

336427  
7



**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MEXICO**

**CAMPUS CHAPULTEPEC  
ESCUELA DE QUIMICO FARMACEUTICO  
BIOLOGO**

**INCORPORADA A LA UNAM**

**ADENOVIRUS RECOMBINANTE QUE  
EXPRESA EL GEN DE LA PROTEINA  
VERDE FLUORESCENTE (GFP)**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A**  
**KAREN IVETTE NIETO FLORES**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**MEXICO, D. F.**

**2003**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

**PAGINACION**

**DISCONTINUA**

## JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

Men C. Guillermo del Rey Pineda

VOCAL

Q.F.B. Gerardo García Camacho

SECRETARIO

Q.F.B. Javier Araiza Santibáñez

1er SUPLENTE

Men C. Angelica Calderon Villagomez

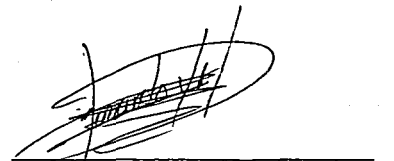
2do SUPLENTE

Men C. Eduardo del Rey Pineda

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN): Departamento de Genética y Biología Molecular, laboratorio N° 1.

Asesores (CINVESTAV):

  
Dr. Efraín Garrido Guerrero

  
Dr. Armando Valencia Hernández

Asesor (UVM):

  
Q.F.B. Gerardo García Camacho

Sustentante:

  
Karen Ivette Nieto Flores

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS SE LA DEDICO A:

### MIS PADRES

**Alma C. Flores De la Peña;** Por tu amor, por que me ayudas a encontrar respuestas, por que sin tí no sería yo.

**Héctor Nieto Téllez;** Por enseñarme a ser lo que soy, por que eres un super Papá.

### MI HERMANA

**Alma Gloria Nieto Flores;** Por tus consejos (buenos y malos), por tu compañía y simplemente por ser tú.

### MI ABUELA Y MI MEJOR AMIGA

**Gloria Rebeca De la Peña Rodríguez;** Por darme fortaleza en cualquier circunstancia, por tu enorme cariño y por que simplemente sin tí mi vida no sería la misma.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**MI HERMANO**

**Luis Antonio De la Peña Velasco;** Por preocuparte siempre por mí, por quererme tanto.

**MI TÍA**

**Gloria del Pilar Flores De la Peña;** Por el enorme cariño que recibo.

**Gracias por hacer de mi vida algo maravilloso**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

# AGRADECIMIENTOS

A mis tías;

Blanca Flores De la Peña  
Beatriz Flores De la Peña

A mi prima y mis sobrinitos;

Ana Sabina Flores De la Peña, Pamela, Emiliano, Natalia;

A todos mis primos

A mis hermanas;

Valeria Silva Moreno; por todos los momentos que pasamos  
juntas.

Carmen Fabiola Muñoz Mendoza; por tu enorme y grandiosa  
amistad

Le agradezco al Dr. Efraín Garrido Guerrero por darme la  
oportunidad de formar parte de su laboratorio y por su gran apoyo.

Dr. Armando Valencia Hernández por su enorme paciencia, su  
tiempo, por hacerme la estancia en el laboratorio única, pero  
sobretudo por su grandiosa amistad.

A mis compañeros y amigos del CINVESTAV

Dr. Rubén Ruíz Ramos, Dr. Emilio Cordova Alarcón y al  
Biólogo. Miguel Angel Fonseca gracias por su amistad.

Dr. Guillermo Del Rey Pineda, por sus consejos, su amistad y por  
que siempre encuentre apoyo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



# ÍNDICE

|  | <u>Pag.</u> |
|--|-------------|
| ÍNDICE DE TABLAS                                     | I           |
| ÍNDICE DE FIGURAS                                    | II          |
| RESUMEN  | IV          |
| <br>   |             |
| Capítulo 1 INTRODUCCIÓN                              |             |
| <br>   |             |
| 1.1 GENERALIDADES                                    | 1           |
| 1.1.1 Sistemas de transferencia y expresión de genes | 1           |
| 1.1.2 Vectores de expresión                          | 1           |
| 1.1.3 Métodos de transferencia de genes              | 3           |
| 1.1.4 Genes reporteros                               | 4           |
| <br>   |             |
| 1.2 PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE                      | 5           |
| 1.2.1 Estructura                                     | 5           |
| 1.2.2 Propiedades                                    | 5           |
| 1.2.3 Aplicaciones                                   | 8           |
| <br>   |             |
| 1.3 ADENOVIRUS                                       | 9           |
| 1.3.1 Clasificación                                  | 10          |
| 1.3.2 Morfología viral                               | 11          |

