los genes tardíos alcanza su punto máximo 20h después de la infección y la mayoría de las proteínas expresadas durante esta etapa son proteínas estructurales necesarias para ensamblar los viriones en partículas virales y sus precursores. Las proteínas tardías de mayor importancia son el hexón (120 kDa), producto de la región L3, el pentón, codificado por L2 y la fibra, transcrita a partir de L5 (Ishibashi y Maizel., 1974; Everitt y Phillipson, 1974).

1.1.4.3 REPLICACIÓN VIRAL.

Como se mencionó anteriormente, Adenovirus se caracteriza por tener un genoma lineal de DNA de doble cadena cuyos extremos exhiben dos características muy peculiares: las repeticiones terminales invertidas y la proteína de 55 kDa unida a cada extremo 5', ambos esenciales para la replicación viral.

A la fecha se han identificado 3 proteínas virales [**pTp**, **Ad pol** (DNA polimerasa α) y **DBP** (Pearson y Hanawalt, 1971; Vliet y Sussenbach, 1972; Horwitz *et al.*, 1973)] y cuatro factores celulares nucleares [Factor nuclear I, **NFI** (Nagat *et al.*, 1982); **NFII**, una topoisomerasa necesaria para llevar a cabo el desplazamiento de las hebras de DNA (Nagata *et al.*, 1983; Nagata y Guggenheimer, 1983); **NFIII**, conocido también como ORP-C (Pruijn *et al.*, 1986) y **ORP A** llamada también proteína A de reconocimiento del origen (Guggenheimer *et al.*, 1984; Rosenfeld *et al.*, 1987)] que son indispensables para la síntesis del DNA viral.

La replicación del genoma de Ad se lleva a cabo por un mecanismo de desplazamiento de hebras ("strand displacement mechanism") y el primer paso consiste en la unión covalente del grupo 3' OH del nucleótido *dCMP* con una molécula del precursor de la proteína terminal (80 kDa) (Lichy *et al.*, 1981; Pincus *et al.*, 1981; Lichy *et al.*, 1982; Chalberg *et al.*, 1982; Nagata *et al.*, 1982) (**Fig. 4**). Una de las hebras de DNA es desplazada y el complejo *dCMP*-pTp, actúa como iniciador para el inicio de la síntesis de una nueva cadena de DNA, la cual se alarga en forma continua en dirección 5' a 3' y por tanto no hay necesidad del uso de fragmentos de Okazaki (replicación de tipo I) (Horwitz 1971; Lechner y Kelly., 1977). La hebra desplazada es capaz de formar una estructura circular ó

en "panhandle" gracias a las redundancias en sus extremos. Una vez más, el complejo *dCMP*-pTp se une a uno de los extremos de esta estructura y empieza a sintetizarse una hebra complementaria en dirección 5' - 3', hasta completar la molécula lineal de DNA de doble cadena (replicación de tipo II), con lo cual el DNA viral está listo para iniciar otro ciclo de replicación (Sussenbach y Kujik, 1978).

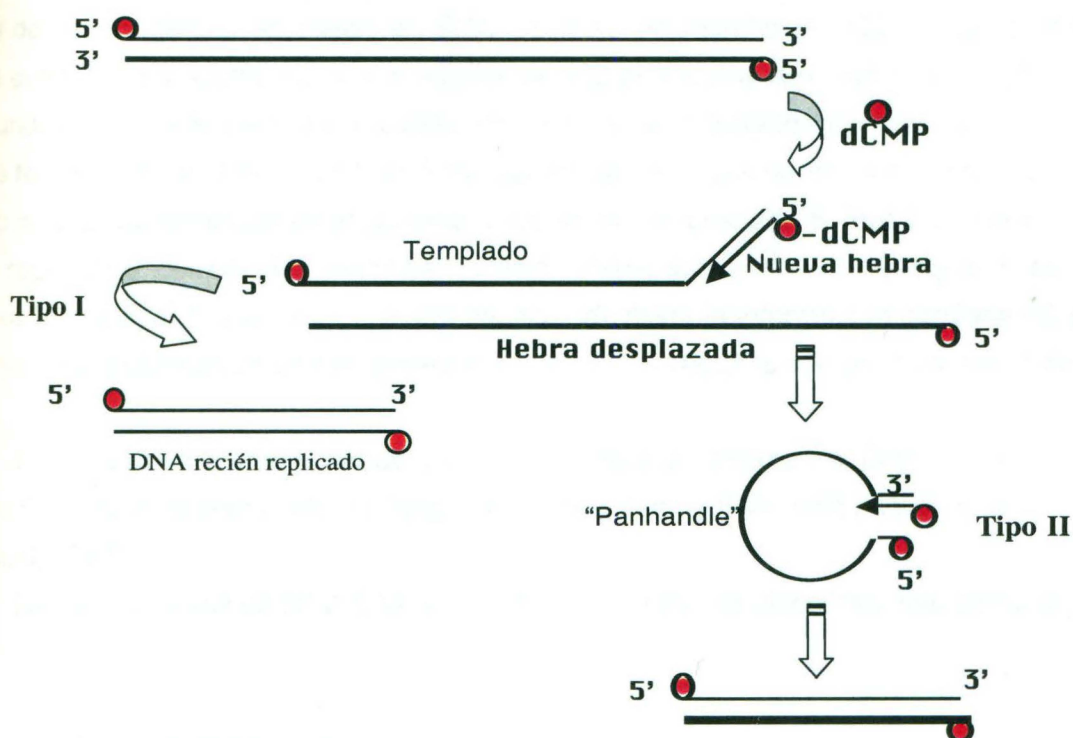


Figura 4. Mecanismo de replicación Adenoviral. Adenovirus replica mediante un mecanismo de desplazamiento de hebras haciendo uso de una molécula proteica denominada precursor de la proteína terminal (pPT) de 80 kDa, la cual funciona como iniciador para el inicio de la replicación. Las nuevas hebras de DNA son alargadas en dirección 5' a 3'. El círculo rojo representa la molécula de proteína terminal.

1.2 ADENOVIRUS COMO VECTOR EN LA TRANSFERENCIA DE GENES.

1.2.1 TERAPIA GÉNICA (VECTORES, VÍAS Y MÉTODOS).

Como consecuencia del desarrollo de la biología molecular, se abrieron muchas áreas de investigación completamente nuevas en medicina, una de ellas, busca desarrollar nuevas formas de corregir enfermedades de origen genético y es conocida como terapia génica. El primer protocolo clínico de terapia génica aprobado en EUA, se puso en marcha en 1990 (Blaese *et al.*, 1995) y desde entonces a la fecha existen alrededor de 300 protocolos que han sido aprobados alrededor del mundo y se cree que al menos 3,000 pacientes han sido tratados por métodos que involucran el uso de terapia génica. Para modificar ó reparar los daños ocasionados por mutaciones ó deleciones de secuencias nucleotídicas en el genoma humano, se ha buscado la forma de como "llegar" hasta estas regiones y corregir los defectos. Como consecuencia de esta búsqueda, se han creado diversos "vehículos" ó "vectores" que son capaces de llevar la información genética útil para revertir ó aminorar los síntomas de una enfermedad dada. Estos vectores son principalmente de dos tipos:

A) No virales (bombardeo de partículas, inyección directa de DNA, liposomas catiónicos, oligonucleótidos antisentido, etc..) (Yang *et al.*, 1990; Yang y Sun, 1995; Wolff *et al.*, 1990; Felgner y Ringold, 1990).

B) Virales (Virus de RNA ó Virus de DNA, los cuales se discutirán más adelante).

1.2.2 MÉTODOS NO VIRALES.

La razón principal de no usar virus como vectores de transferencia, es eliminar el riesgo de una replicación masiva del recombinante en el organismo del receptor. Sin embargo, la mayoría de las terapias no virales desarrollan métodos que emulan a los sistemas virales. Por supuesto, el hacer llegar el DNA a la superficie celular es solo el comienzo de los métodos no-virales. El siguiente paso es construir moléculas capaces de ser internalizadas en la célula, dejar el endosoma y entrar al núcleo celular (proceso que describe una infección viral). A pesar de que las terapias no virales parecen ser más fáciles de producir y por supuesto más seguras que las terapias virales, tienen menos auge y popularidad, porque la eficiencia de transferencia es extremadamente baja (Lever y Goodfellow, 1995; Anderson, 1998).

1.2.3 VECTORES VIRALES.

El uso de agentes virales como vectores en terapia génica, es una idea brillante que surgió principalmente de dos características que poseen los virus y que los hacen ser los candidatos casi perfectos para transportar información genética:

A) *Primero*: Los virus son las entidades vivientes más pequeñas conocidas hasta ahora, que han evolucionado de tal manera que son capaces de entrar a las células blanco (rompiendo las barreras de penetración e invasividad que el cuerpo humano ha desarrollado a lo largo de su historia evolutiva para protegerse de agentes externos) y les es posible replicar en las células del huésped usando en la mayoría de los casos, la maquinaria de replicación del mismo huésped, características que aseguran (en teoría) la "entrega" del material genético no viral que portan.

B) *Segundo*: Algunos de estos agentes virales han desarrollado sofisticados mecanismos que les permiten insertar su material genético dentro del genoma humano, lo cual asegura (en teoría) la expresión prolongada del gen terapéutico de interés.

1.2.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS VECTORES VIRALES.

A pesar de la diversidad de vectores virales que existen actualmente, la mayoría de ellos poseen varias características en común al momento de ser producidos:

a) Parte del genoma viral tiene que ser removido para dar cabida al DNA heterólogo que codifica para la proteína ó proteínas que se desean expresar. El tamaño del inserto capaz de ser introducido al vector depende del tipo de virus parental que se use para construir el vector.

b) Para producir los recombinantes tienen que crearse líneas celulares complementarias, sistemas de empaquetamiento ó plásmidos complementarios que produzcan las proteínas codificadas por las áreas virales removidas.

1.2.3.2 VECTORES BASADOS EN VIRUS DE DNA.

Es tan amplia la variedad de vectores basados en virus de DNA, que la elección del mismo depende principalmente del uso al cual se le vaya a destinar ó del tejido ó tipo celular al cual se quiera dirigir. Entre ellos se cuenta a los vectores basados en el genoma de Adenovirus humano (Ad) y algunos serotipos no humanos (bovino, ovino) (Hemonat y Muzyczka, 1984; McLaughlin *et al.*, 1988; Gao *et al.*, 2000), los Virus asociados a Adenovirus (AAV), Herpes virus (Shih *et al.*, 1984), Epstein Bar (Margolski *et al.*, 1988), etc.

1.2.3.2.1 ADENOVIRUS.

El uso de Adenovirus como vector de expresión y vector de transferencia de genes, es el resultado del trabajo de varios grupos de investigación. Entre ellos Berkner y Sharp, clonaron el genoma de Ad5 (Berkner y Sharp, 1983). En 1977, Frank Graham y *co/s* crearon una línea celular humana transformada con las secuencias del extremo izquierdo de Adenovirus (secuencias transformadoras), lo cual dió pie a la propagación de los primeros Adenovirus deficientes en su replicación, dado que las proteínas E1 expresadas por esta línea celular denominada 293, complementan el crecimiento de Ad (Graham *et al.*, 1977). En 1983 Ruben, del mismo equipo de trabajo de Graham, observó que durante el curso de una infección activa, una pequeña porción de las moléculas de DNA, forman círculos cerrados covalentemente debido a la presencia de las secuencias redundantes en los extremos del genoma y que estas moléculas circulares son capaces de reintegrarse al "pool" de moléculas que están replicando y son capaces de producir progenie viral. Este hallazgo, condujo a la producción de las primeras versiones plasmídicas del genoma adenoviral (Ruben, 1983).

Desde entonces a la fecha, las aplicaciones que se le ha dado al genoma adenoviral van desde su uso como vacunas virales recombinantes, vector de expresión y por supuesto, una de las más importantes, como vector de transferencia de genes en terapia génica (Massie *et al.*, 1988; Hitt y Graham, 2000; Davis *et al.*, 2000).

La popularidad de Adenovirus y su uso en terapia génica se debe al conjunto de varias propiedades:

1. Infecta una gran variedad de células de mamífero, de tal forma que puede ser usado para expresar proteínas recombinantes en la mayoría de los tejidos y líneas celulares de mamífero.
2. Infecta células en división y cultivos primarios.
3. Puede ser crecido a títulos virales de 10^{11} ó 10^{12} partículas virales /mL (PV/ mL), lo cual permite que estos recombinantes puedan ser propagados en suficiente cantidad para uso pre-clínico y clínico y para investigación.
4. Proporciona el ambiente ideal para el correcto plegamiento y modificaciones post-transcripcionales de proteínas humanas.
5. La capacidad de inserto es de hasta 35 kb, lo cual permite la expresión simultánea de múltiples genes.
6. Permanece como DNA episomal, lo cual en primera instancia parecería una desventaja, sin embargo esto evita el riesgo de inserciones al azar no deseadas en el cromosoma del huésped, lo cual puede inactivar genes ó activar oncogenes.

1.2.3.2.2 TIPOS DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES.

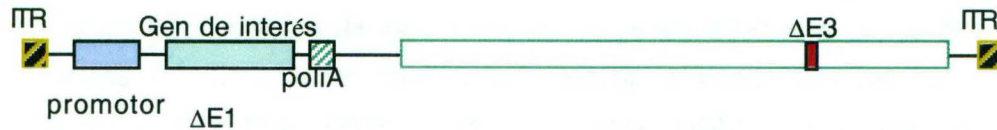
Los diferentes tipos de recombinantes pueden ser agrupados en tres categorías (**Fig. 5**):

1). RECOMBINANTES DE PRIMERA GENERACIÓN. Se caracterizan por tener la región E1 substituida por un cassette de expresión conteniendo el gen ó DNAc terapéutico de interés. Normalmente son producidos en líneas celulares que expresan las proteínas de la región E1 eliminada. Sin embargo, como es bien conocido ya, los Adenovirus de primera generación despiertan una fuerte respuesta inmune (linfocitos T citotóxicos) en las células que infectan (Mullbacher *et al.*, 1991) como consecuencia de la expresión a bajos niveles de los genes virales que permanecen en el vector final (Yang y Nunes, 1994; Yang *et al.*, 1994; Juillard y Villefroy, 1995).

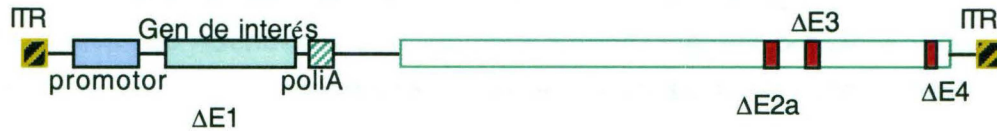
2). RECOMBINANTES DE SEGUNDA GENERACIÓN. Con el fin de tratar de eliminar ó disminuir la fuerte respuesta inmune desarrollada por el huésped después de la administración del recombinante de primera generación (debido a la presencia de casi el 100% de los genes virales), empezaron a construirse nuevos vectores con mayor número de regiones removidas, principalmente aquellas regiones involucradas en la expresión de proteínas inmunodominantes (especialmente E2a y E4), además de E3; siempre y cuando los recombinantes conservasen la región codificante para *gp19*, la cual ayuda al virus a no ser detectado por el sistema inmune del huésped (Burget y Kevist, 1987; Flomenberg *et al.*, 1987). A pesar de que hay indicaciones de que estos vectores son menos tóxicos e inmunogénicos, no existen resultados claros que permitan afirmar que la expresión del DNA heterólogo sea más prolongada que en los vectores de primera generación. En el último de los casos, la delección de estas regiones ha tenido una repercusión significativa en el título viral final, haciendo que los virus sean difíciles de producir en cantidad suficiente para uso clínico (Engelhardt *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994; Gorziglia *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1997).

3). ADENOVIRUS RECOMBINANTES DE ALTA CAPACIDAD DE INSERTO Ó "AYUDADOR-DEPENDIENTE". La última forma de vector adenoviral que ha sido diseñado hasta ahora, se caracteriza por tener solo los elementos en *cis* necesarios para replicación y empaquetamiento, sin tener ningún gen adenoviral. La mayoría de los recombinantes producidos, usan un "helper virus" ó virus ayudador, plásmido ó línea celular que proporciona en *trans* las proteínas que el recombinante necesita para ser propagado (Fisher *et al.*, 1996; Kochanek *et al.*, 1996; Amalfitano *et al.*, 1998; Hartigan *et al.*, 1999).

Adenovirus tipo I:



Adenovirus tipo II:



Adenovirus de alta capacidad:



Figura 5. Tipos de recombinantes. Los Adenovirus de primera generación tienen la región E1 sustituida por DNA heterólogo. Los Adenovirus tipo dos, generalmente poseen deleciones de las regiones E4 y E2A, con inserto de DNA heterólogo en la región E1. Los Adenovirus de alta capacidad de inserto, solo conservan los ITR (redundancias en los extremos) y las secuencias para empaquetamiento. Las 35 kb restantes son sustituidas por DNA no viral.

1.2.3.2.3 TIPOS DE AYUDADORES EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN Y PROPAGACIÓN DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES.

Conforme aumenta el número de deleciones ó regiones adenovirales removidas y sustituidas por DNA heterólogo, incrementa la necesidad de complementar la propagación de los Adenovirus recombinantes. A la fecha han sido descritos 3 tipos de ayudadores:

1. **VIRUS.** Aún y cuando los virus ayudadores contienen deleciones en la región E1 ó mutaciones en las secuencias para empaquetamiento (con el fin de evitar al máximo la reversión a Adenovirus tipo silvestre) el recombinante resulta siempre con algún tipo de contaminación con el virus ayudador, lo cual limita su uso (Fisher *et al.*, 1996; Haecker *et al.*, 1996; Morsy *et al.*, 1998).

2. *LÍNEA CELULAR.* A pesar de los esfuerzos que se han hecho para producir líneas celulares que complementen en *trans* la propagación del recombinante, los principales problemas radican en encontrar un buen sistema de regulación de los genes adenovirales, ya que la mayoría de las proteínas virales involucradas en replicación, resultan tóxicas para las células huésped (Lieber, *et al.*, 1996; Amalfitano *et al.*, 1996; Langer y Schaack, 1996; Zhou y Beaudet, 2000; Gao *et al.*, 2000). Hasta ahora solo existe un reporte de la producción de recombinantes de alta capacidad usando un sistema celular híbrido de Adenovirus con Baculovirus, el cual es poco práctico y poco conveniente, además de que la recombinación entre la región E1 de las células 293 con la copia del genoma de Adenovirus 5 usada para proporcionar las proteínas virales en *trans*, origina el surgimiento de RCAs ó Adenovirus competentes en su replicación. (Cheshenko *et al.*, 2001).

3. *VERSIONES PLASMÍDICAS DEL GENOMA DE Ad5.* El uso de plásmidos es el método de predilección, porque ofrecen la gran ventaja de que disminuyen enormemente las posibilidades de regeneración de Adenovirus competentes en su replicación (RCA), dado que el genoma plasmídico es usualmente 3 ó 7 kb más grande que el genoma viral. De tal manera que el DNA, aún y cuando replique, es excluído de ser empaquetado en partículas virales (Zhang y Fang, 1993; Haecker *et al.*, 1996; Hartigan *et al.*, 1999).

A pesar del gran éxito que tiene el uso de plásmidos como ayudadores en la producción de Adenovirus recombinantes, el sistema ofrece una gran desventaja, esta es, la actividad replicativa y transcripcional de los mismos es extremadamente baja, lo cual hace que los títulos virales iniciales del recombinante sean muy bajos. Para contrarrestar este efecto, el recombinante tiene que ser amplificado ó propagado varias veces en la línea celular durante una preparación de virus a gran escala. Esto no solo resulta en un incremento en el tiempo invertido en la producción del recombinante y la cantidad de material utilizado, sino que con cada ciclo de propagación se incrementa la cantidad de Adenovirus competentes en replicación, en la preparación.

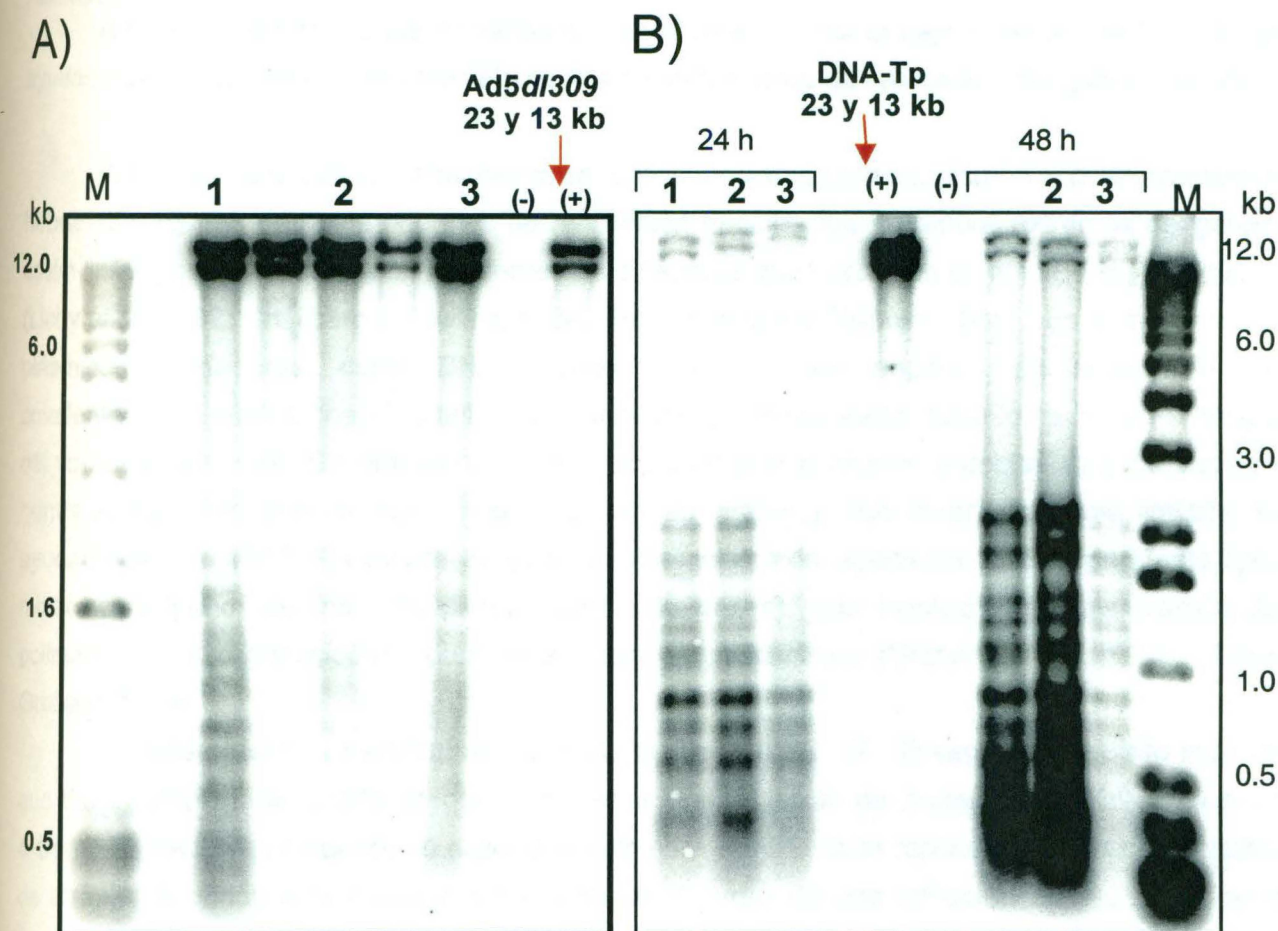
1.3 ANTECEDENTES DIRECTOS.

1.3.1 BAJA EFICIENCIA DE LA REPLICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS AYUDADORES.

Con el propósito de desarrollar un sistema de producción de Adenovirus recombinantes ayudador-dependiente (tipo 1, tipo 2 ó de alta capacidad) que usara una versión plasmídica de Ad5 para proporcionar las funciones virales en *trans* y que a la vez emulara en eficiencia a los sistemas que usan Ad tipo silvestre como ayudador, se iniciaron una serie de experimentos que llevaron a los primeros ensayos de la replicación de tres vectores ayudadores comúnmente usados para la producción de Adenovirus recombinantes. Estos plásmidos fueron pJM17 ($\Delta E1$), pTG3602 (genoma sin inserciones ó deleciones) y pBGH10 ($\Delta E1$ y $\Delta E3$) (McGrory *et al.*, 1988; Chartier *et al.*, 1996). El análisis de los productos de la replicación (mediante Southern blot) del DNA de los tres plásmidos transfectados transitoriamente en células 293, mostró la primera indicación de la casi nula actividad replicativa de los tres genomas. Aún más, *ninguno de los tres plásmidos fue capaz de replicar*, cuando las células 293 fueron previamente infectadas con:

1. Adenovirus tipo silvestre (super-infección) que proporcionara proteínas virales en *trans* (Fig. 6A) ó con
2. Moléculas de DNA con proteína terminal unida a los extremos (previamente purificada a partir células infectadas con Ad5) que sirviera como templado y como fuente de proteína terminal inicial (Fig. 6B).

Estos resultados sugirieron, que la restricción para replicación está en *cis* y no puede ser complementada por las proteínas virales proporcionados en *trans* por el Ad5 wt ó por las moléculas de DNA-proteína terminal. Aunado a ésto, el uso del DNA con la molécula de proteína terminal unida al extremo 5', permitió establecer que la presencia de esta proteína es necesaria para la replicación pero no suficiente, puesto que no fue capaz de activar la replicación adenoviral en pleno.



CELULAS 293

Figura 6. Análisis de la replicación de 3 vectores ayudadores por Southern blot. A) Infección-transfección de 3 vectores ayudadores. El DNA plasmídico de pJM17, pTG3602 y pBGH10 recuperado 72h después de la transfección en células 293 previamente infectadas con Ad5 wt, fue procesado para análisis por Southern blot (como se describe en la sección de métodos), cortado con la enzima *Dpn* I, e hibridado con el genoma de Ad5 marcado con [32 P]. 1: pJM17/Ad5. 2: pTG3602 /Ad5. 3: pBGH10/Ad5. M: marcador de peso molecular, 1 kb. En la autorradiografía se observan solo las bandas de 23 y 13 kb, productos de la replicación de Ad5 wt. B) Co-transfección de 3 vectores ayudadores con DNA- DNA-proteína terminal (Tp). El DNA plasmídico de pJM17, pTG3602 y pBGH10 recuperado 24 y 48 h después de la co-transfección con DNA-proteína terminal, fue procesado para análisis por Southern blot (como se describe en la sección de Métodos), digerido con *Dpn* I, e hibridado con el genoma de Ad5 marcado radiactivamente con [32 P]. 1: pJM17/Ad5. 2: pTG3602 /Ad5. 3: pBGH10/Ad5. M: marcador de peso molecular, 1 kb. En la autorradiografía se observan solo las bandas de 23 y 13 kb, productos de la digestión del DNA -Tp.

1. 3. 2 REQUISITOS DEL TEMPLADO PARA LA REPLICACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN DEL GENOMA ADENOVIRAL.

A la fecha se han propuesto varias hipótesis para explicar la baja actividad de los plásmidos ayudadores, y todas ellas involucran elementos del mecanismo de replicación del genoma adenoviral

1. EXTREMOS 5' LIBRES. Adenovirus se replica mediante un mecanismo de desplazamiento de hebras que requiere que los orígenes de replicación (localizados en ambos extremos del genoma), estén libres para interactuar con los elementos ó factores que participan en el inicio de la replicación (Lichy *et al.*, 1982; Challberg y Rawlins, 1984; Guggenheimer y Stillman, 1984). En la mayoría de los plásmidos ayudadores, como DNA circular que son, los orígenes de replicación están covalentemente unidos ("head to tail") y no funcionan correctamente como lo hacen en el templado del virus tipo silvestre. Sin embargo, a pesar de no replicar a niveles detectables y transcribir los genes activamente, son capaces de producir placas virales y "funcionar" de forma limitada como ayudadores. En 1987, F. Graham propuso un mecanismo de replicación alternativo para este tipo de moléculas (algunos de los ITRs pierden pares de bases), que involucra la translocación de la polimerasa y el oligonucleótido durante el inicio del mecanismo (Graham *et al.*, 1989; Lippe y Graham, 1989).

2. PRESENCIA DE LA PROTEÍNA TERMINAL EN EL EXTREMO 5'. El segundo requisito importante que debe cumplir el templado adenoviral es tener una molécula de proteína terminal unida a cada extremo 5' que sirva no solo como oligonucleótido para el inicio de la replicación, sino como molécula de anclaje del virión a la matriz nuclear durante el curso de una infección activa. Se sabe que viriones con cromosomas con proteínas terminales mutadas son excluidos del proceso de empaquetamiento. (Schaack *et al.*, 1989; Schaack *et al.*, 1996). Nuevamente, los plásmidos ayudadores no poseen extremos 5' libres con proteína terminal.

3. TRANSICIÓN DE EXPRESIÓN DE GENES TEMPRANOS A GENES TARDÍOS Y EL CICLO DE REPLICACIÓN INTERMEDIO. Se especula (no ha sido comprobado plenamente) que para que los genes tardíos sean transcritos, el genoma viral tiene que pasar por un ciclo de replicación primero. Cuando se mezcla DNA viral no replicado con una población de virus que ya pasó por un ciclo de replicación, el DNA no replicado es incapaz de transcribir la región de genes tardíos, lo cual sugiere que algunos de los elementos necesarios para activar la unidad de transcripción tardía actúan *cis* (Thomas y Mathews, 1980) y son propios del DNA viral. De alguna forma, los plásmidos ayudadores no poseen esta capacidad de modificar el genoma para la correcta activación de la transcripción de los genes tardíos. Es bien conocido que el promotor de genes tardíos (AdMLP) se mantiene activo a un nivel bajo durante la fase temprana del ciclo de infección lítica y que tan pronto como ocurre el primer ciclo de replicación viral, el promotor se vuelve 100% activo, indicando que la

replicación del genoma adenoviral produce modificaciones en *cis*, que estimulan la transcripción de la región de genes tardíos del templado replicado.

1.3.2 USO DE UN ORIGEN DE REPLICACIÓN HETERÓLOGO (ORIGEN DEL VIRUS SV40), PARA AMPLIFICAR EL NÚMERO DE COPIAS, Y EL USO DE UN PROMOTOR GENÉRICO (PROMOTOR DEL CITOMEGALOVIRUS HUMANO) PARA TRANSCRIBIR LA REGIÓN DE GENES TARDÍOS EN FORMA INDEPENDIENTE AL MECANISMO DE REPLICACIÓN.

Lo expuesto anteriormente, junto con los resultados preliminares indicaron claramente que si se deseaba producir un plásmido ayudador mejorado cuya replicación y transcripción fueran comparables a Adenovirus *wt*, la modificación debía ser a nivel del DNA adenoviral [dado que la replicación de los plásmidos ayudadores (pJM17, pTG3602 y pBGH10) no pudo ser complementada en *trans*] y que esta modificación debía afectar positivamente la replicación y la transcripción del plásmido adenoviral ayudador.

Con el propósito de resolver el problema de replicación y en base a las evidencias de que los orígenes de replicación en las versiones plasmídicas de Ad5 no son funcionales (por las razones discutidas anteriormente), se propuso sustituir los orígenes de replicación propios de Adenovirus, por el origen de replicación del virus SV40, el cual ha sido usado y descrito anteriormente en la literatura, para incrementar el número de copias de diversos tipos de virus animales que solo replican una vez por ciclo celular tales como Papilomavirus bovino y el virus Epstein-barr (DuBridge *et al.*, 1985; Stary *et al.*, 1989) y para incrementar el título de varios tipos de recombinantes usados en terapia génica (Soneoka *et al.*, 1995).

Como estrategia alterna al uso del origen de replicación de SV40, se propuso promover la transcripción de la unidad de genes tardíos en forma independiente al mecanismo de replicación, mediante la sustitución del promotor de genes tardíos de Adenovirus, por el promotor del citomegalovirus humano (CMV), de tal manera que a pesar de que los plásmidos ayudadores no sean capaces de replicar, el conjunto completo de proteínas adenovirales pueda ser producido.

1.4 JUSTIFICACIÓN.

A pesar de la gran popularidad con que cuentan actualmente los Adenovirus recombinantes como instrumentos de trabajo en el área de terapia génica y del gran número de trabajos que se publican periódicamente sobre nuevos métodos de producción y propagación de recombinantes haciendo uso de DNA plasmídico como ayudador, ninguno de estos sistemas ha sido capaz hasta ahora, de resolver las limitaciones básicas que impiden la implementación del sistema adenoviral óptimo, porque muy pocos grupos de trabajo abordan los mecanismos virales y celulares básicos que llevan a la producción de un recombinante adenoviral. El presente trabajo pretende dar una panorámica más amplia de los problemas de replicación y transcripción asociados con los plásmidos ayudadores y presenta los resultados de dos estrategias aplicadas para resolver el problema de replicación y transcripción asociados a ellos.

1.5 HIPÓTESIS.

- A. El origen de replicación del virus SV40 es capaz de dirigir la maquinaria de replicación del genoma de adenovirus.
- B. El promotor del Citomegalovirus humano (CMV) es capaz de promover la expresión de genes adenovirales tempranos y tardíos, en forma independiente al mecanismo de replicación del DNA viral.

1.6 OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar un sistema adenoviral que permita mejorar la producción y propagación de Adenovirus recombinantes, usando una versión plasmídica de Ad5 como ayudador.

1.6.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- I. Clonar el origen de replicación del virus de SV40 y el promotor del CMV humano en la región E3 y región del promotor de genes tardíos (MLP) de Adenovirus (versión plasmídica de Ad5).
- II. Analizar la replicación, transcripción y expresión de proteínas adenovirales de los vectores ayudadores construidos.
- III. Probar la efectividad del nuevo sistema adenoviral, mediante la producción de un Adenovirus recombinante, conteniendo un cassette de expresión con el DNAC codificante para la proteína roja fluorescente (RFP) como gen reportero; usando dos métodos distintos de producción.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 MATERIAL.

