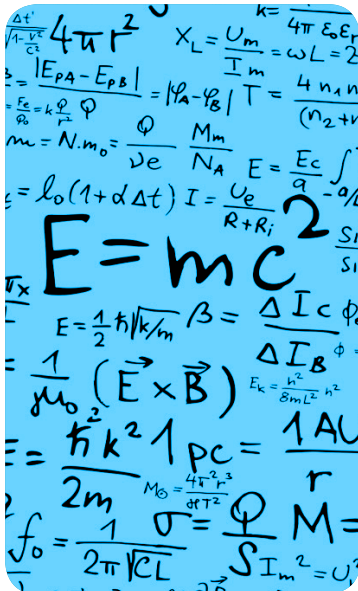




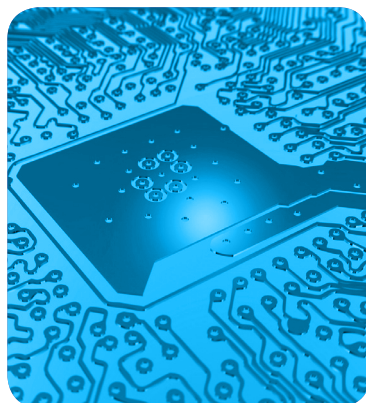
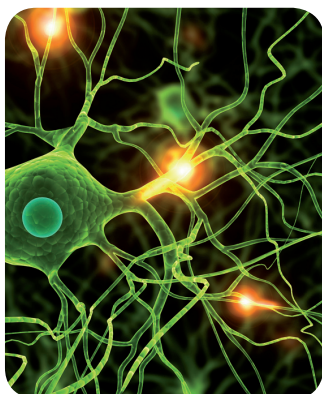
MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias /11-12

Máster en
Microbiología



excelencia Campus Internacional
UAM
CSIC+



**Efectos de la
modulación de
IE180 sobre la repli-
cación de PRV**
*Aurelio Morales
Guerrero*

Índice de contenidos

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. Herpesvirus	2
1.2. Terapia Génica	4
1.3. Sistemas de Regulación inducibles.....	6
1.4. BACS y Herpesvirus.....	9
1.5. PRV pBecker2 y BT80GF.....	10
2. Objetivos.....	11
3. Materiales y Métodos	11
3.1. Células y virus utilizados	11
3.2. Empaquetamiento y ensayo con lentivectores.....	12
3.3. Transfección transitoria con liposomas.....	13
3.4. Ensayo de dilución por punto final.....	13
3.5. Ensayo de placas de lisis	13
3.6. Inmunocitoquímica	14
3.7. Western blot	14
4. Resultados y discusión	15
4.1. La transfección transitoria de tet-reguladores no permite la modulación de PRV BT80GF	15
4.2. Una regulación simple por sistema tet mediante transactivador y transrepresor permite modular la replicación lítica de PRV BT80GF	17
4.3. La replicación viral se correlaciona con los niveles de proteína IE180.....	18
4.4. Una regulación simultánea doble (transactivador y transrepresor) por sistema tet no permite la represión de la replicación lítica	21
4.5. Trabajo actual: Regulación combinatoria con un segundo ligando	23
5. Conclusiones.....	26
6. Referencias bibliográficas.....	27

Resumen

Los alphaherpesvirus son virus con replicación lítica que al infectar células del sistema nervioso establecen una latencia prolongada. Esta capacidad ha atraído numerosos estudios en el campo de la terapia génica relacionados con la utilización de herpesvirus para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso mediante la creación de vectores oncolíticos o de vectores neurotrópicos defectivos en replicación. Por ello, es necesario el conocimiento de los mecanismos moleculares que promueven la replicación lítica del virus. De entre los herpesvirus, el virus de la pseudorrabia (PRV) es un buen candidato para ser utilizado como vector viral puesto que, además de aportar ciertas ventajas relacionadas con su bioseguridad, se sabe que su replicación lítica está estrictamente regulada por un solo gen inmediatamente temprano: IE180. Así, en el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización del mutante PRV BT80GF, previamente generado por el grupo de Enrique Tabarés, en el que el promotor de IE180 se encuentra reemplazado por un promotor de respuesta a tetraciclina. En el estudio se evaluó el efecto que tiene sobre la replicación lítica del virus la manipulación de los niveles de expresión del gen inmediatamente temprano IE180 comparando el virus *wild type* con el mutante PRV BT80GF. Se constató que la replicación del virus se encuentra estrechamente ligada a la producción de la proteína IE180 y que, mediante el sistema de regulación inducible por tetraciclina se puede alcanzar, en el estado activado, una producción viral similar a la obtenida con el *wild type*, consiguiendo simular de una manera artificial el comportamiento del virus en la naturaleza. Por otro lado, en el estado reprimido, aunque se consigue disminuir la replicación lítica del virus mutante, no es posible obtener un silenciamiento total, debido seguramente a un ligero escape de proteína IE180. Por este motivo, se plantea la posibilidad de utilizar un sistema de regulación doble que combine la regulación a nivel de transcripción por el promotor de respuesta a tetraciclina y una regulación a nivel de proteína por el sistema de degradación mediante dominio de desestabilización (DD).

1. Introducción

1.1. Herpesvirus

Los virus de la familia *Herpesviridae*, llamados comúnmente herpesvirus, se caracterizan por ser virus de ADN bicatenario y poseer un genoma de gran tamaño (entre 125 y 250 kilobases) que se mantiene en forma lineal mientras se encuentra dentro del virión pero que circulariza una vez dentro de la célula, en la que pueden mantener un estado de latencia prolongado en función del tipo celular infectado y de las condiciones fisiológicas circundantes (Warden y col., 2010). Asimismo, todos los viriones de herpesvirus poseen una estructura similar con cápside, tegumento y envuelta lipídica (Fig. 1a) (Pomeranz y col., 2005).

Dentro de la familia *Herpesviridae* encontramos a su vez tres subfamilias: *Alpha*-, *Beta*- y *Gammaherpesvirinae*. Éstas difieren en el tipo celular en el que establecen la latencia y en la duración de sus ciclos productivos de replicación (Pomeranz y col., 2005)

Los miembros de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* se caracterizan por su capacidad de replicar en un amplio rango de tipos celulares y por presentar un ciclo de replicación muy corto, produciendo partículas virales en cuestión de horas y desencadenando finalmente la lisis celular. Estos virus son propensos a infectar células neuronales, principalmente de los ganglios sensoriales, en los que establecen una latencia duradera permaneciendo el virus en forma episomal. Este estado latente se mantendrá hasta que algún estímulo externo produzca la activación del virus y la re-entrada al ciclo replicativo (Whitley, 2011).

Cuando estos virus producen una infección efectiva se puede subdividir su ciclo de replicación de manera temporal en tres fases de regulación: inmediatamente temprana (IE), temprana (E) y tardía (L). La fase temprana, en la que se produce la replicación del ADN viral, es dependiente de la expresión de las proteínas de la fase inmediatamente temprana. En la fase tardía se codificarán las proteínas que formarán parte del virión (Muñoz y col., 2010).

La subfamilia *Alphaherpesvirinae* incluye los virus del herpes simple tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2), el virus varicela-zoster (VZV), el virus del herpes equino (EHV-1) o el virus de la pseudorrabia (PRV) (Muñoz y col., 2010), sobre el que trata este estudio.

El virus de la pseudorrabia (PRV) es mundialmente conocido por ser el agente etiológico de la enfermedad de Aujeszky, que provoca importantes pérdidas económicas en la industria porcina (Pomeranz col., 2005). Si bien el cerdo es el hospedador natural del virus, en el que permanece como reservorio al infectar neuronas y mantener un

estado latente, principalmente en el ganglio trigémino, PRV es capaz, una vez que se ha reactivado, de propagarse e infectar a otro tipo de animales como vacas, cabras, ovejas, perros o conejos, en los que suele ser letal poco tiempo después del contagio (Ono y col., 1998).

Este virus es también muy conocido por haber sido utilizado, junto con HSV-1, como trazador “vivo” natural para identificar las diferentes rutas sinápticas debido a su predisposición a infectar células del sistema nervioso (Boldogkői y col., 2004).

En cuanto a sus características, PRV posee un genoma lineal de unas 140 kilobases consistente en dos regiones únicas, una larga (UL) y una corta (US), flanqueada esta última por 2 secuencias repetidas invertidas conocidas como repetición interna (IR) y repetición terminal (TR) (Fig. 1b) (Prieto y col., 2002). Al producirse recombinación entre las secuencias repetidas se pueden producir dos isómeros genómicos que poseen la región Us en una orientación opuesta, siendo ambos isómeros igualmente infecciosos (Pomeranz y col., 2005).

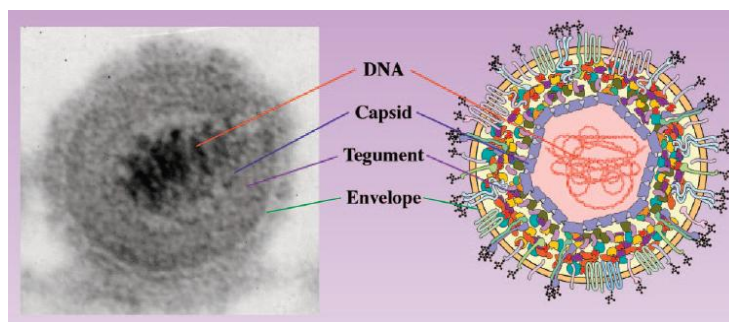
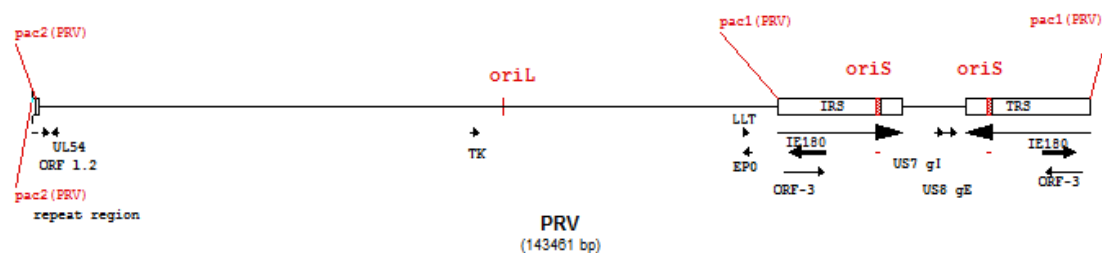


Figura 1. Virus de la pseudorabia.
a) Estructura del virión (Pomeranz y col., 2005)

b) Mapa genómico con secuencias relevantes resaltadas (Imagen de GCK, fuente: F.Lim)



Como se ha comentado, el ciclo reproductivo de herpesvirus se divide en 3 fases: IE, E y L. En PRV existe únicamente un gen inmediatamente temprano, que se encuentra en doble copia debido a su localización en las secuencias repetidas invertidas y cuyo producto, IE180, es esencial para la replicación del virus. Se ha demostrado que esta proteína de 180 kDa es un homólogo estructural de proteínas de genes IE de otros herpesvirus, como ICP4 de HSV-1 (Ono y col., 1998). Asimismo, se han mapeado los tres orígenes de replicación (ori L y dos copias de ori S) y las señales de

empaquetamiento, formadas por la unión de pac1 y pac2 durante la circularización del virus (Pomeranz y col., 2005).