*Raren Nieto Flores*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| 1.3.3        | Organización del genoma                 | 13 |
| 1.3.4        | Ciclo reproductivo de Adenovirus humano | 14 |
| 1.3.4.1.1    | Eventos tempranos de la infección       | 14 |
| 1.3.4.1.2    | Eventos tardíos de la infección         | 17 |
| 1.4          | VECTORES ADENOVIRALES                   | 18 |
| Capítulo 2   | OBJETIVOS                               | 22 |
| 2.1          | OBJETIVO GENERAL                        | 22 |
| 2.2          | OBJETIVOS PARTICULARES                  | 22 |
| 2.3          | PROBLEMA                                | 23 |
| 2.4          | JUSTIFICACIÓN                           | 23 |
| 2.5          | ESTRATEGIA EXPERIMENTAL                 | 25 |
| Capítulo 3   | MATERIAL Y MÉTODOS                      | 27 |
| Capítulo 4   | RESULTADOS                              | 35 |
| Capítulo 5   | CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS             | 48 |
| BIBLIOGRAFÍA |   | 50 |

*Luzmila Nieto Flores*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ÍNDICE DE TABLAS

|   | <u>Pag</u> |
|---|------------|
| 1.1. Promotores utilizados                                  | 2          |
| 1.2. Métodos de transferencia de genes                      | 3          |
| 1.3. Genes reporteros                                       | 4          |
| 1.4. Clasificación de Adenovirus                            | 11         |
| 1.5. Función y localización de algunas proteínas virales    | 12         |
| 1.6. Especies animales no humanas infectadas por Adenovirus | 20         |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | <u>Pag</u> |
|---|------------|
| 1.1. Estructura de la proteína verde fluorescente         | 5          |
| 1.2. Espectro de absorción y emisión de GFP               | 6          |
| 1.3. Localización del fluorocromo en la estructura de GFP | 7          |
| 1.4. Estructura del fluorocromo de GFP                    | 8          |
| 1.5. Micrografía de Adenovirus                            | 9          |
| 1.6. Estructura de Adenovirus                             | 12         |
| 1.7. Corte transversal de una partícula Adenoviral        | 13         |
| 1.8. Organización del genoma de Adenovirus                | 14         |
| 3.1. Mapa del plásmido pGEM-T                             | 27         |
| 3.2. Mapa del plásmido pShuttle                           | 28         |
| 3.3. Mapa del plásmido pAdeno-X viral                     | 28         |
| 4.1. Amplificación del gen GFP                            | 35         |
| 4.2. Gen de GFP   | 36         |
| 4.3. Análisis de restricción del producto de PCR          | 36         |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.4.  | Clonación del gen GFP en el vector pGEM-T  | 37 |
| 4.5.  | Liberación de GFP del vector pGEM-T  | 38 |
| 4.6.  | Figura esquemática de la clonación del gen GFP en el vector pShuttle               | 39 |
| 4.7.  | Clonación del gen GFP en el plásmido pShuttle                                      | 39 |
| 4.8.  | Orientación de GFP dentro del vector pShuttle-GFP                                  | 40 |
| 4.9.  | UNITEX-GFP   | 42 |
| 4.10. | Subclonación de UNITEX-GFP en pAdenoX viral DNA                                    | 42 |
| 4.11. | Corroboración de la clonación pAd-GFP  | 43 |
| 4.12. | Figura esquemática de la clonación de UNITEX-GFP en el plásmido pAdenoX viral DNA. | 43 |
| 4.13. | Generación de pAd-GFP  | 44 |
| 4.14. | Transfección de pAd-GFP en células HEK-293   | 45 |
| 4.15. | Transfección de células HEK293 con el plásmido pCMV/myc/nuc/GFP                    | 46 |
| 4.16. | Transfección de células HEK293 con el plásmido pShuttle-GFP.                       | 46 |
| 4.17. | Infección de células HEK293 con el Adr-GFP   | 46 |

ADENOVIRUS RECOMBINANTE  
QUE EXPRESA EL GEN DE LA  
PROTEÍNA VERDE  
FLUORESCENTE (GFP)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

Los Adenovirus han sido utilizados en los últimos años como "vectores" para la transferencia y expresión de genes en diversos tipos celulares, órganos y organismos, ya que gracias al desarrollo de los métodos de Ingeniería Genética y de la Biología Molecular, ha sido posible desarrollar la tecnología que nos permite generar Adenovirus recombinantes (Adr). La aplicación de estos vectores como herramienta es muy diversa y va desde su uso en estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades como la fibrosis quística y de una variedad de tipos de cáncer, hasta su aplicación en la producción a gran escala de proteínas con interés farmacológico.