2.1.1 ORIGEN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

2.1.1.1 CEPAS BACTERIANAS.

Escherichia coli (*E. coli*) DH5 α calidad subclonación y DH5 α máxima eficiencia usadas para los experimentos de clonación y transformación de plásmidos de más de 20 kb, fueron adquiridas a Life Technologies. Invitrogen Corporation (Rockville, MD, EUA). *E. coli* SURE y NM52, usadas para transformar plásmidos inestables y para controlar el número de copias; así como *E. coli* XL10-Gold y Gene Hogs usadas para transformar plásmidos de 40 kb, fueron compradas a Stratagene (La Jolla, CA, EUA) y Research Genetics, Inc, respectivamente. BJ5183 usada para los ensayos de recombinación homóloga fueron un obsequio de Transgene, S.A. Strasbourg, Francia.

2.1.1.2 CÉLULAS EUCARIOTAS.

HEK-293 fueron compradas a Microbix (Biosystems, Inc., Ontario, Canada) y Clontech (Palo Alto, CA, EUA). COS-7 fueron compradas a *American Type Culture Collection* (ATCC)(Manassas, VA, EUA) y 293T fueron obsequiadas por el Dr. Hung Fan del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de California en Irvine.

2.1.1.3 VIRUS.

El Adenovirus humano tipo 5 y Adenovirus humano tipo 2 fueron comprados a ATCC.

2.1.1.4 PLÁSMIDOS.

El plásmido pcDNA₃ fue comprado a Invitrogen (Invitrogen Corporation). pGreen-Lantern fue adquirido de Life Technologies. pRDsN1 fue comprado a Clontech. pBRX, pLAD, pWSK29, pBR322Δ, pUC19, pΔE1A y pJM17 fueron preparados a partir de stocks con glicerol del laboratorio de Luis P. Villarreal. pTG3602 y ppoly II fueron un obsequio de Transgene.

2.1.2 ORIGEN DEL MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO.

2.1.2.1 MATERIAL.

Todo el material de plástico usado para cultivo de células eucariotas y bacterianas, así como el material usado para trabajar con DNA y RNA, fue adquirido a través de Fisher y VWR (Pittsburgh PA, EUA) a menos que se aclare lo contrario.

2.1.2.2 REACTIVOS.

Los kits de ligación, marcaje de sondas radiactivas, nucleasa S1 y Sma I fueron adquiridos a Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN, EUA). Las enzimas de restricción fueron compradas a New England Biolab (Bethesda, MD, USA). El Kit para rellenar con DNA polimerasa (fragmento Klenow) fue adquirido de Stratagene. Los reactivos para PCR fueron comprados a Promega (Madison, WI, EUA). Los kits para amplificar fragmentos de más de 3 kb fueron comprados a Qiagen (Valencia, CA, EUA) y TakaRa (Carlsbad, CA, EUA). Los Kits para purificar DNA, fragmentos de PCR y para remover enzimas fueron comprados a Promega. Las columnas para purificar fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa fueron compradas a Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Todos los oligonucleótidos usados y descritos en este trabajo fueron sintetizados por Life Technologies. Todos los medios de cultivo bacteriano y los reactivos para cultivo de células eucariotas fueron comprados a Life Technologies y Irvine Scientific, Co. (Irvine, CA, EUA). Los anticuerpos policlonales para detectar Adenovirus fueron adquiridos a Lee BioMolecular Research y los anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína y rodamina fueron comprados a Sigma. El [³²P] dCTP usado para preparar todas las sondas, así como las membranas de nylon usadas para Southern Blot y Northern blot fueron compradas a NEN (Boston; MS. USA). Las soluciones de hibridación y columnas para remover nucleótidos no incorporados fueron adquiridas a 5 Prime 3 Prime, Inc. (Boulder, CO. USA). Las soluciones y reactivos para análisis de RNA fueron comprados a Ambion (Austin, TX, EUA).

2.1.2.3 EQUIPO.

1. Termociclador. Se usó un Robocycler Gradient 96 de Stratagene.
 2. Centrífugas y rotores. Se usó una centrífuga Sorvall RC5C PLUS con rotor SM24 y SS34. Una microcentrífuga Eppendorf 5402 (Hamburgo, Alemania) y una ultracentrífuga Beckman HML8 con rotor SW24, SW28 y 70.1/ (Fullerton, CA, EUA).
 3. Cámaras de electroforesis y fuentes de poder. Para el análisis de DNAs y RNAs se usaron cámaras horizontales y fuentes de poder E-C135 de Life technologies (Invitrogen Corporation).
 4. Microscopio. Se usó un microscopio Nikon ECLIPSE TE200 con filtro azul (B2), verde (G) y UV, con cámara digital unida (Optronics) y el programa de computación Magnafire.
 5. Campanas de cultivo e incubadoras. Se usó una campana de flujo laminar NUAIR clase I tipo A/B3 e incubadoras NAPCO (una para cultivo de células y una para cultivo de virus).
- Fluorómetro. DyNA Quant 200 (Hofer. Amersham Pharmacia Biotech).

2.2 MÉTODOS.

La estrategia general de trabajo ha sido dividida en 3 secciones (**Fig. 7**). En la primera parte se describe todo lo referente a la construcción de los plásmidos "ayudadores" (pJM17_{ori+}, pE13, pMLP31, p13/31, pSV4057, incluyendo la descripción del método D-loop/recombinación homóloga (RH), desarrollado específicamente para construirlos). En la segunda parte se presentan todos los resultados referentes al análisis de la actividad replicativa, transcripcional y expresión de proteínas tardías de los plásmidos ayudadores mediante Southern blot, Northern blot e Inmunocitoquímica.

Finalmente, en la tercera parte y haciendo uso del plásmido ayudador que muestre el mejor nivel de replicación y producción de proteínas virales, se describirá la construcción del recombinante adenoiral de tipo I, que porta el DNAC que codifica para la proteína roja fluorescente (PRF) como gen reportero y al mismo tiempo se comparará la eficiencia de su producción mediante el método clásico de co-transfección en células en cultivo y ensayo en placa usando DNAs superenrollados, y el método de recombinación en *E. coli* usando DNAs linealizados.

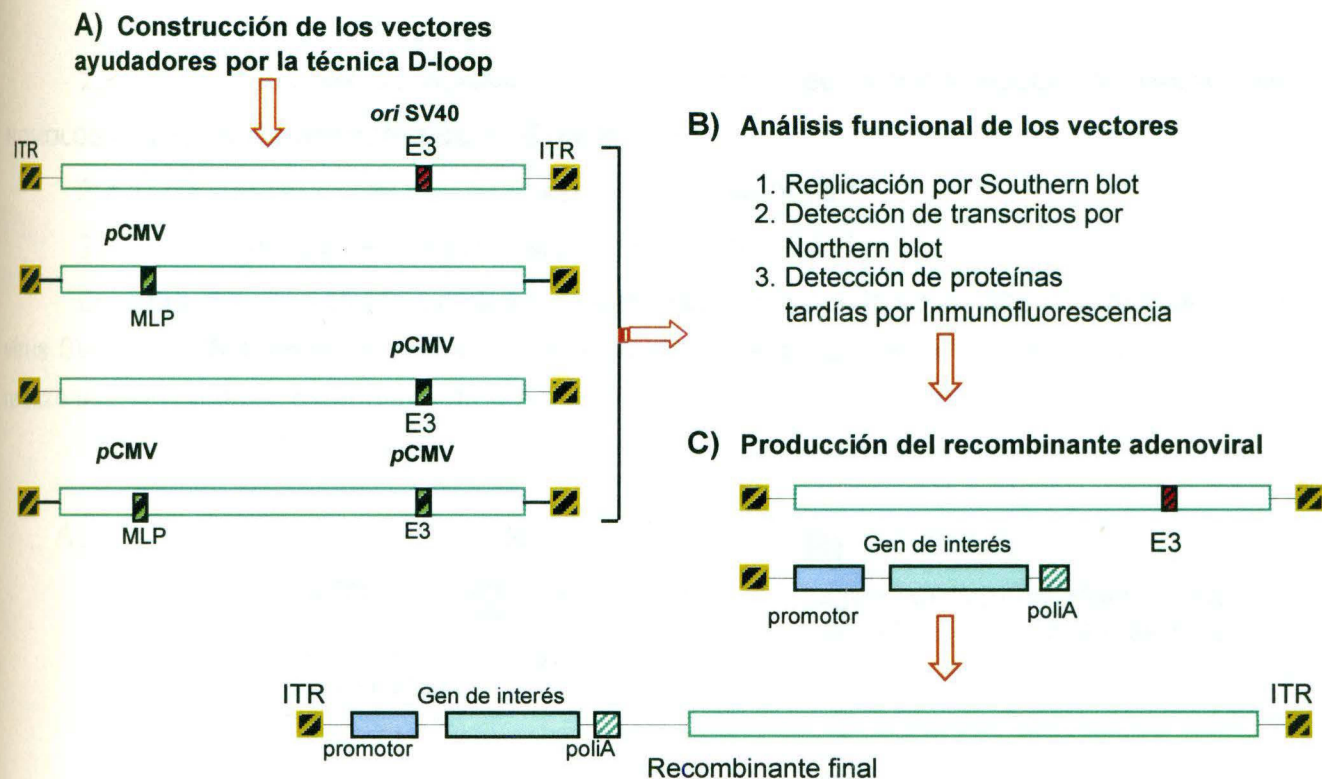


Figura 7. Estrategia general de trabajo. **A) Construcción de los vectores ayudadores.** En la primera parte del trabajo, se describe la estandarización de los parámetros del método D-loop/recombinación homóloga y su aplicación en la producción de un vector adenoviral de 42 kb denominado pAd520, que dió origen a cuatro vectores ayudadores ya sea con el origen SV40 en la región E3 representado en el esquema por el rectángulo rojo-negro ó el promotor del CMV en la región MLP y E3 representado por el rectángulo verde-negro. **B) Análisis funcional de los vectores adenovirales.** En la segunda parte se muestran los resultados del análisis funcional de los cuatro ayudadores por Southern blot, Northern blot e Inmunocitoquímica. **C) Producción del recombinante adenoviral.** Finalmente en la tercera parte, haciendo uso del ayudador que mostró los mejores propiedades replicativas, transcripcionales y traduccionales, se produjo un recombinante de tipo I, para lo cual se construyó previamente un plásmido con el cassette de expresión conteniendo el DNAc codificante para la proteína roja fluorescente como gen reportero.

2.2.1 CONSTRUCCIÓN DE PLASMIDOS Y DESARROLLO DEL METODO D-LOOP/ RECOMBINACION HOMOLOGA (RH) EN *Escherichia coli* (*E. coli*).

2.2.1.1 CONSTRUCCIÓN DE LOS PLASMIDOS AYUDADORES.

2.2.1.1.1 Estrategia de clonación de pJM17_{ori+} (40.5 Kb).

En la **Fig. 8** se muestra la estrategia general diseñada para clonar el origen de replicación del virus SV40 en pBRX; plásmido que está sustituyendo la región E1 de Ad5. Esta construcción se realizó usando técnicas estándares de clonación.

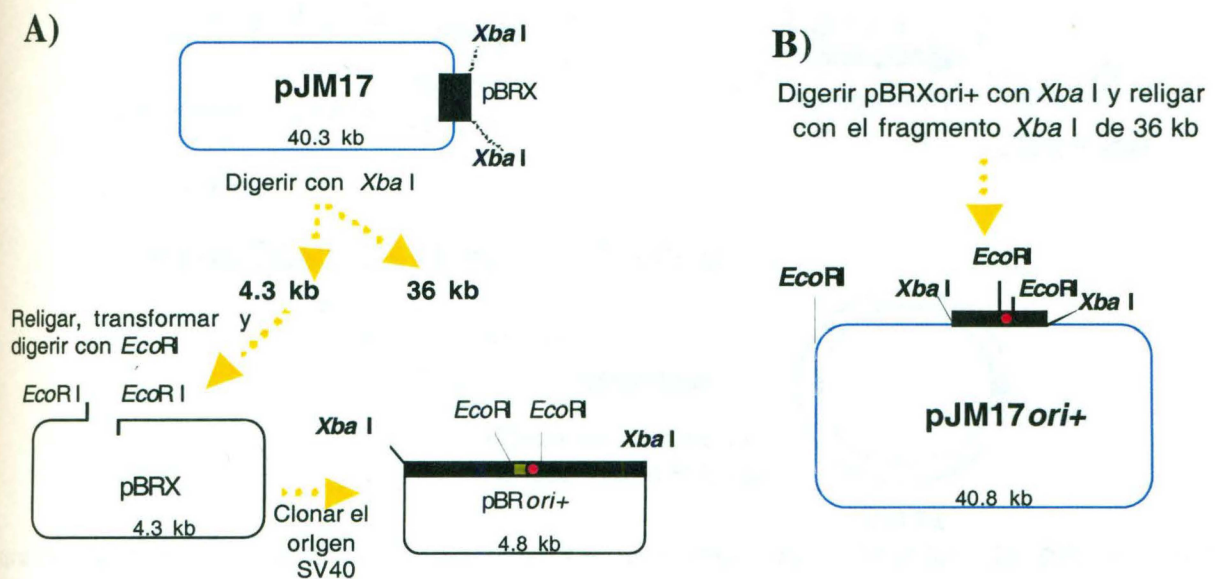


Figura 8. Construcción de pJM17_{ori+}. **A) Construcción de pBRXori+.** pJM17 fue digerido con Xba I obteniéndose dos fragmentos, uno de 36 kb y otro de 3.4 kb. El plásmido de 3.4 kb denominado pBRX fue religado, recuperado como DNA circular, digerido con EcoR I y vuelto a ligar con un segundo fragmento EcoR I conteniendo el origen de SV40 (previamente amplificado por PCR a partir de pcDNA3), creándose así el plásmido pBRXSV40. **B) Construcción de pJM17ori+.** El plásmido pBRXori+ fue digerido con Xba I y religado con el fragmento Xba I de 36 kb aislado inicialmente a partir de la digestión de pJM17 con Xba I, originando pJM17ori+.

2.2.1.1.2 D-LOOP/RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA (RH) EN *E. coli*.

La manipulación genética de plásmidos, especialmente de genomas grandes (más de 20 kb) requiere la presencia de sitios de restricción únicos. Para el caso específico de los plásmidos contienen todo el genoma adenoviral (42 kb), resultaría ideal poder insertar (dirigir la clonación y orientación), remover secuencias ó modificar el DNA sin depender de la presencia de sitios de restricción convenientes. El método D-loop-recombinación homóloga permite realizar tales

modificaciones, en dos etapas secuenciales (Castro-Peralta y Villarreal, 2000) (**Fig. 9**). Primero, el DNA superenrollado es incubado con un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria al sitio donde se quiera modificar el DNA y este híbrido DNA-oligonucleótido es digerido con nucleasa S1 (Beard *et al.*, 1973; Germond *et al.*, 1974; Shenk *et al.*, 1975; Dodgson y Wells, 1977; Kazuo y Andot, 1982). Segundo, el DNA linealizado es co-transformado en *E. coli* con el fragmento de DNA que se desea introducir en el plásmido. Este fragmento debe tener secuencias homólogas en los extremos para recombinarse con el plásmido linealizado con la enzima S1 (Wiegand *et al.*, 1977; Reddy *et al.*, 1994).

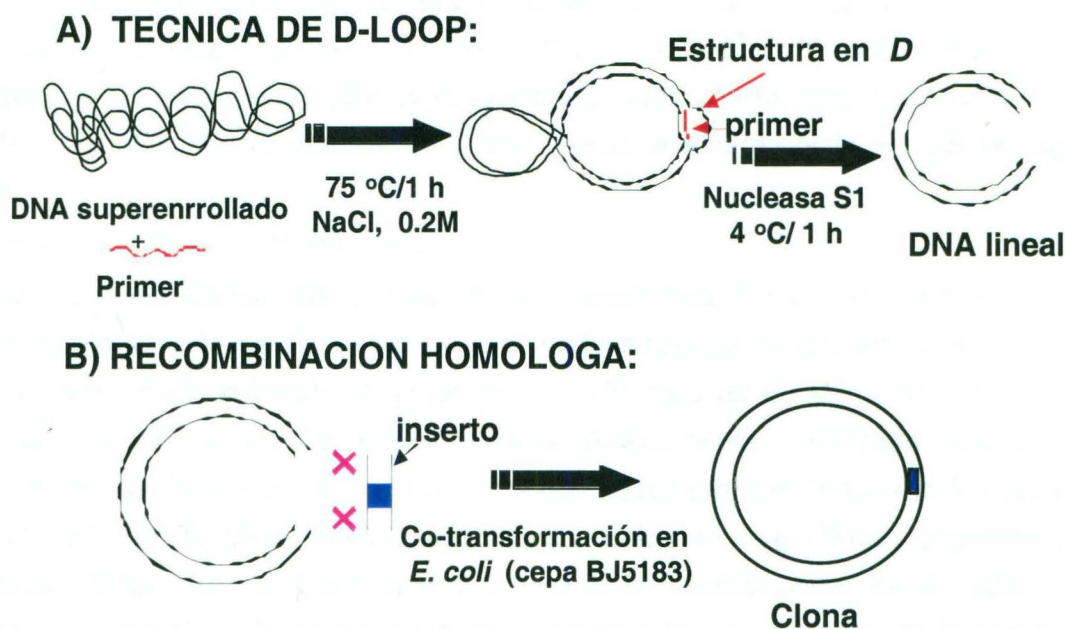


Figura 9. Mecanismo de D-loop/recombinación homóloga. A) Técnica de D-loop. El DNA superenrollado en presencia de un oligonucleótido complementario a la región que se desea linearizar, permite que se lleve a cabo un desplazamiento de hebras de DNA, de tal forma que el iniciador se une a una de las hebras del plásmido, dejando la otra hebra como DNA de cadena sencilla, la cual forma la estructura en D ó D-loop. Esta región de cadena sencilla expuesta (D- loop) es digerida por la nucleasa S1. El cambio de condiciones de la reacción a alta concentración de S1, hace que el plásmido inicialmente superenrollado, pase a un estado relajado; ocasionando que el oligonucleótido se desprenda de la cadena complementaria. Esta segunda cadena de DNA (la cual es ahora cadena sencilla también) es digerida por la nucleasa S1 presente en el medio. De tal modo que al final de la reacción el plásmido queda linealizado exactamente en el sitio donde el oligonucleótido se unió. **B) Recombinación homóloga.** En la segunda etapa, el DNA linealizado por D-loop es co-transformado con un segundo fragmento linealizado, que contiene secuencias homólogas en cada extremo. El producto de la recombinación puede ser analizado con una técnica tan simple como digestión con enzimas de restricción, para identificar la clona deseada.

2.2.1.1.2.1 ELECCIÓN DEL OLIGONUCLEÓTIDO.

Los oligonucleótidos necesarios para linearizar el vector (pAd520) en la región E3 y región MLP, fueron diseñados tomando como base la longitud de los iniciadores reportados por Green (30 pb) (Green y Tibbetts, 1980) y en base a la secuencia de Adenovirus 5 reportada en el GenBank.

E3 5' - CCCGCTCCCACCACTGTGGTACTTCCCAGA -3'
 MLP 5' - TGGAAGAACTTGGAGACGCCCTGTGGGACG-3'

2.2.1.1.2.2 PROCESO D-LOOP.

10 µg de DNA superenrollado (pAd520) fueron incubados con 7 µg de oligonucleótido específico (E3 y MLP en reacciones independientes) en NaCl 0.2M a 75°C/1 h . El complejo DNA-oligo fue precipitado con etanol al 100% (2.5 Vol, -20°C, 1h, 16X10³ g, 10 min), lavado con etanol al 75% e incubado con la nucleasa S1 (200 U/mL, acetato de sodio 33mM, NaCl 50mM, ZnSO₄ 1mM, pH 4.5, 4°C, 1h). El DNA linearizado fue purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y electroelución.

2.2.1.1.2.3 RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.

Antes de cada transformación, las células (*E. coli*, cepa BJ5183) fueron hechas competentes usando el protocolo descrito por Hannahan, el cual produce células con eficiencia de 10¹⁰ (Hannahan, 1983). En un experimento estándar, 1 ng del vector (plásmido de 40 kb, previamente linearizado mediante D-loop) y 20 ng del fragmento a clonar (previamente linearizado con enzimas de restricción) fueron transformados usando la técnica de choque térmico ("heat-shock") (Sambrook *et al.*, 1989). El producto total de la transformación fue sembrado en agar LB con ampicilina (10mg/L). El DNA obtenido de las colonias bacterianas producto de la recombinación, fue sometido a análisis con enzimas de restricción y Southern blot para determinar la presencia de los insertos (en este caso, la presencia del origen de SV40 ó el promotor del CMV).

2.2.1.1.3 CONSTRUCCIÓN DE pAd520 (42kb) MEDIANTE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN *E. coli*.

Debido a la dificultad técnica que representó trabajar con pJM17 como plásmido parental para la clonación del origen de SV40 y el promotor del CMV en el genoma adenoviral (atribuido a la falta de sitios de restricción únicos y la inestabilidad que mostró el plásmido en los ensayos de recombinación homóloga en *E. coli*), se construyó un nuevo plásmido que sustituyera a pJM17. Este nuevo plásmido fue denominado **pAd520** y se caracteriza por tener todo el genoma de Ad5 (36 Kb) insertado en un plásmido de bajo número de copias llamado pWSK29 (5.4 Kb) (Wang y Kushner, 1991).

A diferencia de pJM17, pAd520 no tiene sustituciones, inserciones ó deleciones de ningún tipo. El genoma adenoviral está intacto y puede ser removido de pWSK29 mediante digestión con *Pac*I, lo cual ofrece la ventaja de poder usarlo para ensayos de transfección como DNA lineal. En la Fig. 10 se esquematiza la estrategia de clonación.

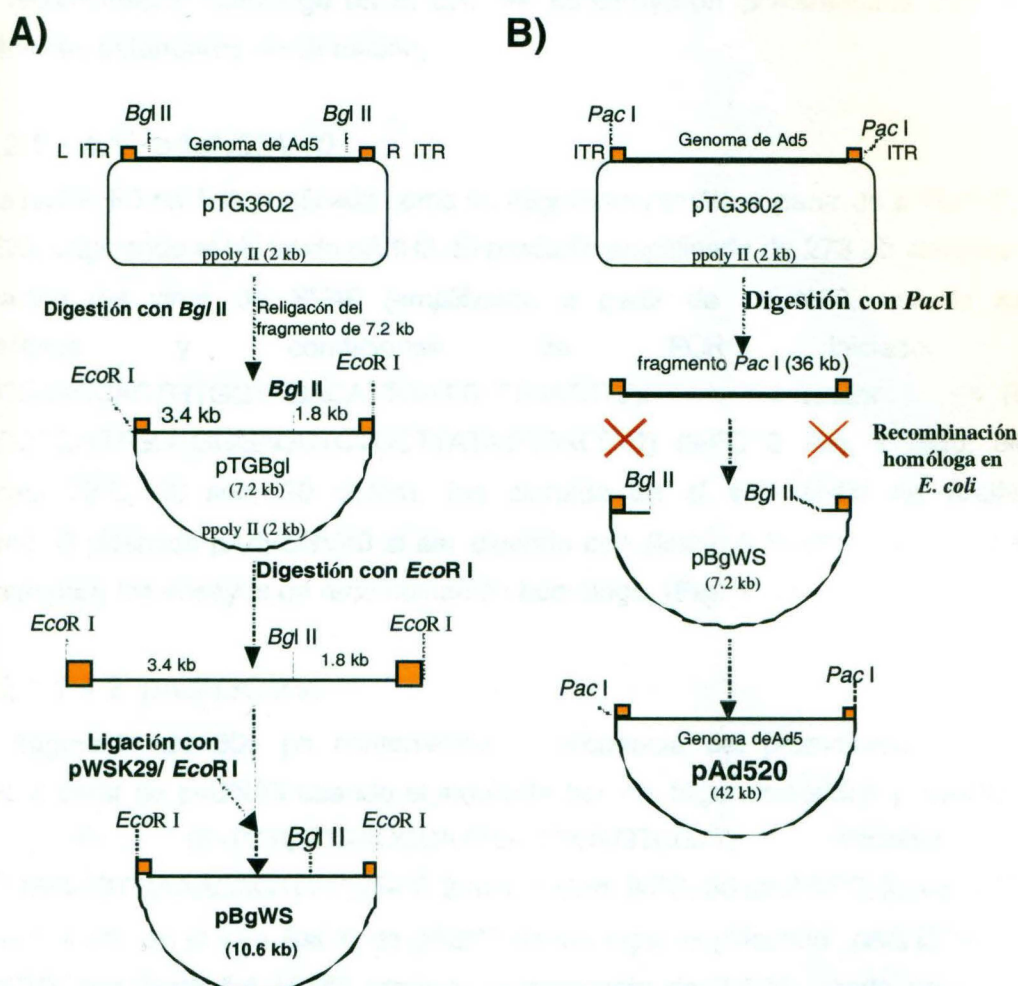


Figura 10. Construcción de pAd520. **A) Construcción del plásmido pBgWS** (plásmido de bajo número de copias). pTG3602 fue primeramente digerido con *Bgl*III. El fragmento de 7.2 kb conteniendo 3.4 kb del extremo izquierdo y 1.8 kb del extremo derecho de Ad5 (separados por un sitio *Bgl* II y flanqueados por sitios *Eco*R I) además de 2 kb del plásmido base pPoly II, fue re-circularizado mediante transformación en *E. coli*. Este plásmido intermediario denominado pTGBgl fue digerido con *Eco*R I para recuperar solo las secuencias adenovirales (3.4 kb y 1.8 kb). El fragmento *Eco*R I de 5.2 kb fue clonado en pWSK29 (plásmido de bajo número de copias), el cual fue primeramente modificado de tal forma que los dos sitios *Bgl* II originales fueron removidos mediante relleno con *Klenow* y dNTPs. La remoción de los sitios *Bgl* II de pWSK29 se hizo con el propósito de poder luego abrir pBgWS usando esta enzima y utilizar el plásmido linealizado para recombinación homóloga ó para clonar otros cassettes de expresión entre el extremo izquierdo y derecho de Ad5. **B) Construcción del plásmido pAd520.** El fragmento *Pac*I de 36 kb con todo el genoma de Ad5 fue aislado a partir de pTG3602 y co-transformado con pBgWS linealizado con *Bgl*II en *E. coli*, cepa BJ5183. El DNA plasmídico extraído a partir de las colonias resistentes a ampicilina fue analizado con enzimas de restricción para identificar la construcción correcta.

2.2.1.1.4 CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS INTERMEDIARIOS.

Para crear los plásmido ayudadores que portarían el origen de SV40 ó el promotor del CMV mediante recombinación homóloga en *E. coli*, se construyeron primeramente tres intermediarios, usando técnicas estándares de clonación.

2.2.1.1.4.1 *pAdH3SV40*.

La región E3 de Ad5 purificada como un fragmento *Hind*III a partir de pTG3602, fue clonada en pBR322Δ, originando el plásmido pAdH3. El producto amplificado de 273 pb conteniendo el origen de replicación del virus de SV40 [amplificado a partir de pcDNA3, usando los siguientes oligonucleótidos y condiciones de PCR: iniciador F (5'-CCCGCTCCCACCACTGTGGTTGACATTGATTATTGACT-3'), iniciador R (5'-CTCGCCCCACAGTGGTGGGAGCTCTGCTTATATAGACC-3') (94°C 2 min, 1 ciclo; 94°C, 30 sec/ 52°C,30 sec/ 72°C, 50 sec, 30 ciclos), fue clonado en el sitio *Bst*XI de pAdH3 originando pAdH3SV40. El plásmido pAdH3SV40 al ser digerido con *Bss*HII ó *Hind*III produce el fragmento de 3.4 kb usado para los ensayos de recombinación homóloga. (Fig. 11A)

2.2.1.1.4.2 *pAdH3CMV*.

El fragmento de 600 pb conteniendo la secuencia del promotor del CMV (previamente amplificado a partir de pcDNA3 usando el siguiente par de oligonucleótidos y condiciones de PCR [iniciador F (5'-TCTCATAAGCCATTGCTCGAGTCG-3'), Iniciador R (5'-GAGTCCTTACCGTGAAACAGTC-3') (94°C 2 min, 1 ciclo; 94°C, 30 sec/ 52°C,30 sec/ 72°C, 50 sec, 30 ciclos)], fue clonado en el sitio *Bst* XI de pAdH3 dando lugar al plásmido pAdH3CMV. La digestión de pAdH3CMV con *Bss*H II ó *Hind*III produce el fragmento de 3.4 kb usado para los ensayos de recombinación homóloga. (Fig. 11A).

2.2.1.1.4.3 *pUC3.4CMV*.

La región del promotor de genes tardíos de Ad5 (fragmento *Hind* III purificado a partir de pTG3602) fue clonada en el plásmido pUC19, originando pUC3.4. El fragmento CMV amplificado por PCR [amplificado a partir de pcDNA3, usando el siguiente par de iniciadores y condiciones: iniciador F (5'-TCTCATAAGCCATTGCTCGAGTCG-3'), iniciador R (5'-GAGTCCTTACCGTGAAACAGTC-3') (94°C 2 min, 1 ciclo; 94°C, 30 sec/ 52°C,30 sec/ 72°C, 50 sec, 30 ciclos)], fue clonado en el sitio *Xho* I de pUC3.4, creando pUC3.4CMV. El plásmido pUC3.4CMV al ser digerido con con *Bss*H II ó *Hind*III produce el fragmento de 3.4 kb usado para los ensayos de recombinación. (Fig. 11B).

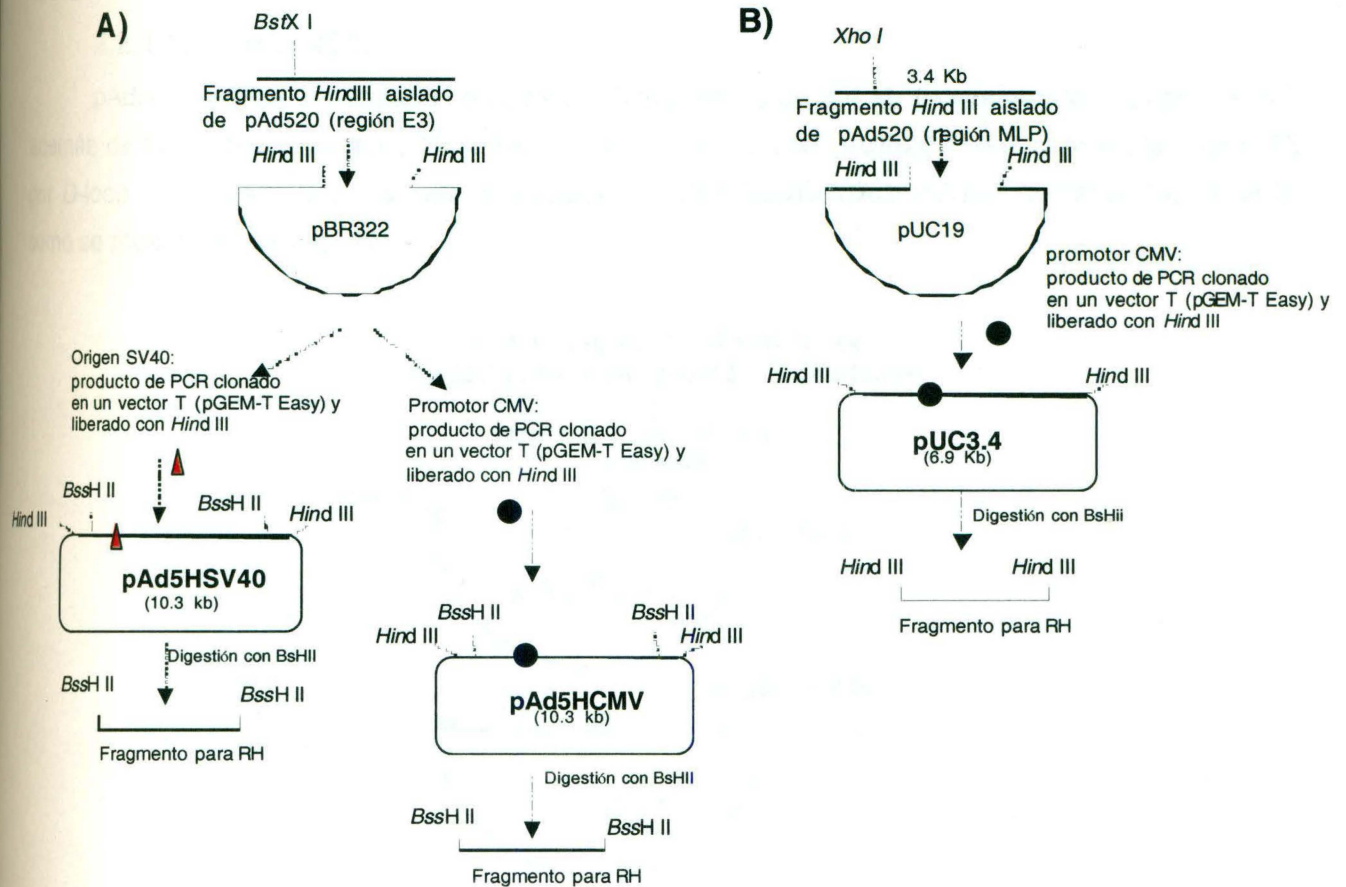


Figura 11. Construcción de tres plásmidos intermedarios. A) Construcción de los plásmidos pAd5HSV40 y pAd5HCMV. El fragmento *Hind*III de 4.3 kb conteniendo la región E3 de Ad5 fue clonado en el plásmido pBR322, dando origen a pAd5H3. El fragmento de 273 pb codificante para el origen SV40 y el fragmento de 652 pb codificante para el promotor CMV (ambos amplificados por PCR a partir del plásmido pcDNA-3, usando el par de oligonucleótidos y condiciones descritos anteriormente y clonados en el vector T (denominado pGEMT-Easy) fueron clonados en el sitio *Bst*XI de pAd5H3, originando los plásmidos pAd5HSV40 y pAdHCMV, los cuales al ser digeridos ya sea con *Bss*HII ó *Hind*III producen el fragmento de aproximadamente 4.3 kb usando para los experimentos de recombinación homóloga con pAd520. **B)** Construcción del plásmido pUC3.4CMV. Por otro lado, el fragmento de 3.4 kb conteniendo la región MLP de Ad5 fue clonada en el plásmido pUC19, originando el plásmido pUC3.4. El fragmento de 652 pb previamente amplificado y clonado en pGEMT-Easy, fue subclonando en el sitio *Xho*I de pUC3.4 creando así el plásmido pUC3.4CMV el cual, al igual que los otros dos intermedarios, al ser digerido con *Bss*HII ó *Hind*III producen el fragmento de aproximadamente 4.3 kb usado para los experimentos de recombinación homóloga con pAd520.