1.2. Terapia Génica

La terapia génica se puede definir como una estrategia biomédica para el tratamiento de enfermedades a través de la modificación en la expresión de determinados genes o la corrección de genes anómalos. Por lo que en el tratamiento de enfermedades de origen genético, *a priori*, se podrían aunar tres características considerables a favor de este tipo de terapia: elevada especificidad en el tratamiento, posibilidad de permanencia de la terapia de por vida e incluso eliminación definitiva de la causa de la enfermedad.

Sin embargo, la terapia génica presenta asimismo una serie de desventajas cuya búsqueda de subsanación ha limitado el avance de este tipo de biotecnología, como la corta duración de la expresión de los transgenes por silenciamiento dentro del individuo, reacciones de la respuesta inmune, problemas en la construcción de los vectores virales o la dificultad en el tratamiento de desórdenes multigénicos.

El éxito en un tratamiento es totalmente dependiente del desarrollo de los vectores de distribución utilizados. Los sistemas de distribución se dividen entre no virales, como los liposomas o la electroporación; y los vectores virales (Toniatti y col., 2004). Los primeros destacan por su alto nivel de seguridad, pero, aunque suelen funcionar en cultivos *in vitro*, en tratamientos *in vivo* son bastante ineficientes (Thomas y col., 2003).

Los vectores virales, por el contrario, poseen mecanismos de penetración altamente específicos y eficientes ya que derivan de organismos que han evolucionado con el objetivo de infectar y replicar en células del organismo hospedador (Thomas y col., 2003). Esto es, asimismo, su mayor crítica, en relación a su posible peligrosidad al utilizarse en humanos. Por eso, actualmente se utilizan vectores defectivos en replicación obtenidos mediante la delección de regiones codificantes esenciales que se introducen en una línea celular estable conocida como empaquetadora, y que se usa para la replicación del vector recombinante *in vitro* (Kay y col., 2001).

Hoy en día, se utilizan una gran cantidad de vectores virales obtenidos mediante modificaciones en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados o lentivirus. De entre todos ellos, los herpesvirus presentan una serie de ventajas, como la posibilidad de incorporar una gran cantidad de ADN exógeno, su facilidad para infectar y replicar en la mayoría de líneas celulares o, la más importante, su capacidad para infectar tanto células replicativas como no replicativas, con especial interés en las células del sistema

nervioso en las que establece un estado de latencia persistente sin integrarse en el genoma celular (Glorioso y Fink, 2004; Watanabe, 2010).

Dentro de los herpesvirus, HSV-1 y PRV destacan por la gran cantidad de estudios que han generado, tanto referentes a la propia caracterización de los virus y a los posibles mecanismos que llevan a su latencia en neuronas (Ono y col., 1998; Pomeranz y col., 2005), la creación y experimentación con posibles vacunas efectivas (Pomeranz y col., 2005; Nesburn y col., 1999), su utilización como trazadores “vivos” naturales para identificar las rutas sinápticas (Boldogkői y col., 2004), y por supuesto, su uso como vectores virales para la terapia génica (Prieto y col., 2002; Muñoz y col., 2011)

En lo referente a los estudios de herpesvirus como vectores virales, hoy en día bastante focalizados en HSV-1, se encuentran principalmente acotados a dos campos terapéuticos:

- el tratamiento de gliomas malignos, mediante la inyección en el cerebro de vectores oncolíticos capaces de replicar y lisar las células tumorales en división de manera natural sin dañar el tejido normal, o de vectores capaces de inducir citotoxicidad (Glorioso y Fink, 2004). Así, se pretenden regular uno o varios genes esenciales que funcionen como interruptores para la replicación, buscando obtener una expresión máxima en las células cancerosas y un silenciamiento total en las demás. Para ello, una de las estrategias más utilizadas es la introducción de un promotor de respuesta a tumores que regule dicho gen (Nettelbeck y col., 2000; Foka y col., 2010) y que se encuentre a su vez bajo el control de un sistema de regulación inducible, aumentando el nivel de bioseguridad.
- el tratamiento de otras enfermedades del sistema nervioso, como las neuropatías periféricas, dolor crónico o la enfermedad de Parkinson (Glorioso y Fink, 2004). En ellos se utilizan herpesvirus no replicativos producidos mediante sistemas de empaquetamiento. Para ello, es necesario conocer el gen cuyo silenciamiento inhiba la replicación viral y regularlo mediante un sistema de regulación inducible o bien delecionarlo e introducirlo en la línea celular estable, la cual en ambos casos podrá portar la señal de empaquetamiento (Kay y col., 2001).

Por razones de bioseguridad no se habían comenzado los ensayos clínicos en humanos hasta que, en 2011, se realizó el primer ensayo de fase 1 con pacientes con dolor focal intratable causado por un estadio avanzado de cáncer. Para el tratamiento se insertó el gen de la preproencefalina humana (PENK) en vectores de HSV defectivos en replicación. Los resultados fueron altamente satisfactorios, no sólo por el funcionamiento de la terapia sino también a nivel de bioseguridad, al no producirse en los pacientes ningún efecto adverso debido al vector (Fink y col., 2011).

En lo que respecta al virus de la pseudorrabia (PRV), presenta ciertas características diferenciales con respecto a otros herpesvirus (más concretamente con HSV-1) que le colocan como un buen candidato para su uso en terapia génica: si bien PRV es altamente patogénico en algunos animales, en primates superiores y humanos no tiene este efecto, permitiendo una manipulación y utilización seguras; puesto que PRV no infecta al ser humano no existe una inmunidad pre-existente que pudiese neutralizar los vectores; además, es capaz de infectar células humanas tanto *in vitro* como *in vivo* sin riesgo de que se produzca una recombinación con un PRV latente (Prieto y col., 2002).

Sin embargo, la principal ventaja de PRV radica en que, mientras que HSV posee 5 genes inmediatamente tempranos codificando tres de ellos proteínas que actúan como transactivadores (ICP0, ICP27 e ICP4), en PRV encontramos exclusivamente un gen de este tipo, que codifica el transactivador IE180 (Boldogkői y col., 2004). Es por esto que si se consigue una prueba de concepto que demuestre que IE180 funciona como primer interruptor de la replicación lítica del virus, sería posible la utilización de PRV en terapia génica para la creación de vectores oncolíticos replicativos y vectores no replicativos. Estos vectores podrían estar muy bien caracterizados al basarse en la modificación de un único gen y estar regulados de manera estricta por sistemas de regulación inducibles, contando además con las características adicionales de bioseguridad antes mencionados.

La creación de un mutante de PRV estrictamente regulado permitiría también el mantenimiento del vector viral en una línea celular estable, sin la replicación y la consiguiente lisis celular hasta el momento de la activación del sistema de regulación inducible para la producción de viriones, pudiéndose detener la misma en el momento deseado. Por último, una buena regulación permitiría la obtención por primera vez de una latencia artificial con herpesvirus en líneas celulares estables *in vitro*, por lo que se podrían estudiar los posibles efectos secundarios que genera una latencia prolongada sobre la célula hospedadora.

1.3. Sistemas de Regulación inducibles

Como ya se ha comentado, la utilización de los vectores virales en humanos tiene que venir precedida de un control muy estricto en la regulación y bioseguridad de los mismos. Por eso, cada día toman más fuerza los sistemas de regulación inducibles, que permiten controlar de manera estricta el momento, lugar y cantidad de expresión de expresión del vector y de los genes que porta (Toniatti y col., 2004).

Un sistema inducible ideal constaría de tres puntos básicos: alta especificidad, por lo que no debería responder a activadores endógenos o interferir con las rutas de

regulación celular; eficiencia, debería evidenciar niveles basales muy bajos consiguiendo un elevado nivel de expresión tras la inducción; ser dependiente de la dosis, de esta manera se consigue modular los niveles de expresión del gen de interés (Rossi y Blau, 1998).

En la actualidad los más utilizados son aquellos que usan como inductores, o bien compuestos hormonales, como el sistema de respuesta a progesterona o el sistema de ecdysona (Goverdhana y col., 2005); o bien aquellos que utilizan antibióticos, como el sistema inducible de FK506/rapamicina (Agha-Mohammadi y Lotze, 2000) o, el más ampliamente utilizado en la actualidad: el sistema de regulación por tetraciclina (Goverdhana y col., 2005).

El sistema inducible de tetraciclina permite que la transcripción de un gen se active o se silencie de manera reversible en función de la presencia/ausencia de tetraciclina o alguno de sus derivados (como la doxiciclina) (Goverdhana y col., 2005). Este sistema es totalmente procariota, por lo que resulta muy específico al ser usado en organismos eucariotas, eliminando posible efectos pleiotrópicos o unión de ligandos endógenos (Rossi y Blau, 1998). Asimismo, se eliminan pasos intermediarios, puesto que el propio inductor se une al transactivador dirigiendo la expresión o el silenciamiento del gen. (Rossi y Blau, 1998). Dicho inductor (tetraciclina o doxiciclina) está bien caracterizado puesto que se ha utilizado como antibiótico durante décadas, se sabe que no es tóxico a altas concentraciones y se metaboliza de manera muy rápida en el organismo, por lo que es ideal para una expresión a largo plazo (Goverdhana y col., 2005).

El sistema original se basa en el operón de resistencia a tetraciclina de *Escherichia coli* (Agha-Mohammadi y Lotze, 2000). La resistencia se produce gracias a la expresión de la proteína TetA que, al quedar embebida en la membrana, genera el antiporte de tetraciclina fuera de la célula. Los genes que codifican TetA están regulados a nivel de transcripción por la proteína de unión a ADN Tet represora (TetR), la cual, cuando no hay tetraciclina en el medio, forma dímeros que se unen a las secuencias tet operadoras (*tetO*) disminuyendo la transcripción del propio gen *tetR* y de los genes de resistencia *tetA*. Por el contrario, la presencia de tetraciclina conlleva la unión de ésta a las proteínas TetR generando un cambio conformacional que provoca la separación de los dímeros de las secuencias *tetO* con la consiguiente expresión de las proteínas TetR y TetA y una rápida expulsión de tetraciclina de la bacteria (Berens y Hillen, 2003).

Este sistema se encuentra estrechamente regulado ya que una sobreexpresión de la proteína integral de membrana es letal para la bacteria. El sistema artificial se aprovecha, por tanto, de la elevada especificidad de la proteína TetR por la secuencia *tetO* y de su alta sensibilidad a tetraciclina (Agha-Mohammadi y Lotze, 2000).