Por lo anterior se decidió construir un Adr que nos permita evaluar la eficiencia de infección (así como los niveles de expresión de otros genes) de este Sistema Adenoviral en distintos tipos celulares.

El Sistema Adenoviral recombinante (pAd-GFP) construido, permite la expresión de un gen reportero GFP que puede ser observado mediante microscopía de fluorescencia. La proteína codificada por el gen GFP es una proteína fluorescente que funciona como un excelente reportero ya que su fluorescencia puede ser detectable directamente en muchas especies diferentes sin tener que adicionar sustratos o cofactores.

*Karen Niño Flores*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El sistema pAd-GFP permite, generar partículas virales altamente infectivas pero deficientes en su replicación en células normales, por lo cual no generan progenie viral y por lo tanto, no inducen un efecto citopático. Una vez que el Adenovirus infecta a la célula blanco su genoma permanece en estado episomal y a partir de este se expresa exclusivamente el gen de GFP. Además este sistema tiene eliminadas aquellas secuencias que podrían participar en un evento de recombinación homóloga con el genoma celular.

El sistema pAd-GFP nos permite analizar cualitativa y cuantitativamente la expresión de GFP y con ello nos permite determinar con precisión la eficiencia de infección. Además de que nos permite optimizar las condiciones de infección, nos permitirá observar el tiempo de expresión del producto proteico del gen GFP después de la infección, cuanto tiempo permanece expresándose el gen y si la progenie celular expresará la proteína y si hay alguna alteración en la expresión de la proteína.





CAPITULO I  
INTRODUCCION

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **1.1 GENERALIDADES**

### **1.1.1 SISTEMAS DE TRANSFERENCIA Y EXPRESIÓN DE GENES**

En la actualidad se cuenta con sistemas que facilitan la introducción de genes específicos dentro de una célula, y que nos permiten controlar finamente su expresión. Estos sistemas constan de vectores, ya sea virales o plasmídicos, que incluyen además del gen de interés, genes marcadores y/o estructurales, el promotor transcripcional adecuado y otras secuencias reguladoras, etc.

Mediante este tipo de sistemas ha sido posible no solamente estudiar la función de algunas proteínas dentro de una célula, sino también dentro del organismo completo mediante la generación de organismos transgénicos. Este tipo de sistemas también han permitido inducir altos niveles de expresión para la producción a gran escala de proteínas con interés farmacológico.

### **1.1.2 VECTORES DE EXPRESIÓN**

Diversas herramientas de Biología Molecular han permitido generar una amplia gama de vectores con distintas características que son utilizados para generar proteínas recombinantes tanto en organismos procarióticos como eucarióticos.

*Loren Nieto Flores*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Para que estos vectores puedan expresar eficientemente genes específicos dentro de una célula, necesitan contener señales de transcripción y traducción que regulen la expresión de estos genes. Entre estas señales se encuentran distintos elementos como: Origen de replicación (ori), Promotores transcripcionales que son secuencias de ADN involucradas en la unión de la RNA polimerasa para iniciar la transcripción, (los promotores más utilizados para la construcción de vectores son los de origen viral, en la Tabla 1.1 se mencionan algunos ejemplos), Sitio Múltiple de clonación (SMC) (región del vector que contiene varios sitios de corte para distintas enzimas en donde podría ser clonado el gen de interés), Marcadores de resistencia para antibióticos (son genes que confieren la resistencia a bacterias o células de mamíferos, para crecer en medios de cultivo con antibióticos específicos como pueden ser ampicilina, kanamicina, gentamicina, estreptomycin, neomicina, etc).