2.2.1.1.5 CONSTRUCCIÓN DE pSV4057 MEDIANTE D-LOOP/RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN *E. coli*.

2.2.1.1.5.1 pSV4057.

pAdH3SV40 fue linearizado con *Bss*HII. El fragmento de 3.4 kb (conteniendo el origen SV40, además de las secuencias para RH), fue co-transformado con pAd520 linearizado en la región E3 por D-loop y nucleasa S1, usando el iniciador: 5'-CCCGCTCCCACCACTGTGGTACTTCCCAGA-3', como se muestra en la Fig. 12.

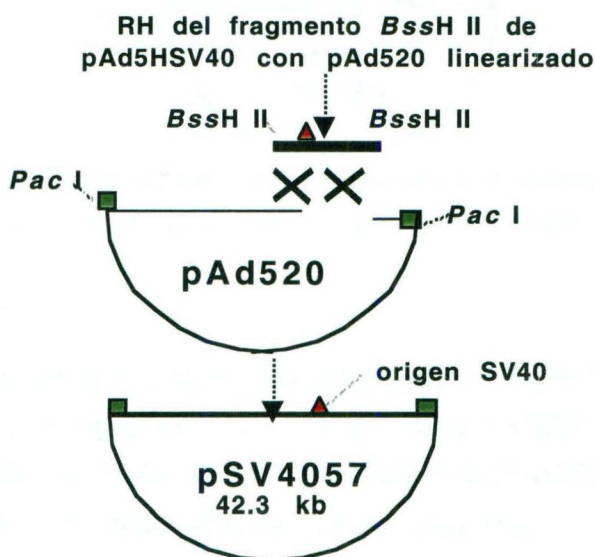


Figura 12 Producción de pSV4057. El fragmento *Bss*HII conteniendo el origen SV40, fue co-trasformado en *E. coli* con pAd520 (linearizado por D-loop en la región E3 de Ad5), dando origen al plásmido ayudador denominado pSV4057.

2.2.1.1.6 CONSTRUCCIÓN DE PE13, PML31 Y P13/31 MEDIANTE D-LOOP/RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN *E. coli*. Estos plásmidos “ayudadores” se diferencian entre sí por tener el promotor del CMV clonado en diferentes regiones del genoma adenoviral.

2.2.1.1.6.1 pE13.

La región E3 de Ad5 (obtenida a partir de pTG3602) fue clonada en el sitio *Hind*III de pBR322Δ originando el plásmido pAdH3, como ya se describió anteriormente. El fragmento CMV amplificado por PCR, fue clonado en el sitio *Bst*XI de pAdH3 originando pAdH3CMV. pAdH3CMV fue digerido con *Hind*III, liberando un fragmento de 4.2 kb que se usó en los experimentos de recombinação homóloga con pAd520 linearizado con el primer E3: 5'-CCCGCTCCCACCACTGTGGTACTTCCCAGA-3' (Fig. 13).

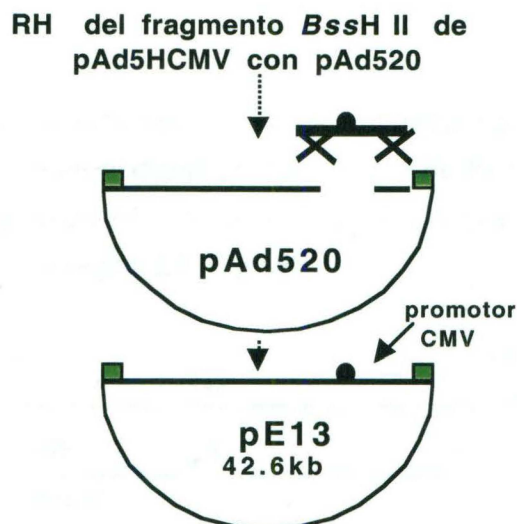


Figura 13 Producción de pE13. El fragmento *Bss*HII conteniendo el promotor CMV fue co-trasformado en *E. coli* con pAd520 linerizado por D-loop en la región E3 de Ad5, dando origen al plásmido ayudador denominado pE13.

2.2.1.1.6.2 pMLP31.

Para crear este plásmido pUC3.4CMV fue linearizado con *Bss*HII para liberar un fragmento de 4.0 kb que fue purificado y co-transformado con el plásmido pAd520 linearizado por D-loop en la región MLP usando el iniciador: 5'- TGGAAGAACTTGGAGACGCCCTGTGGGACG-3'. pMLP31 tiene el promotor CMV sustituyendo el promotor de genes tardíos.(Fig. 14).

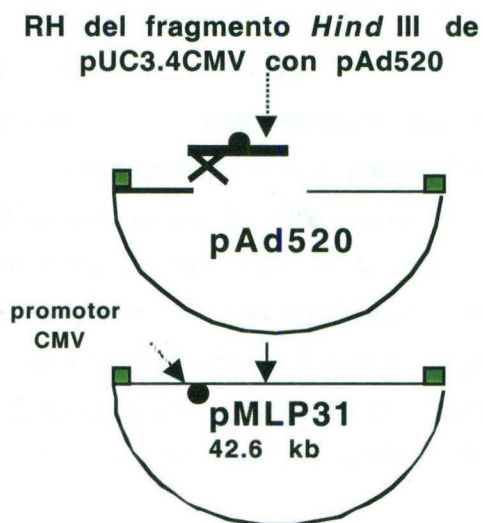


Figura 14. Construcción de pMLP31. El fragmento *Bss*HII conteniendo el promotor del CMV clonado en la región del promotor de genes tardíos de Ad5, fue co-trasformado en *E. coli* con pAd520 (linearizado por D-loop en la región MLP de Ad5) originando el plásmido ayudador denominado pMLP31.

2.2.1.1.6.3 p13/31.

Con el objeto de producir un plásmido que tuviera un promotor CMV en la región MLP y otro en la región E3, pMLP31 y pE13 fueron digeridos con *PacI*. Los fragmentos de 36 Kb fueron co-transformados en *BJ5183* originando p13/31, en el cual un promotor CMV está localizado en la región de genes tardíos y otro en la región E3 (Fig.15).

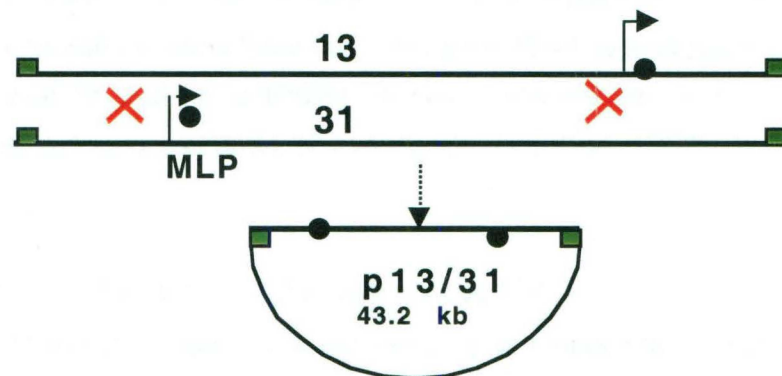


Fig 15. Producción de p13-31. El plásmido pE13 fue linearizado por D-loop en la región E3, en tanto que pMLP31 fue digerido con *Pac I* para liberar el genoma de Ad5 conteniendo el promotor del CMV en la región MLP. Ambos DNAs fueron co-transformados en *E. coli*, originando así el plásmido ayudador denominado p13-31.

2.2.1.1.7 ANÁLISIS DE LAS CLONAS PRODUCTO DE LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA, MEDIANTE DIGESTIÓN CON *EcoRI*, PCR Y SOUTHERN BLOT.

La presencia del fragmento de 273 pb dentro del plásmido de 42 kb, se determinó en tres pasos consecutivos. Primero, las colonias resistentes a ampicilina fueron digeridas con *EcoRI*, para identificar y aislar solamente aquellas clonas que hubieran recombinando perfectamente y que solo exhibieran las bandas de 27, 5.8, 5.4 y 2.7 kb. Las clonas con el patrón de digestión correcto fueron luego analizadas por PCR usando iniciadores específicos para amplificar ya sea el origen SV40 ó el promotor CMV. Las clonas positivas por PCR, fueron luego analizadas por Southern blot con el fin de establecer que los fragmentos introducidos por recombinación homóloga estuvieran localizados en la posición y región correcta y eliminar la posibilidad de inserciones inespecíficas.

2.2.2 ANÁLISIS DE LA REPLICACIÓN, EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS TARDÍAS Y TRANSCRIPCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS AYUDADORES.

2.2.2.1 ANÁLISIS DE LA REPLICACIÓN POR "SOUTHERN BLOT".

2.2.2.1.1 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE LOS PLÁSMIDOS EN CÉLULAS 293 Y 293T.

10 μ g de DNA de cada uno de los plásmidos ayudadores como DNAs superenrollados y linealizados con *PacI*, fueron introducidos en células 293 y 293-T (sembradas en cajas de cultivo de 100mm 24h antes), usando 40 μ l de lipofectamina como reactivo de transfección. 24, 48 y 72h después, el DNA fue extraído mediante el método de Hirt (Hirt 1967), el cual se describe a continuación.

2.2.2.1.2 EXTRACCIÓN DE DNA POR EL MÉTODO DE HIRT.

El medio de cultivo fue removido por aspiración y la monocapa celular fue lavada 2 veces con PBS (pH= 7). 1 mL de solución de Hirt (10% SDS, EDTA 0.5M) fue añadido a cada caja de 100 mm, incubando por 1 min a temperatura ambiente. La solución viscosa resultante (células lisadas) fue colocada en un tubo falcon de 15 mL e incubada con proteinasa K (10 mg/L; 1 h ;55°C). El DNA celular fue precipitado con NaCl a una concentración final de 0.02%, incubado a 4°C por 16h. El DNA plasmídico contenido en el sobrenadante, fue separado del DNA celular mediante centrifugación (10 min/ 8,000 g/ 4°C), lavado con un volumen de fenol, seguido por un volumen de cloroformo y precipitado con etanol al 100% (1/10 V de acetato de sodio pH= 5.2; 1h/-20°C). Finalmente, el DNA fue secado al aire, cuantificado y guardado a -20°C hasta su uso.

2.2.2.1.3 ANÁLISIS DE LA REPLICACIÓN POR "SOUTHERN BLOT".

Con el fin de detectar los productos de replicación de los plásmidos ayudadores y determinar el efecto del origen de SV40 y el promotor del CMV sobre la replicación del genoma adenoviral, se usó la técnica de Southern blot siguiendo el protocolo descrito en Maniatis (Sambrook et al., 1989). 10 μ g del DNA extraído a partir de las células transfectadas transitoriamente con cada uno de los plásmidos ayudadores, fueron primeramente digeridos con *Dpn I* (enzima que permite distinguir el cambio en el patrón de metilación entre DNA replicado en bacterias y DNA replicado en células eucariotas). El DNA digerido, fue resuelto en un gel de agarosa al 0.7%, tratado con HCl al 0.25M, desnaturalizado (NaCl 0.5 M y NaOH 0.5 N)(2 tiempos de incubación de 15 min), neutralizado (Tris 0.5 M y NaCl 0.5 M) (2 tiempos de incubación de 15 min) y transferido a una membrana de nylon usando vacío (40 min; usando SSC 20X como buffer de transferencia). El DNA fue fijado a la membrana de nylon mediante "cross linking" (1200x100 mJ/cm²), fue incubado posteriormente con

20 ml de solución de prehibridación (SSC 6X, 0.5% SDS, Denhardt's 5X, esperma de salmón) por 1 h a 68°C. La solución de prehibridación fue sustituida luego por solución de hibridación (SSC 6X, 0.5% SDS, esperma de salmón) conteniendo la sonda marcada radiactivamente [El marcaje de todas las sondas descritas en este trabajo, se llevó a cabo usando [³²P]dCTP y el método de primers al azar (Sambrook et al., 1989); los nucleótidos no incorporados fueron removidos usando columnas G50] incubando por 16 h a 68°C. La membrana fue lavada por 5 min a temperatura ambiente con solución 1 (SSC 2X, SDS 0.5%), seguido por un lavado de 15 min con solución 2. (SSC 2X, SDS 0.1%) y dos lavados consecutivos de 40 min con solución 3 (SSC 0.1X, SDS 0.5%;/ 37°C y 68°C respectivamente). La membrana radiactiva fue colocada en un fosforímetro y analizada usando el programa ImageQuant 4.0.

2.2.2.2 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ADENOVIRALES TARDÍAS POR INMUNOFLUORESCENCIA.

Con el fin de confirmar la producción de proteínas tardías codificadas por los plásmidos ayudadores, se usó la técnica de Inmunofluorescencia, para lo cual células 293 y 293T previamente sembradas en portaobjetos (cámaras de cultivo de vidrio divididas en 4 compartimentos) fueron transfectadas con 1µg de DNA de cada uno de los plásmidos ayudadores, como DNA superenrollado y como DNA linearizado con *Pac I*, usando 4µl de lipofectamina. 24, 48 y 72h después de la transfección, las células fueron fijadas al portaobjetos con metanol helado (guardado a -20°C) (En este punto los portaobjetos con las células ya fijadas fueron almacenados a -20°C hasta su uso, ó bien procesados inmediatamente).

La monocapa celular fue bloqueada usando PBS (pH= 8.0) con albúmina sérica bovina al 1%, por 20 min a temperatura ambiente y lavada tres veces con PBS para remover la albúmina no unida. El primer anticuerpo (diluído 1:50 en PBS, pH= 8.0) fue añadido en cantidad suficiente hasta cubrir completamente la monocapa celular. Las muestras fueron incubadas en cámara húmeda a 37°C por 2 h. El primer anticuerpo fue removido mediante tres lavados consecutivos con PBS. Las células fueron bloqueadas nuevamente con PBS con albúmina sérica bovina y lavadas como se describió anteriormente, antes de añadir el segundo anticuerpo marcado con fluoresceína (diluído 1:200 en PBS, pH= 8.0). Los portaobjetos fueron incubados en cámara húmeda por 1-2 h, lavados con PBS y secados al aire antes de ser fijadas con medio de montaje para preservar la fluorescencia. Finalmente las preparaciones fueron analizadas por microscopía.

2.2.2.3 DETECCIÓN DE DOS TRANSCRITOS ADENOVIRALES (HEXÓN Y PROTEÍNA TERMINAL) POR NORTHERN BLOT.

2.2.2.3.1 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE LOS PLÁSMIDOS EN CÉLULAS 293T.

10µg de DNA de cada uno de los plásmidos ayudadores como DNAs superenrollados y linearizados con *Pac I*, fueron introducidos en células 293-T sembradas en cajas de cultivo de 100mm usando 40µl de lipofectamina como reactivo de transfección. 72h después se extrajo el RNA total como se describe a continuación.

2.2.2.3.2 EXTRACCIÓN DE RNA.

Con el fin de detectar los transcritos de dos de las proteínas adenovirales (hexón y proteína terminal) producidas por los plásmidos ayudadores, se usó el kit de extracción de RNA de TRI-ZOL de Promega, así como material de plástico y vidrio libre de RNAsas y soluciones preparadas con agua MilliQ previamente tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). *Priori* a la extracción, las células 293T fueron transfectadas transitoriamente con 10µg de cada uno de los plásmidos ayudadores como se describió anteriormente. 72 h después, las células fueron cosechadas usando 1 ml del reactivo TRI-ZOL, por cada caja de cultivo de 100 mm. La mezcla de células-tri-zol fue incubada por 10 min a temperatura ambiente y lavada con 1 volumen de fenol y 1 volumen de cloroformo libre de RNAsas. El RNA total contenido en el sobrenadante, fue precipitado (2.5 vol. de etanol al 100%/ $1/_{10}$ de vol. de acetato de sodio 3M (pH 5.2)/1 h/ -20°C), lavado con etanol al 75% y resuspendido en agua DEPC. 1 µl del RNA total extraído, fue analizado en un gel de agarosa-MOPS-formaldehído al 1% teñido con bromuro de etidio para determinar su integridad. Las muestras fueron cuantificadas espectrofotométricamente y guardadas a -80°C hasta su uso.

2.2.2.3.3 PRODUCCIÓN DE LAS SONDAS PARA NORTHERN BLOT.

El plásmido pAd520 fue usado como templado para amplificar por PCR a partir de pAd520, un fragmento conteniendo 400 pb de la secuencia nucleotídica del hexón y un fragmento conteniendo 350 pb de la secuencia de la proteína terminal. Ambos fragmentos fueron clonados en el vector T pGEM-T Easy, originando los plásmidos pGEM-hexón y pGEM-proteína terminal. Las dos construcciones fueron digeridas con la enzima *EcoRI* para liberar los insertos de 400 y 350 pb respectivamente, antes de ser marcados radiactivamente usando [³²P]dCTP y el método de primers al azar.

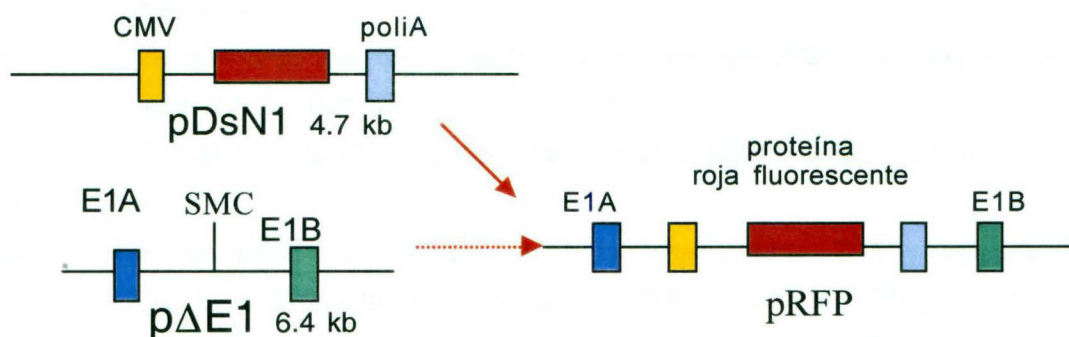
2.2.2.3.4 NORTHERN BLOT.

20 μ g del RNA total fueron resueltos en un gel de agarosa-MOPS-formaldehído al 1%, usando MOPS al 1% como buffer de corrida. El gel fue expuesto a una solución de NaOH al 0.05 N por 30 min a temperatura ambiente y en agitación, antes de transferir el RNA a una membrana de nylon usando vacío (40 min, usando SSC 20X como buffer de transferencia). El RNA fue fijado a la membrana de nylon mediante "cross linking" (1200x100 mJ/cm²) e incubado con 20 ml de solución de prehibridación (SSC 6X, 0.5% SDS, denhardt's 5X, esperma de salmón) por 1 h a 68°C. La solución de prehibridación fue sustituida por 20 ml de solución de hibridación (SSC 6X, 0.5% SDS, esperma de salmón) conteniendo la sonda marcada radiactivamente y las muestras fueron incubadas por 16 h a 68°C. La membrana fue lavada por 5 min a temperatura ambiente con solución 1 (SSC 2X, SDS 0.5%), seguida por un lavado de 15 min con solución 2 (SSC 2X, SDS 0.1%) y dos lavados consecutivos de 40 min con solución 3 (SSC 0.1X, SDS 0.5%;/ 37°C y 68°C respectivamente). La membrana radiactiva fue colocada en el fosforímetro y analizada usando el programa ImageQuant 4.0 (Goda, 1995).

2.2.3 CONSTRUCCIÓN DE pRFP Y PRODUCCIÓN DEL RECOMBINANTE ADENOVIRAL DE TIPO I.

2.2.3.1 CONSTRUCCIÓN DE pRFP.

El cassette de expresión *EcoRI-Bgl II* de 1.6 kb obtenido a partir del plásmido pDsN1 y conteniendo la secuencia codificante para la proteína roja fluorescente, fue clonado en el plásmido comercial p Δ E1A (6.4 Kb), originando el plásmido pRFP de 8.0 kb, como se esquematiza en el siguiente diagrama.



2.2.3.2 PRODUCCIÓN DEL RECOMBINANTE ADENOVIRAL AdRFP MEDIANTE CO-TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS EN CULTIVO (ENSAYO EN PLACA).

2.2.3.2.1 CO-TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS 293T.

8 μ g del plásmido ayudador pSV4057 (DNA superenrollado) y 2 μ g del plásmido acarreador pRFP, fueron co-transfectados en células 293-T 100% confluentes [mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, usando un pasaje menor de 30 y sembradas en cajas de 60 mm (1×10^6 células) 24 h antes de la transfección], usando 40 μ l de lipofectamina como agente de transfección y 1.6 ml de medio optimem. La mezcla DNA-lipofectamina-optimem fue incubada 45 min. a temperatura ambiente y puesta en contacto con las células por 5 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

2.2.3.2.2 ENSAYO EN PLACA.

Después de 5 h de incubación a 37°C, la mezcla de transfección DNA-lipofectamina-optimem fue removida mediante aspiración y la monocapa celular transfectada fue cubierta con 3 ml de mezcla 2X MEM-bactoagar (medio esencial mínimo 2X, suero bovino fetal, mezcla penicilina-estreptomicina y bactoagar al 2.8%). Las cajas fueron incubadas nuevamente a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 10-15 días ó hasta la aparición de placas de lisis que indican la producción de virus. Para mantener la viabilidad de las células durante el período de incubación, la monocapa fue alimentada con la mezcla 2X MEM-bactoagar cada cuatro días. Como control de producción de recombinantes, se usó el plásmido pJM17 junto con el plásmido pLAD para producir un recombinante codificante para la enzima β -galactosidasa.

2.2.3.2.3 AISLAMIENTO Y PROPAGACIÓN DE LAS PLACAS DE LISIS.

2.2.3.2.3.1 AISLAMIENTO.

Las placas de lisis producto de la recombinación de los DNAs en células 293T, fueron levantadas del agar con una puntilla p200 y fueron ya sea:

Resuspendidas en 500 μ l de medio D-MEM con 2% de suero bovino fetal y almacenadas a -80°C hasta su uso ; ó bien

A) Lisadas mediante tres tratamientos sucesivos de congelamiento a -20°C y descongelamiento a 37°C, clarificando el sobrenadante mediante centrifugación a 5000g/10 min y usado inmediatamente para infectar nuevas células 293T sembradas en placas de 6 pozos y preparar el primer stock viral.

2.2.3.2.3.2 DETERMINACIÓN DE LA MULTIPLICIDAD DE LA INFECCIÓN (MOI) INICIAL.

Con el objeto de determinar y obtener un valor aproximado del número de partículas virales presentes en el sobrenadante inicial, células 293 T sembradas en placas de 6 pozos, fueron infectadas con cantidades variables (desde 1 hasta 50 μ l) del sobrenadante conteniendo virus. Las células fueron incubadas por 3 días a 37°C en atmósfera de CO₂, hasta la aparición del efecto citopático (CPE).

2.2.3.2.3.3 PRODUCCIÓN DEL PRIMER STOCK VIRAL.

Células 293T fueron sembradas en placas de 6 pozos (1×10^6 células) e infectadas con 100 μ l del sobrenadante donde fue resuspendida la placa viral ó bien, infectadas con la placa viral directamente (volumen total 1 mL). Las células fueron incubadas a 37°C/5%CO₂ y revisadas diariamente hasta la aparición de efecto citopático (morfología característica de células infectadas por virus). Las células fueron recuperadas y lisadas mediante 3 ciclos consecutivos de congelamiento y descongelamiento (como se describió anteriormente) y los virus contenidos en el sobrenadante fueron colectados mediante centrifugación y almacenados a -80°C. Este sobrenadante constituyó el PRIMER STOCK VIRAL y tuvo suficiente cantidad de virus para hacer el primer análisis mediante PCR (Mittereder *et al.*, 1996).

2.2.3.2.3.4 IDENTIFICACIÓN DEL RECOMBINANTE ADENOVIRAL Y ANÁLISIS FUNCIONAL.

En este caso particular, debido a que el recombinante final posee la proteína roja fluorescente como gen reportero, la simple inspección de las cajas bajo el microscopio usando luz verde (590 nm de emisión), permitió la identificación de los recombinantes deseados. De igual manera, la infección inicial de células 293T y su análisis por microscopía permitió comprobar la obtención del recombinante adenoviral conteniendo la proteína roja fluorescente. En el caso del recombinante control Ad β gal, producido mediante la co-transfección de pJM17 con pLAD, tuvieron que levantarse todas las placas de lisis obtenidas como se describió anteriormente, para poder determinar la presencia del inserto mediante PCR (datos no mostrados). Para establecer la funcionalidad de este recombinante, células 293T previamente sembradas en cajas de 6 pozos, fueron infectadas con 10 μ l del sobrenadante conteniendo el virus y fueron incubadas a 37°C/5%CO₂. 24 h después de la infección, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con 1 ml de mezcla glutaraldehído-formaldehído en PBS por 5 min a temperatura ambiente. La monocapa celular fué lavada dos veces con PBS y expuesta a 1 ml de la mezcla PBS-Xgal. 30 min después, las células fueron analizadas para establecer la presencia de actividad de la enzima β -galactosidasa por microscopía.

2.2.3.3 PRODUCCIÓN DEL RECOMBINANTE AdRFP POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN *E. coli*.

2.2.3.3.1 PRODUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pAdRFP EN *E. coli*.

Con el propósito de comparar la eficiencia de producción de recombinantes usando el sistema de DNA circular en células en cultivo y el sistema de recombinación homóloga usando DNA linealizado en *E. coli*, el plásmido pRFP conteniendo el cassette de expresión codificante para la proteína roja fluorescente fue usado como templado para amplificar por PCR un fragmento de aproximadamente 2 kb conteniendo además del cassette de expresión, 300 pb de la región E1A y 300 pb de la región E1B en cada extremo. Por otra parte, el plásmido ayudador pSV4057 fue linealizado mediante D-loop en la región E1, usando el oligonucleótido N50 (5'-CATCATCATAATATAACCTTAT-3'). Ambos DNAs linealizados fueron co-transformados en *E. coli* BJ5183 como se describió anteriormente, y las clonas positivas fueron identificadas mediante digestión con enzimas de restricción y Southern blot.

El plásmido resultante denominado pAdRFP, fue digerido con *Pac* I y el fragmento de 36 kb fue usado para transfectar células 293T previamente sembradas en cajas de 60 mm. La producción del recombinante adenoviral fue monitoreada mediante microscopía.

El recombinante fue sometido a los ensayos de multiplicidad de infección, generación del primer stock y ensayo de infectividad y funcionalidad, como se describió anteriormente.

2.2.3.4 PROPAGACION DEL RECOMBINANTE ADENOVIRAL.

Células 293-T fueron sembradas en cajas de 150 mm 24 h antes de la infección. Cuando las células alcanzaron el 100% de confluencia, fueron infectadas a una multiplicidad de infección (MOI) de 10, con el sobrenadante conteniendo el virus recombinante. Las células fueron mantenidas en medio DMEM con 2% de suero fetal bovino a 37°C/5%CO₂, hasta que el CPE fue del 100 % (usualmente dos días después de la infección). El contenido total de cada caja de 150 mm, fue colectado y sometido a 3 ciclos consecutivos de congelamiento y descongelamiento (como se describió anteriormente) y los virus contenidos en el sobrenadante fueron colectados mediante centrifugación y ya sea, almacenados a -80°C ó purificados inmediatamente en un doble gradiente de cloruro de cesio como se describe a continuación (Mittereder *et al.*, 1996).

2.2.3.5 PURIFICACIÓN DE LOS RECOMBINANTES POR DOBLE GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO.

20 ml del sobrenadante conteniendo el recombinante adenoviral fueron depositados en la superficie de un gradiente discontinuo 1.2 g/L-1.4g/L de cloruro de cesio. Las muestras fueron centrifugadas por 90min/4°C/100000 g, en un rotor SW28. La banda conteniendo el recombinante fue extraída por punción, disuelta en 2 volúmenes de TE al 1% y colocada nuevamente en la superficie de un gradiente 1.2 g/L-1.4g/L de cloruro de cesio continuo, preparado usando un formador de gradientes de Bio-Rad. Las muestras fueron centrifugadas por 24 h/4°C/32000 g, en el rotor SW28. Nuevamente, la banda conteniendo el recombinante fue extraída por punción, colocada en un cassette Dialyzer y dializada contra un solución de PBS con sacarosa por 3h a 4°C, reemplazando la solución al término de cada hora de incubación. Finalmente la solución conteniendo el virus fué extraída del cassette de diálisis por punción, depositada en un criovial y guardada a -80°C hasta su uso (Nyberg *et al.*, 1999).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS ADENOVIRALES AYUDADORES.

3.1.1 *pJM17ori⁺*.

pJM17ori⁺ fue construido, clonando el fragmento de 500 pb conteniendo la secuencia con el promotor temprano, el potenciador y el origen de replicación del virus de SV40 en el sitio *EcoRI*, posición 3,460 del plásmido pBRX, que se encuentra interrumpiendo la unidad de transcripción E1 A / B de Adenovirus tipo 5 (Fig. 16).

3.1.1.1 LA REPLICACIÓN GENÓMICA Y SUBGENÓMICA DE *pJM17ori⁺*.

La actividad replicativa de *pJM17ori⁺*, junto con *pJM17* sin modificar que fue usado como testigo negativo de replicación, se determinó mediante la transfección transitoria de los DNAs en células 293T, las cuales expresan las proteínas adenovirales codificadas por la región E1, además del antígeno T grande de SV40 y 293 que expresan las proteínas adenovirales codificadas por la región E1. Células infectadas con Ad5 *del309* fueron usadas como control positivo de replicación. Los DNAs plasmídicos extraídos a las 24, 48 y 72 h después de la transfección, fueron digeridos con *Dpn I* (enzima que reconoce patrones de metilación) y *BamHI*, con el propósito de asegurarse que las bandas de alto peso molecular esperadas en caso de replicación (36 kb), son debidas a éste proceso y no son producto de digestión incompleta con *DpnI*.

En el caso de replicación, además del genoma plasmídico (40 kb), se esperaba detectar un conjunto de bandas pequeñas (1-5 kb), producto de la digestión del DNA no replicado (el DNA que se usó para transfectar las células y que sirvió como templado para la replicación) con *DpnI*. El análisis por Southern blot arrojó los siguientes datos:

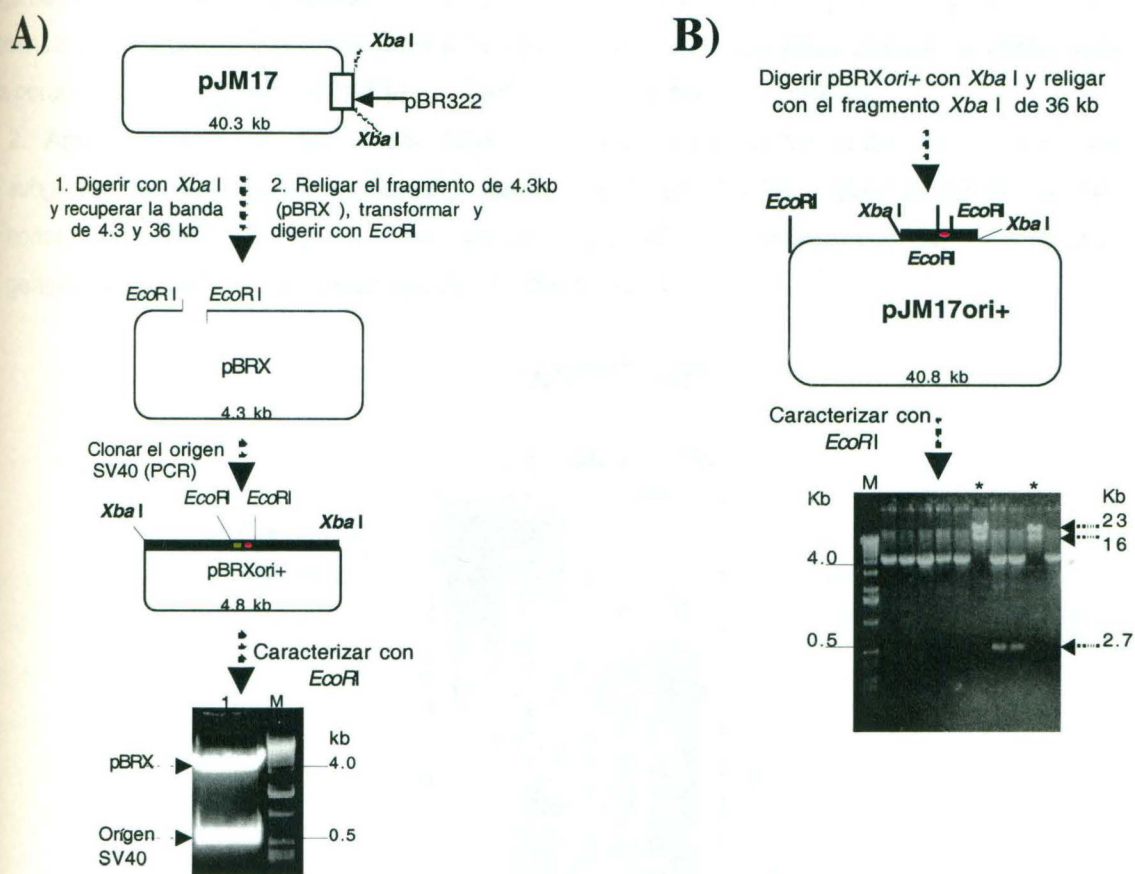


Figura 16 Construcción de pJM17ori+. **A) Construcción de pBRXori+.** La digestión de pJM17 con *Xba*I produjo un fragmento de 36 kb (genoma de Ad5) y un fragmento de 4.3 kb. El fragmento de 4.3 kb denominado pBRX (derivado de Δ pBR322), fue religado y transformado en *E. coli* y recuperado como DNA circular. El plásmido fue digerido con *Eco*RI y ligado con el producto amplificado por PCR (500 pb) codificante para el origen de replicación del virus SV40 (previamente amplificado a partir de pcDNA-3 y digerido con *Eco*RI), creándose el plásmido pBRXori+. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. 1: pBRXori+ digerido con *Eco*RI, observándose la banda de 4.3 (vector) y 0.5 (inserto) kb; M: marcador de peso molecular, 1 kb. **B) Construcción de pJM17ori+.** pBRXori+ fue digerido con *Xba*I y religado con el fragmento *Xba*I de 36 kb, el producto de la ligación fue transformado en *E. coli* y el DNA plasmídico extraído a partir de 10 colonias ampicilina-resistentes fue digerido con *Eco*RI y analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio. En la foto se muestra M: marcador de peso molecular, λ HindIII; asterisco*: 2 clonas positivas que muestran los fragmentos de 27, 16 y 0.5 kb, característicos del patrón de restricción de pJM17ori+.