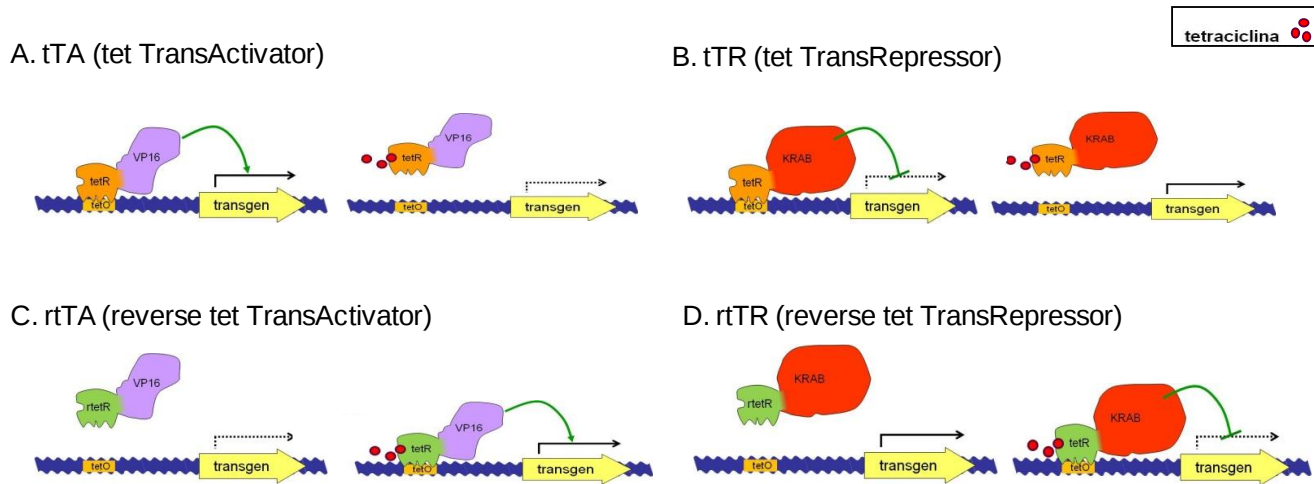


Figura 2. Ilustración del sistema de regulación de la expresión génica dependiente de tetraciclina. a) activación por transactivador sin tetraciclina (tet-off). b) silenciamiento por represor sin tetraciclina (tet-on). c) activación transactivador inverso con tetraciclina (tet-on). d) silenciamiento por represor inverso con tetraciclina (tet-off).

Para el funcionamiento del sistema de manera artificial se han de insertar en el genoma siete secuencias *tetO* en tándem, separadas por espaciadores delante de la secuencia del codón de iniciación del transgén de interés y, a continuación, el promotor mínimo del citomegalovirus (CMV) (Goverdhana y col., 2005), componiendo ambos el llamado elemento de respuesta a tetraciclina (TRE). Esto se combina con la introducción de un gen que codifica un transactivador condicional (tTA), generado al fusionar la proteína represora TetR con un potente activador transcripcional del virus HSV-1, VP-16 (Rossi y Blau, 1998), que posee una elevada actividad ubicua en eucariotas (Agha-Mohammadi y Lotze, 2000). De esta manera, en ausencia de tetraciclina se produce la unión de tTA a TRE produciéndose la transactivación del transgén gracias a VP16, mientras que la adición de tetraciclina promueve un cambio conformacional en TetR acompañado de la pérdida de afinidad por *tetO* silenciándose, por tanto, la expresión del transgén (Rossi y Blau, 1998).

Si bien se ha demostrado la eficacia del factor de transcripción original (tTA), una de sus mayores limitaciones es que la tetraciclina inhibe tTA en vez de activarlo. Este tipo de sistemas se conoce como Tet-off y obliga a añadir la droga de una manera continuada para mantener un gen silenciado (Corbel y Rossi, 2002) por lo que podría acarrear tolerancia al antibiótico o citotoxicidad. Para solventar estos problemas se creó

mediante mutaciones una proteína TetR reversa que responde de manera inversa a la tetraciclina. Así pues, el transactivador rtTA, que forma parte de los llamados sistemas Tet-off, provoca la transcripción del transgén al adicionar tetraciclina al medio, permaneciendo inactivo en ausencia de la misma (Berens y Hillen, 2003).

Ahora bien, en el caso de querer trabajar con un gen codificante de una proteína tóxica o que pueda causar un descenso en el crecimiento celular es necesario que se elimine totalmente la expresión basal que pueda producirse en el promotor inducible (Rossi y Blau, 1998). Esto condujo a la creación de un transrepresor mediante la fusión de TetR o rTetR con un algún tipo de silenciador, como la proteína KRAB, denominándose respectivamente tTR o rtTR (Freundlieb y col., 1999).

Así pues, para tener un control mucho más preciso de la expresión de un transgén, en la actualidad se combinan los sistemas de activación y silenciamiento dando lugar a sistemas dobles Tet-on (rtTA y tTR), que producen expresión del transgén en presencia de tetraciclina, y Tet-off (tTA y rtTR), activos en ausencia de la droga (Freundlieb y col., 1999; Corbel y Rossi, 2002).

1.4. BACS y Herpesvirus

Los cromosomas artificiales bacterianos o BACs son vectores basados en el plásmido factor-F de *Escherichia coli* los cuales pueden transformarse en dicha bacteria mediante electroporación de una manera muy eficiente. Estos vectores se utilizan para clonar fragmentos de ADN de hasta 300 kb y, puesto que se trata de plásmidos de bajo número de copia, permanecen estables durante muchas generaciones (Monaco y Larin, 1994).

La invención de los BACs fue un punto de inflexión para el manejo de los herpesvirus como vectores virales en terapia génica ya que, al poseer un ADN de gran tamaño, no podían ser clonados en plásmidos o cósmidos individuales (Warden y col., 2010).

Para la creación de un BAC de herpesvirus hay que introducir en el genoma viral un origen de replicación bacteriano del plásmido factor-F así como los genes necesarios para que se produzca dicha replicación. También se suelen incluir genes para regular el número de copias del BAC por bacteria y un gen de selección, que generalmente suele ser un gen de resistencia a antibiótico. Por último, es habitual introducir en ambos extremos del BAC secuencias loxP que te permitan escindir la secuencia del BAC del virus recombinante (Warden y col., 2010).

Finalmente, para la recolección de viriones infectivos se transfecta el plásmido en un cultivo celular en el que se producirá la replicación y expresión de proteínas virales, obteniendo finalmente un virus funcional.

1.5. PRV pBecker2 y BT80GF

Puesto que la inclusión de los herpesvirus en un BAC permite realizar todo de tipo de modificaciones genéticas, la gran mayoría de estudios de terapia génica concernientes a estos virus usan este tipo de construcciones. En los experimentos con PRV, el más utilizado como *wild type* proviene del BAC pBecker2 creado por Smith y Enquist en el año 2000. Este plásmido, tras ser transfectado en células de mamíferos genera el virus vBecker2 que posee un genoma idéntico al del virus salvaje (Smith y Enquist, 2000).

A partir de vBecker2, el grupo de Enrique Tabarés creó en 2011 sucesivos mutantes por recombinación homóloga y selección con antibióticos, delecionando primero la secuencia repetida invertida terminal (TR) y a continuación la secuencia repetida interna (IR), obteniendo finalmente el mutante en bacterias pBAC90 (Muñoz y col., 2011), en el que faltan ambas copias de IE180. Mediante cotransfección en células HeLa tet-off del pBAC90 y un plásmido con una copia de IE180 (de la TRS) bajo regulación del promotor de respuesta a tetraciclina se consiguió el rescate genómico por recombinación (únicos virus replicativos), obteniéndose el virus PRV BT90 (Muñoz y col., 2011).

En estudios posteriores (todavía sin publicar) el grupo de Enrique Tabarés utilizó el mismo procedimiento para obtener el mutante PRV BT80GF (fig. 3), en el que se centra el presente estudio. Este mutante tiene delecionada la TRS completa y posee el gen IE180 de la IRS bajo control del promotor de respuesta a tetraciclina. Asimismo, posee una secuencia de GFP (que permite el estudio de su ciclo de replicación) y tiene delecionadas una de las dos copias de pac1, pac2 y oriS

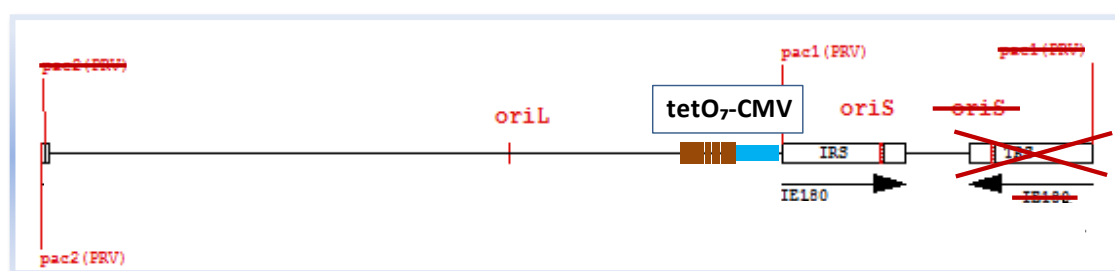


Figura 3. Esquema del genoma del mutante PRV BT80GF

La eliminación de una de las secuencias repetidas invertidas, y por tanto de una copia de IE180, responde a la finalidad de no tener que realizar por duplicado cada cambio en la secuencia genómica y de desechar la posibilidad de recombinación entre ellas y, por

tanto, la producción de isómeros, así como evitar que se produjese algún tipo de rescate por recombinación.

2. Objetivos

El objetivo científico principal del trabajo consiste en la manipulación de la expresión del único gen inmediatamente temprano del virus de la pseudorrabia, IE180, y la comprobación del efecto que ésta produce sobre la replicación lítica del virus.

Paralelamente, con el fin de utilizar este virus en terapia génica, se pretenden desarrollar unos objetivos tecnológicos consistentes en:

- evaluar si el virus mutante en el estado inducido es capaz de alcanzar los títulos obtenidos con el virus *wild type*.
- evaluar si, en el estado reprimido, el virus mutante ve silenciada su replicación.

3. Materiales y Métodos

3.1. Células y virus utilizados

Las células de riñón de mono verde africano (Vero) y sus líneas celulares modificadas: Vero-tTR-BI^R y Vero-rtTA/tTR, ambas creadas por Hena Khalique (Departamento de Biología Molecular, UAM), así como las células de riñón de embrión humano 293 (HEK 293) se crecieron en medio esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal al 10%.

Las células HeLa-tet off fueron proporcionadas por Enrique Tabarés (Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología, Facultad de Medicina, UAM) y para su crecimiento se acidificó el medio DMEM 10% con 0,35% HEPES p/v. Estas células poseen la secuencia del transactivador tTA-VP16 y un gen de resistencia al antibiótico G418 para su selección.