**Tabla 1.1: Promotores utilizados**

| PROMOTOR                        |        |
|---------------------------------|--------|
| Citomegalovirus                 | (CMV)  |
| Virus de tumor mamario de ratón | (MMTV) |
| Virus de la leucemia murina     | (MuLV) |
| Virus del sarcoma de Rous       | (RSV)  |
| Virus del simio                 | (SV40) |

### 1.1.3 MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DE VECTORES DE EXPRESIÓN

Existe una gran variedad de métodos de transfección, desde aquellos que utilizan reacciones químicas en donde se forman complejos con el DNA, otros en los que el DNA es "inyectado" dentro de la célula por medio de procedimientos físicos, o hasta la utilización de virus defectivos en la tabla 1.2. se mencionan algunos de estos métodos. Todos estos métodos ya han sido estudiados y manejados en distintos tipos celulares, por lo que ahora se conoce la eficiencia y ventajas de cada uno de ellos para algunas líneas celulares.

**Tabla 1.2: Métodos de transferencia de genes**

| MÉTODOS DE TRANSFERENCIA                           | PRINCIPIO  | CARACTERÍSTICAS   |
|--|--|---|
| <b>MÉTODOS QUÍMICOS</b>                            |  |   |
| - Precipitación con fosfatos<br>*CaPO <sub>4</sub> | Reacción química que permite la formación de cristales microscópicos de DNA/CaPO <sub>4</sub> que son fagocitados por las células.                   | Se observa mayor eficiencia con células adherentes.   |
| - Liposomas  | Los liposomas son vesículas de fosfolípidos que encapsulan al DNA y que se fusionan con la membrana celular para liberar el DNA dentro de la célula. | Se observa mayor eficiencia con células adherentes.   |
| <b>MÉTODOS FÍSICOS</b>                             |  |   |
| - Electroporación                                  | Las células son expuestas a un impulso eléctrico para permeabilizar la membrana celular y permitir que el DNA pueda entrar a la célula.              | Utilizados principalmente en células en suspensión. Han sido usados para la transfección de fibroblastos y células epiteliales. |
| <b>MÉTODOS VIRALES</b>                             |  |   |
| - Virus Recombinantes                              | El gen de interés es liberado en forma de virus defectivo, encapsulado con una envoltura vírica, que incrementa la eficiencia de la transfección.    | Se ha infectado en muchos tipos de células de mamífero.   |

### 1.1.4 GENES REPORTEROS

Existen diversos genes reporteros que permiten el monitoreo de los genes transfectados en las células. En la tabla 1.3 se mencionan algunos ejemplos de genes reporteros. La  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) y  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) son genes reporteros que permiten teñir a las células transfectadas. Otros como la luciferasa (Luc), cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) y la fosfatasa alcalina (AP) han sido utilizados para determinar la eficiencia de transfección, y más recientemente, se ha utilizado GFP, como gen reportero debido a sus características que serán mencionadas más adelante (Zhang, 1996).

**Tabla 1.3: Genes reporteros**

| Gen reportero                          | Detección  |
|--|--|
| $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) | Espectrofotométrica y fluorimétrica  |
| $\beta$ -glucuronidasa (GUS)           | Espectrofotométrica, fluorimétrica e histoquímica                            |
| cloramfenicol acetiltransferasa (CAT)  | Cromatografía en capa fina y cuantificación de la radioactividad incorporada |
| proteína verde fluorescente (GFP)      | Espectrofotométrica y fluorimétrica  |
| Luciferasa (Luc)                       | Espectrofotométrica  |

## 1.2 PROTEINA VERDE FLUORESCENTE

### 1.2.1 ESTRUCTURA

El gen de GFP (aislado de la medusa *Aequorea victoria*) fue clonado y secuenciado en 1992, y codifica para una proteína de 238 aminoácidos que presenta un peso molecular de entre 27 kD y 30 kD (Chalfie, 1994., Yang, 1996) (figura 1.1). El gen ha sido expresado en una gran variedad de especies, incluyendo bacterias, plantas, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, pez zebra, mamíferos, etc.

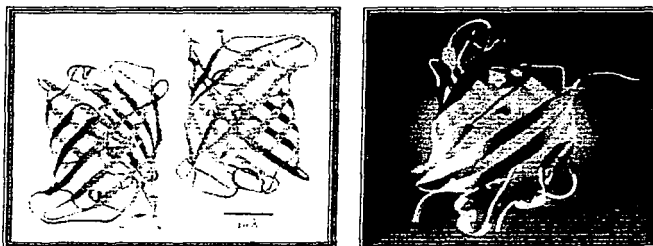


Figura 1.1. Estructura de la proteína verde fluorescente (GFP). La estructura de GFP tiene forma de cilindro, por lo que se le ha denominado a su estructura, Barril- $\beta$ , está constituida por 11 cadenas antiparalelas  $\beta$  en forma de hojas y en los extremos del cilindro se aprecian  $\alpha$ -hélices cortas (Yang, 1996).