1. pJM17ori+, replica solamente en células que expresan el antígeno T grande [en células 293T, (produciendo aproximadamente 5,000 copias/célula 48h después de la transfección y alcanzando el pico máximo de 10,000c/c a las 72h)], lo que indica claramente que las bandas de replicación detectadas por la sonda marcada radiactivamente, son resultado de la actividad del

origen SV40 clonado en la región E1 del genoma de Adenovirus (**Fig. 17**), el cual se vuelve activo en presencia del antígeno T grande (única proteína viral requerida para activar la replicación de DNAs que portan el origen SV40) (Wold *et al.*, 1987; Danna y Nathans, 1972).

2. Aproximadamente 60% del DNA replicado está compuesto por moléculas de DNA subgenómico que varían en tamaño desde 2 kb hasta 15 kb y solo el 40 % del DNA restante constituye pJM17ori⁺ replicado en su totalidad (40 kb), observándose mayor producción de genomas completos 72h después de la transfección.

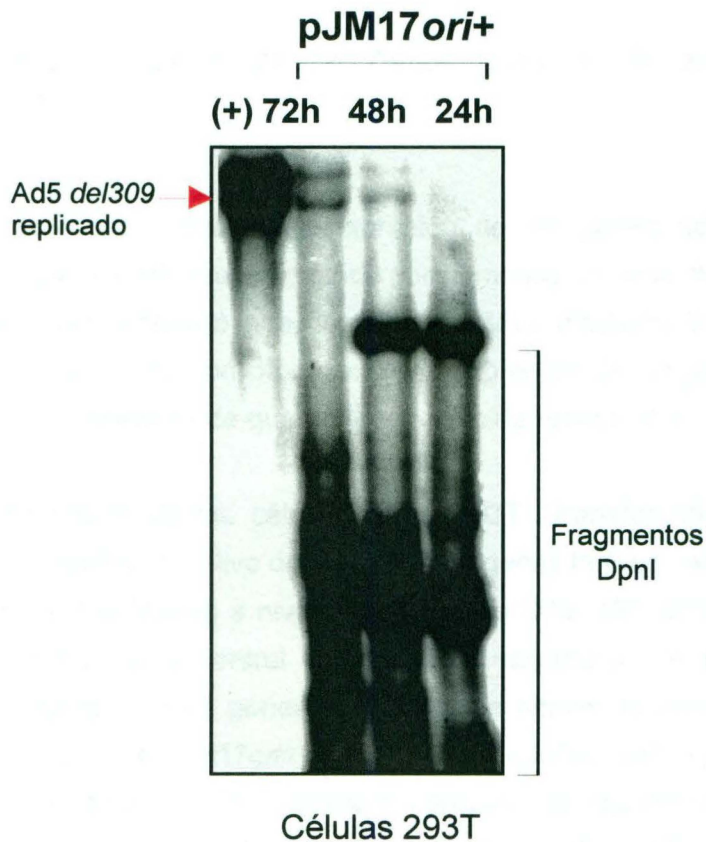


Figura 17. Análisis de pJM17ori⁺ por Southern blot. pJM17ori⁺ fue transfectado en células 293T en tres experimentos independientes. El DNA plasmídico recuperado a las 24, 48 y 72h mediante el método de Hirt, fue digerido con *DpnI*, enzima que reconoce patrones de metilación y permite diferenciar entre el DNA plasmídico usado para la transfección "input" y el DNA replicado "De Novo", y con *BamHI*, enzima que corta una vez el genoma de Ad5 y dos veces pJM17ori⁺ produciendo dos fragmentos de 23 y 16 kb. Los productos de la digestión fueron resueltos en un gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio, transferidos a una membrana de nylon e hibridados con el genoma de Ad5 marcado radiactivamente con [³²P]. La membrana radiactiva fue expuesta al fosforímetro para obtener la autorradiografía y cuantificar las bandas de replicación. DNA de células 293T infectadas con Adenovirus tipo 5 *del309* fue usado como control positivo de replicación (+) y sometido al mismo tratamiento. Como se muestra en la figura, se observaron las bandas de 23 y 13 kb en el caso de la replicación de Ad5 tipo silvestre y 23 y 16 kb de pJM17ori⁺ replicado a las 48 y 72h después de la transfección.

A pesar de que solo el 40-50% del DNA replicado constituyó moléculas genómicas completas, los resultados anteriores mostraron claras evidencias de la replicación de pJM17ori⁺ por primera vez y la influencia positiva del origen SV40, aunque no explican el fenómeno de replicación incompleta ó interrumpida. Previamente ha sido reportado que la presencia de secuencias repetitivas cercanas al origen SV40 (como las que rodean el origen en pJM17), ocasionan fallas en el mecanismo de replicación e interfieren con éste (Heinzel *et al.*, 1988).

3.1.1.2 EL INCREMENTO EN LA REPLICACIÓN DE pJM17ori⁺ ACTIVA LA TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES TARDÍOS.

Como se mencionó anteriormente, la expresión de los genes adenovirales tardíos es la evidencia más clara de que el DNA viral ha pasado por al menos un ciclo de replicación. Es posible demostrar que el origen SV40 promovió la replicación de pJM17, mediante la simple inmunodetección de las proteínas virales, las cuales son producto de la expresión de los genes de la región tardía , región que se vuelve activa después de que ocurre el ciclo de replicación.

El análisis microscópico de las células 293 y 293T transfectadas con pJM17ori⁺ y el plásmido pJM17, el como testigo negativo de expresión de genes tardíos, mostró que solo pJM17ori⁺ transcribió y expresó proteínas tardías a niveles detectables (**Fig. 18**). células 293T infectadas con Ad5 *del309* fueron usadas como control positivo de la expresión de proteínas tardías. Este resultado mostró claramente, que los genes tardíos fueron activados solamente en aquellos DNAs capaces de replicar, como lo es pJM17ori⁺ y el control positivo Ad5 tipo silvestre y que estas proteínas fueron expresadas como consecuencia del proceso de replicación viral, provocado por el origen SV40 en el caso específico de pJM17ori⁺ , ya que el control negativo pJM17, que no replica a niveles detectables, no produjo proteínas tardías a niveles detectables. En contraste, Ad5 *wt* replicó y expresó eficientemente proteínas virales tardías.

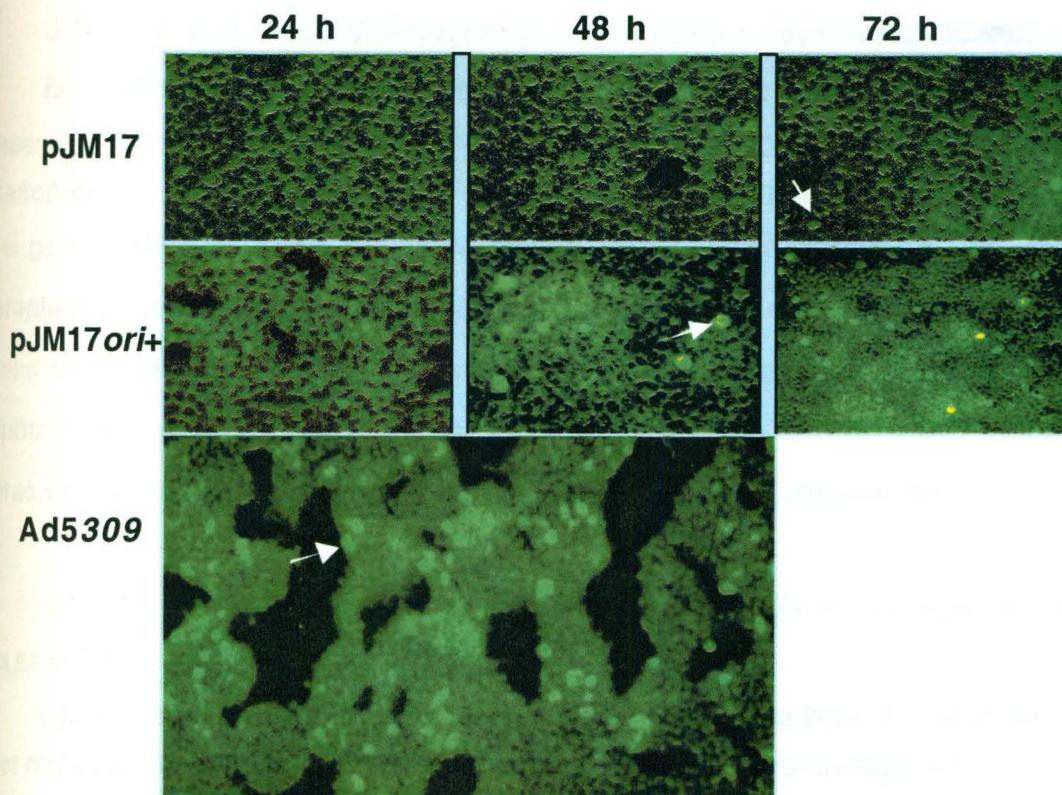


Figura 18. Detección de proteínas tardías de Adenovirus por inmunofluorescencia (IF). Células 293T cultivadas en portaobjetos fueron transfectadas con pJM17*ori+*. 24, 48 y 72 h después de la transfección, la monocapa celular previamente fijada con metanol, fue expuesta a un anticuerpo primario policlonal que reconoce proteínas tardías de Adenovirus, seguido por un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína y analizadas al microscopio usando luz azul (550 nm). Como se muestra en la serie fotográfica, solo las células que expresan proteínas tardías aparecen fluorescentes como resultado del reconocimiento específico entre las proteínas tardías y los anticuerpos usados.

Aunque los experimentos de Southern blot e Inmunofluorescencia mostrados, no establecieron de forma contundente que el origen SV40 promovería eficientemente la replicación y expresión de genes tardíos a un nivel similar al del Adenovirus tipo silvestre, sí demostraron que incrementando la replicación del genoma adenoviral con el origen heterólogo (SV40), es posible incrementar la expresión de la región de genes tardíos.

Por otra parte, los ensayos de replicación transitoria usando las moléculas de DNA incompletas indicaron, que la posición del origen SV40 dentro de pJM17*ori+* parecía ser el factor responsable del fenómeno de replicación subgenómica y por tanto resultaría conveniente clonar el origen en una región del genoma adenoviral diferente a E1 (pBRX).

3.1.2 MÉTODO D-LOOP/RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y ESTANDARIZACIÓN DE PARÁMETROS.

El método D-loop/recombinación homóloga que permite clonar DNAs independientemente de la disponibilidad de sitios de restricción únicos (Castro y Villarreal, 2000), fue desarrollado con el propósito de resolver el problema de la falta de sitios de clonación específicos en el genoma de Adenovirus y poder clonar el origen de SV40 en una área adenoviral diferente a E1 (eligiéndose la región E3, dado que no es esencial para el crecimiento del virus en células en cultivo) para eliminar el fenómeno de producción de DNA subgenómico y con el propósito de hacer uso del promotor CMV y clonarlo en la región MLP para promover la expresión de los genes tardíos en forma independiente al mecanismo de replicación.

3.1.2.1 D-LOOP: ALINEAMIENTO DEL INICIADOR CON EL VECTOR Y DIGESTIÓN CON NUCLEASA S1.

Los métodos que usan nucleasa S1 y oligonucleótido para linearizar DNA de doble cadena y hacer mutaciones puntuales y deleciones, fueron diseñados para trabajar con plásmidos de 3-5 kb (Green y Tibbetts, 1980; Shortle *et al.*, 1980). Por tanto, para modificar y linearizar pJM17 (plásmido de 40.5 kb) en la región E1 y E3 tuvieron que estandarizarse las condiciones de reacción. Con el propósito de probar temperaturas de alineamiento diferentes a 75°C (reportada por Green) y determinar su efecto sobre la reacción, 10µg del plásmido fueron incubados con 7µg del oligonucleótido a 55, 65, 75 y 85°C/1h y tratados posteriormente con 200 U/mL de nucleasa S1. El análisis de cada una de las reacciones por electroforesis en gel de agarosa no mostró diferencias en la cantidad de producto linearizado (**Fig. 19A**). Diversas proporciones vector-oligonucleótido (1:1; 10µg de vector con 7 µg de iniciador, 1:5, 1:10, 1:25 y 1:50) fueron probadas con el propósito de determinar la influencia de la cantidad de oligonucleótido sobre el producto final linearizado. Las mezclas fueron incubados a 75°C/1h, digeridas con S1 (4°C/1h) y analizados en gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio. No se observaron diferencias significativas entre las diversas reacciones (**Fig. 19 B**). Para determinar la cantidad exacta de nucleasa S1 a usar en la reacción de D-loop, 10µg del plásmido fueron incubados con 7µg del oligonucleótido (ya sea E1 ó E3, ambos de 30 pb) e incubados a 75°C/1h. El DNA fue expuesto a concentraciones ascendentes de S1 (50,100,200, 400 y 800 U/mL) por 1h a 4°C. El producto de las digestiones fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa (**Fig. 19 C**), observándose que con 200 U/mL de enzima, los 10µg de DNA son perfectamente linearizados y no quedan trazas de DNA sin digerir. Para probar la especificidad de la nucleasa S1 por DNA de cadena sencilla y asegurarse de que la enzima no digiere

inespecíficamente DNA de doble cadena, 10 μg del plásmido *sin oligonucleótido* fueron sometidos al proceso D-loop (usando 200U/mL de S1), observándose que cuando el oligonucleótido no está presente en la reacción de alineamiento, la enzima no digiere el DNA de doble cadena, el cual permanece superenrollado (Fig. 19 D).

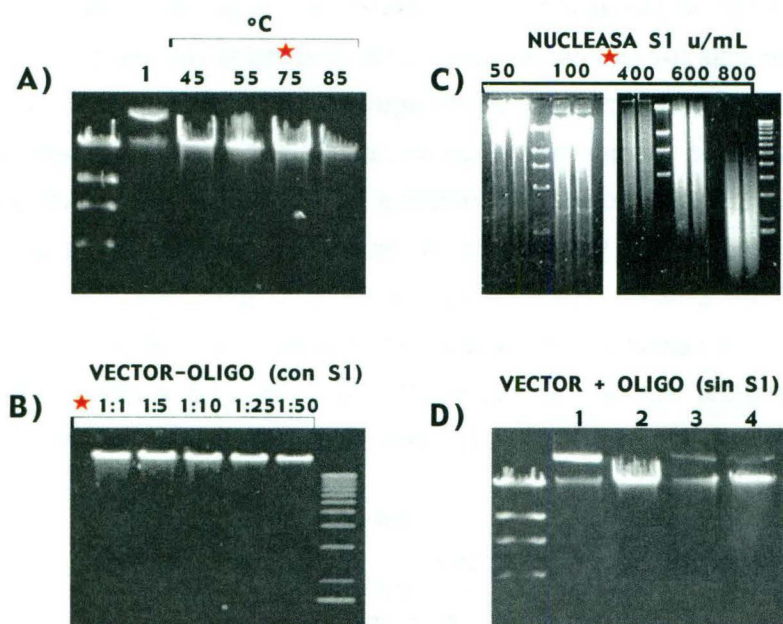


Figura 19 . Estandarización del método D-loop para plásmidos de 40 kb. **A) Temperatura de alineamiento.** 10 μg de pJM17 fueron mezclados con 7 μg del oligonucleótido E3 en cuatro reacciones independientes, incubando cada una de ellas a una temperatura dada: 45, 55, 75 y 85°C por 1 h/200U/mL de nucleasa S1 (4°C/1h). Las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio y como se muestra en la figura, no se observaron diferencias significativas entre las diferentes reacciones. **1:** plásmido sin tratar. **M:** marcador de peso molecular, λ HindIII. **B) Concentración de nucleasa S1.** 10 μg de pJM17 y 7 μg de oligonucleótido E3 previamente apareados a 75°C/1h, fueron expuestos a diversas concentraciones de Nucleasa S1/1h/4°C: 50, 100, 200, 400, 600 y 800 U/mL, y analizadas por electroforesis. Con 50 y 100 U el vector queda sin digerir, en tanto que con 400, 600 y 800U, el DNA es completamente degradado. **M:** marcador de peso molecular, λ HindIII y 1kb **C) Relación vector-oligo.** 10 μg de pJM17 fueron mezclados con proporciones ascendentes de iniciador E3: 1:1 (10 μg de vector con 7 μg de iniciador), 1:5, 1:10, 1:25 y 1:50 . Las mezclas fueron incubados a 75°C/1h, digeridas con S1 (4°C/1h) y analizados en gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio. No se observaron diferencias significativas entre las diferentes reacciones. **M:** marcador de peso molecular, 1 kb **D) Nucleasa S1 es enzima específica de cadena sencilla.** 10 μg de pJM17 fueron procesados a 75°C/1h sin añadir iniciador E3. El DNA fue digerido con 200U/mL de nucleasa S1 (4°C/1h) y analizado por electroforesis (descrito anteriormente). **1:** plásmido control sin tratar, permanece superenrollado. **2:** plásmido tratado con primer y nucleasa S1 (10 μg vector/7 μg de oligonucleótido; 75°C/1h; 200US1/mL/1h/4°C), aparece linealizado. **3 y 4 :** 5 y 10 μg de vector (sin añadir iniciador E3) fueron incubados a 75°C/1h y 200US1/mL/1h/4°C. En ausencia de oligonucleótido, S1 no digiere el DNA, el cual permanece superenrollado. **M:** marcador de peso molecular, λ HindIII.

3.1.2.2 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRANSFORMACIÓN.

3.1.2.2.1 ELECCIÓN DE LA CEPA BACTERIANA.

Anteriormente, ha sido reportado en la literatura el uso de la maquinaria de recombinación de *E. coli*, con fines de clonación (Oliner *et al.*, 1993; Bubeck *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1998), lo cual simplifica el proceso porque no hay ningún paso de ligación *in vitro priori* a la transformación, el único requisito indispensable es que los fragmentos co-transformados, tengan secuencias homólogas para recombinación en los extremos. A la fecha existen varios reportes que describen el uso de cepas *rec A* para construir vectores adenovirales por recombinación homóloga (Chartier *et al.*, 1996; He *et al.*, 1998). La mayoría de estas cepas exhiben grandes diferencias en los resultados dependiendo del genotipo y de su capacidad para aceptar DNAs de tamaño considerable. Varias cepas *rec A* (XL1-MRA, SURE, XL-10 GOLD, Hogs, JM54, DH10B, STBL2, ABLE C y ABLE K) fueron probadas (resultados no mostrados) antes de elegir *BJ5183* para los experimentos de recombinación homóloga descritos en este trabajo. *BJ5183*, contrario a la mayoría de las cepas bacterias usadas para recombinación, no es *rec A*, pero posee mutaciones en *recBC* y *sbcBC* que median recombinación a una eficiencia mayor y acepta DNAs de gran tamaño con buena eficiencia (Kuzminov y Stahl, 1999). Como se muestra en la Fig. 21, el tamaño mínimo de las secuencias para recombinar un plásmido de 42 kb, usando *BJ513* fue de 250 pb, lo que representa 1/150 del tamaño del vector. Esto indica que para clonar un fragmento en un vector de aproximadamente 5 Kb, el inserto debe tener solamente 20-25 nucleótidos en cada extremo, los cuales pueden ser introducidos fácilmente por PCR.

3.1.1.2 ELECCIÓN DEL MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN.

Como se aprendió durante el desarrollo del método D-loop/recombinación homóloga para que se produzca una buena recombinación de DNAs, las bacterias deben tener una eficiencia de al menos 10^8 . Menos de esto, se traduce en la casi nula obtención de colonias. Varios métodos de transformación fueron probados (electroporación, calcio competentes) y células competentes de varias marcas comerciales (Stratagene, Life technologies, GeneHogs, Clontech, etc.), encontrándose que el método descrito por Hannahan (Hannahan 1983) y usando una relación vector-inserto de 1:3, produce eficiencias de 10^{10} y se obtienen al menos 80 colonias por caja después de cada transformación.

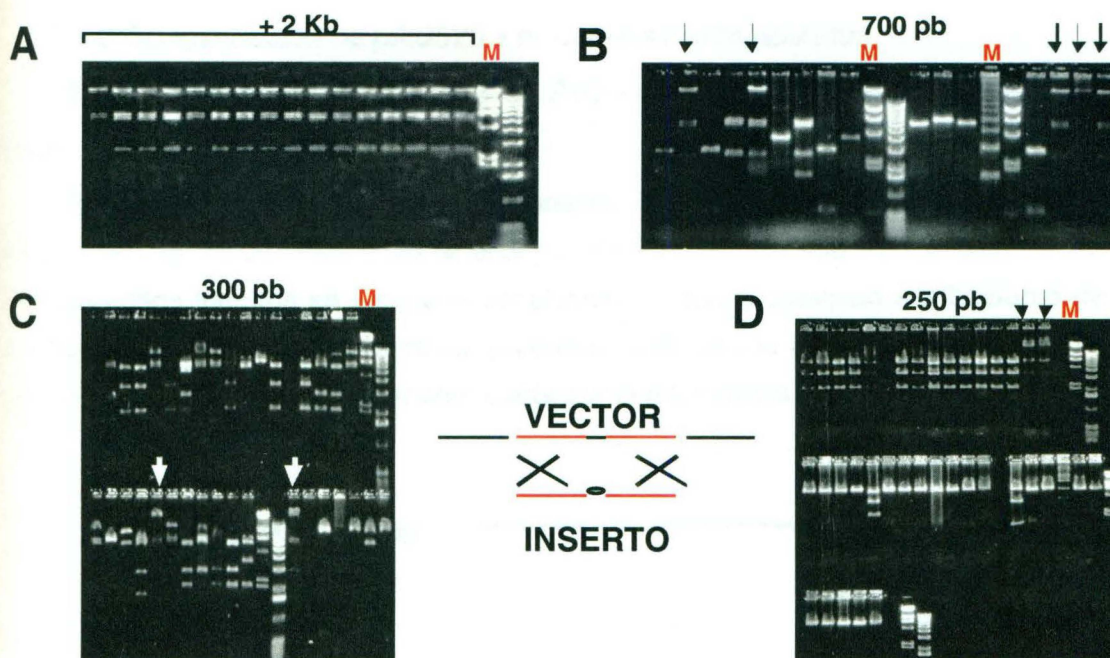


Figura 21. Homología mínima requerida para recombinación homóloga en la cepa BJ5183. **A) 2 kb de DNA en cada extremo.** 1 ng del fragmento de 36 kb conteniendo todo el genoma de Ad5 fue co-transformado con 7ng de plásmido linearizado, conteniendo 2 kb del extremo izquierdo y 2.4 kb del extremo derecho de Ad5. El producto de la transformación fue sembrado en agar LB con ampicilina (10µg/mL) y 16 colonias resistentes al antibiótico fueron propagadas en medio LB/16h/37°C. El DNA plasmídico extraído a partir de los cultivos, fue digerido con *EcoRI* y el producto de las digestiones fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio. Las clonas positivas deben presentar el siguiente patrón de restricción: 2.7, 4.8, 4.5 y 27 kb. Como se muestra en la fotografía, el 100% de los DNAs recombinados, mostraron el patrón de restricción correcto. **M:** marcador de peso molecular, λ *HindIII* y 1 kb plus. **B) 700 pb de DNA en cada extremo.** 1 ng de vector linearizado (40 kb) fue co-transformado con un fragmento de PCR de 3.5 kb, conteniendo 700 pb de homología en cada extremo. Las muestras fueron procesadas y digeridas con *EcoRI* como en A. De un total de 16 clonas, solo 5 mostraron el patrón de restricción correcto (indicadas con la flecha). **M:** marcador de peso molecular, λ *HindIII* y 1 kb plus. **C) 300 pb de DNA en cada extremo.** El vector de 42 kb linearizado, fue co-transformado con un fragmento de PCR de 1.8 kb conteniendo 300 pb para recombinación en cada extremo. Los DNAs producto de la co-transformación fueron procesados y digeridos con *EcoRI* como en A. Como se muestra en la fotografía, solo dos clonas resultaron positivas. **M:** marcador de peso molecular, λ *HindIII* y 1 kb plus. **D) 250 pb de DNA en cada extremo.** El vector linearizado, fue co-transformado con un fragmento de PCR de 2.1 kb conteniendo 250 pb para recombinación en cada extremo. Los DNAs fueron procesados y analizados como en A. De un total de 40 clonas, solo dos mostraron el patrón de restricción correcto producido por *EcoRI*. **M:** marcador de peso molecular, λ *HindIII* y 1 kb plus.

3.1.3 CONSTRUCCIÓN DE pAd520 Y PLÁSMIDOS INTEREMDIARIOS.

3.1.3.1 CLONACIÓN DEL GENOMA DE Ad5 EN UN PLÁSMIDO DE BAJO NÚMERO DE COPIAS : pAd520.

Una vez que el método D-loop/recombinación homóloga fue estandarizado para trabajar con plásmidos grandes, se procedió a clonar el origen de SV40 en la región E3 de pJM17. Sin embargo, después de varios intentos se llegó a la conclusión de que el plásmido era bastante inestable para los ensayos de recombinación homóloga, probablemente debido a que el origen *ColE1* produce alto número de copias que no puede ser controlada por la maquinaria de replicación de *E. coli* (Fig. 22).

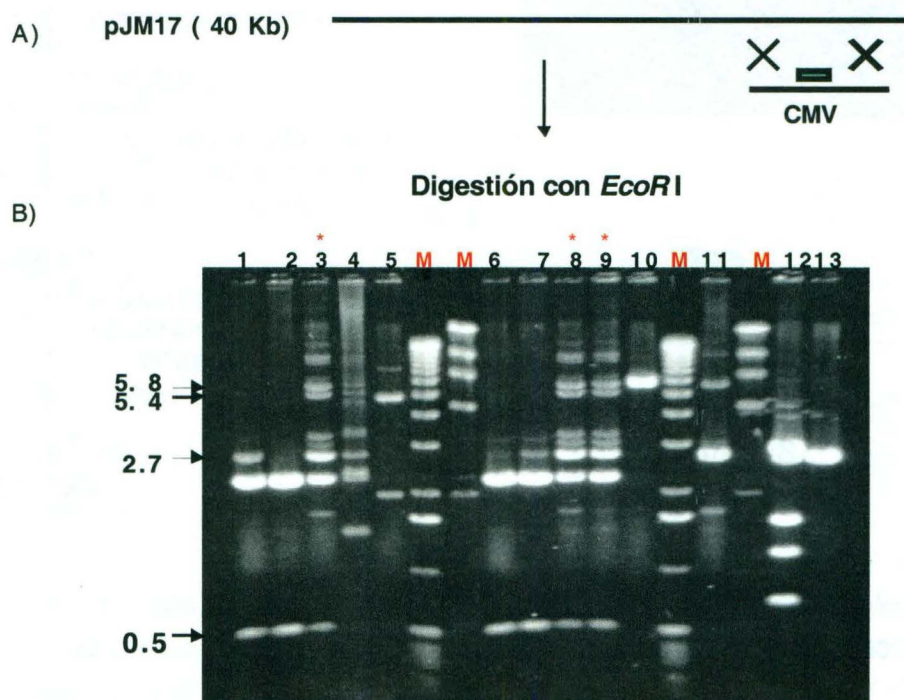


Figura 22. Inestabilidad de pJM17 para los ensayos de recombinación homóloga en *E. coli* BJ5183.

A) Esquema de las áreas de los DNAs recombinados. 1 ng de pJM17 fue mezclado con 20 ng del fragmento *BssHII* conteniendo la secuencia del promotor del CMV. Ambos DNAs fueron transformados por "choque térmico" y las colonias ampicilina-resistentes fueron crecidas en medio LB con ampicilina (10 μ g/mL). B) Análisis de los DNAs recombinados con *EcoRI*. El DNA plasmídico extraído a partir de cada una de las 13 colonias, fue digerido con *EcoRI* y los productos de la digestión fueron analizados en gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio. Los 13 DNAs analizados exhiben bandas de menor y mayor tamaño, además de algunos de los fragmentos esperados, lo cual denota la inespecificidad de la recombinación. M: marcador de peso molecular, λ . *HindIII* y 1 kb plus.

Dadas las circunstancias, pJM17 fue reemplazado por un plásmido de bajo número de copias denominado pAd520. En el nuevo vector ayudador construido por recombinación (Fig. 23), el genoma adenoviral (el cual no tiene interrupciones) está flanqueado por sitios *PacI* y puede ser transfectado en células en cultivo como DNA lineal, mimetizando al genoma de Adenovirus.

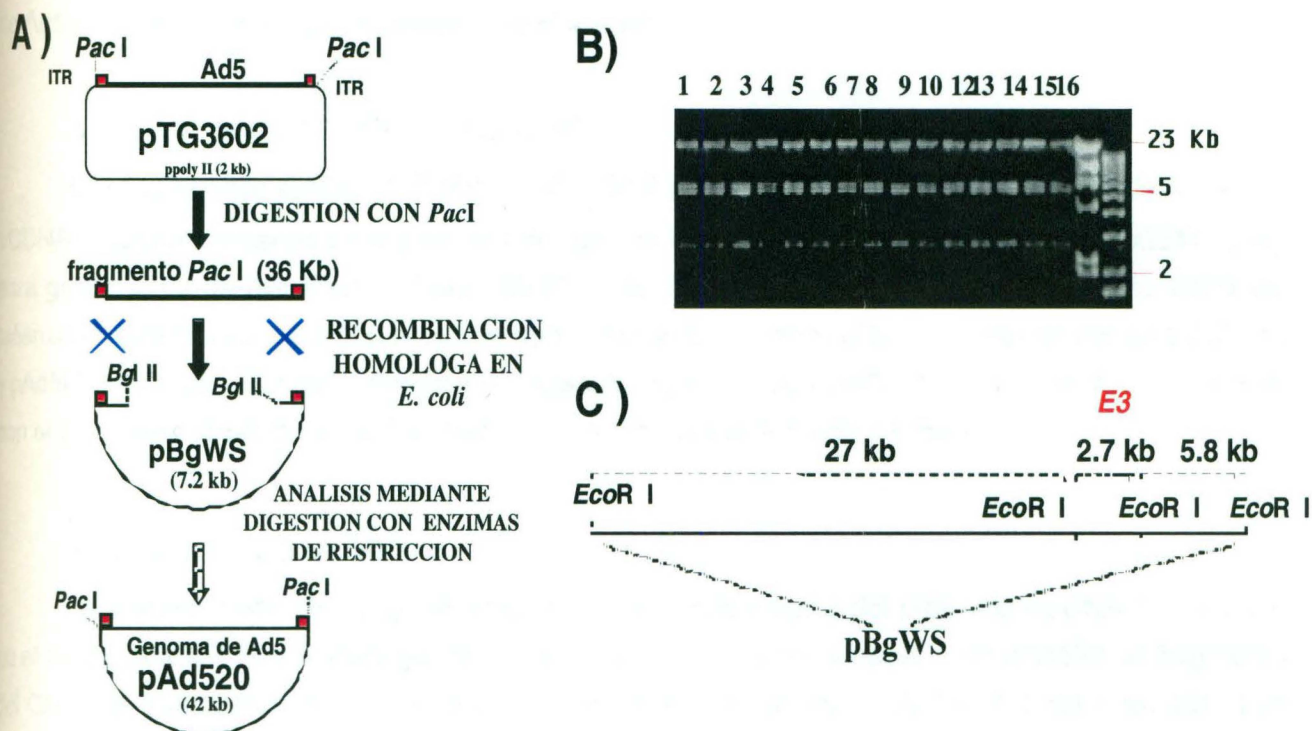


Figura. 23. **A) Producción del plásmido pAd520 por recombinación homóloga en *E.coli*.** El fragmento *PacI* de 36 kb que contiene todo el genoma de Ad5 fue aislado a partir de pTG3602 y co-transformado con pBgWS (linearizado con *BglII*) en *E. coli*, cepa BJ5183. **B) Identificación de pAd520 con enzimas de restricción.** El DNA plasmídico extraído a partir de las colonias resistentes a ampicilina obtenidas después de la co-transformación, fue digerido con *EcoRI* como enzima diagnóstica. El producto de la digestión de la clona correcta debe ser en orden descendente: 27, 4.8, 4.5 y 2.7 kb. Como se muestra en la fotografía tomada al gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, todos los DNAs fueron recombinados perfectamente. M: marcador de peso molecular, λ *HindIII* y 1 kb plus. **C) Esquema del mapa de restricción de pAd520 con *EcoRI*.** La enzima de restricción *EcoRI* corta cuatro veces el genoma de pAd520 produciendo cuatro fragmentos: 27, 4.8, 4.5 y 2.7 kb, como se muestra en el diagrama.