Las células Vero-tTR-BI^R se crearon por transfección en células Vero de un plásmido integrativo con las secuencias de tTR y con una resistencia a blasticidina, que permite su selección. Mientras que las células Vero-rtTA/tTR se originaron mediante la transfección de un plásmido epimosal con las secuencias rtTA-VP16, tTR-KRAB y la proteína EGFP, que permitió la selección de clones positivos por fluorescencia. Asimismo, el plásmido posee la secuencia del antígeno nuclear asociado de Epstein-Barr (EBNA-1), que confiere al plásmido episomal replicación a largo plazo en células de mamíferos y retención durante la segregación mitótica (Sena-Esteves y col., 2000).

La diferencia entre ambos clones utilizados (6 y 14) radica en los niveles de respuesta a doxiciclina, siendo más elevados en el clon 14 en el estado basal y en el activado. Los dos tipos de virus utilizados en el estudio (PRV pBecker2 y PRV BT80GF) fueron proporcionados por Enrique Tabarés.

3.2. Empaquetamiento y ensayo con lentivectores

Se sembraron las células empaquetadoras HEK 293T en sub-confluencia en placas p100. Se prepararon las mezclas de transfección con medio Opti-MEM bajo en suero (Invitrogen) diluyendo en 750µl del medio: 5µg del plásmido de uno de los 6 lentivectores a empaquetar (portando: tTA-VP16+GFP; rtTA-VP16; tTR-KRAB+GFP; rtTR-KRAB+GFP; tTR+BlastR; y el plásmido control con EGFP), 5µg del plásmido de empaquetamiento, 2µg del plásmido de pesudotipado de la proteína G de VSV y 24µl de PLUS Reagent (Invitrogen), un agente potenciador de las transfecciones mediadas por lípidos catiónicos mediante la formación de complejos con el ADN. Tras 20 minutos, se añadieron 750µl de Opti-MEM mezclados con 36µl de Lipofectamine Reagent (Invitrogen), un agente formador de los liposomas catiónicos que contendrán los plásmidos antes mencionados. Se dejó la mezcla de transfección durante 20 minutos para la formación de los complejos lipídicos tras lo cual se fue añadiendo a cada una de las placas de 293T. Pasadas 20 horas se cambió el medio por Opti-MEM+BSA 1%, el cual se mantuvo 24 horas hasta la recogida de los virus mediante filtración con una jeringuilla con filtro de “baja unión” de 0,45µm de poro.

Para calcular el título de los lentivectores empaquetados se sembraron células Vero a una densidad de 3×10^5 cels/pocillo en 4 multiplacas M6 (tantas como lentivectores con GFP empaquetados) y una placa p35. Tras 24 horas se quitó el medio de crecimiento de las M6 y se infectaron las placas con cada uno de los lentivectores utilizando volúmenes crecientes de virus: 0 (control), 1, 5, 10, 50 y 200µl, diluidos en medio DMEM 10% hasta un volumen final de 750µl, adicionándose otros 750µl de medio tras 5 horas. Asimismo, se levantaron las células de la placa p35 y se calculó con un hemocitómetro el número exacto de células en el momento de la infección. Las placas se dejaron 2 días en incubación para permitir la expresión de GFP y finalmente se levantaron las células y se lavaron con PBS 1X para medir el porcentaje de infección por citometría de flujo.

Para calcular el título viral de los dos lentivectores sin GFP se pensaba medir mediante qPCR el número total de partículas virales (infectivas y no infectivas) de los 6 tipos de lentivectores y extrapolar el número de partículas infectivas comparando estos datos con los de citometría de las lentivectores-GFP, pero debido a los bajos resultados de infección con citometría (ver Resultados) no se llevó a cabo el procedimiento.

3.3. Transfección transitoria con liposomas

Se realizó la transfección de los plásmidos con los tet-reguladores (los mismos que para los lentivectores) en placas p60 con células HEK 293 (10^6 cels/placa) de manera similar al proceso de empaquetamiento de los lentivectores (aunque sin adicionar plásmidos de empaquetamiento ni de pseudotipado): se diluyeron 4µg del plásmido y 8µl de PLUS en 250µl de Opti-MEM, y se mezclaron con 12µl de Lipofectamine diluidos en 250µl de Opti-MEM. Para cada uno de los plásmidos se realizó la transfección en dos placas p60: una con la presencia de doxyciclina (a concentración saturante) y otra sin el inductor. Tras 48 horas se calculó el número de células y se procedió a la infección de todas las placas con PRV BT80GF con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,03. Dos días después se recolectaron los virus producidos y se procedió a la titulación mediante ensayos de dilución por punto final en células HeLa tet-off.

3.4. Ensayo de dilución por punto final

Se sembraron 10^4 células/pocillo en placas M96 en medio DMEM 10% (titulación de la transfección transitoria) o en medio DMEM 10% +/- doxyciclina (titulación en regulación simple). Al día siguiente se realizaron diluciones seriadas de los virus stock diferenciadas en un orden de magnitud y se añadió cada dilución en una fila de la placa (10 repeticiones) dejando las 2 últimas columnas como controles. Se incubaron las placas durante 5-7 días, tras lo cual se identificaron los pocillos con un efecto citopático (CPE) positivo provocado por el virus con un microscopio Nikon Eclipse TS100. De esta manera, teniendo en cuenta los pocillos positivos dentro de cada dilución se calculó el título viral en pfu/ml mediante la fórmula basada en el método de Spearman-Kärber (Clontech Lab., Protocol PT3414-1).

3.5. Ensayo de placas de lisis

El día anterior a la infección se sembraron las diferentes líneas celulares a una densidad de 10^6 células/placa en p60 con 3ml DMEM+10% FCS y se trataron diferentes placas con doxyciclina 4µM en función de los experimentos a realizar. Se dejaron crecer a 37°C hasta el día siguiente, en el que se prepararon diluciones del stock de los virus para realizar la titulación. Tras retirar 2ml de medio, se infectaron las placas con las diluciones en 1ml de DMEM+2% FCS (y con doxyciclina en las placas correspondientes), permitiendo la adsorción del virus durante 90 minutos. Se retiró el medio y se procedió a la adición del medio semisólido de agar al 0,7% mezclado con DMEM +5 FCS. Tres días después de la infección se fijaron las muestras con 10% ácido acético + 5% metanol y se tiñeron con cristal violeta. Tras contar las placas de lisis se usaron los factores de dilución para calcular los títulos virales obtenidos en cada línea celular, expresados en pfu/ml (unidades formadoras de placa/ml). Para la

visualización se utilizaron una lupa Nikon SMZ1000 y un microscopio Nikon Eclipse TS100.

3.6. Inmunocitoquímica

Se siguió el mismo procedimiento que con el ensayo de placas de lisis hasta el paso de la fijación de las muestras, donde el protocolo cambia. En lugar de utilizar ácido acético, se fijaron las células con PFA al 4%. Se trataron con buffer de bloqueo (PBS 1X, 10% FCS, 2% Triton X-100) durante 1 h a t^a ambiente y, a continuación, se incubaron hasta el día siguiente a 4°C con anticuerpo 1^{ario} dirigido contra TetR (crecido en conejo, dil 1:3000) o contra la proteína gG de la cápside de PRV (crecido en conejo, dil 1:5000), según el experimento realizado. Tras lavar con PBS 1X, se incubaron las muestras con anticuerpo 2^{ario} anti-IgG de conejo (crecido en cabra, dil 1:2000) unido a HRP (peroxidasa de rábano). Se lavaron las muestras y, finalmente, se incubaron con una mezcla de DAB easy tablets (Acròs Organics) junto con peróxido de H₂ 0,1%. El peróxido, al reaccionar con la peroxidasa de los anticuerpos, oxida el 4-cloronaftol del DAB produciendo un sustrato cromógeno que da el color marrón característico.

3.7. Western blot

Se sembraron los tres tipos celulares (HeLa, VERO y Blast Res-9) en P60 a una densidad de 10⁶ células/placa y se añadió la doxiciclina a las placas correspondientes a una concentración saturante (4µM). Al día siguiente se infectaron las placas con PRV BT80GF o PRVwt (control sin infectar) a una multiplicidad de infección de 1 y se dejaron 24 horas para permitir la expresión de IE180, tras lo cual se lavaron las células con PBS, se levantaron y se lisaron con buffer de lisis (TrisHCL 50 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, SDS 0.5%, Tritón X-100 1%). Posteriormente se incubaron 15min a 95°C y se centrifugaron otros 15 min a 13.000 rpm para obtener los extractos proteicos.

Se calculó la concentración de proteína mediante el método de Bradford, usando el kit DC Protein Assay (BioRad) y utilizando concentraciones conocidas de BSA para hallar la recta patrón. Las muestras se prepararon conteniendo la misma cantidad de proteína (40µg), así como el marcador molecular correspondiente, mezclados con buffer de electroforesis 5X. Tras incubación a 95°C durante 5 min, se cargaron las muestras en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico al 6, 8 y 10%. Una vez finalizada la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y, tras comprobación de la transferencia mediante tinción con rojo Ponceau, se lavó la membrana con PBS-T (PBS1X, 0.05% Tween-20) y se bloquearon las muestras con PBS-T 5% leche en polvo. A continuación, se incubó la membrana a 4°C durante toda la noche en agitación con anticuerpos 1^{arios} diluidos en solución de bloqueo dirigidos contra β- tubulina III (crecido en ratón, dil 1:2000) (utilizado como control celular) y

contra IE180 (crecido en conejo, dil 1:500). Al día siguiente se lavó 3 veces la membrana con PBS-T y se incubó 1h a temperatura ambiente en agitación con los anticuerpos 2^{arios} anti-IgG correspondientes (crecidos ambos en cabra, dil 1:3000) unidos a peroxidasa. Tras lavar tres veces con PBS-T se utilizó un agente oxidante del kit “Advance enhanced chemiluminescence” (Amersham, Little Chalfont, UK) que, al reaccionar con la peroxidasa, produce quimioluminiscencia, permitiendo visualizar las proteínas inmunoreactivas con una cámara Gel Logic 1500 Imaging System (Kodak, Hemel Hempstead, UK) con el Software Kodak Molecular Imaging 4.0.5f7. Finalmente se calculó la densidad integrada de cada banda mediante análisis con el programa Imagine J 1.45.

4. Resultados y discusión

4.1. La transfección transitoria de tet-reguladores no permite la modulación de PRV BT80GF

Con el objetivo inicial de valorar el efecto de cada uno de los reguladores sobre la replicación del mutante PRV BT80GF, se procedió al empaquetamiento en lentivectores de diferentes plásmidos portadores de cada uno de los cuatro reguladores (tTA, rtTA, tTR y rtTR) para, de esta manera, infectar células y elegir para el estudio el/los más adecuado/s.