### 1.2.2 PROPIEDADES

Como se observa en la figura 1.2. GFP puede ser excitada con luz UV o luz azul (395nm) y presenta la capacidad de emitir fluorescencia verde (509nm), que

puede ser analizada mediante microscopía de fluorescencia, espectrofotometría y citometría de flujo, además de la gran estabilidad de la fluorescencia, no se requiere de ningún sustrato o cofactor (Chalfie, 1995).

Debido a estas características, GFP es una proteína altamente atractiva para el uso en Biología Molecular como gen marcador.

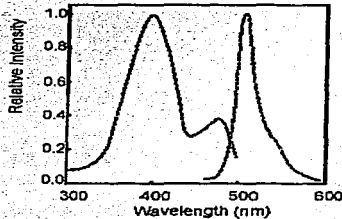


Figura 1.2. Espectro de absorción y emisión de GFP (Chalfie, 1995).

La capacidad de fluorescencia de GFP está mediada por una secuencia de aminoácidos (Ser-Tyr-Gly), que mediante un proceso de ciclización forman la estructura del fluorocromo, como se observa en la figura 1.3. El fluorocromo se encuentra en el interior de la estructura de GFP, por lo que está protegido del medio que rodea a la proteína, lo que explica la gran estabilidad de la fluorescencia de GFP y su resistencia a la desnaturalización.

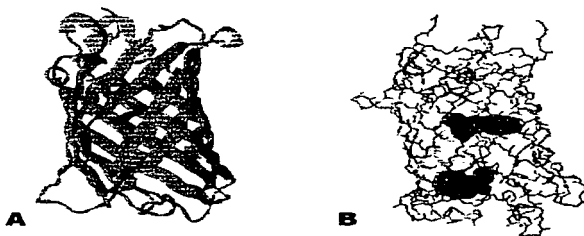


Figura 1.3. Localización del fluorocromo en la estructura de GFP. A) de rojo se observa el fluorocromo el cual está protegido en el interior del cilindro y de azul las cadenas  $\alpha$  helíce, B) se observa de azul Trp57, el fluorocromo de rojo y de amarillo Phe64 y Phe46 (Ormó , 1996).

El fluorocromo (ver figura 1.4.) es una *p*-hydroxybenzylideno-imidazolidona que consiste de residuos Ser - *dehydro*Tyr - Gly, (Cody 1993). La ciclización de estos residuos forma el anillo de imidazolinona. La formación del fluorocromo se lleva a cabo mediante dos pasos: El primer paso es el ataque nucleofílico del grupo amino de la Gly67 con el grupo carbonilo de Ser65, subsecuentemente la eliminación de una molécula de agua resulta en la formación de un anillo imidazolidinona. En el segundo paso el puente C <sup>$\alpha$</sup> -C <sup>$\beta$</sup>  de Tyr66 es oxidado y cuando es excitado (395nm) emite la fluorescencia (Ormó , 1996).

Con lo anterior se puede deducir que la expresión de GFP recombinante es posible debido a que en la formación del fluorocromo no requiere ninguna enzima específica de *A. victoria*.



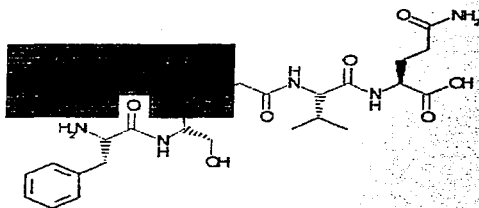


Figura 1.4. Estructura del fluorocromo de GFP (representado con el cuadro verde) (Prasher, 1992).

### 1.2.3 APLICACIONES

Las aplicaciones que se le han dado a GFP recombinante son muy diversas, a continuación se mencionan algunas de ellas:

1. Determinación de la eficiencia de transfección, infección, etc.
2. Análisis de actividad de promotores y de diversas secuencias de ADN reguladoras de la transcripción como potenciadores y silenciadores, etc. Así mismo, se ha analizado el efecto de algún factor de transcripción sobre la actividad de algún promotor o secuencia específica de ADN.
3. Análisis del efecto de una secuencia peptídica específica como señal de localización intracelular, etc.