148025

3.1.3.2 PLÁSMIDOS INTEMEDIARIOS: pAd5HSV40, pAd5HCMV y pUC3.4CMV.

Dado que el origen SV40 (273 pb) y el promotor CMV (652 pb) resultaron demasiado pequeños para ser clonados por recombinación homóloga directamente dentro de pAd520, y además porque no poseen secuencias para recombinación, las cuales para este caso específico deben ser al menos de 250 pb en cada extremo), se construyeron tres intermediarios ó subclonas de Ad5 empleando métodos estándares de clonación.

3.1.3.2.1 pAd5HSV40 y pAd5HCMV.

Los fragmentos SV40 (273 pb) y CMV (652 pb) amplificados por PCR a partir del plásmido pCDNA-3, fueron clonados en reacciones de ligación independientes dentro del vector pGEMT-Easy para ganar sitios de restricción. Tanto SV40 como CMV fueron subclonados en el sitio *Bst*XI del plásmido intermediario pAdH3 (unidad de transcripción E3 de Ad5) (**Fig. 24**), creándose pAd5HSV40 y pAd5HCMV. Las clonas identificadas mediante digestión con *Bst*XI, fueron digeridas con *Bss*HI con el propósito de producir los fragmentos para recombinación con pAd520.

3.1.3.2.2 pUC3.4CMV.

El promotor CMV (652 pb) fue amplificado por PCR a partir del plásmido pCDNA-3 y clonado en el vector pGEMT-Easy. Para ganar las secuencias para recombinación con pAd520, el fragmento del CMV fue subclonado en el sitio *Bst*XI del plásmido intermediario pUC3.4 (7.3 kb) (**Fig. 25**). Las clonas positivas fueron identificadas mediante digestión con *Bst*XI, con lo que se liberó el inserto de 652 pb. Los DNAs resultantes fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. La clona pUC3.4CMV, fue digerida con *Bss*H II con el propósito de producir los fragmentos para recombinación con pAd520.

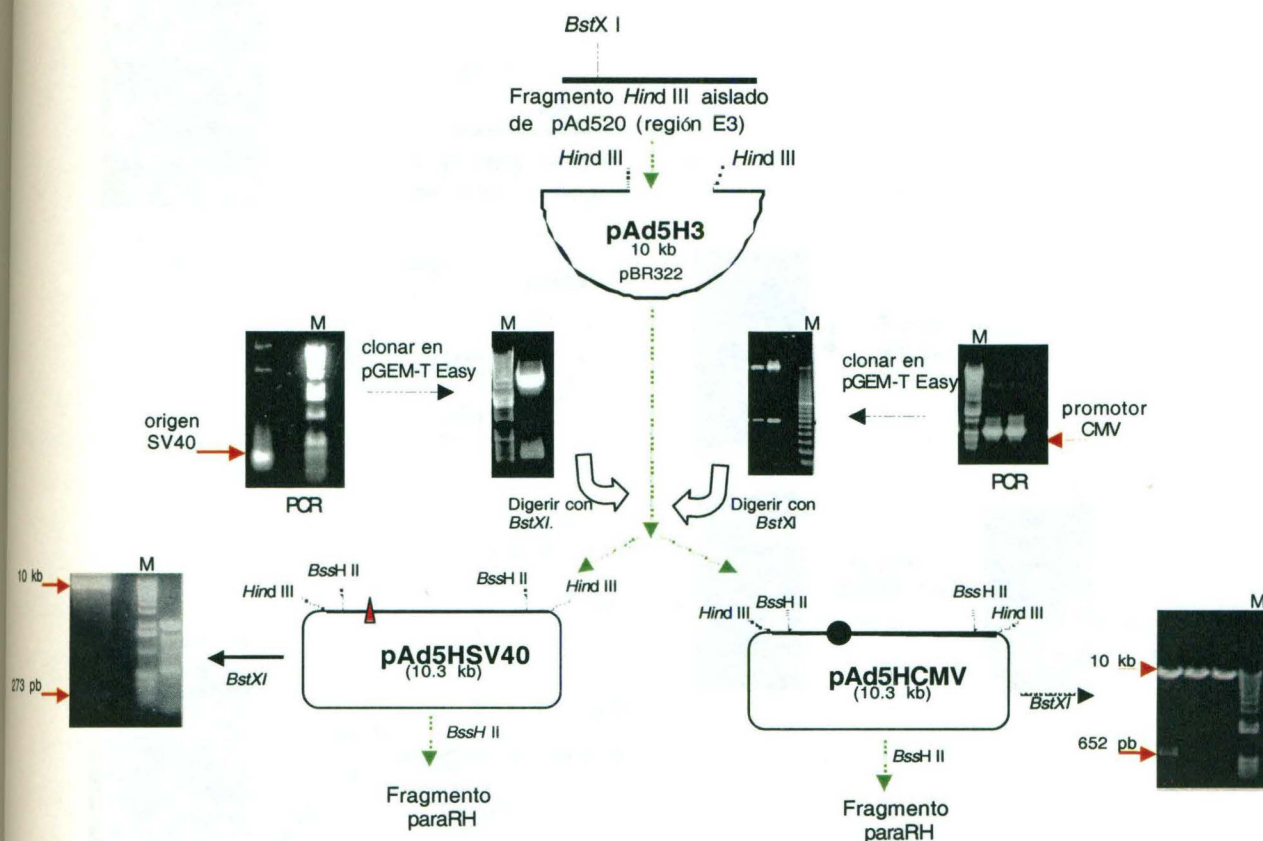


Figura 24. Construcción de los plásmidos intermediarios: pAd5HSV40 y pAd5HCMV. pAd520 fue digerido con *Hind*III y dos fragmentos de 3.4 y 4.3 kb fueron aislados. El fragmento de 4.3 kb conteniendo toda la unidad de transcripción E3, fue clonado en el sitio *Hind*III de pΔBR322, dando origen al plásmido pAd5H3 (10 kb). pAd5H3 fue digerido con *Bst*XI y ligado en reacciones independientes con: 1) un fragmento *Bst*XI de 273 pb codificante para el origen de SV40 previamente amplificado a partir de pcDNA3 y clonado en pGEMT (ver fotografía), creándose el plásmido pAd5HSV40 de 10.2 kb y con: 2) un fragmento *Bst*XI de 650 pb codificante para el promotor del citomegalovirus humano previamente amplificado a partir de pcDNA3 y clonado en pGEMT (ver fotografía), creándose pAd5HCMV de 10.6 kb. Tanto pAd5HSV40 como pAd5HCMV fueron caracterizados con *Bst*XI, antes de ser digeridos con *Bss*H II, enzima que produjo los fragmentos usados para los ensayos de recombinación homóloga con pAd520 en *E. coli*. M: marcador de peso molecular, 1 kb plus.

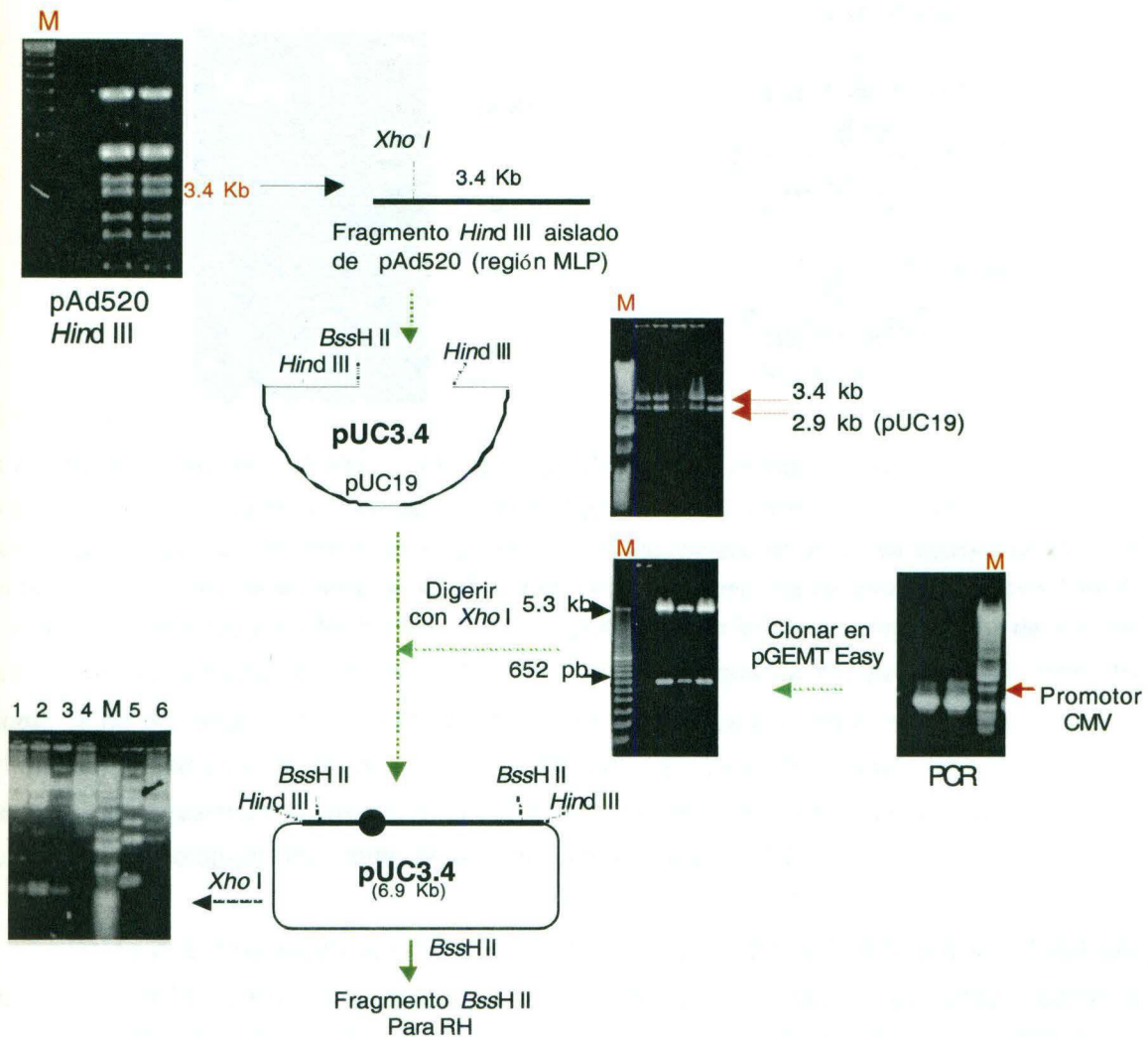
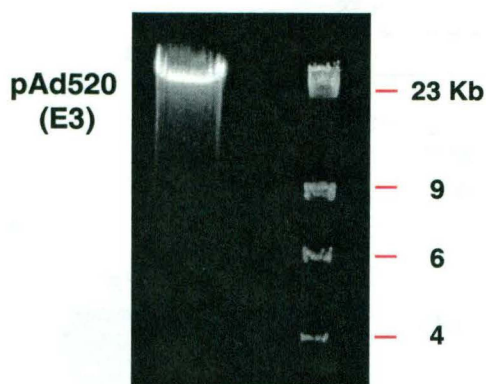


Figura 25. Construcción del plásmido intermediario pUC3.4CMV. El segundo fragmento *Hind*III de 3.4 kb aislado a partir de la digestión de pAd520 y conteniendo la región del promotor de genes tardíos, fue clonado en pUC19 (2.9 kb) originando el plásmido pUC3.4 (7.3 Kb). El plásmido pUC3.4 fue digerido con *Xho*I y ligado con el fragmento de 650 pb codificante para el promotor del citomegalovirus humano (previamente amplificado por PCR a partir de pcDNA-3), creándose el plásmido pUC3.4 CMV. El fragmento para recombinación homóloga fue obtenido mediante la digestión de pUC3.4CMV con *Hind*III. **M:** marcador de peso molecular, 1 kb plus.

3.1.4 CONSTRUCCIÓN DE CUATRO VECTORES ADENOVIRALES AYUDADORES POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.

3.1.4.1. PLÁSMIDO pSV4057: INSERCIÓN DEL ORIGEN SV40 EN LA REGIÓN E3 DE ADENOVIRUS 5. La recombinación homóloga de pAd520 linearizado por D-loop en la región E3, con el fragmento *Bss*HII con el origen SV40 (proveniente del intermediario pAdH3SV40) en *E coli* BJ5183, dió origen al plásmido pSV4057 (Fig 26 A y B).

A) D-loop



B)

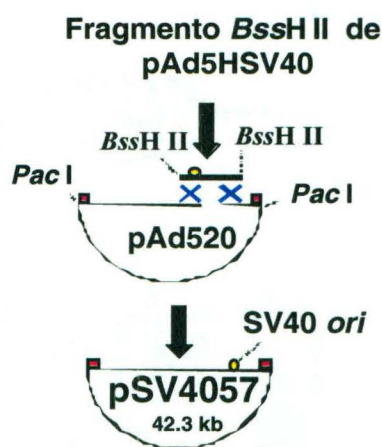


Figura 26. Producción de pSV4057. **A). D-loop.** El plásmido parental pAd520 fue linearizado mediante el método D-loop en la región E3 de Adenovirus, usando el oligonucleótido E3 que se alinea corriente arriba del inicio de la transcripción de E3. El DNA linerizado y digerido con S1, fue resuelto en un gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio, observándose la banda de 42 Kb correspondiente al genoma de pAd520. La banda de 42 kb fue aislada a partir de la agarosa y el DNA fue electroeluido y purificado con fenol y cloroformo antes de ser usado en la co-transformación. **M:** marcador de peso molecular, λ HindIII. **B) Esquema del proceso de recombinación homóloga.** 1 ng del fragmento linearizado de 42 kb fue co-transformado con 20 ng del fragmento BssH II obtenido mediante la digestión de pAd5HSV40. El DNA plasmídico extraído a partir de las colonias ampicilina-resistentes producto de la co-transformación, fue analizado mediante digestión con *EcoRI*, PCR y Southern blot, como se describe en la figura 25 C,D y E.

Los DNAs que produjeron el patrón de restricción correcto (27, 5.8, 5.4 y 2.7 kb) después de digerir con *EcoRI*, fueron analizadas por PCR. pAd520 sin inserto fue usado como control negativo para PCR y Southern blot. El plásmido pcDNA-3 que contiene el origen SV40, fue usado como control positivo de PCR y el fragmento amplificado de 273 pb, fue usado como control positivo de hibridación para el análisis por Southern blot. Las colonias que dieron positivo el fragmento de 273 pb (origen SV40), fueron seleccionadas y sometidas a análisis por Southern blot. Si el proceso D-loop ocurrió correctamente y pA520 fue linearizado en el sitio específico y la maquinaria de *BJ5183* recombinó los DNAs correcta y eficientemente, se esperaba observar señal radiactiva positiva solamente en la banda de 2.7 kb, que corresponde a la región de Ad5 donde está localizada la unidad de transcripción E3 (región a la cual se une el iniciador E3). Como se muestra en la **Fig 26 C, D y E**; después de analizar las clonas por Southern blot, solo la banda de 2.7 kb resultó positiva y la sonda radiactiva correspondiente al fragmento de 273 pb no hibridó inespecíficamente con ninguna otra área de pAd520, el cual fue usado como control negativo.

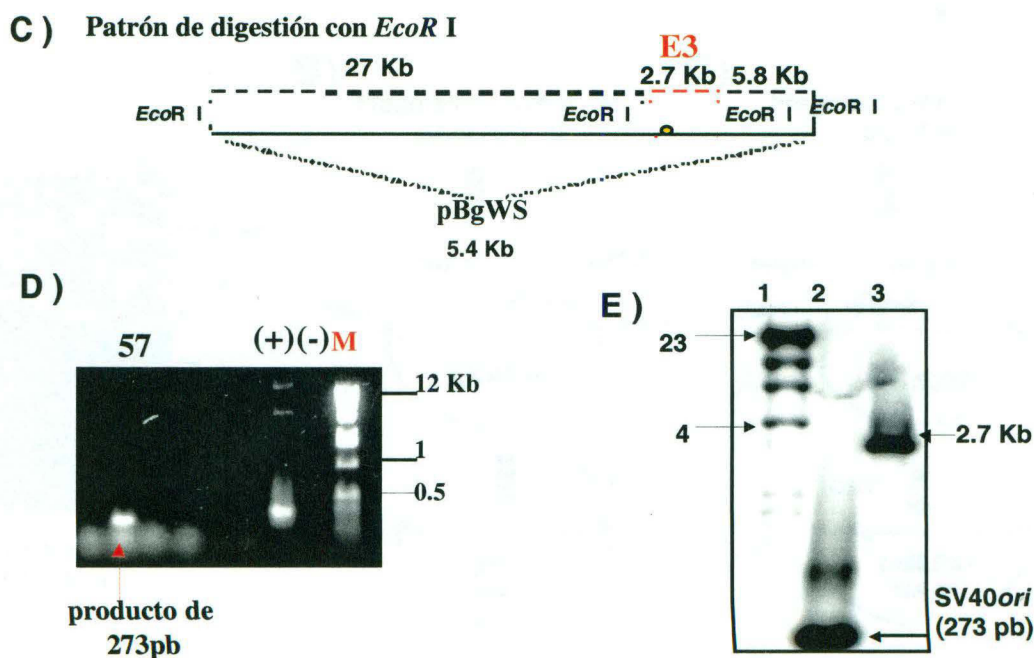


Figura 26. C) Esquema del patrón de restricción producido por *EcoR* I. El producto de la digestión de la clona correcta con *EcoR* I debe ser en orden descendente: 27, 4.8, 4.5 y 2.7 kb. Como se indica en el esquema, en la banda de 2.7 kb se localiza la región E3 de Adenovirus y en consecuencia es el sitio donde debe encontrarse el inserto introducido por recombinación homóloga. **D) Análisis por PCR.** Las clonas que exhibieron el patrón de digestión correcto, fueron analizadas por PCR usando el par de iniciadores que amplifican solo el origen SV40. De un total de 4 clonas analizadas, solamente la clona 57 (indicada en la fotografía del gel de agarosa teñido con BrEt), mostró la banda de amplificación de 273 pb correspondiente al origen de SV40. **M:** marcador de peso molecular, 1 kb plus. **(+):** pcDNA-3 amplificando el fragmento de 273 pb. **(-):** pAd520 sin inserto, no amplifica el fragmento de 273 pb. **E) Análisis por "Southern blot".** Las clonas positivas por PCR fueron analizadas por Southern blot usando como sonda el fragmento de 273 pb marcado radiactivamente con [32 P]. **1:** marcador de peso molecular, λ HindIII. **2:** producto de 273 pb (control positivo). **3:** clona 57, indicando la banda de 2.7 kb positiva, lo cual indica que el origen SV40 fue correctamente insertado en la región E3 del plásmido pAd520.

3.1.4.2 PLÁSMIDOS pE13, pMLP Y p13/31: INSERCIÓN DEL PROMOTOR CMV EN LA REGIÓN MLP (PROMOTOR DE GENES TARÍDOS DE) Y REGIÓN E3 DE ADENOVIRUS 5.

pAd520 linearizado por D-loop en la región MLP y región E3 (en reacciones independientes)(Fig. 27 A), fue co-transformado con los fragmentos *Bss*HII de los intermediarios pUC3.4CMV (región MLP) y pAdHCMV (región E3) (Fig 27 B y C).

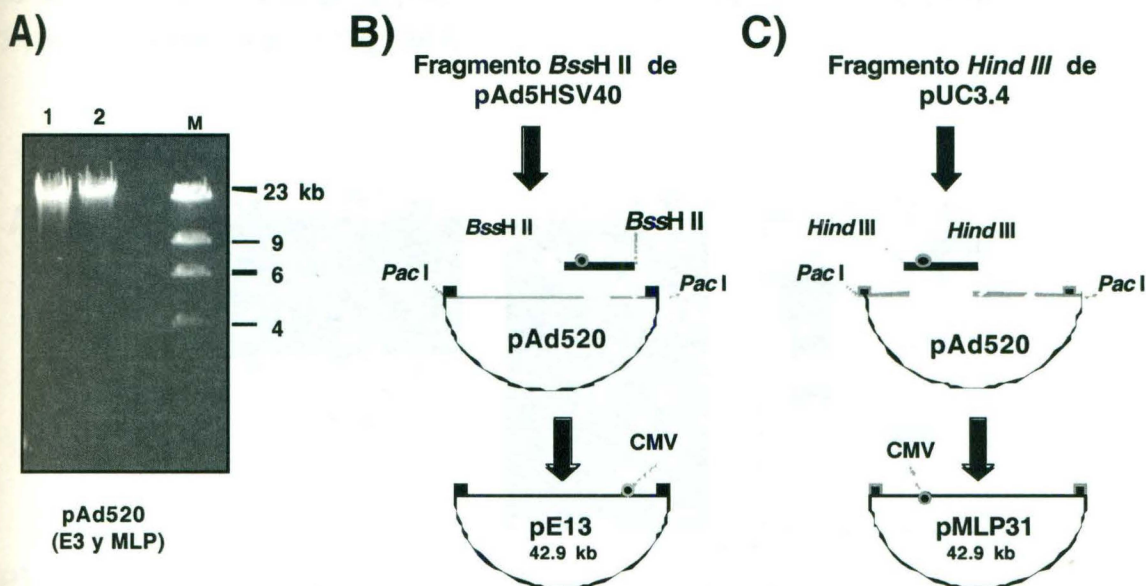


Figura 27. Producción de pE13 y pMLP31. A) D-loop. En dos reacciones independientes, pAd520 fue linearizado por D-loop con el iniciador E3 y el iniciador MLP. Las bandas de 42 kb, fueron resueltas y aisladas por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% 1: pAd520 linearizado con E13. 2: pAd520 linearizado con MLP31. M: marcador de peso molecular, λ HindIII. B) Recombinación homóloga en *E. coli*. 1 ng de pAd520-E3 fue co-transformado con 20 ng del fragmento *BssHII* purificado a partir de pAdHCMV en BJ5183 originando pE13. C) 1 ng de pAd520-E3 fue co-trasformado con 20 ng del fragmento *HindIII* purificado a partir de pUC3.4 dando lugar al plásmido pMLP31.

Las colonias resistentes a ampicilina recolectadas a partir de cada transformación, fueron analizadas como se describió para pSV4057, con la excepción de que los iniciadores para PCR y la sonda marcada radiactivamente usada en el Southern blot, fueron específicos para el promotor CMV. pAd520 sin inserto fue usado como control negativo para PCR y Southern blot, en tanto que el plásmido pCDNA-3 que contiene el promotor CMV, fue usado como control positivo para PCR y el fragmento de 652 pb amplificado, fue usado como control positivo de hibridación en el Southern blot. En la **Fig. 28 A** se muestra que la clona 13 (producto de la co-transformación de pAd520 con el fragmento *BssHII* de pAdHCMV) y la clona 31 (producto de la co-transformación de pAd520 con el fragmento *BssHII* de pUC3.4CMV) resultaron positivas por PCR, amplificando ambas el fragmento de 652 pb característico de CMV. Como era de esperarse, la clona pMLP31 dió positiva (por Southern blot) la banda de 27 kb que indicó claramente la inserción correcta de CMV en la región MLP de Ad5. La clona pE13 por otra lado, dió positiva la banda de 2.7 kb indicando que CMV fue clonado en la región E3. Con el propósito de el clonar el promotor CMV en ambas regiones adenovirales en un solo plásmido, pE13 fue linearizado en MLP por D-loop y recombinado con el

fragmento *PacI* obtenido a partir de pMLP31. Este proceso de recombinación dió origen a la clona p13/31, como se muestra en la Fig. 28 B.

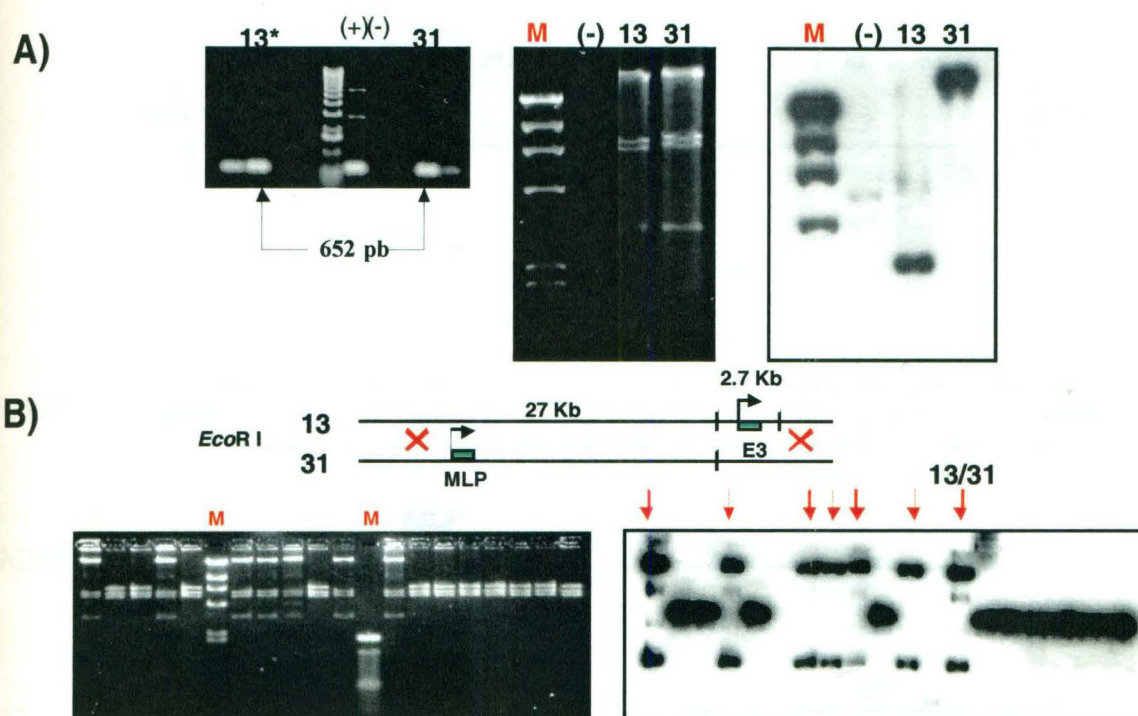


Figura 28. Identificación de pE13, pMLP31 y p13/31 por PCR y Southern blot. **A) Producción de los plásmidos pE13 y pMLP31.** Los DNAs producto de la recombinación homóloga en *E. coli*, fueron analizado mediante digestión con *EcoRI*. Las clonas positivas fueron identificadas por PCR, amplificando el fragmento de 652 pb para la clona 13 y [(-): pAd520. (+): fragmento de 652 pb] y por Southern blot, observándose positivas las bandas de 2.7 kb para la clona 13 (CMV en la región E3) y 27 kb para la clona 31 (CMV en la región MLP). **M:** marcador de peso molecular, λ *HindIII*. **B) Producción del plásmido p13/31.** pMLP fue linearizado por D-Loop con el iniciador E3. El plásmido pE13 fue digerido con *PacI* para liberar el fragmento de 36.7 kb. 1 ng de cada uno de los fragmentos linearizados y purificados, fueron co-transformados en *E. coli* para obtener la clona deseada. El rectángulo indica el promotor CMV. El DNA extraído de las colonias ampicilina-resistentes fueron digeridas con *EcoRI*, resueltas en gel de agarosa (ver fotografía) y transferidas a membrana de nylon para ser analizadas por Southern blot. La autorradiografía muestra las clonas que exhiben la banda de 27 y 2.7 kb positivas (indicadas con la flecha), lo cual pone de manifiesto la presencia del promotor CMV en ambas regiones adenovirales.

De esta manera, pAd520 sirvió como plásmido parental para introducir el origen SV40 y el promotor CMV en el genoma de Ad5, originando cuatro nuevos plásmidos ayudadores (**Fig. 29**).

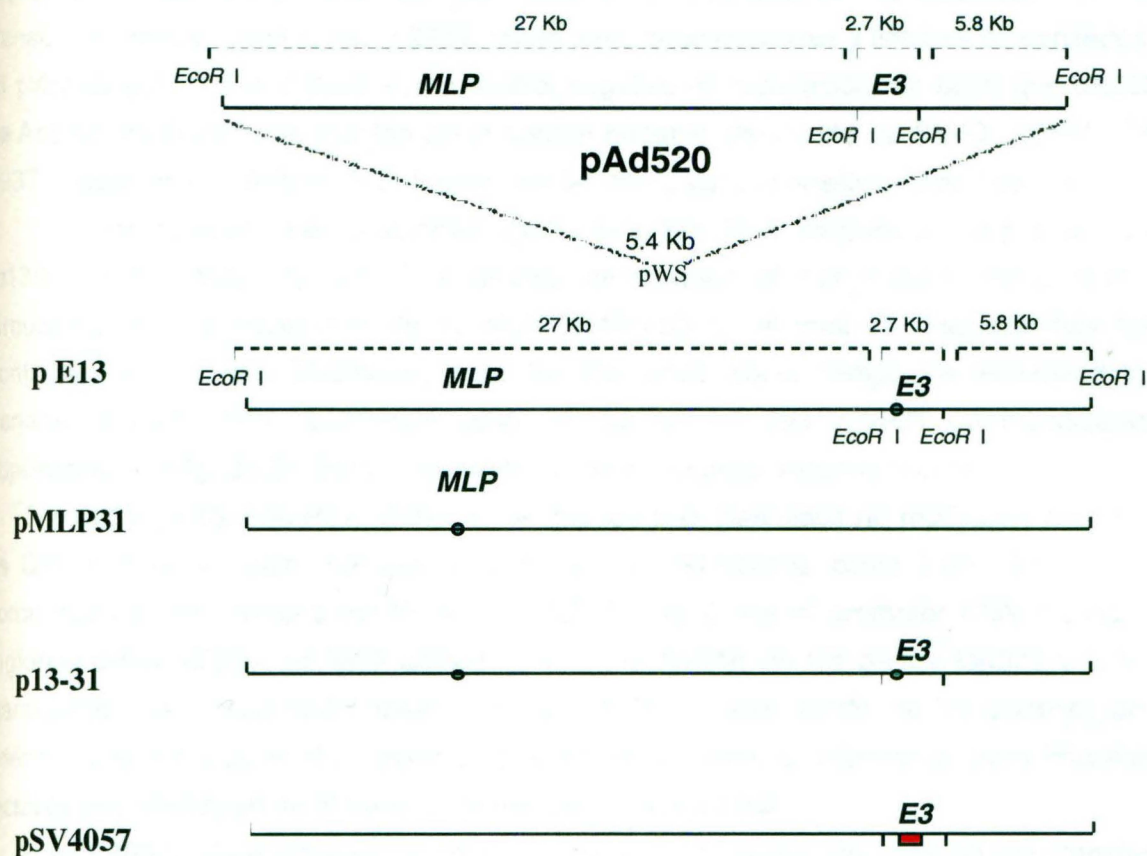


Figura 29. Vectores adenovirales. pAd520 se usó como vector de clonación para introducir el promotor del CMV en la región E3 (**E13**), en la región de genes tardíos (**MLP31**), ambos CMV en un solo plásmido (**13-31**), y el origen de SV40 en la región E3 (**SV4057**). **Círculo** = promotor CMV. **Rectángulo** = origen de SV40.

La correcta posición y orientación del origen de SV40 y el promotor del CMV, fueron corroborados mediante la determinación de la secuencia nucleotídica de los vectores en las áreas donde los insertos fueron introducidos (Datos no mostrados).

3.2 REPLICACIÓN, EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS TARDÍAS Y DETECCIÓN DE TRANSCRITOS DEL HEXÓN

Y LA PROTEÍNA TERMINAL .

3.2.1 REPLICACIÓN: TEMPLADO CIRCULAR VS LINEAL.

Con el propósito de determinar la influencia del origen SV40 y el promotor CMV sobre la replicación viral, cada uno de los plásmidos ayudadores construidos fue transfectado transitoriamente en células 293 y 293T, como templados circulares y lineales (linearizados con *Pac I*). El plásmido pJM17 fue incluido como control negativo de replicación, en tanto que pAd520 (genoma de Ad5 sin modificar) fue incluido como control negativo del efecto de SV40 ó CMV. Células 293 y 293T infectadas con *Ad5del 309*, fueron usadas como control positivo de replicación.

Como se observa en la autorradiografía de la **Fig. 30 A**, ninguno de los plásmidos ayudadores (p13/31, pE13, pMLP31) replicó a niveles detectables al ser transfectados como templados circulares, con la excepción de pSV4057 (pSV4057c), el cual se discutirá más adelante. En contraste, los mismos plásmidos, pero transfectados como templados linearizados, mostraron bandas de replicación (replicación genómica) en células 293 y 293T (aproximadamente 20,000 copias/célula) (**Fig. 30 B**). Estos resultados llevan a remarcar algunos puntos:

1. p13/31, pE13, pMLP31. El hecho de que los tres plásmidos no replicaran cuando el templado es DNA circular y solo repliquen cuando son transfectados como DNA lineales y a un nivel comparable al del control pAd520 (Ad5 sin CMV) sugirió que el promotor CMV clonado en las dos regiones adenovirales, no está activando la transcripción de los genes tardíos y a la vez indicó claramente que la replicación observada, es debida a la sola acción de los orígenes de replicación adenovirales, los cuales al no estar unidos covalentemente, quedan libres para interactuar con los factores que participan en el inicio de la replicación adenoviral.

2. pSV4057. Este plásmido, es el único que mostró replicación cuando fue transfectado como templado circular y solo en células 293T, lo cual indica que la replicación es antígeno T-grande-dependiente y por tanto es el producto de la sola acción del origen SV40. Sorprendentemente, la replicación observada fue comparable a la exhibida por Ad5 (**Fig. 31**) y el fenómeno de replicación subgenómica desapareció completamente.

Cuando el plásmido fue transfectado como DNA lineal, se observó replicación tanto en células 293 (lo cual indicó que los orígenes de Ad5 eran funcionales) como en 293T. Sin embargo, contrario a lo que se esperaba, el nivel de replicación en 293T fue comparable al resto de los ayudadores, incluyendo el control pAd520. La replicación eficiente bservada con pSV4057c, desapareció completamente al linearizar el genoma, sugiriendo que aún en presencia de antígeno T-grande, el origen SV40 no es funcional cuando el cromosoma a replicar tiene una conformación diferente a la forma circular tradicional.