Puesto que los plásmidos utilizados no poseían ningún gen de resistencia válido en mamíferos, se aprovechó la presencia en tres de ellos (y en el plásmido control) del gen de la proteína verde fluorescente (EGFP), tanto para ver la eficiencia de transfección mediante microscopía como para medir la eficiencia de infección de los lentivectores mediante citometría de flujo. En el primer caso es posible la utilización de microscopía ya que la expresión del plásmido es lo suficientemente fuerte como para visualizar la fluorescencia, sin embargo, tras la infección con lentivirus la intensidad no suele ser lo suficientemente alta por lo que se ha de utilizar una tecnología más sensible, como la citometría.

Como se puede observar en la figura 4, la eficiencia de transfección en células HEK 293 fue muy elevada por lo que se procedió a la infección de células Vero con los lentivectores creados y la posterior medición del porcentaje de infección mediante citometría de flujo. Los resultados fueron bastante pobres, incluso en las diluciones más concentradas de virus, pues el porcentaje de infección no superó el 7%. Esto puede ser debido, por una parte, a una baja eficiencia de empaquetamiento de algunos de los vectores, y por otra, a una baja infectividad de las células Vero.

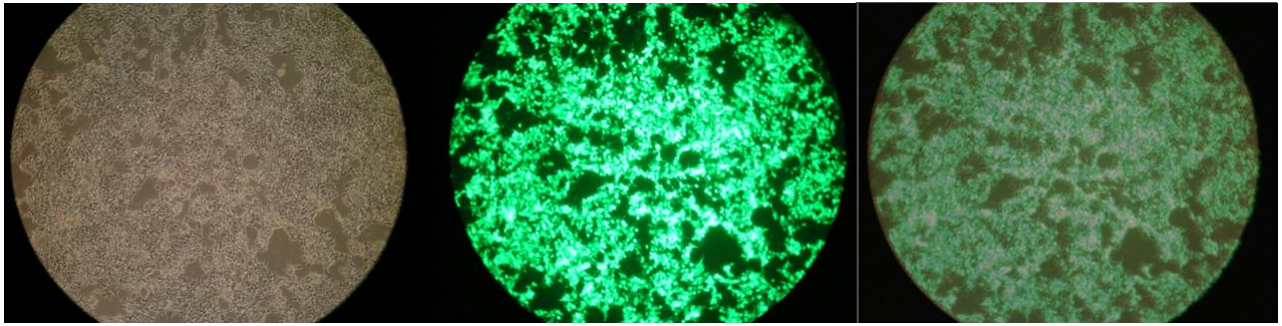


Figura 4. Imágenes de microscopía 10X de células HEK293 durante el proceso de empaquetamiento del lentivector con el plásmido CAGptTA. a) Imagen en campo claro. b) imagen de fluorescencia en verde. c) montaje con superposición de ambas imágenes.

Para intentar mejorar los resultados se procedió a la infección de células HEK 293 y Vero (como control) a diferentes diluciones de los lentivectores, incluyendo asimismo repeticiones de ambas con la adición de polibreno, un polímero catiónico que aumenta la eficiencia de infección por retrovirus en células en cultivo (Davis y col., 2004). Para visualizar los resultados se utilizó un ensayo inmunocitoquímico con anticuerpos contra TetR, para eliminar la posibilidad de que un bajo resultado en la eficiencia de infección (como el del ensayo anterior) sea debido a algún problema en la medición de la fluorescencia por GFP. El análisis de los resultados en el microscopio mostró que el polibreno era capaz de provocar un ligero aumento en la eficiencia de infección y que la infección en células HEK 293 era bastante más elevada que en Vero, confirmando la hipótesis de que estas últimas no son muy propensas a la infección. Sin embargo, en ningún caso se llegó a sobrepasar el 50% de células infectadas.

Aunque sería posible intentar optimizar aún más el proceso, dado que para nuestro estudio es necesaria una infectividad cercana al 100%, la cual sería muy difícil de alcanzar dados los resultados preliminares, se optó por infectar directamente con PRV BT80GF las células HEK 293 tras la transfección transitoria con los plásmidos, ya que la eficiencia de transfección sí resultó elevada. Así, se llevó a cabo el procedimiento de transfección con los cuatro reguladores en presencia y ausencia de doxyciclina (ver Material y Métodos) y se infectó con PRV BT80GF para estudiar la regulación sobre el mismo.

La titulación de los virus mostró una tasa de replicación viral bastante más elevada en todos los experimentos correspondientes a la no adición de doxyciclina, por lo que no se vio ningún efecto de los reguladores (ni de activación ni de represión de la replicación lítica). Una de las explicaciones más plausibles es que, puesto que el proceso de transfección supone un ligero estrés para las células (Bilim y col., 2008), la adición inmediata de un compuesto antibiótico en concentraciones tan elevadas como para que alcancen la saturación (incluso tratándose de uno *a priori* inocuo para las células de

mamíferos como la doxiciclina) (Goverdhana y col., 2005) supone una diferencia suficiente como para comprometer ligeramente la viabilidad celular y, de esta manera, la infección y replicación viral. En cualquier caso, los resultados que se pudiesen obtener no parecen lo suficientemente fiables y representativos en lo referente a la actuación de los diferentes reguladores de estudio, por lo que se decidió abordar la investigación utilizando líneas celulares estables ya modificadas y comparar el efecto de la adición de doxiciclina en PRV BT80GF.

4.2. Una regulación simple por sistema tet mediante transactivador y transrepresor permite modular la replicación lítica de PRV BT80GF

Debido al bajo rendimiento obtenido con los lentivectores y con la transfección transitoria se decidió probar la eficiencia en la regulación de IE180 por la secuencia tet del PRV BT80GF. En los primeros ensayos con líneas celulares estables se utilizaron: la línea celular HeLa tet-off (que expresa el transactivador tTA-VP16) y la línea celular Vero-tTR-BLR, que expresa tTR (ver Material y Métodos).

El objetivo fue tanto comprobar la diferencia que la doxiciclina podía producir sobre la activación/represión del transactivador, como ver en las células Vero-tTR-BLR el efecto en la represión de la proteína TetR unida a *tetO* pero sin la fusión a una proteína de represión (como KRAB). De esta manera la expresión de IE180 debería ser silenciada exclusivamente por la unión del regulador a las secuencias *tetO*, creando un impedimento estérico para la unión de la ARN-polimerasa e imposibilitando la transcripción.

Así pues, en primer lugar se realizó un estudio control con ensayos de dilución de punto final con células HeLa tet-off utilizando PRV wt, confirmando que la doxiciclina y el activador no tienen efecto significativo en el virus salvaje, y con PRV BT80GF, comprobándose el efecto de regulación. A continuación, se procedió al ensayo mediante placas de lisis para comparar ambos tipos de técnicas y, puesto que se obtuvo la misma tendencia, se procedió a utilizar el ensayo por placas de lisis a partir de ese momento, debido al menor gasto de tiempo y material que éste conlleva.

Como vemos en la figura 5, la infección con PRV wt en células Vero generó un título viral cercano a 10^6 pfu/ml, decreciendo el título al utilizar la línea celular HeLa debido a las diferencias de replicación de herpesvirus en distintas líneas celulares (Warden y col., 2010). También podemos comprobar que no existieron diferencias significativas al utilizar un medio con o sin doxiciclina, ya que el represor tTR no debería afectar al virus de fenotipo salvaje.

Por contra, mediante la infección con PRV BT80GF se constataron diferencias importantes debidas a la adición de doxiciclina en las dos líneas celulares estables del sistema de regulación por tetraciclina (fig 5).

En la línea celular HeLa tet-off se alcanzaron títulos de hasta 10^6 pfu/ml, similares a lo obtenido al infectar células Vero con el virus tipo salvaje, gracias a la transactivación de IE180 por medio de tTA-VP16. Mientras que, con la adición de doxiciclina al medio y por tanto la inactivación de tTA-VP16, el título viral decreció por encima de un orden de magnitud, siendo bastante menor que durante la

infección de células Vero.

En las células Vero-tTR-BI^R, al infectar con PRV BT80GF en la

ausencia de doxiciclina se obtuvieron títulos por debajo de 10^4 pfu/ml debido a la unión de tTR en las secuencias tet-o, inhibiéndose la transcripción de IE180. Sin embargo, la adición del antibiótico se traduce en la imposibilidad de la unión de tTR por lo que, al no haber inhibición, se alcanzan títulos en torno a 10^5 pfu/ml. Cabe mencionar que, aunque este título debería ser similar al que se obtiene cuando se infectan células Vero sin transformar (ya que el tTR al estar unido a la doxiciclina no produce ningún efecto), el número de partículas infectivas por mililitro es ligeramente más bajo. Esto puede ser debido precisamente a que este proceso de modificación haya variado ligeramente el comportamiento en el ciclo celular. En cualquier caso, el título viral continúa siendo más elevado que en células HeLa con doxiciclina, que sería su “homólogo funcional” al estar ambas transformadas pero inhibida la acción de sus respectivos reguladores.

4.3. La replicación viral se correlaciona con los niveles de proteína IE180

Para confirmar que las diferencias obtenidas en los títulos se deben realmente a una regulación de IE180, se realizó un análisis de proteína mediante la técnica de western

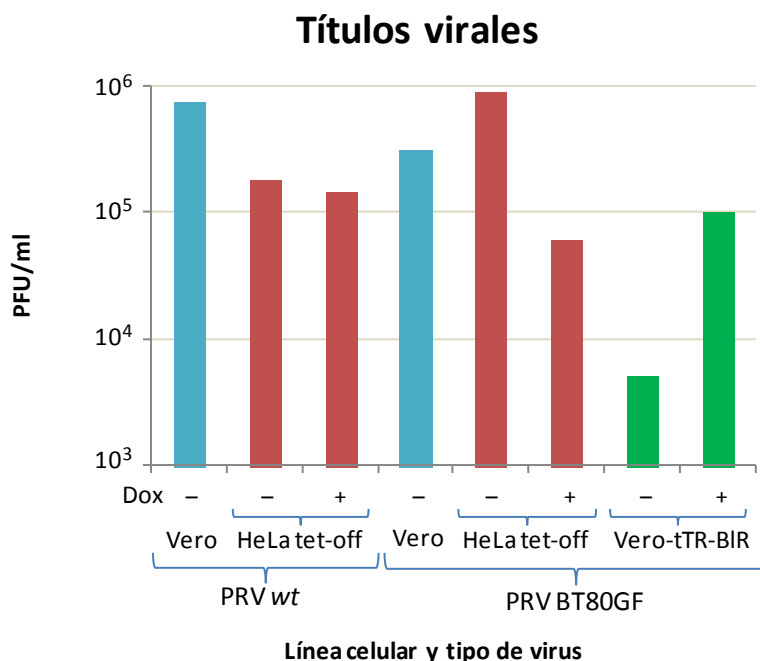


Figura 5. Histograma representativo de los títulos virales obtenidos con y sin la adición de doxiciclina en diferentes líneas celulares, medidos mediante ensayo de placas de lisis.

blot con anticuerpos específicos contra esta proteína de 180 kDa, utilizándose como control la proteína del citoesqueleto β -tubulina III (55kDa).