### 1.3 ADENOVIRUS

Los Adenovirus (Figura 1.5) se aislaron y caracterizaron al estudiar el origen de muchas enfermedades del tracto respiratorio superior a mediados del siglo XX. Los nombres iniciales con que les denominaron los investigadores reflejan este tropismo hacia el tracto respiratorio: *Adenoid Degeneration* (AD), *Respiratory Illness* (RI), *Adenoidal-Pharyngeal-Conjunctival* (APC) o *Acute Respiratory Disease* (ARD) *agents*. El prefijo Adeno- proviene del tejido a partir del cual fueron aislados por primera vez, es decir, el tejido glandular adenoide.



Figura 1.5. Micrografía de Adenovirus.

Los Adenovirus también están asociados con infecciones del tracto intestinal e infecciones en los ojos. Muchas infecciones son persistentes y pueden ser reactivadas por episodios de inmunosupresión (White,1994). Estos virus también provocan diversos trastornos en los animales y pueden transformar células normales en tumorales.

En 1962 se descubrió que el Ad-12 inducía la formación de tumores malignos tras su inoculación en hámsters recién nacidos. Esa fue la primera vez que un virus humano mostró capacidad oncogénica. A pesar de su habilidad inductora de tumores *in vitro* y de transformación de cultivos celulares, no se ha demostrado que los Adenovirus causen cáncer en el ser humano, aunque sí existe un informe que vincula a un RNA relacionado con los Adenovirus con tumores neurogénicos. Los intentos por encontrar genoma Adenovirico en tumores humanos han fracasado. Esta capacidad tumorigénica ha determinado que los Adenovirus sean considerados como importantes modelos para ensayos sobre oncogénesis. Los estudios de las células infectadas por Adenovirus han contribuido al conocimiento sobre la expresión y regulación genética virales, la replicación, el control del ciclo celular y la regulación del crecimiento celular. La contribución más destacable de este grupo de virus fue el descubrimiento del proceso de procesamiento (splicing) del RNAm, ya que los estudios del RNAm Adenoviral revelaron la existencia de los intrones.

### 1.3.1 CLASIFICACIÓN

Los Adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae*, la cual se divide en los géneros *Mastadenovirus* y *Aviadenovirus*. El género de los *Aviadenovirus* se limita a virus de aves, mientras que el género *Mastadenovirus* incluye virus de humanos, de simios, ovinos, bovinos, equinos, porcinos, caninos y de marsupiales pequeños.

*Loren Nieto Flores*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 1.3 ADENOVIRUS

Los Adenovirus (Figura 1.5) se aislaron y caracterizaron al estudiar el origen de muchas enfermedades del tracto respiratorio superior a mediados del siglo XX. Los nombres iniciales con que les denominaron los investigadores reflejan este tropismo hacia el tracto respiratorio: *Adenoid Degeneration* (AD), *Respiratory Illness* (RI), *Adenoidal-Pharyngeal-Conjunctival* (APC) o *Acute Respiratory Disease* (ARD) *agents*. El prefijo Adeno- proviene del tejido a partir del cual fueron aislados por primera vez, es decir, el tejido glandular adenoide.



Figura 1.5. Micrografía de Adenovirus.

Los Adenovirus también están asociados con infecciones del tracto intestinal e infecciones en los ojos. Muchas infecciones son persistentes y pueden ser reactivadas por episodios de inmunosupresión (White,1994). Estos virus también provocan diversos trastornos en los animales y pueden transformar células normales en tumorales.

Hasta el momento se conocen 49 serotipos de **Adenovirus humanos**, los cuales han sido distinguidos en base a su resistencia a la neutralización por un antisuero de otro serotipo de Adenovirus conocido. Estos 49 serotipos están clasificados dentro de 6 subgrupos, y esta clasificación está basada en su habilidad para aglutinar eritrocitos, por lo que una de las clasificaciones de los **Adenovirus humanos** es la siguiente:

**Tabla 1.4: Clasificación de Adenovirus**

| SUBGRUPO | SEROTIPO   |
|----------|--|
| A        | 12, 18, 31   |
| B        | 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35                                       |
| C        | 1, 2, 5, 6   |
| D        | 8, 9, 19, 37, 10, 13, 15, 17, 20, 22, 30, 32, 33<br>36, 39, 42, 49 |
| E        | 4  |
| F        | 40, 41   |

### 1.3.2 MORFOLOGÍA VIRAL

Los Adenovirus carecen de envoltura pero presentan una cápside icosaédrica (20 superficies triangulares y 12 vértices) con un diámetro de 70 a 100 nm (ver figura 1.6.). La cápside esta compuesta de 252 capsómeros, de los cuales 240 son hexones y 12 son pentones. Cada penton contiene una proteína base (pentona base) que forma parte de la superficie de la cápside, de la cual se proyecta una fibra que permite la unión con la célula blanco (Shenk, 2001).