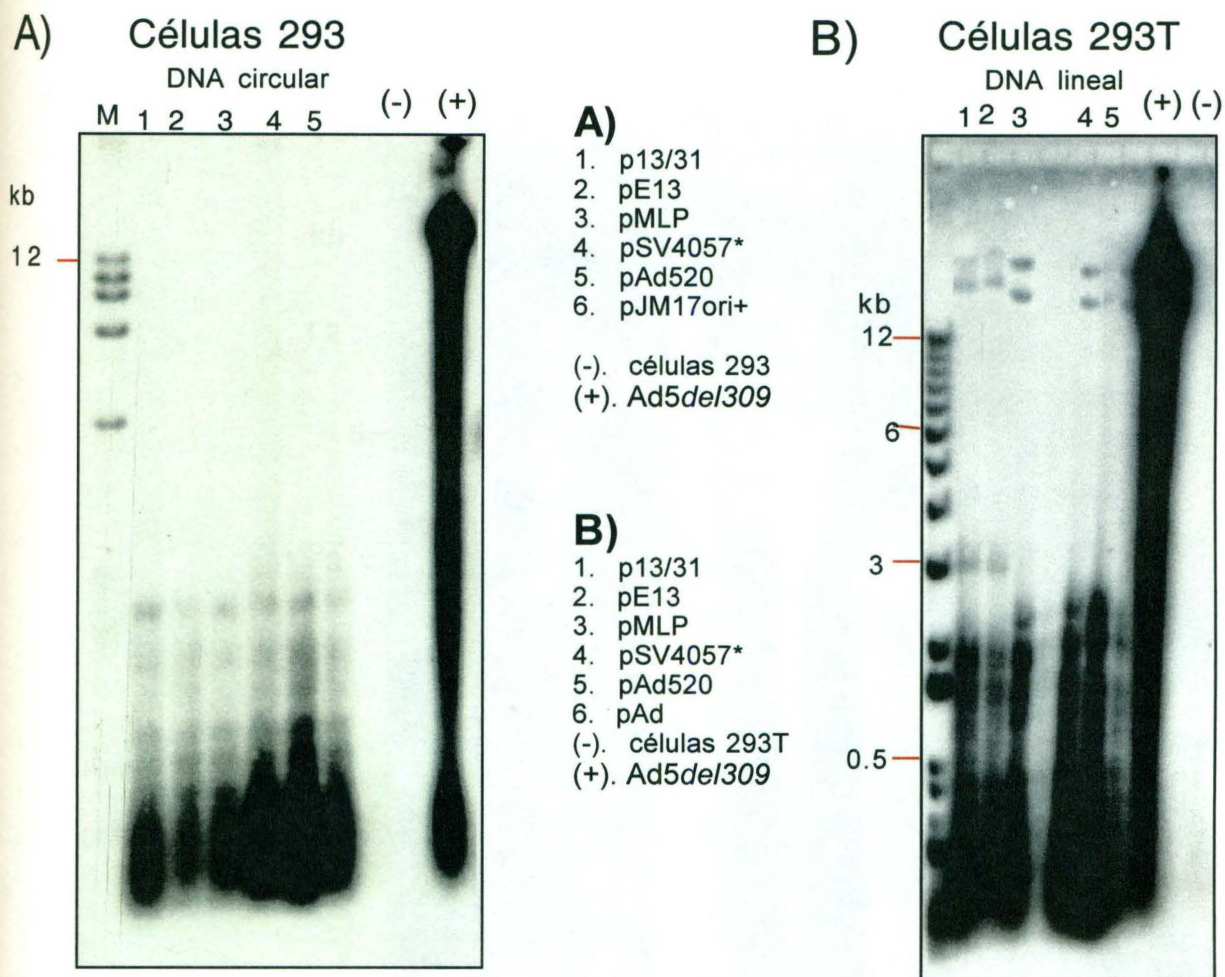


Figura 30. Análisis de la replicación de los plásmidos mediante digestión con *DpnI/BamHI* y Southern blot. Células 293 y 293T fueron transfectadas con 10 μ g de cada uno de los plásmidos ayudadores, como DNA circular y DNA lineal. 72 h después, el DNA plasmídico fue recuperado mediante la técnica de Hirt y digerido con *DpnI* la cual corta innumerables veces el DNA que no replica produciendo fragmentos pequeños y *BamHI* que corta solo una vez el DNA produciendo dos fragmentos de 23 kb y 16 kb. Los DNAs digeridos fueron resueltos en gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio y transferidos a una membrana de nylon. El DNA fijo, fue hibridado con una sonda (genoma de Ad5) marcado radiactivamente con [32 P]. **A) Replicación de plásmidos circulares en células 293.** Como indica la autorradiografía, ninguno de los plásmidos ayudadores mostró replicación en células 293, solo se aprecia en la parte inferior, la acumulación de los fragmentos pequeños, producidos por la digestión del DNA no replicado con la enzima *DpnI* y las bandas de replicación producidas por el testigo positivo. **M:** marcador de peso molecular, 1 kb plus. **B) Replicación de los plásmidos linealizados con *Pac I*, en células 293T.** Todos los plásmidos ayudadores mostraron bandas de replicación de 23 y 16 Kb, además de los fragmentos pequeños, producidos por la digestión del DNA no replicado con la enzima *DpnI*. **M:** marcador de peso molecular, 1 kb plus.

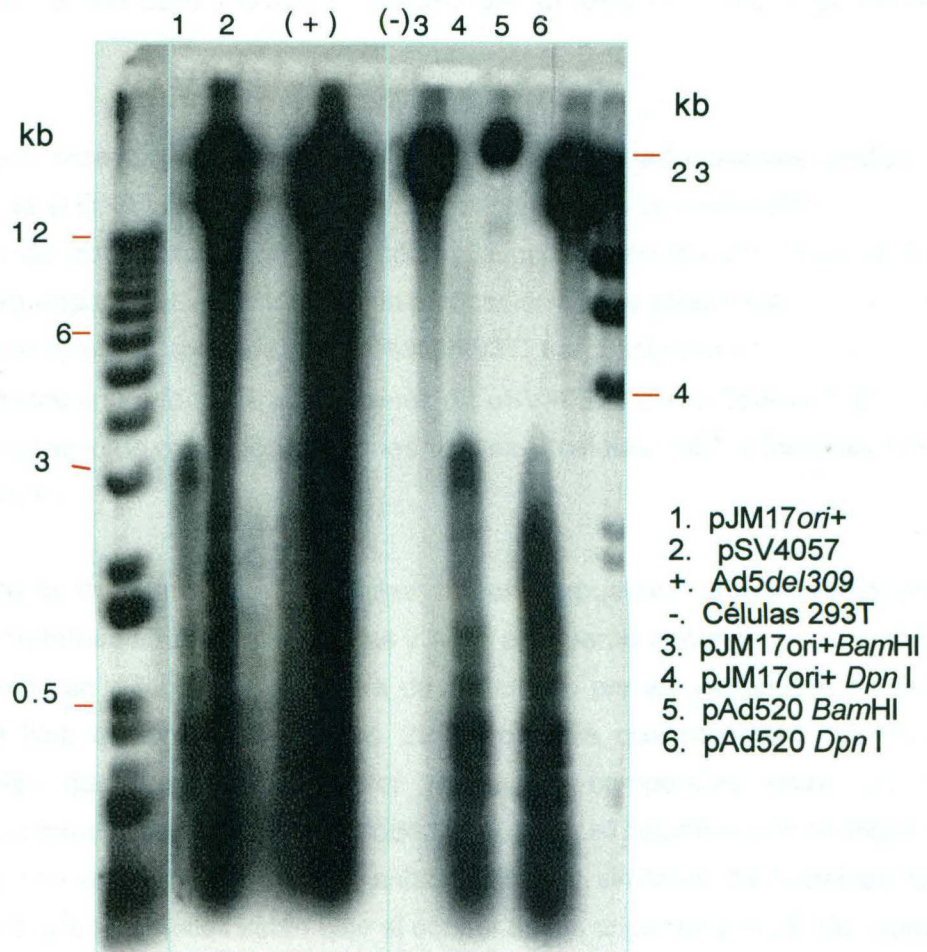


Figura 31. Análisis de la replicación de pSV4057c por Southern blot. Células 293T fueron transfectadas con 10µg de pSV4057 y pJM17ori+ superenrollado, en transfecciones independientes. 72 h después, los DNAs plasmídicos fueron recuperados y digeridos con *Dpn I* y *BamH I*. Los DNAs fueron resueltos en gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio, transferidos a una membrana de nylon e hibridados con una sonda (genoma de Ad5) marcada radiactivamente con [³²P]. Como controles del ensayo, pJM17 y pAd520 fueron digeridos con *BamHI* y *DpnI* y células 293T fueron infectadas con Ad5 *del309*. Como muestra la autorradiografía y el fosforímetro, el número de copias de pSV4057c (que muestra las bandas de replicación de 23 y 16 kb) es al menos 50 veces más abundante que las previamente observadas para el plásmido pJM17ori+ y casi comparables a Ad *del309*. **M**: marcador de peso molecular, en el extremo izquierdo aparece 1 kb plus, en tanto que en el extremo derecho se muestra λ *HindIII*.

3.2.2 EXPRESIÓN DE LOS GENES TARDÍOS: EFECTO DEL ORIGEN DE SV40 Y EL PROMOTOR DEL CMV.

Como se mencionó anteriormente, la expresión de los genes adenovirales tardíos es la evidencia más clara de que el DNA viral ha pasado por al menos un ciclo de replicación.

Con el propósito de corroborar el incremento en la producción de proteínas tardías de Adenovirus, como consecuencia en el incremento en la replicación de los plásmidos ayudadores, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia en células 293T, transfectando transitoriamente 1 μ g de cada uno de los plásmidos en su forma lineal, además de pSV4057c como DNA circular. pJM17 fue usado como testigo negativo de expresión de genes tardíos y células 293T infectadas con Ad5 *del309*, como control positivo.

72h después de la transfección, las células fueron expuestas al anticuerpo primario policlonal que reconoce proteínas adenovirales tardías y a un anticuerpo secundario conjugado con rodamina. Como se muestra en la **Fig. 32** y como era de esperarse por los resultados previamente obtenidos por Southern blot, el número de células 293T positivas que muestran expresión de proteínas tardías (células que fluorescen en color rojo), fué comparable entre las cuatro construcciones que fueron transfectadas como templado lineal, tanto el plásmido con el origen SV40 como los tres plásmidos con el promotor del CMV exhiben niveles similares de proteínas tardías, presumiblemente debido a que todos ellos están bajo el control de los orígenes y modo de replicación adenoviral y se comportan de manera semejante, mostrando solo pequeñas variaciones de plásmido a plásmido. El control pJM17, que replica muy ineficientemente, no muestra producción de proteínas tardías.

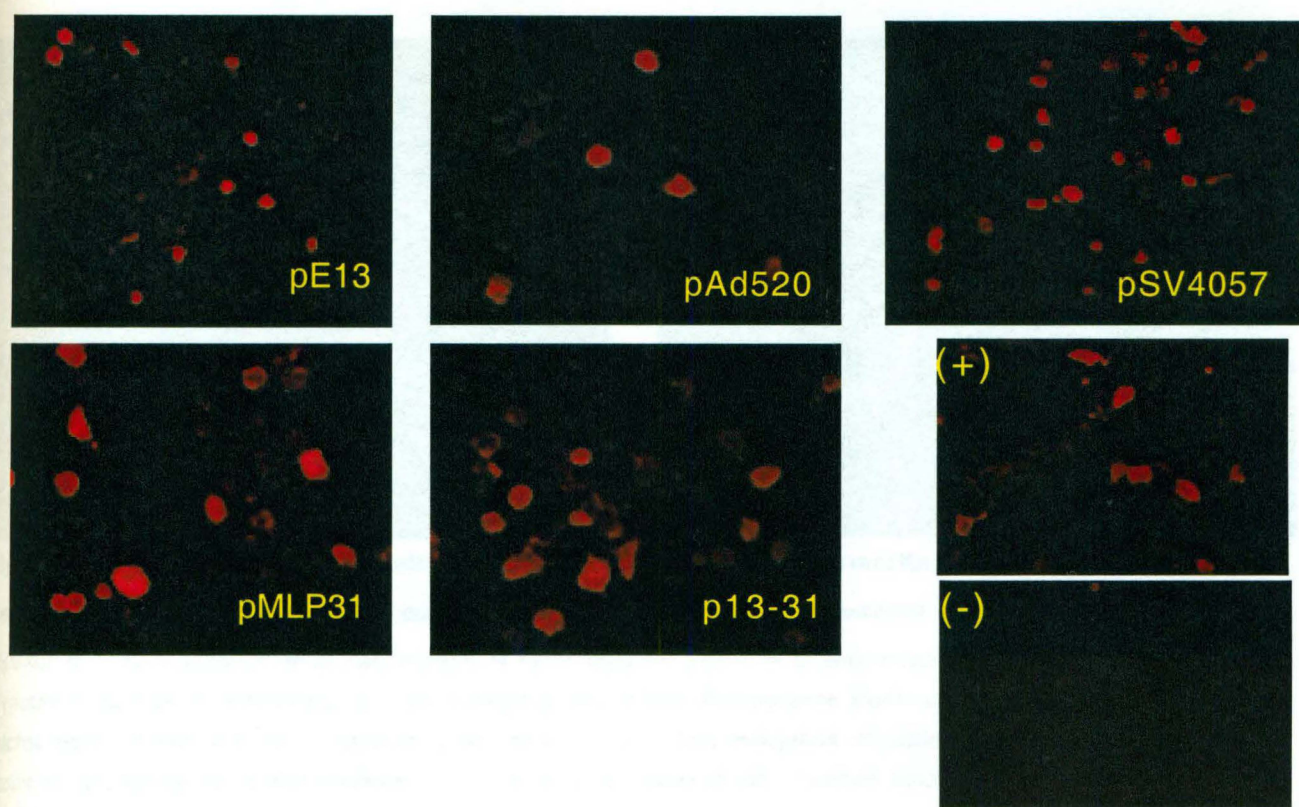


Figura 32. Detección de proteínas tardías de Adenovirus por inmunofluorescencia (IF): Templados lineales. Células 293T cultivadas en portaobjeto, fueron transfectadas transitoriamente con $1\mu\text{g}$ de cada uno de los plásmidos ayudadores (DNA lineal). 72 h después de la transfección, la monocapa celular (previamente fijada con metanol) fue expuesta a un anticuerpo primario policlonal que reconoce proteínas tardías de Adenovirus, seguido por un conjugado secundario fluorescente (rodamina, color rojo) y analizadas al microscopio usando luz verde (500nm) (imágenes a 20X). Células infectadas con Ad5, fueron usadas como control positivo (+) de expresión de proteínas tardías y células transfectadas con pJM17 fueron usadas como control negativo (-). Todas las construcciones muestran niveles similares de expresión de proteínas tardías.

Para el caso de pSV4057c, la cantidad de proteínas tardías detectadas, fue comparable a Ad5 *wt* y al menos 80 veces más alto que el observado anteriormente con pJM17*ori+*. Este resultado demostró una vez más, el efecto notable que produjo el cambio del origen SV40 de la región E1 a la región E3 (Fig. 33).

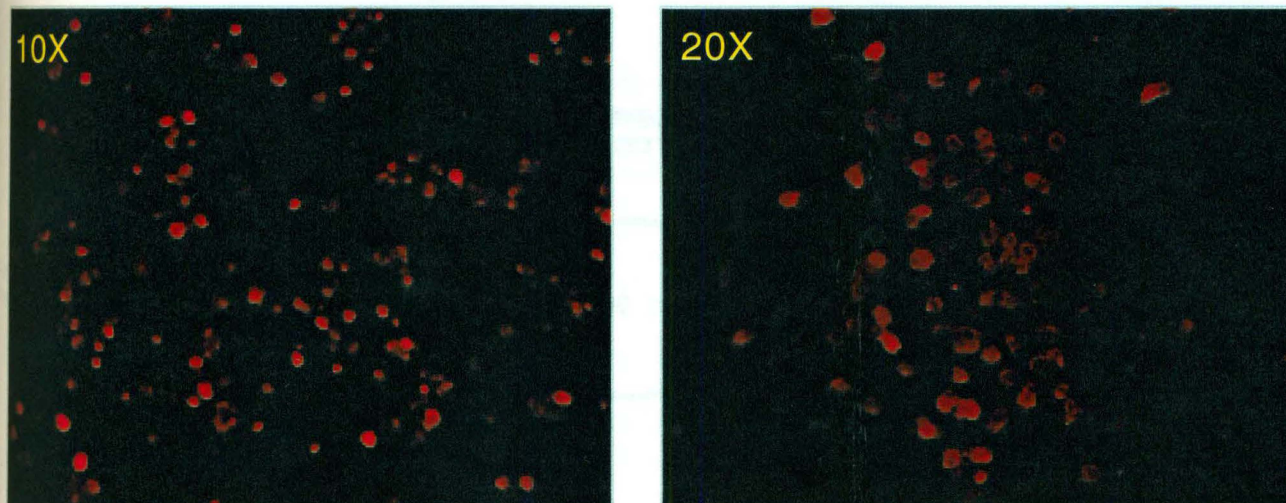


Figura 33. Detección de proteínas tardías de Adenovirus transcritas a partir de pSV4057c: Templado circular. Células 293T cultivadas en portaobjeto, fueron trasfectadas transitoriamente con 1 μ g de pSV4057c. 72 h después de la transfección, la monocapa fue expuesta al anticuerpo primario policlonal que se une a proteínas tardías de Adenovirus y a un conjugado secundario fluorescente (rodamina, color rojo) y analizadas al microscopio usando luz verde (500nm) (imágenes a 20X). Las imágenes captadas a 10X y 20X muestran la cantidad abundante de células positivas que se encuentran expresando proteínas tardías.

3.2.3 TRANSCRITOS DEL HEXÓN Y LA PROTEÍNA TERMINAL.

Con el fin de corroborar que la poca cantidad de proteínas tardías detectadas por inmunofluorescencia a partir de los plásmidos p13/31, pE13 y pMLP31, es debida a la baja cantidad de transcritos (lo cual indicaría la nula actividad del promotor CMV) y con el propósito de determinar las diferencias en el nivel ó cantidad de transcritos del resto de los plásmidos adenovirales, se llevaron a cabo ensayos de Northern blot, usando RNA total extraído a partir de células 293T transfectadas con cada uno de los plásmidos lineales y pSV4057c circular; además de pJM17 $ori+$ y controles pJM17 y pAd520 (**Fig. 34**). Los transcritos identificados corresponden a dos de los genes adenovirales más importantes, el hexón que codifica para una proteína tardía y es el principal componente de la cápside adenoviral y el gen de la proteína terminal, que produce la proteína del mismo nombre (es una proteína temprana) que actúa como oligonucleótido en el inicio de la replicación viral.

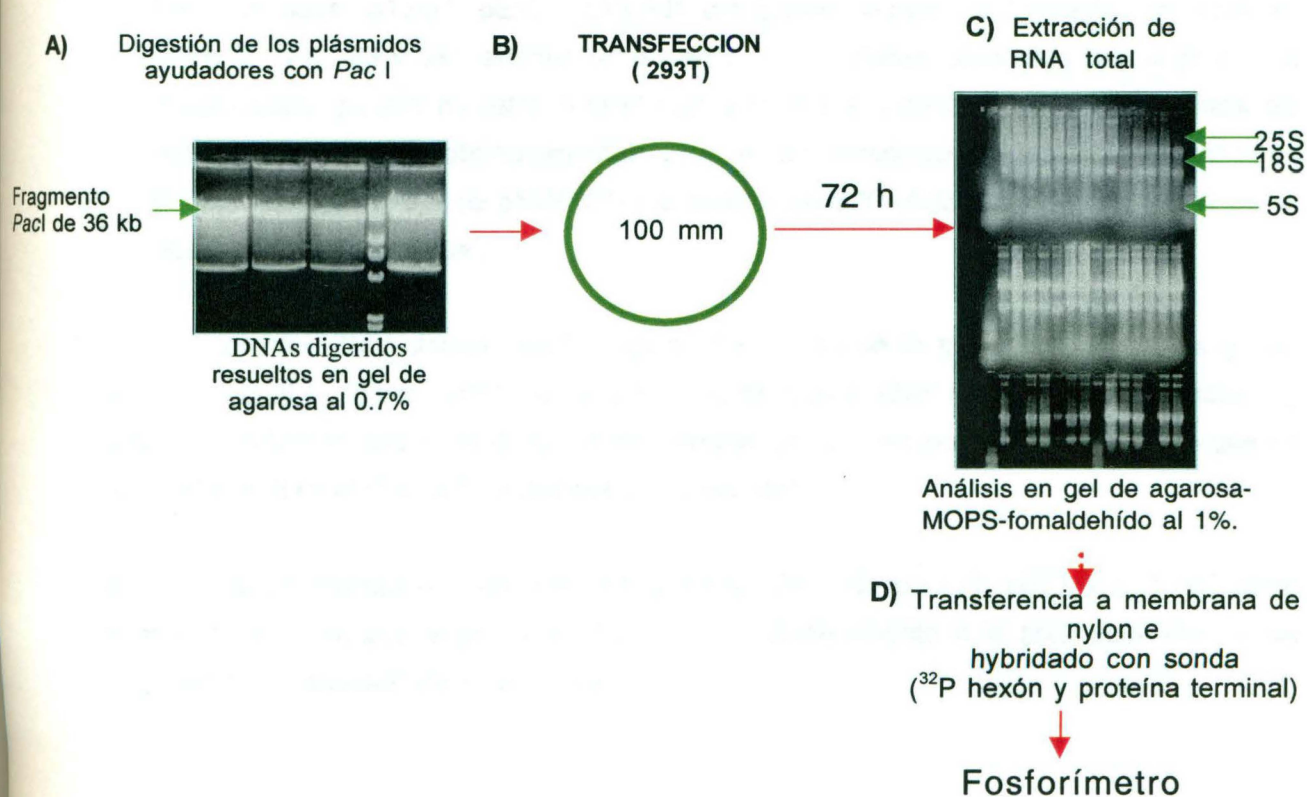


Figura 34. Análisis de los plásmidos ayudadores por Northern blot. **A) Digestión de los ayudadores con *Pac*I.** 10 μg de cada uno de los plásmidos ayudadores fueron digeridos con *Pac*I y purificados a partir del gel de agarosa para producir los templados lineales. **B) Transfección en células 293T.** 10 μg de p13/31, pE13, pMLP31, pSV4057I y pAd520 linearizados, además de pSV4057c, pJM17ori+ y pJM17 (como control negativo) circulares, fueron transfectados en células 293T. **C) Extracción de RNA.** El RNA total extraído 72 h después, fue analizado electroforéticamente en un gel de agarosa-MOPS-formaldehído y cuantificado. **D) Northern blot.** 20 μg de cada uno de los RNAs, después de haber sido resueltos en gel de agarosa-MOPS-formaldehído y transferidos a una membrana de nylon, fueron hibridados en dos experimentos independientes, con cada una de las dos sondas: hexón y proteína terminal previamente marcadas con [^{32}P]. La membrana fué expuesta y analizada en el fosforímetro.

El análisis del RNA total extraído a partir de células 293T transfectadas con los plásmidos ayudadores (DNAs linearizados y pSV4057c), usando dos sondas para indentificar los transcritos del hexón y la proteína terminal, permitió hacer las siguientes observaciones :

1. Los plásmidos p13/31, pE13 y pMLP31 exhibieron niveles de transcripción similares entre sí (**Fig. 35 y 36**), aunque de acuerdo a los valores obtenidos por el programa ImageQuant, p13/31 muestra el nivel más alto de los 3 (tanto para los transcritos del hexón como para la proteína terminal). El nivel de transcripción de los tres plásmidos es también comparable al de pSV4057/ y el control pAd520 (Ad5 sin inserto). Esta última observación prueba que :
 - A). El promotor CMV clonado en la región MLP no activó la transcripción de los genes tardíos, lo cual pudo ser correlacionado finalmente, con el nivel de transcritos detectado y a la vez explica el bajo nivel de proteínas tardías detectadas por IF (contrario a lo que se esperaba si el promotor CMV estuviese funcionando).
 - B). El nivel de replicación, transcripción y traducción de p13/31, pE13 y pMLP31 como templados lineales, puede ser atribuido total y exclusivamente a la sola actividad de los orígenes de replicación de Adenovirus.
2. pSV4057. Contrario a lo que se esperaba, la diferencia total de transcritos entre pSV4057 lineal y circular no es tan marcada, a pesar de que como ya se mostró, el templado circular no replica abundantemente, ni produce tantas proteínas tardías como lo hace el templado circular. Esto podría sugerir, la existencia de un mecanismo de producción de transcritos alterno a la replicación. El control pJM17 (replica a niveles no detectables por Southern blot) exhibió el nivel más bajo de transcritos de ambas proteínas analizadas.

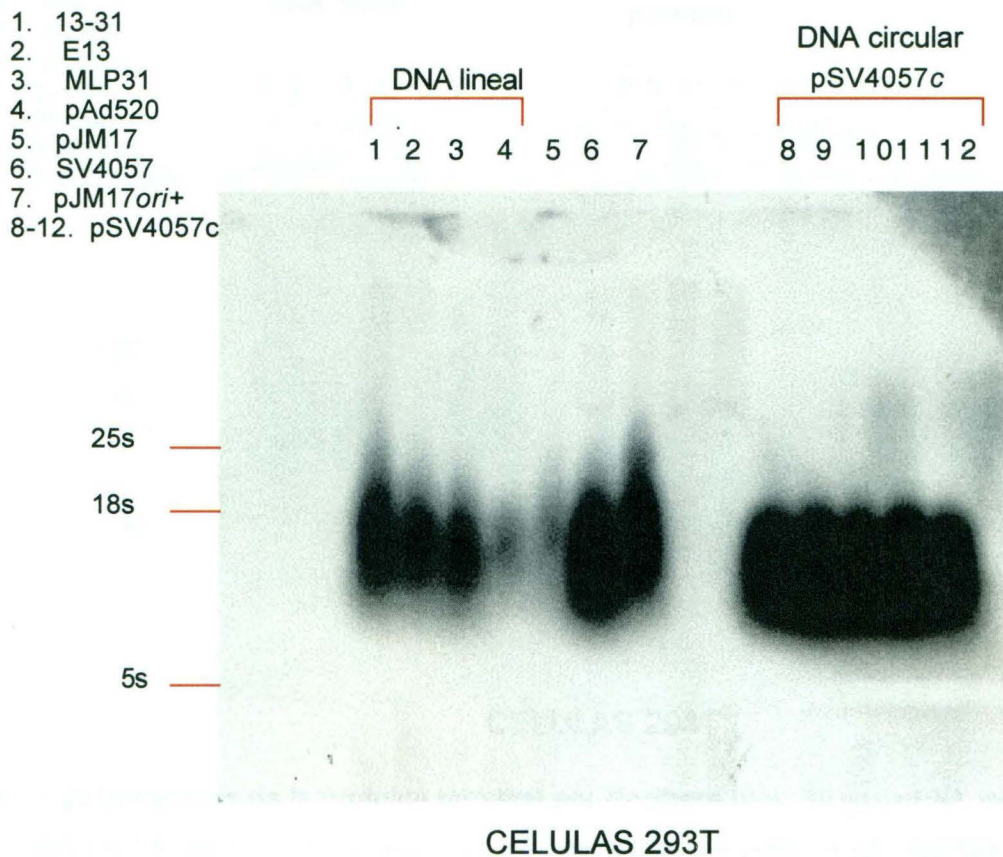


Fig. 35. Detección de transcritos del hexón por Northern blot. 20 μ g de RNA total extraído a partir de células 293T transfectadas con los ayudadores lineales y con pSV4057c circular, fueron resueltos en un gel de agarosa al 1%, transferidos a una membrana de nylon e hibridados con una sonda de 400 pb correspondiente a parte de la secuencia nucleotídica que codifica para el hexón. Como lo muestra la autorradiografía, muestras 8 al 12: pSV4057c (circular), muestran la cantidad más abundante de transcritos, seguido por la muestra 6: pSV4057 lineal y muestra 7: pJM17ori+. 1, 2, 3: El nivel mostrado por los plásmidos CMV, es comparable entre sí, en tanto que 4: pAd520 y el control 5: pJM17, mostraron los niveles de transcripción más bajos.

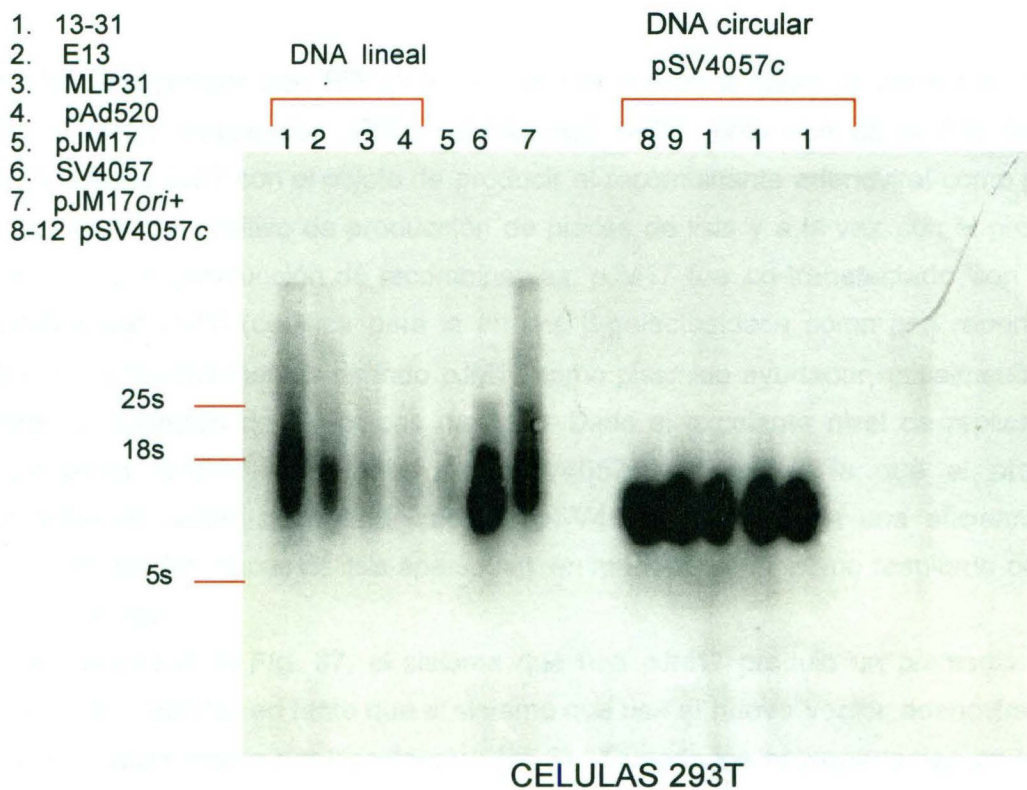


Fig. 36. Detección de transcritos de la proteína terminal por Northern blot. 20 μ g de RNA total extraído a partir de células 293T transfectadas con los ayudadores como templados lineales y con pSV4057c circular, fueron resueltos en un gel de agarosa al 1% , transferidos a una membrana de nylon e hibridizados con una sonda que reconoce 350pb de la secuencia nucleotídica de la proteína terminal. Como lo muestra la Autorradiografía, las muestras del 8-12: pSV4057c (circular), exhibe la cantidad más abundante de transcritos, seguido por la muestra 6: pSV4057 lineal y muestra 7: pJM17ori+. 1, 2, 3: Los plásmidos CMV muestran niveles de transcripción semejantes, en tanto que 4: pAd520 y el control 5: pJM17, mostraron los niveles de transcripción más bajos.

A pesar de que no todos los resultados obtenidos a partir del análisis por Southern blot, inmunofluorescencia y Northern blot, pueden ser explicados en su totalidad, sí permiten establecer claramente y sin lugar a dudas, que pSV4057 es el plásmido con mejores cualidades de replicación, transcripción y producción de proteínas adenovirales para ser usado como ayudador en la producción de Adenovirus recombinantes y tratar de optimizar en el siguiente orden : 1) título viral inicial, 2) menor tiempo de producción de recombinantes, 3) menos pasajes para su propagación y finalmente, uno de los puntos más importantes, 4) disminuir la cantidad de Adenovirus competentes en replicación, en la preparación final.

3.3 NUEVO SISTEMA ADENOVIRAL: pSV4057/293T

3.3.1 pSV4057C COMPLEMENTA LA PRODUCCIÓN DEL RECOMBINANTE pAdRFP EN CÉLULAS EN CULTIVO.

El cassette de expresión con RFP (1.6 kb), fue clonado en el plásmido comercial pΔE1 (6.2 kb), originando el vector acarreador pRFP. El plásmido pRFP, junto con pSV4057c fueron co-transfectados en células 293T con el objeto de producir el recombinante adenoviral como placas de lisis en agar. Como control positivo de producción de placas de lisis y a la vez con el propósito de comparar la eficiencia de producción de recombinantes, pJM17 fue co-transfectado con el vector acarreador denominado pLAD (codifica para la enzima β-galactosidasa como gen reportero). La producción normal de recombinantes usando pJM17 como plásmido ayudador, usualmente toma de 10-15 días, hasta la aparición de las placas de lisis. Dado el excelente nivel de replicación y la cantidad de proteínas tardías expresadas por pSV4057c, se esperaba que el proceso de recombinación entre el vector acarreador pRFP y pSV4057c ocurriera a una eficiencia mucho mayor, ocasionando que las placas de lisis aparezcan en menor tiempo, como resultado de un título adenoviral inicial más alto.