Si bien se puede asegurar que la cantidad de proteína cargada en todos los pocillos es constante, habiéndose comprobado este hecho tanto por el método de Bradford como por la tinción de la membrana con rojo Ponceau, atendiendo al control de β -tubulina III (fig. 6) podemos ver que las bandas son bastante menos nítidas en la infección de células Vero con virus *wild type* y mutante. Esto se explica por la capacidad de los herpesvirus de desestabilizar la estructura del citoesqueleto tras la infección, disminuyendo la expresión de proteínas del mismo (Liu y col., 2010), ya que como se puede observar, en estos dos carriles también se produce una mayor expresión de la proteína viral IE180, siendo por tanto esta desestabilización máxima.

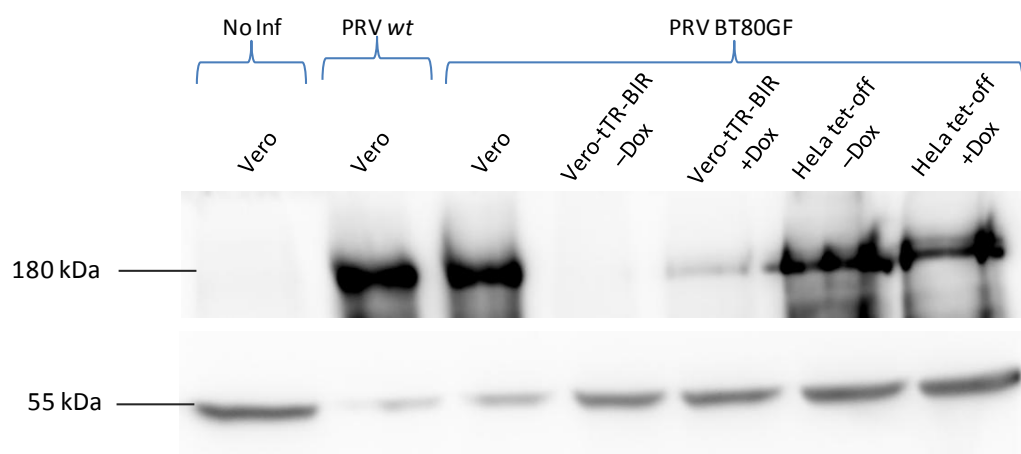


Figura 6. Análisis de la abundancia de la proteína de IE180 y de β -tubulina III mediante western blot en gel al 8% tras no infección, infección con PRV wt o infección con PRV BT80GF en diferentes tipos celulares.

En cuanto a la proteína IE180, en la imagen 6 podemos comprobar que en el control negativo (células Vero sin infectar con virus) no hay ninguna banda en 180kDa, mientras que al infectar Vero con PRV wt y BT80GF aparecen bandas gruesas en ambos carriles. Asimismo, podemos constatar que tanto en las células Vero-tTR-BI^R como en HeLa tet-off se sigue la tendencia esperada en función de la adición o no de doxiciclina en el medio.

Para interpretar de una manera correcta los datos se realizó un análisis de densidad óptica integrada utilizando la imagen del gel, obteniéndose la gráfica 7. En ella se confirma la gran diferencia en células Vero sin y con infección con PRV, previamente vista en el gel. Se tomará la medición obtenida en el control como densidad óptica basal, ya que como se ha visto en el gel, no había unión de los anticuerpos en esta muestra. En las células HeLa tet-off se obtiene una tendencia muy similar a la vista en los títulos virales representados en el histograma anterior (figura 5), viéndose que la

cantidad de IE180 producida por PRV BT80GF está próxima a la obtenida con el *wild type* en Vero, lo que se traduce en la similitud de títulos virales ya comentada. Asimismo, podemos ver en la gráfica 7 que la adición de doxiciclina al medio provoca un ligero descenso en la expresión de IE180, aunque bien es cierto que éste no parece tan marcado como el que se aprecia en la diferencia de producción viral en la figura 5.

En cuanto a las células Vero-tTR-BIR, el patrón obtenido también mantiene la tendencia de los títulos virales de la gráfica 5, pero en el análisis de proteína las diferencias con los otros tipos celulares son bastante más significativas. De hecho, tomando el control como nivel basal, el resultado sería que en las células con represor activo no hay producción de la proteína de IE180, y que ésta sólo se expresaría a niveles bastante bajos cuando se adiciona doxiciclina al medio. Las diferencias entre ambas

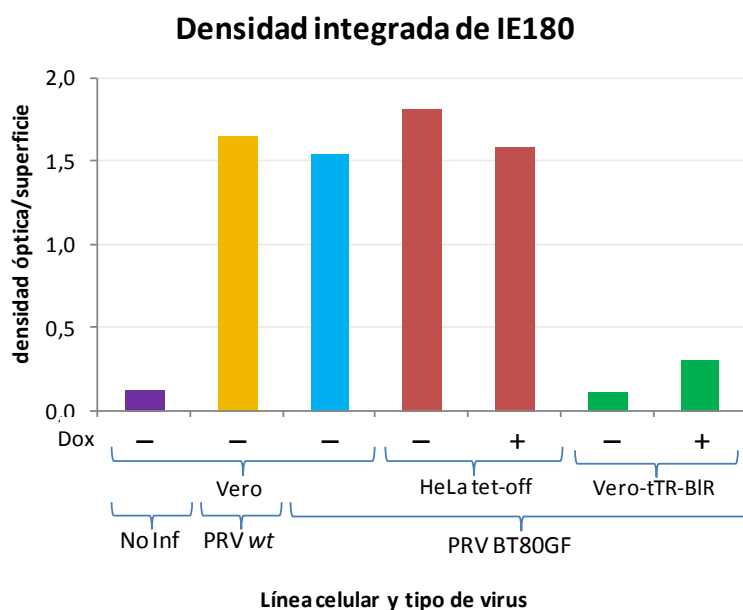


Figura 7. Análisis cuantitativo de la densidad integrada de cada banda del western blot a la altura de 180 kDa obtenida tras dividir la densidad óptica entre el área correspondiente a la banda.

gráficas pueden ser debidas, en parte, a que el ensayo de western blot se realiza un día después de la infección puesto que el objetivo es ver la expresión de un gen inmediatamente temprano, mientras que en los ensayos de titulación se mantiene la infección durante tres días para poder medir la replicación viral. Asimismo, aunque en el western blot no se ve la expresión de IE180 en las células Vero-tTR-BI^R (sin doxiciclina), parece seguro que hay producción de dicha proteína puesto que se han visto placas de lisis en los ensayos de titulación y, por tanto, replicación viral y se ha demostrado que IE180 es imprescindible para la replicación lítica de PRV (Yamada y Shimizu, 1994). Esta necesidad de IE180 se ha demostrado mediante la creación de mutantes “knock out” para dicho gen en los que se produce un silenciamiento total del virus, restableciéndose la capacidad replicativa mediante transfección en líneas celulares complementarias o mediante rescate del gen (Ono y col., 1998).

Por todo esto, parece muy probable que se esté produciendo un ligero escape de proteína IE180, lo que se traduce en la transactivación del promotor de CMV con la consiguiente expresión de más IE180, incrementándose las diferencias con el tiempo.

Este efecto se ha demostrado en HSV-1 en el que los tres productos transactivadores de los genes inmediatamente tempranos (ICP0, ICP4 e ICP27) son capaces de activar el promotor *tetO*/CMV interfiriendo, por tanto, con la regulación del sistema inducible por tetraciclina (Herrlinger y col., 2000), ocurriendo de manera análoga con el transactivador de PRV: IE180.

En cualquier caso, es evidente que la replicación viral se ve influenciada por la producción del transactivador de IE180 ya que la tendencia es constante al comparar ambos experimentos.

4.4. Una regulación simultánea doble (transactivador y transrepresor) por sistema tet no permite la represión de la replicación lítica

Una vez realizado el ensayo del virus mutante con una regulación simple, se procedió a la utilización de una línea celular con doble regulación: Vero-rtTA/tTR, usándose dos clones (6 y 14) para los ensayos. Este sistema doble tet-on, *a priori*, debería silenciar la

expresión de IE180 en ausencia de doxyciclina (cuando tTR es activo), mientras que la adición de dicha molécula al medio debería traducirse en una elevada activación de la replicación viral y, por tanto, de la producción de partículas virales con la consiguiente formación de placas de lisis.

Sin embargo, como se ve en la figura 8 se comprobó que, si bien la respuesta a doxyciclina era coincidente con lo esperado, alcanzándose títulos virales cercanos a los obtenidos con las células HeLa tet-off sin doxyciclina, la inhibición en ausencia del inductor no estaba funcionando. De hecho, los títulos alcanzados sin doxyciclina Vero-rtTA/tTR no distaban mucho de los obtenidos con el inductor, y eran bastante

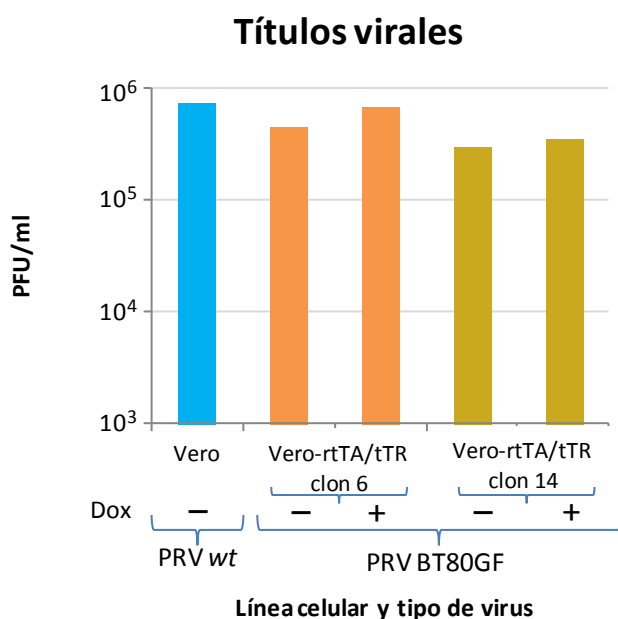


Figura 8. Histograma representativo de los títulos virales obtenidos con y sin la adición de doxyciclina en líneas celulares Vero-rtTA/tTR, títulos medidos mediante ensayo de placas de lisis.

superiores que los de las líneas celulares simples sin el efecto de los reguladores.