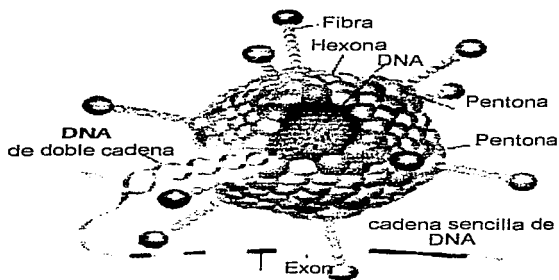


Figura 1.6. Estructura de Adenovirus. Representación esquemática de una partícula viral de Ad donde se muestran las principales unidades estructurales de la cápside

Además de las proteínas encontradas en la cápside del Ad, existen otras proteínas virales menores que juegan un papel importante en el ensamblamiento de la cápside y el empaquetamiento del cromosoma viral. En la Tabla 1.5. se mencionan algunas proteínas de este tipo con su respectiva función, y en la figura 1.7. se muestra una representación esquemática de un corte transversal de la estructura del Ad, señalando la localización de algunas de estas proteínas virales.

Tabla 1.5: Función y localización de algunas proteínas virales

| Nombre | Localización                                    | Funciones conocidas                                      |
|--------|---|--|
| II     | Monómero hexamérico                             | Estructural  |
| III    | Base pentamérica                                | Penetración  |
| IIIa   | Asociada con la base pentamérica                | Penetración  |
| IV     | Fibra   | Unión al receptor celular                                |
| V      | Core: asociado con el DNA y la base pentamérica | Como Histona; empaquetamiento                            |
| VI     | Polipéptido menor hexomérico                    | Estabilización de la cápside, ensamblado de la partícula |
| VII    | Core  | Como Histona   |
| VIII   | Polipéptido menor hexomérico                    | Estabilización, ensamblado de la partícula               |
| IX     | Polipéptido menor hexomérico                    | Estabilización de la cápside, ensamblado de la partícula |
| PT     | Genoma -- proteína terminal                     | Replicación del genoma                                   |

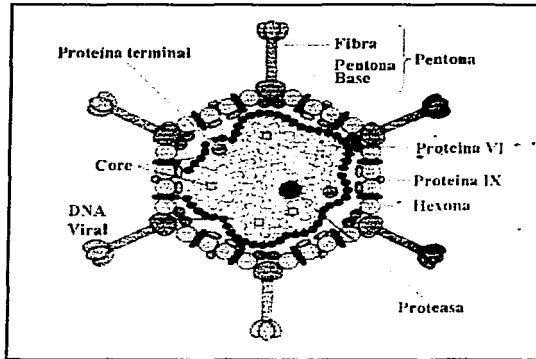


Figura 1.7. Representación esquemática de un corte transversal de una partícula viral de Ad donde se muestran además de las proteínas de la cápside (hexonas y pentonas), proteínas adicionales (por ej. VI y IX) que estabilizan la cápside y proteínas del core viral (V, VII y IX) que se encuentran asociadas con DNA viral, el cual presenta en su extremo 5' a la proteína terminal (PT) (Flint, 2000).

### 1.3.3 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

El genoma de Ad5 es una molécula de DNA lineal de doble cadena de aproximadamente 36 Kb, que se encuentra asociado con diversos polipéptidos virales que lo condensan dentro de la cápside en una estructura semejante a la cromatina (Yeh, 1997). Este genoma codifica para 8 transcritos que son clasificados como tempranos (representados con la letra E) y tardíos (representados como L) dependiendo de su momento de expresión con respecto al ciclo de replicación viral (Yeh, 1997). En la figura 1.8. se muestra esquemáticamente la organización del genoma de Adenovirus .

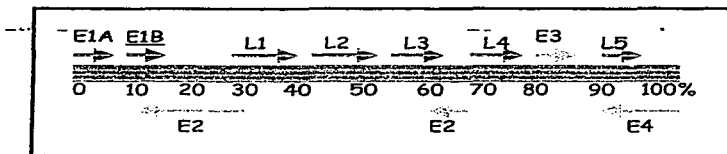


Figura 1.8. Representación esquemática de la organización del genoma de Adenovirus (Flint 2000).