Como se muestra en la **Fig. 37**, el sistema que usa pJM17 produjo un promedio de 10-15 placas de lisis por transfección, en tanto que el sistema que usa el nuevo vector adenoviral, produjo un promedio de 80 placas virales por transfección (n= 3). Cuando los sobrenadantes en los cuales fueron resuspendidas las placas de lisis, fueron sometidos a análisis para determinar el número aproximado de partículas virales iniciales (ensayo de multiplicidad de la infección), el título viral total del recombinante producido usando pJM17 fue de alrededor de 5×10^3 , en tanto que usando pSV4057c, las partículas virales totales fueron 1×10^7 . Los recombinantes producidos por ambos sistemas fueron "funcionales", es decir, retuvieron su capacidad de infectar células 293T y expresaron apropiadamente las proteínas codificadas por el gen reportero, con la gran diferencia de que para realizar el ensayo de funcionalidad del recombinante pAdRFP, el virus solo tuvo que ser propagado una vez en células 293T, en tanto que para realizar el mismo ensayo usando el recombinante pLADβgal, el virus tuvo que ser pasado tres veces en el mismo tipo celular, para producir suficiente virus para las infecciones. El uso del nuevo sistema adenoviral (pSV4057c y células 293T), incrementó la eficiencia del proceso de producción de recombinantes adenovirales reflejado por los siguientes resultados:

1. Mayor número de placas de lisis (promedio de 80)
2. Incremento en el título viral inicial (de 5×10^3 a 1×10^7)
3. Menor número de propagaciones en células 293T, lo cual no solo se tradujo en menor tiempo de producción y menor uso de material de trabajo, sino que la ventaja más grande que

ofrece este sistema, es que el título viral inicial elevado, ayuda enormemente a la disminución de Adenovirus replicación-competentes.

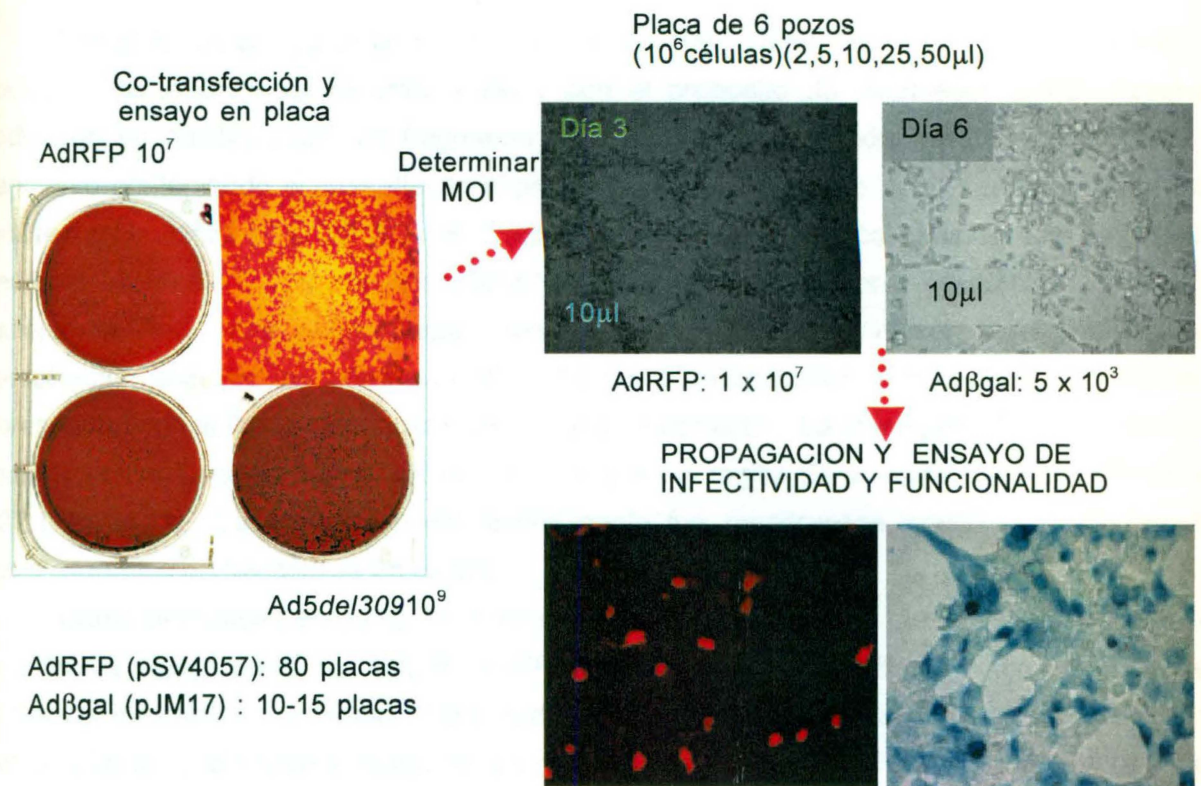


Fig. 37. Producción del recombinante pAdRFP por co-transfección en células en cultivo. 2 μ g del vector acarreador pRFP, fueron co-transfectados con 8 μ g del plásmido pSV4057c en células 293T. Como control positivo, 8 μ g de pJM17 fueron co-transfectados con 2 μ g de pLAD. Las placas de lisis producto de cada recombinación (como las que se muestran en la figura), fueron recuperadas y eluidas en 500 μ l de medio fresco con 2% de SBF. 5, 10, 25 y 50 μ l del SN de elución, fueron usados para determinar el número de partículas virales iniciales de pAdRFP (1×10^7) y pAdLAD (5×10^3) (MOI). Posteriormente, cada uno de los recombinantes fue propagado y usado para determinar la capacidad de infección y funcionalidad, determinada por microscopía para el caso de pAdRFP (células infectadas expresan la proteína roja fluorescente) y tinción con X-gal y microscopía para pAdLAD (células infectadas expresan la enzima β -galactosidasa, color azul).

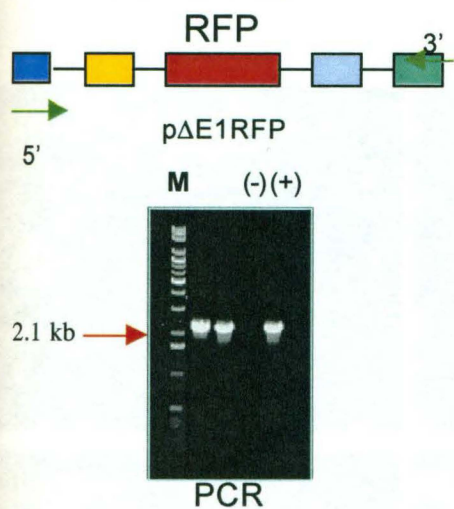
3.3.2 pSV4057 (LINEAL), ORIGINA EL RECOMBINANTE pAdRFP EN CÉLULAS 293T.

Con el fin de comparar la efectividad de pSV4057 como DNA lineal y DNA circular en la producción de Adenovirus recombinantes y con el propósito de establecer ambos sistemas de producción en células 293T, un fragmento de 2.1 kb fue amplificado a partir del plásmido pRFP (fragmento conteniendo el cassette de expresión RFP y 300 pb de secuencias en cada extremo para recombinación) (**Fig. 38 A**). El fragmento amplificado fue co-transformado con pSV4057 linealizado mediante D-loop con el iniciador N-50 (**Fig. 38 B**), que se une al nucleótido 50 del extremo izquierdo de Ad5. Las clonas bacterianas producto de la recombinación fueron analizadas por digestión con enzimas de restricción (**Fig. 38 C**), y microscopía (expresión de la proteína roja fluorescente) con el fin de identificar el recombinante correcto. La clona pRFP fue digerida con *Pac I*, para liberar el genoma adenoviral con el inserto en la región E1 y usarlo para transfectar células 293T (**Fig 38 D**). La producción del recombinante fue monitoreada mediante el seguimiento del efecto citopático en las células en cultivo.

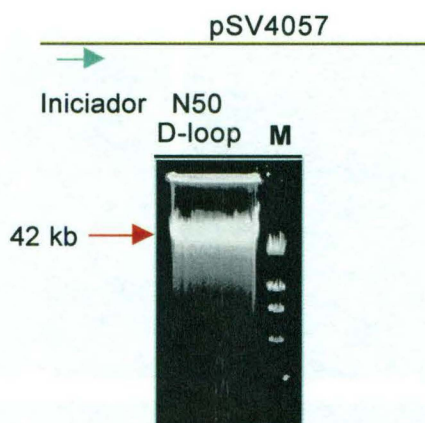
Como se muestra en la **Fig. 39**, para el día 3 después de la co- transfección, se observaron los primeros signos de efecto citopático (CPE) (característica morfológica principal que distingue a las células infectadas con virus). Para el día 8, cuando el 90% de las células mostraron CPE, se llevó a cabo la recolección y lisado de las células infectadas. El hecho de que el efecto citopático haya sido casi de un 100% para el día 8, dió la primera indicación de que el título viral podía ser un poco más elevado que el producido por la mayoría de los sistemas comerciales disponibles, los cuales requieren de entre 10-12 días para alcanzar el 100%. El lisado recuperado fue usado para realizar el ensayo de MOI inicial, el cual fue de $5 \times 10^{4-5}$ partículas virales totales. Este título, como se había anticipado, resultó ligeramente más elevado que el normalmente reportado para los sistemas comerciales, el cual es de alrededor de 5×10^3 . El resto del sobrenadante fue usado para propagar el recombinante y producir el primer stock viral. Parte del lisado viral de este primer stock, fue usado para realizar el ensayo de infectividad en células 293T. Ambos recombinantes producidos fueron luego purificados por doble gradiente de cloruro de cesio (**Fig. 40**), para su uso en estudios *in vivo*.

El sistema de recombinación en *E. coli* resultó menos eficiente que el sistema que usa el plásmido circular, lo cual se atribuye al hecho de que el origen SV40 no es funcional en el genoma lineal como se mostró en los ensayos de replicación.

A) Amplificación del fragmento de 2.1 kb para RH



B) Linearización de pSV4057 por D-loop



C) Analisis de las clonas producto de la RH en E. coli



D) Digestión de la clona con Pacl y Purificación del genoma de 37 kb

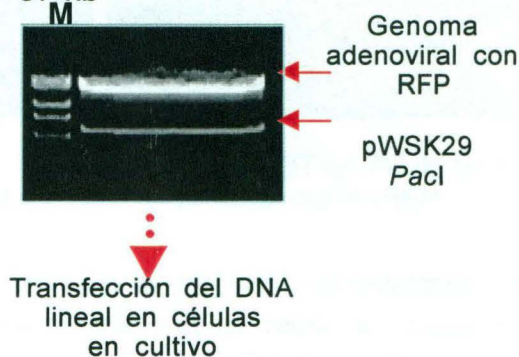
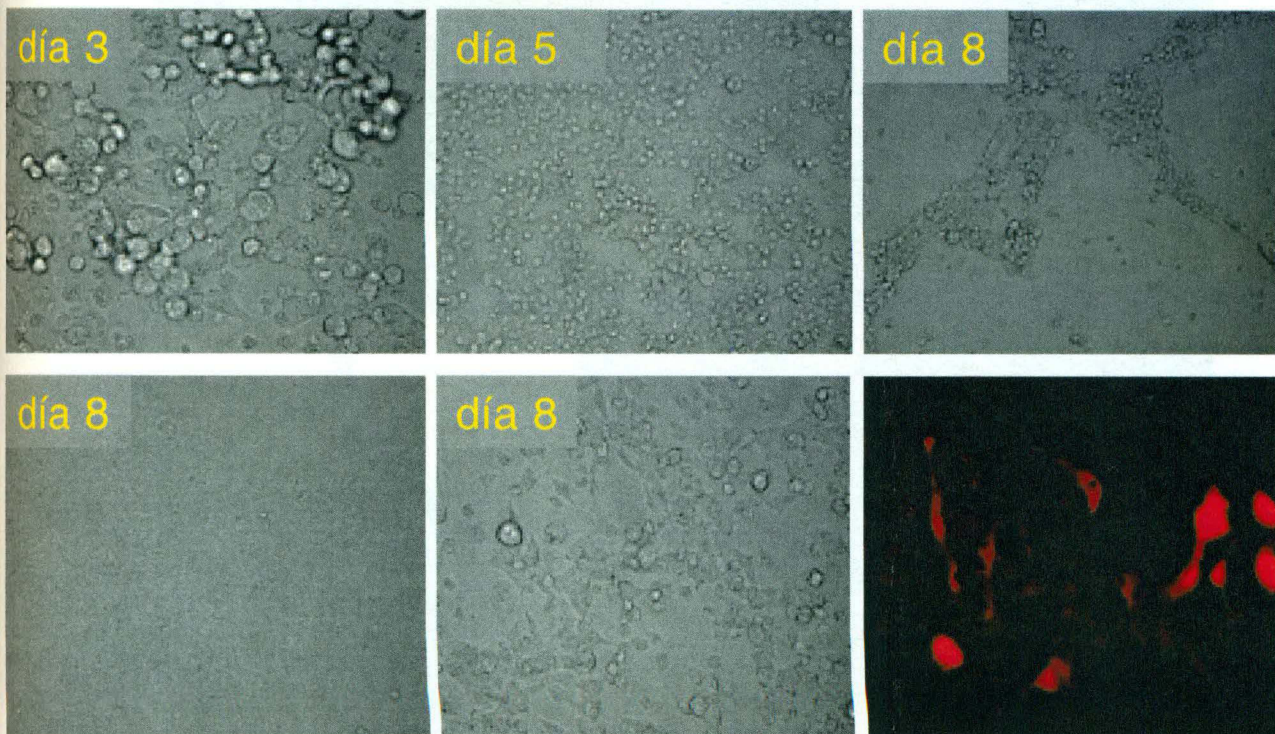


Fig. 38. Producción de pAdRFP por RH en BJ5183. **A) Amplificación del fragmento de 2.1 kb para RH.** pRFP sirvió como templado para amplificar por PCR un fragmento de 2.1 kb (fragmento con el cassette de expresión RFP y 300 pb de secuencias para recombinación). **B) Linearización de pSV4057 por D-loop.** El fragmento de 2.1 kb fue recombinado con el plásmido pSV4057 linearizado por D-loop usando el primer N-50, con el propósito de introducir el cassette de expresión en la región E1. **C) Análisis de las clonas producto de la RH.** Las clonas positivas producto de la recombinación, fueron analizadas por digestión con enzimas de restricción y microscopía, hasta identificar la clona correcta (DNAs indicados con las flechas). **D) Digestión de la clona positiva con Pacl y purificación del genoma del recombinante.** Una de las clonas positivas fue propagada y digerida con Pacl para producir el DNA lineal (37 kb), que fue usado para transfectar células 293T con el fin de producir el recombinante adenoviral. M: marcador 1 kb y λ HindIII.



Control:
Células 293T en 10% de SFB.

Control:
Células 293T en 2% SFB.

Células 293T en 2% de SFB,
infectadas con AdRFP.

Fig. 39 Producción de AdRFP en células 293T. El seguimiento de la producción del recombinante por monitoreo del efecto citopático se llevó a cabo mediante la observación directa de las células por microscopía. Como control negativo, células 293T sembradas el mismo día que las células transfectadas, fueron mantenidas en medio de cultivo con 10% y 2% de suero fetal bovino. Como se muestra en la serie de fotos, para el día 8 el 100% de las células mostraron CPE, lo cual indicó producción de virus a partir del DNA del plásmido transfectado. Las células 293 mantenidas en 10% de SFB permanecieron casi intactas, en tanto que algunas de las células del control mantenido en SFB al 2% muestran apoptosis, pero su morfología resultó fácilmente diferenciable de la morfología característica de células con efecto citopático.

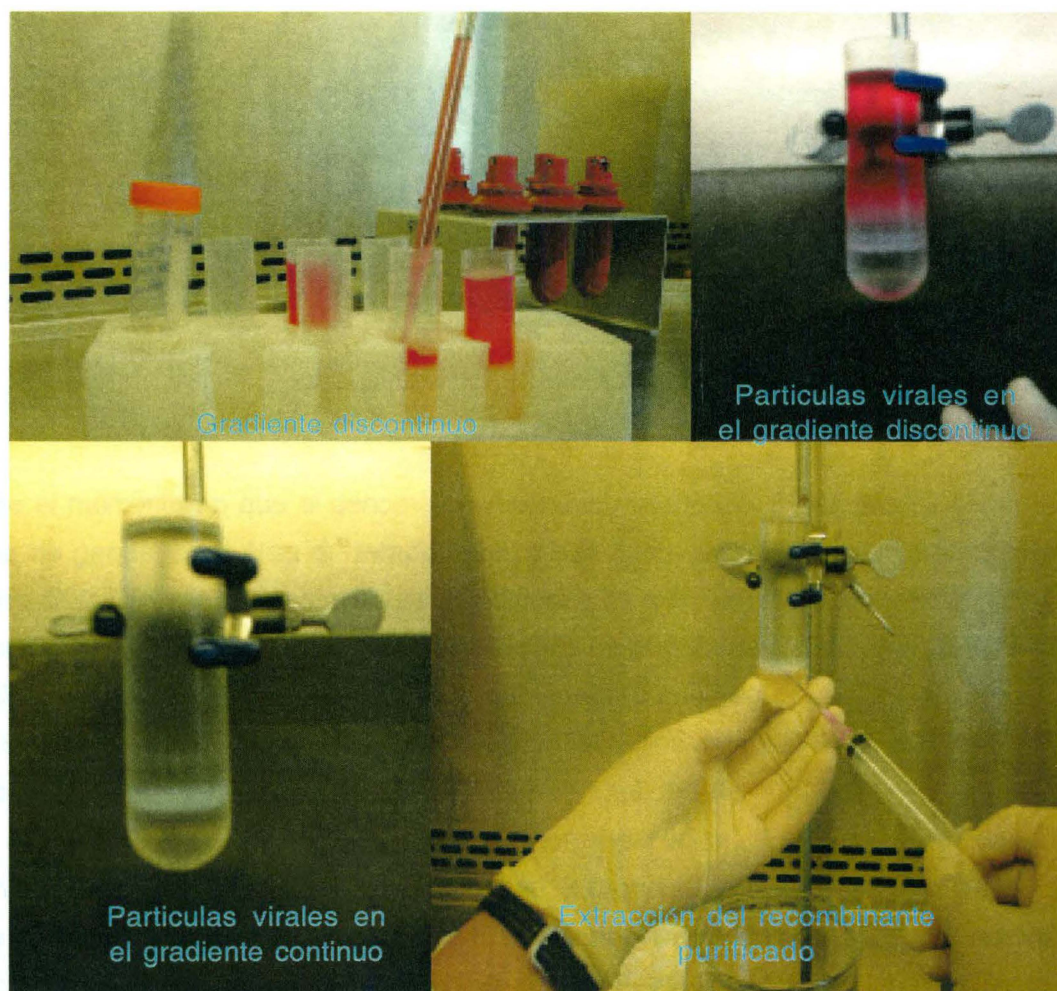


Fig. 40. Purificación de AdRFP por doble gradiente en cloruro de cesio. El sobrenadante producto de la propagación del virus en D-MEM con 2% de suero fetal bovino, fue puesto encima de un gradiente discontinuo de cloruro de cesio. Las muestras fueron centrifugadas por 90 min a 4°C y la banda viral fue purificada y sometida a un segundo tratamiento de purificación en un gradiente continuo. El recombinante final fue recuperado por punción y desalado, dializándolo en una solución de TE con 5% de sacarosa.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Desde el momento en que el genoma de Adenovirus empezó a ser usado como vector de transferencia de genes en el área de terapia génica con fines específicos de aplicación clínica en humanos, una de las principales metas y preocupaciones ha sido el desarrollar y producir el sistema adenoviral perfecto (líneas celulares, vectores, métodos de purificación, etc.) que permita simplificar la construcción, producción y propagación de Adenovirus recombinantes.

Los sistemas adenovirales más populares son aquellos que permiten obtener el título viral más elevado en el menor tiempo posible y con la menor cantidad de contaminación con Adenovirus revertantes ó los llamados Adenovirus competentes en replicación. Estos tres aspectos, han sido motivo de numerosos trabajos científicos, que han pretendido resolver los problemas técnicos asociados a ellos. Hasta ahora, la forma más efectiva de eliminar los Adenovirus revertantes ha sido producir Adenovirus recombinantes deficientes en replicación. La mayor parte de los recombinantes adenovirales producidos son deficientes en replicación (tipo I, II ó de alta capacidad), porque parte del genoma viral (ó todo), es eliminado para dar cabida al DNA heterólogo que codifica para el gen de interés y para disminuir la respuesta inmune celular provocada en el huésped, debido a la expresión a bajos niveles de proteínas adenovirales (Yang *et al.*, 1994). Para producir y propagar el recombinante deficiente en replicación, es necesario usar un ayudador ó "helper" (el cual puede ser un virus, una línea celular ó un plásmido) que exprese las proteínas virales codificadas por las regiones adenovirales faltantes en el recombinante.

Hasta hace algunos años el único tipo de ayudador con que se contaba, eran versiones modificadas de Ad tipo silvestre, que a pesar de contar con deleciones ó sustituciones de la región E1, producía un alto número de partículas adenovirales replicación-competentes (PARC), como consecuencia de la recombinación con la región E1 de la línea celular 293.

Han sido reportados anteriormente varios sistemas que utilizan líneas celulares para complementar la producción y propagación de los recombinantes (Lieber *et al.*, 1996; Amalfitano *et al.*, 1996; Langer y Schaack, 1996; Zhou y Beaudet, 2000; Gao *et al.*, 2000). A pesar de que el

título viral se mejora, estos sistemas presentan problemas para regular la expresión de las proteínas virales y controlar la toxicidad asociada con ellas. Algunos sistemas híbridos como Adenovirus-baculovirus, presentaron también problemas de reversión (Cheshenko *et al.*, 2001).

Las versiones plasmídicas de Ad5 resuelven casi por completo el problema de revertantes, pero sacrifican la producción de recombinantes con títulos virales aceptables para ser usados *in vivo*.

El uso de versiones plasmídicas de Ad5 como ayudador, surgió a partir de los primeros trabajos con AAV (Matsushita *et al.*, 1998) en los cuales, la transfección transitoria del genoma de AAV con DNA plasmídico conteniendo las regiones adenovirales E2 y E4, produjo stocks libres de ayudador y a un título viral alto. Una estrategia similar dió origen a los sistemas retrovirales actuales, en los cuales mediante la co-transfección de tres DNAs plasmídicos, es posible producir Retrovirus a un título viral alto y libre de revertantes (Pear y Nolan, 1993; Soneoka *et al.*, 1995). En un inicio se pensó que este tipo de estrategia podría funcionar para el sistema adenoviral. Sin embargo, pronto se vió que el genoma adenoviral clonado como DNA plasmídico, a pesar de tener orígenes de replicación intactos es incapaz de replicar a niveles detectables, aún y cuando fueran proporcionadas en *trans* el grupo completo de proteínas virales, sugiriendo que el DNA plasmídico es muy ineficiente como templado para replicación.

4.1 Resultados preliminares: pJM17 no replica en células en cultivo.

El hecho de que pJM17 no replicó en células 293 y mostró muy poca producción de proteínas adenovirales tardías, no resultó sorprendente dados los antecedentes que se acaban de mencionar. Al inicio se pensó que la delección que tiene el plásmido en el extremo izquierdo, podría ser la causa de la baja actividad replicativa y transcripcional, sin embargo al examinar DNAs con ITRs intactos, se vió que estos también eran ineficientes para replicar, aún en presencia de virus ayudador (Datos no mostrados).

Los parámetros que afectan la eficiencia de la replicación de los DNAs plasmídicos han sido analizados por varios grupos. Se sabe que la unión covalente de proteína terminal junto con el factor de activación del templado, incrementa notablemente la actividad replicativa *in vitro* (Matsumoto *et al.*, 1993; Matsumoto *et al.*, 1995). Se ha visto que este factor también incrementa la expresión de los genes tardíos después de que el DNA replica, sugiriendo una vez más como se ha venido sospechando desde hace tiempo, que para que la región de genes tardíos pueda ser transcrita, el DNA debe replicarse primero. Se cree que la replicación viral, provoca ó induce que la cromatina adopte una conformación ó estructura tridimensional específica, que activa la transcripción de los genes tardíos.

4.2 LA REPLICACIÓN GENÓMICA Y SUBGENÓMICA DE pJM17 ori^+

Todas las observaciones y resultados indican actualmente que para expresar todo el grupo de proteínas adenovirales, el DNA plasmídico debe replicarse primeramente. La dificultad técnica que representa el proporcionar moléculas de proteína terminal a DNAs plasmídicos (como estrategia para incrementar la replicación y la producción de placas virales), llevó a plantear la idea de que quizás el uso de un origen de replicación heterólogo como el origen SV40, pudiera solucionar el problema de replicación del genoma de Adenovirus. Si es verdad que la replicación induce la expresión de los genes tardíos, entonces la simple clonación del origen SV40 en la región E1 debe permitir la replicación de pJM17 y la activación de los genes tardíos.

El análisis de pJM17 ori^+ en células 293T, mostró por primera vez la replicación genómica de Adenovirus como plásmido y la activación de la expresión de proteínas tardías como consecuencia de la replicación. Sin embargo, el análisis por Southern blot mostró también que aproximadamente 60% de las bandas de replicación detectadas estaban compuestas por moléculas de DNA subgenómico que varían en tamaño desde los 2 hasta los 15 Kb. El análisis de los DNAs incompletos por Southern blot usando sondas que codifican para secuencias localizadas en diversas áreas de pJM17 ori^+ indicó, que las moléculas incompletas solo contienen secuencias nucleotídicas cercanas (2-15 kb) ó que rodean el origen SV40, sugiriendo que la replicación fue interrumpida antes de que finalizara la síntesis del templado en su totalidad (datos no mostrados). Con el fin de descartar la posibilidad de que el origen SV40 tuviera algún tipo de restricción de la replicación, relacionada al tamaño de la molécula a replicar (el genoma de SV40 mide 5.4 kb, pJM17 ori^+ mide 40.5 kb), se probó la replicación de DNAs plasmídicos de diversos tamaños (4, 7 y 12 kb), observándose que todos los DNAs analizados fueron replicados en su totalidad y no fue detectado DNA subgenómico, lo cual sugirió que la replicación incompleta está ligada intrínsecamente al DNA de pJM17 ori^+ (datos no mostrados). Previamente ha sido reportado que la presencia de secuencias repetitivas cercanas al origen SV40 (como las que rodean el origen en pJM17), ocasionan fallas en el mecanismo de replicación e interfieren con éste (Heinzl *et al.*, 1988). Con el objeto de eliminar el efecto de replicación interrumpida, se decidió clonar el origen SV40 en una área diferente a la que se encuentra en pJM17 ori^+ .

Si bien es cierto que los niveles de replicación de pJM17 ori^+ no aseguraron de manera contundente que el plásmido pudiera ser usado como ayudador en la producción de Adenovirus recombinantes, los resultados fueron positivos en el sentido de que demostraron que mejorando la replicación es posible mejorar la expresión de proteínas tardías del genoma de Adenovirus.

4.3 MÉTODO D-LOOP/RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y CONSTRUCCIÓN DE CUATRO VECTORES AYUDADORES.

Anteriormente ha sido reportado en la literatura el uso de un oligonucleótido y nucleasa S1 para introducir mutaciones puntuales y deleciones en DNAs circulares (Green y Tibbetts, 1980; Shortle *et al.*, 1980). Este método, aunado al uso de la maquinaria de recombinación homóloga de *E. coli*, BJ5183 (Hanahan 1983), permitieron desarrollar y estandarizar las condiciones para realizar inserciones en DNAs circulares que carecen de sitios de restricción únicos para clonación (Castro y Villarreal, 2000).

En la primera etapa del método D-loop/recombinación homóloga, una de las hebras de DNA del plásmido es desplazada por el oligonucleótido (30 pb), formando una estructura estable (Estructura en D ó D-loop). Esta estructura en D (la cual es DNA de cadena sencilla), es digerida por la nucleasa S1 (enzima cadena sencilla-específica). Con un exceso de S1, el plásmido pasa de ser superenrollado a un estado relajado, lo cual ocasiona que el iniciador se desprenda y la cadena de DNA quede expuesta para ser digerida también por la nucleasa S1. En la segunda etapa, el DNA linealizado es co-transformado con un segundo fragmento de DNA lineal que contiene secuencias homólogas para recombinación en cada extremo. La maquinaria de la cepa BJ5183, recombina y repara el DNA introduciendo el inserto direccionalmente en la región linealizada. BJ5183 no es *recA*, pero posee mutaciones en *recBC* y *sbcBC* que median recombinación a una eficiencia mayor y acepta DNAs de gran tamaño con buena eficiencia (Kuzminov y Stahl, 1999).

4.4 INESTABILIDAD DE pJM17 PARA LOS ENSAYOS DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.

La idea inicial era usar pJM17 para clonar el origen SV40 en la región E3 y el promotor CMV en la región MLP mediante el método D-loop/recombinación homóloga, sin embargo los experimentos de RH en *E. coli*, pronto mostraron lo inestable e inadecuado que resultó pJM17. Probablemente debido a la presencia de las repeticiones terminales invertidas (ITR) y a que el origen *ColE1* produce alto número de copias que no puede ser controlada por la maquinaria de recombinación de BJ5183, dado que tan pronto como pJM17 fue sustituido por un genoma adenoviral clonado en un vector de bajo número de copias, los problemas de recombinación inespecífica desaparecieron.

Empleando D-loop y recombinación homóloga se construyó el plásmido parental pAd520 en el cual, a diferencia de pJM17 y pJM17*ori+*, los orígenes de replicación se encuentran intactos, el genoma es ininterrumpido y puede ser liberado del vector bacteriano mediante digestión con *PacI*, sitio que está localizado en cada extremo. De esta manera, en pAd520 los extremos 5' quedan libres para interactuar con los factores que participan en el mecanismo de replicación adenoviral.

pAd520 fue usado como plásmido parental para introducir el origen SV40 en la región E3, produciendo el plásmido pSV4057 y el promotor CMV en la región de transcripción de genes tardíos (MLP) y E3, originando los plásmidos pE13, pMLP31 y p13/31.

4.5 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS PLÁSMIDOS AYUDADORES: TEMPLADO LINEAL VS CIRCULAR.

4.5.1 p13/31, pE13, pMLP31 Y EL PROMOTOR CMV.

Se ha sabido por mucho tiempo que durante la etapa temprana el promotor MLP es activo a muy bajos niveles y que inmediatamente después de que ocurre el primer ciclo de replicación viral, su actividad se incrementa al 100% (Shaw y Ziff, 1980). A pesar de que han sido identificados una gran variedad de elementos que activan al promotor MLP en *trans* tales como E1A 289R (Nevins 1981), la proteína Iva2 que se une a la secuencia DE1 localizada corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción (Leong *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1992; Lutz y Kedinger, 1996), las proteínas DEFA y DEFB que se unen a las secuencias DE1 y DE2b respectivamente (Mondesert *et al.*, 1992) y algunos elementos que actúan en *cis*, entre los que se cuenta una caja TATA bien definida y localizada, el elemento UPE 'o Elemento del promotor localizado entre -67 -49, una caja CAAT entre -80-76 la cual puede substituir a UE *in vivo*, un elemento iniciador (INR) que rodea el sitio de inicio de la transcripción, además de DE1 localizado entre +85 y +98 y DE2b entre +100 y +120 (Brunet *et al.*, 1987; Logan y Shenk, 1986; Lu *et al.*, 1997; Reach *et al.*, 1990; Reach *et al.*, 1991)], todavía no se ha podido elucidar el mecanismo y los elementos que gobiernan la transición entre etapa temprana y tardía y que desencadenan el mecanismo de replicación viral y en consecuencia la expresión de los genes tardíos. Se sabe que el promotor de genes tardíos puede ser activado y funciona en sistemas *in vitro*. Que es lo que limita su actividad en el sistema *in vivo*?. Aparentemente en el sistema *in vivo*, el DNA viral adquiere una estructura cromatínica especial que promueve a activación del promotor de genes tardíos y en consecuencia la expresión de las proteínas virales codificadas por esta región.

Si el promotor de genes tardíos fuera sustituido por un promotor heterólogo como CMV, cuya actividad no depende de la activación de un mecanismo de replicación, se esperaría que las proteínas adenovirales tardías fueran transcritas sin que el templado ó plásmido ayudador tuviera que replicar primeramente.

TEMPLADO CIRCULAR. El hecho de que p13/31, pE13 y pMLP31 fueran incapaces de replicar al ser transfectados como DNA circulares, no resulta sorprendente si se asume que el promotor CMV pueda estar ejerciendo su función y activando la transcripción de los genes tardíos aunque el DNA no necesariamente tenga que replicar (proceso opuesto a lo que normalmente ocurre).

Sin embargo, el análisis de la expresión de los genes tardíos por inmunocitoquímica y el hecho de que la cantidad de células expresando proteínas tardías resultó igual al control pAd520 (Ad5 sin CMV), sugirió inicialmente que el promotor CMV no estaba modificando el patrón de transcripción de las moléculas de DNA circular. Dada la complejidad de estructura de las

secuencias que componen la unidad de transcripción de genes tardíos, debido a la presencia de múltiples incios y paradas de la transcripción, además de una gran cantidad de secuencias para "splicing alternativo" (cada uno de los 5 genes que componen la unidad codifica para 4-5 proteínas en promedio) (Nevins y Wilson, 1981; Nevins 1982), no resulta difícil imaginar que CMV fuera incapaz de incrementar la transcripción de la región, aunque cabía la posibilidad de que como resultado de la misma complejidad, los transcritos producidos no estuvieran siendo procesados correctamente. Sin embargo, la detección (por Northern blot) de bajos niveles del transcrito del hexón, (que es la proteína adenoviral tardía más abundante), demostró contundentemente que la transcripción de la región adenoviral no fue modificada por el promotor CMV clonado en la región MLP, debido probablemente a la complejidad de la que se habló antes.