Estos resultados fueron coincidentes en ambos clones e iban acompañados de un aumento en el diámetro de las placas de lisis en las células sin doxyciclina (fig. 9). Para confirmar este efecto, se repitieron los mismos ensayos utilizando diferentes diluciones del virus y se realizó asimismo un ensayo de inmunocitoquímica con anticuerpos

dirigidos contra la glicoproteína G de PRV. De esta manera se constató que todas las placas de lisis eran debidas a la replicación viral y que el aumento en el tamaño era resultado de un incremento en la velocidad de crecimiento del virus y no el resultado de algún tipo de citotoxicidad.

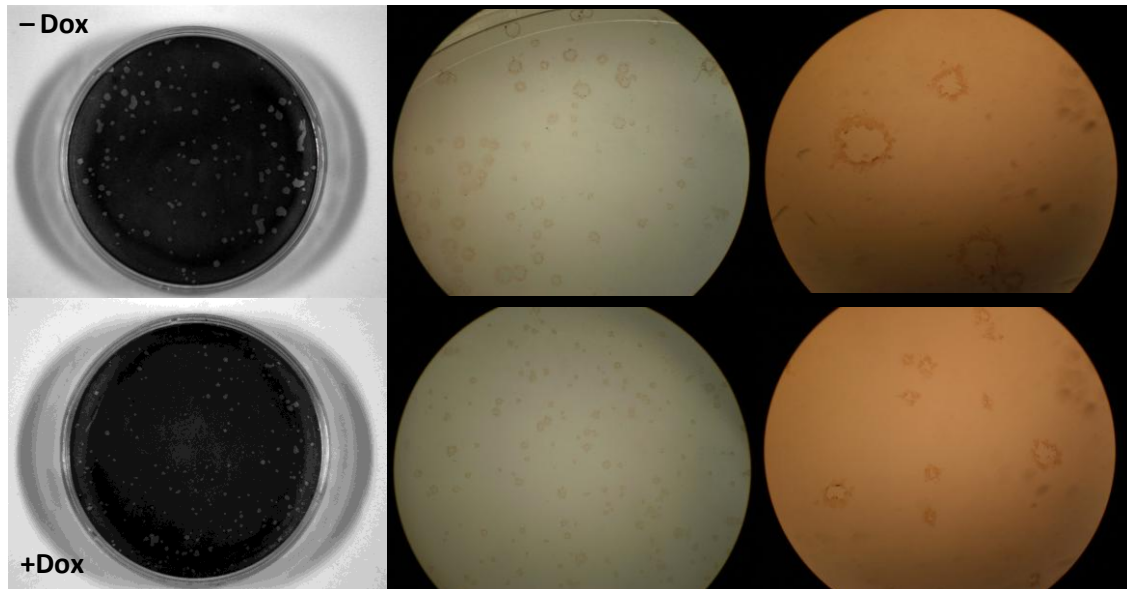


Figura 9. Comparación de las placas de lisis obtenidas al infectar Vero-rtTA/tTR clon 6 con PRV BT80GF sin y con doxiciclina en el medio. a) ensayo de placas de lisis, imagen tamaño real; b) inmunocitoquímica, imagen con lupa aumento 1X; c) inmunocitoquímica, imagen con microscopio con aumento 4X.

Como ya se ha comentado, un escape de IE180 seguramente sea capaz de activar el promotor del CMV, sin embargo esta teoría no podría explicar por si sola los altos títulos alcanzados cuando debería haber silenciamiento ni la diferencia en el tamaño de las placas de lisis. Así pues, la explicación más plausible incluiría a VP16 en la desregulación del sistema puesto que, como se ha comprobado en HSV-1, este factor de transcripción es capaz de provocar interferencias en la integridad del sistema inducible de tetraciclina (Herrlinger y col., 2000), pudiendo ocurrir de manera similar en PRV.

Es posible que rTetR sea capaz de unirse a alguna secuencia concreta del genoma de PRV BT80GF cercana a IE180 cuando no hay doxiciclina en el medio (fig. 10) derivando en una transactivación del promotor de CMV por medio del factor de transcripción VP16. Esto no ocurriría cuando se adiciona doxiciclina ya que ésta produce un cambio conformacional en rTetR, que desemboca además en un elevado aumento de la afinidad del mismo por las secuencias *tetO* quedando secuestradas las proteínas rTetR. Así pues, la disparidad en el tamaño de las placas de lisis sería resultado de las diferentes formas de transactivación de IE180.

Otra posibilidad es que las diferencias en tamaño sean debidas a una transactivación directa por VP16 sin necesidad de unión al genoma de rTetR, la cual no se produce cuando hay doxiciclina debido a la elevada afinidad de rTetR-dox por *tetO* quedando el transactivador secuestrado en este promotor.

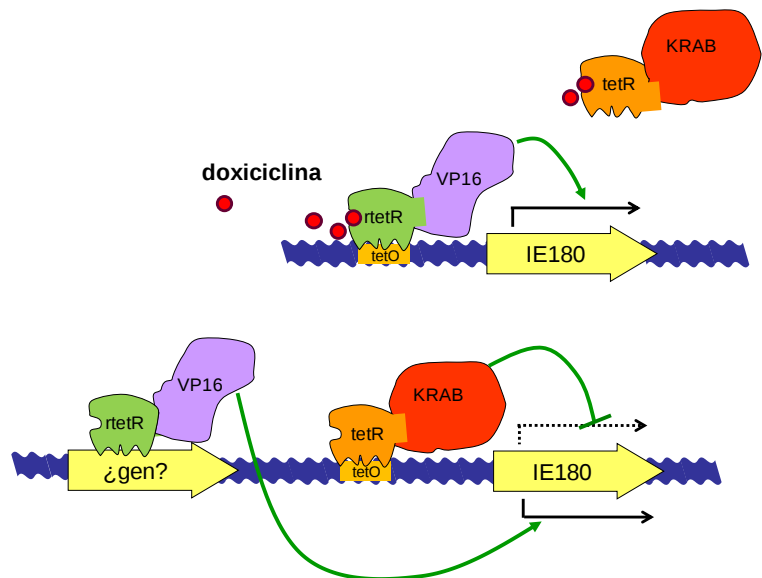


Figura 10. Hipótesis de la desregulación del sistema de tetraciclina en PRV BT80GF en células Vero-rtTA/tTR.

En cualquier caso, parece evidente que, si bien es posible alcanzar títulos virales elevados mediante la eliminación del promotor natural de IE180 e intercambiarlo por un promotor de sistema inducible, la cuestión se complica cuando conjuntamente se pretende ser capaz de silenciar la replicación viral mediante regulación a nivel transcripcional, más aún cuando el sistema utiliza un solo ligando en ambos casos, compitiendo por el mismo. Puesto que un pequeño escape de proteína parece ser capaz de activar la expresión de IE180, seguramente sea necesaria la creación de un sistema doblemente regulado, no sólo a nivel transcripcional si no también traduccional en el que se utilicen diferentes moléculas para su control.

4.5. Trabajo actual: Regulación combinatoria con un segundo ligando

Puesto que se ha demostrado que se produce una autoactivación de IE180 debido al escape de un bajo nivel de proteína, de manera análoga a como ocurre con ICP4 en HSV-1, es necesaria una regulación conjunta: tanto a nivel de transcripción (como se ha venido haciendo), como a nivel de traducción.

Para conseguir el silenciamiento total de la proteína se va a utilizar el sistema ProteoTuner™ de Clontech, que se basa en la fusión a la proteína que se quiere regular de un mutante de 12kDa derivado de la proteína FKBP, denominado como dominio de desestabilización (DD). Cuando se expresa la proteína de interés unida a DD, es rápidamente desestabilizada por lo que se dirige al proteasoma celular donde se degrada (fig. 11). Por contra, si se añade al medio de cultivo el ligando estabilizador de DD (Shield 1) éste protege la desestabilización por DD acumulándose la proteína en la célula. Puesto que Shield 1 es un ligando de 750 Da capaz de atravesar la membrana

celular y de unirse a DD de manera reversible, permite una regulación muy rápida y estrechamente regulada.

Así pues, para intentar conseguir el silenciamiento completo de IE180, y por tanto de la replicación viral, hay que introducir la secuencia del DD entre medias del promotor y de la secuencia del propio gen. Para comparar la conveniencia de usar una regulación única o una doble se pretende introducir dicho dominio en dos mutantes:

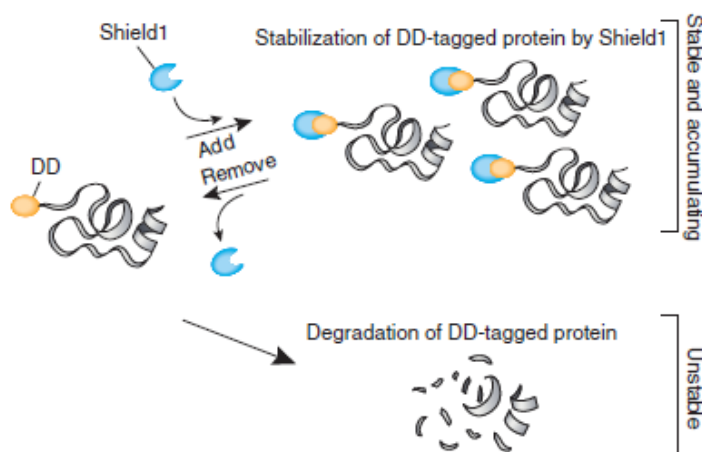


Figura 11. Esquema del funcionamiento del sistema DD.

- PRV BT60, un mutante creado por el grupo de Enrique Tabarés (Muñoz y col., 2010) que solamente tiene deletada la secuencia repetida terminal, pero que mantiene el promotor de IE180 original en la IR tras el que se introduciría la secuencia de DD (regulación única a nivel traduccional por Shield 1).
- PRV BT80GF, en el que la secuencia de DD se insertaría a continuación del promotor del CMV regulado por tet-O (regulación doble: a nivel transcripcional por doxiciplina y traduccional por Shield 1)

En cuanto al procedimiento técnico, puesto que para llevar a cabo la modificación no es posible la utilización directa de enzimas de restricción y ligación, ya que el genoma de los herpesvirus es de un tamaño demasiado elevado, se va a realizar mediante recombinación homóloga en bacterias.

Como se esquematiza en la figura 12-a, la idea principal es eliminar una parte de IE180 de los BACs, sustituyéndolo por una resistencia ampicilina para seleccionar las bacterias recombinantes. Posteriormente, se pretende rescatar el gen, intercambiando la resistencia por la secuencia de IE180 deletada fusionada a DD. En este caso, la selección de las bacterias recombinantes no se producirá en bacterias (ya que no hay resistencia) sino que se realizará en células Vero, mediante la extracción de las secuencias genómicas de los BAC y la transfección de éstas al cultivo celular. Puesto que el gen IE180 es esencial para la replicación de PRV, únicamente los virus con el gen completo serán capaces de replicar y, por tanto, de producir placas de lisis, pudiéndose finalmente recolectar los virus mutantes regulados por DD (con la presencia de Shield1 en el medio).

Hasta el momento, se ha llevado a cabo la producción y amplificación del fragmento con la resistencia a ampicilina para llevar a cabo la interrupción del gen IE180 (fig. 12,c) y se han introducido por electroporación los genes necesarios para llevar a cabo la recombinación homóloga (plásmido ETRed, GeneBridge), tanto en pBAC 60 como en pBAC 80GF (fig. 12,b), confirmándose la presencia del plásmido y del BAC por doble selección por antibióticos. Así pues, en los subsiguientes experimentos, se procederá a electroporar el fragmento de PCR y llevar a cabo la recombinación y selección por ampicilina.

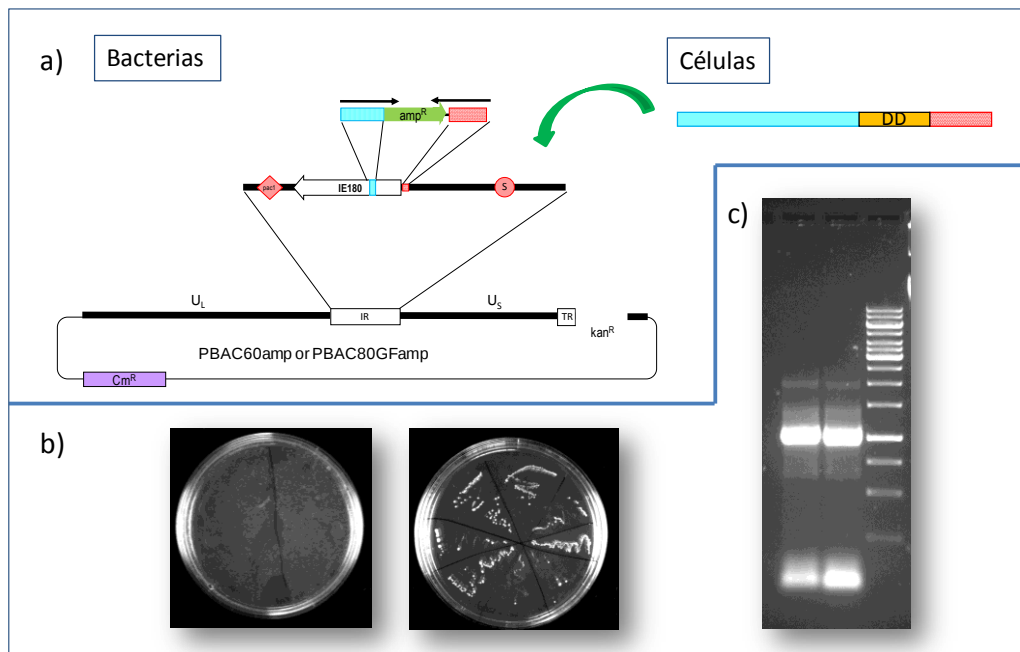


Figura 12. Esquema de trabajo para la fusión de DD a IE180. a) Representación gráfica del plan de trabajo a realizar, se destaca la selección primaria en bacterias y la secundaria en cultivo celular. b) Fotografías de los BACs con el plásmido pETRed electroporado en su interior: pBAC 60 (selección con Km y Tetr) y pBAC 80GF(selección con Zeo y Tetr), de izquierda a derecha. c) gel de agarosa al 10% que muestra el fragmento de PCR necesario para la primera recombinación.

5. Conclusiones

1. La replicación del virus de la pseudorrabia es dependiente del nivel de expresión del gen IE180, siendo por tanto este gen un buen candidato para utilizar como interruptor en el control de la replicación en vectores modificados a partir del virus *wild type*.
2. El sistema de regulación inducible por tetraciclina, en el estado activado, permite alcanzar un nivel de replicación similar al obtenido por el virus salvaje en un virus mutante en el que el promotor de IE180 ha sido intercambiado por uno de respuesta a tetraciclina, pudiéndose crear un sistema artificial que funciona igual de bien que el natural.
3. El sistema de regulación por tetraciclina permite, en el estado reprimido, una bajada en la expresión de IE180 en el mutante pero no consigue la obtención de un silenciamiento total de la replicación. Este silenciamiento se ve enmascarado cuando se intentan combinar ambos reguladores (transactivador y transrepresor) con el mismo sistema.
4. La utilización combinada de dos sistemas de regulación para IE180, dirigidos contra diferentes etapas de la replicación viral y controlados por diferentes ligandos, podría llegar a conseguir un silenciamiento total del virus.

6. Referencias bibliográficas

- Agha-Mohammadi, S., y Lotze, M.T., 2000. Regulatable systems: applications in gene therapy and replicating viruses. *J. Clinical Inv.* vol.105, 9: 1177-1183.
- Berens, C. y Hillen, W., 2003. Gene regulation by tetracyclines: Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur. J. Biochem.* 270: 3109-3121.
- Bilim, V., Yuuki, K., Itoi, T., Muto, A., Kato, T., Nagaoka, A., Motoyama, T., y Tomita, Y., 2008. Double inhibition of XIAP and Bcl-2 axis is beneficial for retrieving sensitivity of renal cell cancer to apoptosis. *British J. Cancer* 98: 941 – 949.
- Boldogkői, Z., Sik, A., Dénes, A., Reichart, A., Toldi, J., Gerendai, I., Kovács, K.J., Palkovits, M., 2004. Novel tracing paradigms—genetically engineered herpesviruses as tools for mapping functional circuits within the CNS: present status and future prospects. *Neurobiology*, 72: 417-445.
- Corbel, S.Y., y Rossi, F.M.V., 2002. Latest developments and *in vivo* use of the Tet system: *ex vivo* and *in vivo* delivery of tetracycline-regulated genes. *Current Opinion in Biotechn.* 13:448–452.
- Davis, H.E., Rosinski, M., Morgan, J.R., y Yarmush, M.L., 2004. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophysical J.* 86: 1234–1242.
- Foka, P., Pourchet, A., Hernandez-Alcoceba, R., Doumba, P.P., Pissas, G., Kouvatiss, V., Dalagiorgou, G., Kazazi, D., Marconi, P., Foschini, M., Manservigi, R., Konstadoulakis, M.M., Koskinas, J., Epstein, A.L., Mavromara, P., 2010. Novel tumour-specific promoters for transcriptional targeting of hepatocellular carcinoma by herpes simplex virus vectors. *J. Gene. Med.* vol. 12, 12:956-967.
- Freundlieb, S., Schirra-MuÈller, C., y Brujard, H., 1999. A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J. Gene Med.* 1: 4-12.
- Glorioso, J.C., y Fink, D.F., 2004. Herpes vector-mediated gene transfer in treatment of diseases of the nervous system. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 253-271.
- Goverdhana, S., Puntel, M., Xiong, W., Zirger, J.M., Barcia, C., Curtin, J.F., Soffer, E.B., Mondkar, S., King, G.D., Hu, J., Sciascia, S.A., Candolfi, M., Greengold, D.S., Lowenstein, P.R., y Castro, M.G., 2005. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Molec. Therapy* Vol. 12, 2: 189-211.
- Herrlinger, U., Pechan, P.A., Jacobs, A.H., Woiciechowski, C., Rainov, N.G., Fraefel, C., Paulus, W., y Reeves, S.A., 2000. HSV-1 infected cell proteins influence tetracycline-regulated transgene expression. *J. Gene Med.* 2: 379-389.
- Kay, M.A., Glorioso, J., y Naldini, L., 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine* vol. 7, 1: 33-40.
- Liu, M., Schmidt, E.E., y William P. Halford, W.P., 2010. ICP0 dismantles microtubule networks in Herpes Simplex Virus-infected cells. *PLoS ONE* vol. 5, 6: 1-18.
- Monaco, A.P., y Larin, Z., 1994. YACs, eACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Science* 12: 280-286.
- Muñoz, A.L., Gadea, I., Lerma, L., Varela, L., Torres, M., Martín, B., García-Culebras, A., Lim, F., y Tabarés, E., 2010. Construction and properties of a recombinant pseudorabies virus with tetracycline-regulated control of immediate-early gene expression. *J. Virolog. Methods* 171: 253-259.

- Nesburn, A.D., Ghiasi, H., y Wechsler, S.L., 1990. Ocular safety and efficacy of an HSV-1 gD vaccine during primary and latent infection. *Invest. Ophthalmology & Visual Sc.* vol. 31, 8: 1497-1502.
- Nettelbeck, D.M., Jérôme, V., y Müller, R., 2000. Gene therapy: designer promoters for tumour targeting. *Trends in Genetics* vol. 16, 4: 174-181.
- Ono, E., Taharaguchi, S., Watanabe, S., Nikami, H., Shimizu, Y., y Kida, H., 1998. Suppression of pseudorabies virus replication by a mutant form of immediate-early protein IE180 repressing the viral gene transcription. *Vet. Microbiol.* 60: 107–117
- Ono, E., Watanabe, S., Nikami, H., Tasaki, T., y Kida, H., 1998. Pseudorabies virus (PRV) early protein 0 activates PRV gene transcription in combination with the immediate-early protein IE180 and enhances the infectivity of PRV genomic DNA. *Vet. Microbiol.* 63: 99-107.
- Pomeranz, L.E., Reynolds, A.E., y Hengartner, C.J., 2005. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol. & Molec. Biol. Revs*, vol. 69, 3: 462–500.
- Prieto, J., Solera, J., y Tabarés, E., 2002. Development of new expression vector based on pseudorabies virus amplicons: application to human insulin expression. *Virus Research* 89: 123-129.
- Rossi, F.M.V., y Blau, H.M., 1998. Recent advances in inducible gene expression systems. *Current Opinion Biotechnol.* 9: 451-456.
- Sena-Esteves, M., Saeki, Y., Fraefel, C., y Breakfield, O., 2000. HSV-1 amplicon vectors—simplicity and versatility. *Molec. Therapy* vol.2, 1: 9-15.
- Smith, G.A., y Enquist, L.W., 2000. A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis. *PNAS* vol. 97, 9: 4873-4878.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A., y Kay, M.A., 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature* 4: 346-358.
- Toniatti, C., Bujard, H., Cortese, R., y Ciliberto, G., 2004. Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. *Gene Therapy* 11: 649–657.
- Warden, C., Tang, Q., y Zhu, H., 2010. Herpesvirus BACs: past, present, and future. *J. Biomed. & Biotechnol.*, 1-16.
- Watanabe, D., 2009. Medical application of herpes simplex virus. *J. Dermatol. Sc.*, 57: 75-82.
- Whitley, R.J., 2011. Herpesviruses (Human). *eLS, John Wiley & Sons*, 1-6.
- Yamada, S., y Shimizu, M., 1994. Isolation and characterization of mutants of pseudorabies virus with deletion in the immediate-early regulatory gene. *Virology* 199: 366-375.