TEMPLADO LINEAL. Dados los resultados obtenidos con los templados circulares, resultó evidente que el nivel de replicación mostrado por los templados lineales en células 293 y 293T, era debida a la sola acción de los orígenes de replicación adenovirales, presumiblemente debido a que al no estar unidos covalentemente (unidos "head to tail"), quedan libres para interactuar con los factores que participan en el inicio de la replicación viral. Este resultado es perfectamente lógico si se toma en cuenta que todos los plásmidos ayudadores construidos, conservan intactos los orígenes de replicación nativos de Adenovirus (aún los plásmidos que portan el origen SV40). La activación de la expresión de los genes tardíos fue corroborada por inmunofluorescencia y el incremento sustancial de transcritos del hexón, también pudo ser comprobada por Northern blot.

4.5.2 pSV4057 y el origen SV40 .

En base a los resultados observados con pJM17 $ori+$, se esperaba que en presencia de Antígeno T grande (único requisito indispensable para activar el origen SV40), pSV4057 produjera replicación genómica y desapareciera el efecto de replicación incompleta.

TEMPLADO CIRCULAR. pSV5057 es el único plásmido ayudador que mostró replicación genómica al ser transfectado como DNA circular en células 293T. Ambas observaciones demuestran claramente que la replicación detectada es debida a la actividad del origen SV40, aunque los orígenes de replicación adenovirales estén presentes. El nivel de replicación observado fue comparable al mostrado por Ad5 $del309$ y las proteínas tardías detectadas y el nivel de transcripción, corroboraron el alto nivel de replicación observado. El cambio del origen SV40 de la región E1 en la cual se encuentra clonado en pJM17 $ori+$, a la región E3 en pSV4057 eliminó completamente el problema de replicación subgenómica, lo cual demuestra que las secuencias

repetitivas que se encuentran rodeando al origen SV40 en pJM17ori+, limitan e interrumpen el mecanismo de replicación.

TEMPLADO LINEAL. Si es cierto, que el origen SV40 está dirigiendo la replicación del genoma adenoviral y se toma en cuenta que el templado circular mostró excelentes niveles de replicación en presencia de antígeno T grande, era de esperarse que el templado lineal se comportara de igual manera. Sin embargo esto no fue así. El templado lineal mostró replicación en células 293 y 293T a un nivel semejante al resto de los vectores adenovirales. Estas observaciones sugieren que:

A) En ausencia de antígeno T grande (293) y cuando los extremos 5' no están cerrados covalentemente, los orígenes de replicación adenovirales se vuelven activos (dado que la replicación observada no es semejante a la exhibida por pSV4057c ó Ad5 wt), replicando el templado lineal.

B) Cuando el antígeno T grande está presente y el templado es DNA circular, no ocurre el switch ó cambio en el modo de replicación antígeno T grande-dependiente característico de SV40, sino que permanece en el modo de replicación adenoviral.

El hecho de que pSV4057 linearizado, replica a niveles comparables en presencia y ausencia de antígeno T grande (células 293 y 293T), sugiere la existencia de elementos de replicación intrínsecos al DNA, que solo están presentes ó se dan cuando el DNA plasmídico adopta la estructura del virus a partir del cual proviene. Al parecer, para que la maquinaria de SV40 replique un DNA eficientemente, el templado debe ser DNA circular. Es importante recordar que el mecanismo de replicación de SV40 comienza en el origen, se alarga en ambas direcciones y termina cuando las nuevas hebras de DNA se encuentran aproximadamente 180 grados de donde empezaron (DePamphilis, 1996). Lo cual indica que en caso de tener un templado lineal, las hebras de DNA replicando en ambas direcciones, obviamente nunca se encontrarán. El antígeno T grande además de ser una proteína que reconoce secuencias específicas, también tiene función de helicasa, de tal manera que durante el inicio de la replicación, esta proteína forma una "burbuja ó área de replicación" en el origen y el DNA puede ser alargado y sintetizado conforme el antígeno T grande vá separando las hebras de DNA. En el caso de pSV4057I, las secuencias de reconocimiento están presentes, pero quizás la estructura lineal impide que el antígeno T grande se una al DNA y desarrolle sus funciones específicas.

A pesar de que los resultados mostraron que los orígenes de replicación adenovirales son funcionales en genomas lineales, el nivel de replicación que pueden inducir no es comparable al mostrado por el Ad wt, indicando que el requisito de que los extremos 5' deben estar libres para interactuar con la proteína terminal, es necesario pero no es suficiente para activar la replicación del genoma adenoviral en pleno. El mecanismo de replicación adenoviral depende de la presencia de la

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se describe una nueva técnica para hacer modificaciones a DNAs que carecen de sitios de restricción únicos. Esto se lleva a cabo mediante el uso de una enzima específica para cadena sencilla y el mecanismo de recombinación homóloga en *Escherichia coli*.

El uso de la técnica D-loop/recombinación homóloga, permitió la construcción de un nuevo vector adenoviral ayudador (pAd520) y la inserción del origen de replicación de SV40 (pSV4057) y el promotor del CMV (pMLP31, pE13, p13-31) en el genoma adenoviral, con el propósito de producir un vector adenoviral ayudador mejorado que sustituyera en un momento dado el uso de virus y plásmidos ayudadores con baja actividad replicativa y transcripcional, en el proceso de producción y propagación de Adenovirus recombinantes.

Los experimentos de replicación mostraron contundentemente que el origen de replicación del virus SV40, solo promueve la replicación del genoma Adenoviral (pSV4057), cuando el antígeno T grande (293T) está presente en el medio (mecanismo SV40) y cuando el templado para la replicación es DNA circular.

Este incremento en la actividad replicativa de pSV4057c se tradujo en mayor cantidad de proteínas virales (detectadas por inmunofluorescencia), como consecuencia de la activación de la transcripción de los genes tardíos.

El plásmido homólogo pSV4057 / linearizado con *Pac I*, exhibió un nivel de transcritos semejantes a los producidos por pSV4057c, aunque como se mostró, este plásmido no replica eficientemente como templado lineal, sugiriendo la existencia de un mecanismo de transcripción independiente al de replicación.

Por otro lado, la presencia del promotor CMV en la región del promotor de genes tardíos no provocó ningún efecto en *cis* sobre la transcripción y replicación de Adenovirus, aunque los plásmidos linearizados replicaron en células 293 y 293T, indicando que la presencia de los extremos 5' libres del genoma adenoviral son requisito indispensable, aunque no suficiente para activar la replicación de Adenovirus hasta condiciones óptimas.

Por último, el uso pSV4057c permitió la producción de un Adenovirus recombinante de tipo I funcional, que exhibió un título viral inicial considerablemente alto (6×10^7), mayor número de placas de lisis y solo requirió dos rondas de amplificación en células en cultivo para alcanzar un título de 10^{12} pfu/mL.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

- Amalfitano A; Begy CR y Chamberlain JS. 1996. Improved adenovirus packaging cell lines to support the growth of replication-defective gene-delivery vectors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 93(8):3352-6.
- Amalfitano A; Hauser MA; Hu H; Serra D; Begy CR y Chamberlain JS. 1998. Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J Virol*. 72(2):926-33.
- Anderson, F. 1998. Human gene therapy. *Nature*. 392: 25-30.
- Beard P; Morrow JF y Berg P. 1973. Cleavage of circular, superhelical simian virus 40 DNA to a linear duplex by S1 nuclease. *J of Virol*. 12(6):1303-13.
- Bergelson JM; Cunningham JA; Droguett G; Kurt-Jones EA; Krithivas A; Hong JS; Horwitz MS; Crowell RL y Finberg RW. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 275(5304):1320-3.
- Bergelson JM; Modlin JF; Wieland-Alter W; Cunningham JA; Crowell RL y Finberg RW. 1997. Clinical coxsackievirus B isolates differ from laboratory strains in their interaction with two cell surface receptors. *J.of Infectious Disease*. 175(3):697-700.
- Berget SM; Berk AJ; Harrison T y Sharp PA. 1978. Spliced segments at the 5' termini of adenovirus-2 late mRNA: a role for heterogeneous nuclear RNA in mammalian cells. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 42 Pt 1:523-9.
- Berk AJ; Lee F; Harrison T; Williams J y Sharp PA. 1979. Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell*. 17(4):935-44.
- Berk AJ y Sharp PA. 1977. Ultraviolet mapping of the adenovirus 2 early promoters. *Cell*. 12(1):45-55.
- Berkner KL y Sharp PA. 1983. Generation of adenovirus by transfection of plasmids. *Nucleic Acids Res*. 11(17):6003-20.

- Blaese RM; Culver KW; Miller AD; Carter CS; Fleisher T; Clerici M; Shearer G; Chang L; Chiang Y; Tolstoshev P. 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. 270(5235):475-80.
- Blanton RA y Carter TH. 1979. Autoregulation of adenovirus type 5 early gene expression. III. Transcription studies in isolated nuclei. *J of Virol*. 29(2):458-65.
- Brunet LJ; Babiss LE; Young CS y Mills DR. 1987. Mutations in the adenovirus major late promoter: effects on viability and transcription during infection. *Mol Cell Biol*. 7(3):1091-100.
- Bubeck P, Winkler M y Bautsch W. 1993. Rapid cloning by homologous recombination *in vivo*. *Nucleic Acids Res*. 15: 3601-3602.
- Burgert HG y Kvist S. 1987. The E3/19K protein of adenovirus type 2 binds to the domains of histocompatibility antigens required for CTL recognition. *Embo Journal*. 6(7):2019-26.
- Castro-Peralta F y Villarreal LP. 2000. The use of oligonucleotide directed cleavage of DNA and homologous recombination in the production of large recombinant adenoviral vectors. *Gene Therapy*. 7(7):583-6.
- Challberg MD; Ostrove JM y Kelly TJ Jr. 1982. Initiation of adenovirus DNA replication: detection of covalent complexes between nucleotide and the 80-kilodalton terminal protein. *J of Virol*. 41(1):265-70.
- Challberg MD y Rawlins DR. 1984. Template requirements for the initiation of adenovirus DNA replication. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 81(1):100-4.
- Chartier C; Degryse E; Gantzer M; Dieterle A; Pavirani A y Mehtali M. 1996. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J of Virol*. 70(7):4805-10.
- Cheshenko N; Krougliak N; Eisensmith RC y Krougliak VA. 2001. A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. *Gene Therapy*. 8(11):846-54.
- Chow LT y Broker TR. 1978. The spliced structures of adenovirus 2 fiber message and the other late mRNAs. *Cell*. 15(2):497-510.
- Chow LT; Broker TR y Lewis JB. 1979. Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2. *J of Mol Biol*. 134(2):265-303.
- Dales S y Chardonnet Y. 1973. Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum. *Virology*. 56(2):465-83.
- Danna KJ y Nathans D. 1972. Bidirectional replication of Simian Virus 40 DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* . 69(11):3097-100.
- Davis AR; Wivel NA; Palladino JL; Tao L y Wilson JM. 2000. Construction of adenoviral vectors. *Meth in Mol Biol*. 135:515-23.

- Davison J. 1984. Mechanism of control of DNA replication and incompatibility in ColE1-type plasmids—a review. *Gene*. 28(1):1-15.
- DePamphilis ML. 1996. DNA Replication in Eukaryotic Cells. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Dodgson JB y Wells RD. 1977. Action of single-strand specific nucleases on model DNA heteroduplexes of defined size and sequence. *Biochemistry*. 16(11):2374-9.
- DuBridge RB; Lusky M; Botchan MR y Calos MP. 1985. Amplification of a Bovine Papillomavirus-Simian Virus 40 Chimera. *J of Virol*. 56(2):625-27.
- Engelhardt JF; Ye X; Doranz B y Wilson JM. 1994. Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 91(13):6196-200.
- Everitt E y Philipson L. 1974. Structural proteins of adenoviruses. XI. Purification of three low molecular weight virion proteins of adenovirus type 2 and their synthesis during productive infection. *Virology*. 62(1):253-69.
- Felgner PL y Ringold GM. 1989. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*. 337(6205):387-8.
- Fields BN, Knipe DM y Howley, PM. 1996. Virology. Third Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia:286-90.
- Fisher KJ; Choi H; Burda J; Chen SJ y Wilson JM. 1996. Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology*. 217(1):11-22.
- Flomenberg PR; Chen M y Horwitz MS. 1987. Characterization of a major histocompatibility complex class I antigen-binding glycoprotein from adenovirus type 35, a type associated with immunocompromised hosts. *J of Virol*. 61(12):3665-71.
- Friefeld BR; Lichy JH; Field J; Gronostajski RM; Guggenheimer RA; Krevolin MD; Nagata K; Hurwitz J y Horwitz MS. 1984. The in vitro replication of adenovirus DNA. *Curr Top Microbio Imm*. 110:221-55.
- Friefeld BR; Lichy JH; Hurwitz J y Horwitz MS. 1983. Evidence for an altered adenovirus DNA polymerase in cells infected with the mutant H5ts149. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 80(6):1589-93.
- Gao GP; Engdahl RK y Wilson JM. 2000 . A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus. *Hum Gene Therapy*. 11(1):213-9.
- Gao GP; Wilson JM y Wivel NA. 2000. Production of recombinant adeno-associated virus. *Advances in Virus Res*. 55:529-43.
- Garon CF; Berry KW y Rose JA. 1972. A unique form of terminal redundancy in adenovirus DNA molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 69(9):2391-5.
- Germond JE; Vogt VM y Hirt B. 1974. Characterization of the single-strand-specific nuclease S1 activity on double-stranded supercoiled polyoma DNA. *Euro J of Biochem*. 43(3):591-600.

- Ginsberg HS; Lundholm U y Linne T. 1977. Adenovirus DNA-binding protein in cells infected with wild-type 5 adenovirus and two DNA-minus, temperature-sensitive mutants, H5ts125 and H5ts149. *J of Virol.* 23(1):142-51.
- Ginsberg HS; Williams JF; Doerfler WH y Shimojo H. 1973. Proposed nomenclature for mutants of adenoviruses. *J of Virol.* 12(3):663-4.
- Goda, SK y Minton NP. 1995. A simple procedure for gel electrophoresis and Northern blotting of RNA. *Nucleic Acids Res.* 23(16):3357-3358.
- Gorziglia MI; Lapceovich C; Roy S; Kang Q; Kadan M; Wu V; Pechan P y Kaleko M. 1999. Generation of an adenovirus vector lacking E1, e2a, E3, and all of E4 except open reading frame 3. *J of Virol.* 73(7):6048-55.
- Graham FL; Rudy J y Brinkley P. 1989. Infectious circular DNA of human adenovirus type 5: regeneration of viral DNA termini from molecules lacking terminal sequences. *Embo Journal.* 8(7):2077-85.
- Graham FL; Smiley J; Russell WC y Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J of Gen Virol.* 36(1):59-74.
- Green C y Tibbetts C. 1980. Targeted deletions of sequences from closed circular DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 77(5):2455-9.
- Green M; Pina M; Kimes R; Wensink PC; MacHattie LA y Thomas CA Jr. 1967. Adenovirus DNA. I. Molecular weight and conformation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 57(5):1302-9.
- Guggenheimer RA; Nagata K; Lindenbaum J y Hurwitz J. 1984. Protein-primed replication of plasmids containing the terminus of the adenovirus genome. I. Characterization of an in vitro DNA replication system dependent on adenoviral DNA sequences. *J of Biol Chem.* 259(12): 7807-14
- Guggenheimer RA; Stillman BW; Nagata K; Tamanoi F y Hurwitz J. 1984. DNA sequences required for the in vitro replication of adenovirus DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 81(10):3069-73.
- Haecker SE; Stedman HH; Balice-Gordon RJ; Smith DB; Greelish JP; Mitchell MA; Wells A; Sweeney HL y Wilson JM. 1996. In vivo expression of full-length human dystrophin from adenoviral vectors deleted of all viral genes. *Hum Gene Therapy.* 7(15):1907-14.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids; *J. Mol. Biol.* 166: 557-80.
- Hartigan-O'Connor D; Amalfitano A y Chamberlain JS. 1999. Improved production of gutted adenovirus in cells expressing adenovirus preterminal protein and DNA polymerase. *J of Virol.* 73(9):7835-41.
- He TC, Zhou S, DaCosta L, Yu J, Kinzler KW y Vogelstein B. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 95: 2509-2514.
- He TC; Zhou S; da Costa LT; Yu J; Kinzler KW y Vogelstein B. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 95(5):2509-14.

- Heinzel SS; Krysan PJ; Calos MP y DuBridge RB. 1988. Use of simian virus 40 replication to amplify Epstein-Barr virus shuttle vectors in human cells. *J of Virol.* 62(10):3738-46.
- Hermonat PL y Muzyczka N. 1984. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* (20):6466-70.
- Hirt B. 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J of Mol Biol.* 26(2):365-9. (Unique ID/PMID: 67210985)
- Hitt MM y Graham FL. 2000. Adenovirus vectors for human gene therapy. *Advances in Virus Res.* 55:479-505.
- Hong SS; Karayan L; Tournier J; Curiel DT y Boulanger PA. 1997. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *Embo Journal.* 16(9):2294-306.
- Horne, RW, Bonner S.,Waterson AP y Wildy, P. 1959. The icosahedral form of an adenovirus. *J. Mol Biol.* 1:84-86.
- Horwitz MS. , 1971. Intermediates in the synthesis of type 2 adenovirus deoxyribonucleic acid. *J of Virol.* 8(5):675-83.
- Horwitz MS. 1974. Location of the origin of DNA replication in adenovirus Type 2. *J of Virol.* 13(5):1046-54.
- Horwitz MS; Brayton C y Baum SG. 1973. Synthesis of type 2 adenovirus DNA in the presence of cycloheximide. *J of Virol.* 11(4):544-51.
- Ishibashi M y Maizel JV Jr.1974.The polypeptides of adenovirus. VI. Early and late glycopolypeptides. *Virology.* 58(2):345-61.
- Jones N y Shenk T. 1979. An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 76(8):3665-9.
- Juillard V; Villefroy P; Godfrin D; Pavirani A; Venet A y Guillet JG. 1995. Long-term humoral and cellular immunity induced by a single immunization with replication-defective adenovirus recombinant vector. *Euro J of Immuno.* 25(12):3467-73.
- Kazuo, S y Andot T. 1982. Single strand-specific nucleases. *Nucleases.* Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Kochanek S; Clemens PR; Mitani K; Chen HH; Chan S y Caskey CT. 1996. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 93(12):5731-6.
- Kuzminov A y Stahl FW. 1999. Double-strand end repair via the RecBC pathway in *Escherichia coli* primes DNA replication. *Genes and Devel.* 13(3):345-56.
- Langer SJ y Schaack J. 1996. 293 cell lines that inducibly express high levels of adenovirus type 5 precursor terminal protein. *Virology.* 221(1):172-9.

- Lechner RL y Kelly TJ Jr. 1977. The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules. *Cell*. 12(4):1007-20.
- Leong K; Lee W y Berk AJ. 1990. High-level transcription from the adenovirus major late promoter requires downstream binding sites for late-phase-specific factors. *J of Virol*. 64(1):51-60.
- Lever, A.M.L. y Goodfellow, P. 1995. Gene therapy. *British Med Bulletin*. 51;1:57-71
- Lewis JB y Mathews MB. 1980. Control of adenovirus early gene expression: a class of immediate early products. *Cell*. 21(1):303-13.
- Li XC; Huang WL y Flint SJ. 1992. The downstream regulatory sequence of the adenovirus type 2 major late promoter is functionally redundant. *J of Virol*. 66(9):5685-90.
- Lichy JH; Field J; Horwitz MS y Hurwitz J. 1982. Separation of the adenovirus terminal protein precursor from its associated DNA polymerase: role of both proteins in the initiation of adenovirus DNA replication. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 79(17):5225-9.
- Lichy JH; Horwitz MS y Hurwitz J. 1981. Formation of a covalent complex between the 80,000-dalton adenovirus terminal protein and 5'-dCMP in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 78(5):2678-82.
- Lieber A; He CY; Kirillova I y Kay MA. 1996. Recombinant adenoviruses with large deletions generated by Cre-mediated excision exhibit different biological properties compared with first-generation vectors in vitro and in vivo. *J of Virol*. 70(12):8944-60.
- Linne T; Jornvall H y Philipson L. 1977. Purification and characterization of the phosphorylated DNA-binding protein from adenovirus-type-2-infected cells. *Euro J of Biochem*. 76(2):481-90.
- Lippe R y Graham FL. 1989. Adenoviruses with nonidentical terminal sequences are viable. *J of Virol*. 63(12):5133-41.
- Logan J y Shenk T. 1986. In vivo identification of sequence elements required for normal function of the adenovirus major late transcriptional control region. *Nucleic Acids Res*. 14(15):6327-35.
- Lu JC. 1997. The initiator element of the adenovirus major late promoter has an important role in transcription initiation in vivo. *J Virol*. 71(1):102-9.
- Luftig RB y Weihing RR. 1975. Adenovirus binds to rat brain microtubules in vitro. *J of Virol*. 16(3):696-706.
- Lutz P y Keding C. 1996. Properties of the adenovirus IVa2 gene product, an effector of late-phase-dependent activation of the major late promoter. *J of Virol*. 70(3):1396-405.
- Margolskee RF; Kavathas P y Berg P. 1988. Epstein-Barr virus shuttle vector for stable episomal replication of cDNA expression libraries in human cells. *Mol Cell Biol*. 8(7):2837-47.
- Massie B; Couture F; Lamoureux L; Mosser DD; Guilbault C; Jolicoeur P; Belanger F y Langelier Y. 1998. Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J of Virol*. 72(3):2289-96.
- Mathias P; Wickham T; Moore M y Nemerow G. 1994. Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J of Virol*. 68(10):6811-4.

- Matsumoto K; Nagata K; Ui M y Hanaoka F. 1993. Template activating factor I, a novel host factor required to stimulate the adenovirus core DNA replication. *J of Biol Chem.* 268(14):10582-7.
- Matsumoto K; okuwaki M; Kawase H; Handa H; Hanaoka F y Nagata K. 1995. Stimulation of DNA transcription by the replication factor from the adenovirus genome in a chromatin-like structure. *J of Biol Chem.* 270(16):9645-50.
- Matsuo T; Wold WS; Hashimoto S; Rankin A; Symington J y Green M. 1982. Polypeptides encoded by transforming region E 1b of human adenovirus 2: immunoprecipitation from transformed and infected cells and cell-free translation of E 1b-specific mRNA. *Virology.* 118(2):456-65.
- Matsushita T; Ellinger C; Podsakoff G; Villarreal L; Kurtzman G; Iwaki Y y Colosi P. 1998. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Therapy.* 5(7):938-45.
- McGlade CJ; Tremblay ML y Branton PE. 1989. Mapping of a phosphorylation site in the 176R (19 kDa) early region 1B protein of human adenovirus type 5. *Virology.* 168(1):119-27.
- McGrory WJ; Bautista DS y Graham FL. 1988. A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology.* 163(2):614-7.
- McLaughlin SK; Collis P; Hermonat PL y Muzyczka N. 1988. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J of Virol.* 62(6):1963-73.
- Mondesert G; Tribouley C y Keding C. 1987. Identification of a novel downstream binding protein implicated in late-phase-specific activation of the adenovirus major late promoter. *J of Virol.* 64(8):1963-75
- Mittereder N; March KL y Trapnell BC. 1996. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nat Med. J of Virol.* 70:7498- 7509.
- Morsy MA; Gu M; Motzel S; Zhao J; Lin J; Su Q; Allen H; Franlin L; Parks RJ; Graham FL. 1998. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 95(14):7866-71.
- Nagata K; Guggenheimer RA; Enomoto T; Lichy JH y Hurwitz J. 1982. Adenovirus DNA replication in vitro: identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 79(21):6438-42.
- Nagata K; Guggenheimer RA y Hurwitz J. 1983. Adenovirus DNA replication in vitro: synthesis of full-length DNA with purified proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 80(14):4266-70.
- Nagata K; Guggenheimer RA y Hurwitz J. 1983. Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 80(20):6177-81.
- Nevins JR. 1982. Adenovirus gene expression: control at multiple steps of mRNA biogenesis. *Cell.* 28(1):1-2.
- Nevins JR. 1981. Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. *Cell.* 26(2 Pt 2):213-20.

- Nevins JR y Wilson MC. 1981. Regulation of adenovirus-2 gene expression at the level of transcriptional termination and RNA processing. *Nature*. 290(5802):113-8.
- Nevins JR y Winkler JJ. 1980. Regulation of early adenovirus transcription: a protein product of early region 2 specifically represses region 4 transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 77(4):1893-7.
- Norrby E y Wadell G. 1972. The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. VI. Further characterization of antigenic sites available at the surface of virions. *Virology*. 48(3):757-65.
- Norrby, E. 1969. The structural and functional diversity of Adenovirus capsid components. *J Gen Virol*. 5(2):221-36.
- Nyberg-Hofmann C, Shabram P, Li W, Giroux D y Aguilar-Cordova E. 1997. Evaluation and concentration of Bioactivity of Adenovirus Vectors for Gene Therapy. *Nat Med*. 5(8): 955-7.
- Oliner JD; Kinzler KW y Vogelstein B. 1993. In vivo cloning of PCR products in E. coli. *Nucleic Acids Res*. 21(22):5192-7.
- Pear WS; Nolan GP; Scott ML y Baltimore D. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 90(18):8392-6.
- Pearson GD y Hanawalt PC. 1971. Isolation of DNA replication complexes from uninfected and adenovirus-infected HeLa cells. *J of Mol Biol*. 62(1):65-80.
- Philipson L; Lonberg-Holm K y Pettersson U. 1968. Virus-receptor interaction in an adenovirus system. *J of Virol*. 2(10):1064-75.
- Pincus S; Robertson W y Rekosh D. 1981. Characterization of the effect of aphidicolin on adenovirus DNA replication: evidence in support of a protein primer model of initiation. *Nucleic Acids Res*. 9(19):4919-38.
- Pruijn GJ; van Driel W y van der Vliet PC. 1986. Nuclear factor III, a novel sequence-specific DNA-binding protein from HeLa cells stimulating adenovirus DNA replication. *Nature*. 322(6080):656-9.
- Rawlins DR; Rosenfeld PJ; Wides RJ; Challberg MD y Kelly TJ Jr. 1984. Structure and function of the adenovirus origin of replication. *Cell*. 37(1):309-19.
- Reach M; Babiss LE y Young CS. 1990. The upstream factor-binding site is not essential for activation of transcription from the adenovirus major late promoter. *J of Virol*. 64(12):5851-60.
- Reach M; Xu LX y Young CS. 1991. Transcription from the adenovirus major late promoter uses redundant activating elements. *Embo Journal*. 10(11):3439-46.
- Reddy G; Jwang B; Rao BJ y Radding CM. 1994. Joints made by RecA protein in the interior of linear duplex DNA: effects of single-stranded ends, length of homology, and dynamic state. *Biochemistry*. 33(38):11486-92.
- Rekosh DM; Russell WC; Bellet AJ y Robinson AJ. 1977. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell*. 11(2):283-95.
- Ricciardi RP; Jones RL; Cepko CL; Sharp PA y Roberts BE. 1981. Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic polypeptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 78(10):6121-5.

- Robinson AJ; Younghusband HB y Bellett AJ. 1973. A circular DNA-protein complex from adenoviruses. *Virology*. 56(1):54-69.
- Rosenfeld PJ; o'Neill EA; Wides RJ y Kelly TJ. 1987. Sequence-specific interactions between cellular DNA-binding proteins and the adenovirus origin of DNA replication. *Mol Cell Biol*. 7(2):875-86.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrot, RH y Ward, TG. 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human Adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol Med*. 84:570-573.
- Ruben M; Bacchetti S y Graham F. 1983. Covalently closed circles of adenovirus 5 DNA. *Nature*. 301(5896):172-4.
- Sambrook J. Maniatis T y Fritsch EF. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor University Press: pp 1.74 - 181.
- Sarnow P; Hearing P; Anderson CW; Reich N y Levine AJ. 1982. Identification and characterization of an immunologically conserved adenovirus early region 11,000 Mr protein and its association with the nuclear matrix. *J of Mol Biol*. 162(3):565-83.
- Schaack J; Guo X y Langer SJ. 1996. Characterization of a replication-incompetent adenovirus type 5 mutant deleted for the preterminal protein gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 93(25):14686-91.
- Schaack J; Ho WY; Freimuth P y Shenk T. 1990. Adenovirus terminal protein mediates both nuclear matrix association and efficient transcription of adenovirus DNA. *Genes and Devel*. 4(7):1197-208.
- Shaw AR y Ziff EB. 1982. Selective inhibition of adenovirus type 2 early region II and III transcription by an anisomycin block of protein synthesis. *Mol Cell Biol*. 2(7):789-9.
- Shaw AR y Ziff EB. 1980. Transcripts from the adenovirus-2 major late promoter yield a single early family of 3' coterminal mRNAs and five late families. *Cell*. 22(3):905-16.
- Shenk TE; Rhodes C; Rigby PW y Berg P. 1975. Biochemical method for mapping mutational alterations in DNA with S1 nuclease: the location of deletions and temperature-sensitive mutations in simian virus 40. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 72(3):989-93.
- Shih MF; Arsenakis M; Tiollais P y Roizman B. 1984. Expression of hepatitis B virus S gene by herpes simplex virus type 1 vectors carrying alpha- and beta-regulated gene chimeras. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 81(18):5867-70.
- Shortle D; Koshland D; Weinstock GM y Botstein D. 1980. Segment-directed mutagenesis: construction in vitro of point mutations limited to a small predetermined region of a circular DNA molecule. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 77(9):5375-9.
- Smart JE y Stillman BW. 1982. Adenovirus terminal protein precursor. Partial amino acid sequence and the site of covalent linkage to virus DNA. *J of Biol Chem*. 257(22):13499-506.
- Soneoka Y; Cannon PM; Ramsdale EE; Griffiths JC; Romano G; Kingsman SM y Kingsman AJ. 1995. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res*. 23(4):628-33.

- Stary A; James MR y Sarasin A. 1989. High recombination rate of an Epstein-Barr virus-simian virus 40 hybrid shuttle vector in human cells. *J of Virol.* 63(9):3837-43.
- Stillman BW; Lewis JB; Chow LT; Mathews MB y Smart JE. 1981. Identification of the gene and mRNA for the adenovirus terminal protein precursor. *Cell.* 23(2):497-508.
- Thomas GP y Mathews MB. 1980. DNA replication and the early to late transition in adenovirus infection. *Cell.* 22(2 Pt 2):523-33.
- Tomko RP; Xu R y Philipson L. 1997. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 94(7):3352-6.
- Tooze J. 1981. DNA Tumor viruses, 2nded. Cold Spring Harbor, New York:Cold Spring Harbor Laboratory. 943-1054.
- Varga MJ; Weibull C y Everitt E. 1991. Infectious entry pathway of adenovirus type 2. *J of Virol.* 65(11):6061-70.
- Vliet PC van der y Sussenbach JS. 1972. The mechanism of adenovirus-DNA synthesis in isolated nuclei. *Euro J of Bioch.* 30(3):584-92.
- Wang RF y Kushner SR.1991.Construction of versatile low-copy number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli.* *Gene.* 100: 195-199.
- Wang, Q, *et al.* 1997. Persistent transgene expression in mouse liver following in vivo gene transfer with a delta E1/delta E4 adenovirus vector. *Gene Therapy.* 4(5):393-400.
- Weatherbee JA; Luftig RB y Weihing RR. 1977. Binding of adenovirus to microtubules. II. Depletion of high-molecular-weight microtubule-associated protein content reduces specificity of in vitro binding. *J of Virol.* 21(2):732-42.
- White E y Stillman B. 1987. Expression of adenovirus E1B mutant phenotypes is dependent on the host cell and on synthesis of E1A proteins. *J of Virol.* 61(2):426-35.
- Wickham TJ; Filardo EJ; Cheresch DA y Nemerow GR. 1994. Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J Cell Biol.* 127(1):257-64.
- Wiegand RC; Beattie KL; Holloman WK y Radding CM. 1977. Uptake of homologous single-stranded fragments by superhelical DNA. III. The product and its enzymic conversion to a recombinant molecule. *J Mol Biol.* 116(4):805-24.
- Wilson MC; Fraser NW y Darnell JE Jr. 1979. Mapping of RNA initiation sites by high doses of uv irradiation: evidence for three independent promoters within the left 11% of the Ad-2 genome. *Virology.* Apr 15, 94(1):175-84.
- Wold MS; Li JJ y Kelly TJ. 1987. Initiation of simian virus 40 DNA replication in vitro: large-tumor-antigen- and origin-dependent unwinding of the template. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 84(11):3643-7.
- Wolff JA; Malone RW; Williams P; Chong W; Acsadi G; Jani A y Felgner PL. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 247(4949 Pt 1):1465-8.

- Wolfson, J y Dressler D. 1972. Adenovirus-2 DNA contains an inverted terminal repetition. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 69(10):3054-7.
- Yang NS; Burkholder J; Roberts B; Martinell B y McCabe D. 1990. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 87(24):9568-72.
- Yang NS y Sun WH. 1995. Gene gun and other non-viral approaches for cancer gene therapy. *Nat Med* .1(5):481-3.
- Yang Y; Ertl HC y Wilson JM. 1994. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity*. 1(5):433-42.
- Yang Y; Nunes FA; Berencsi K; Furth EE; Gonczol E y Wilson JM. 1994. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 91(10):4407-11.
- Yang Y; Nunes FA; Berencsi K; Gonczol E; Engelhardt JF y Wilson JM. 1994. Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat Genet*. 7(3):362-9.
- Yoshida K; Venkatesh L; Kuppaswamy M y Chinnadurai G. 1987. Adenovirus transforming 19-kD T antigen has an enhancer-dependent trans-activation function and relieves enhancer repression mediated by viral and cellular genes. *Genes Devel*. 1(7):645-58.
- Zhang WW; Fang X; Branch CD; Mazur W; French BA y Roth JA. 1993. Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis. *Biotechniques*. 15(5):868-72.
- Zhang Y, Buchholz F, Muyrers PPJ y Stewart F.1998. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet*. 20:123-128.
- Zhou, H y Beaudet, A. 2000. A New Vector System with inducible E2a cell line for production of higher titer and Safer Adenoiral vectors. *Virology* . 275:348-357.