### 1.3.4 CICLO REPLICATIVO DE ADENOVIRUS HUMANO

El ciclo replicativo se divide por convención en dos fases que son separadas por el inicio de la replicación del genoma viral. La **fase temprana** comienza tan pronto como el virus interactúa con la célula hospedera. Estos eventos incluyen la adsorción del virus, la penetración, el movimiento del genoma viral al núcleo y la expresión de genes tempranos. Las proteínas de expresión temprana regulan la replicación del genoma viral, controlan la progresión del ciclo celular de células en reposo e inducen un arresto en la fase S, inhiben la vía de la apoptosis y evaden la respuesta antiviral de la célula y/o organismo. La **fase tardía** inicia con la expresión de los genes tardíos y culmina con el ensamblamiento y liberación de los viriones.

#### 1.3.4.1 Eventos tempranos de la infección

El adenovirus se une a la célula humana permisiva mediante la interacción de la fibra con el receptor adenoviral de la superficie celular CAR (Ad2) (Receptor



de Coxsackievirus y Adenovirus) ó mediante su unión al dominio  $\alpha 2$  de las moléculas del MHC-I (Ad5) (Wang, 2000). Posteriormente, la interacción de la proteína base del penton con los receptores de superficie celular  $\alpha 3\beta 3$  y  $\alpha 3\beta 5$  promueve la endocitosis del virus mediada por vesículas cubiertas de clatrina (Flint, 2000; Yeh, 1997; Wang, 2000). En el endosoma temprano se lleva a cabo una degradación parcial conocida como desnudamiento para liberar la núcleo-partícula viral que migra hacia el núcleo a través del complejo del poro nuclear. Esta núcleo-partícula viral se encuentra asociada con la proteína VII, que dirige al genoma viral a sitios específicos de la matriz nuclear donde se inicia la transcripción de los genes virales.

Las 3 metas principales de la expresión de los genes tempranos son:

1. Inducir a la célula hospedera a entrar y permanecer en la fase S del ciclo celular, para que se lleve a cabo la replicación viral.
2. Activar los mecanismos que protegen a la célula infectada contra la respuesta antiviral del organismo.
3. Sintetizar las proteínas virales necesarias para la replicación del genoma viral.

El gen E1A se expresa inmediatamente después de que el genoma viral llega al núcleo celular, codifica para dos proteínas de fase temprana (12S y 13S) que se unen a proteínas celulares y modulan su función para controlar la progresión del

ciclo celular, inducen la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular en células en reposo y mantienen a la célula hospedera arrestada en la fase S, en la cual existen todos los elementos necesarios para llevar a cabo la replicación del genoma viral. Además, E1A controla la expresión de los genes E1B, E2A, E3 y E4 (Shenk, 2001; Fernández,1999). La eliminación del gen E1A bloquea gran parte de la expresión de genes virales, así como la síntesis del DNAv, pero se pueden generar viriones deficientes en la replicación. Esta eliminación ha sido ampliamente utilizada en la tecnología de los vectores adenovirales (Fernández,1999). E1B contribuye a la activación de células en reposo al evitar el arresto del ciclo celular e inhibir la apoptosis dependiente de p53, ya que codifica para dos proteínas (55kd y 19 kd) que secuestran y reprimen la función y expresión del antioncogen p53 (Shenk, 2001; Fernández,1999). El gen E2A codifica para distintas proteínas que están involucradas en la replicación del DNAv, que incluyen a la DNA polimerasa viral, al precursor de la proteína terminal (TP) y a la proteína que se une a DNA de cadena sencilla (ssDNA). El gen E4 codifica para una ó más proteínas que son necesarias para la replicación eficiente del DNAv. Esta proteína de 35Kd, forma un complejo con E1B (55 Kd) regulando el transporte de los mRNA's virales del núcleo al citoplasma mientras bloquea el transporte de los mRNA's celulares (Shenk, 2001). A diferencia de los demás genes de expresión temprana, los productos protéicos del gen E3 no son requeridos para la replicación del virus en cultivos celulares (Fernández, 1999), y en cambio están involucrados en evadir la respuesta inmune antiviral.

El gen E3 codifica para una proteína de 19 kd que disminuye el transporte de moléculas MHC-I a la superficie de una célula infectada y reduce la respuesta inflamatoria. Dado que el gen E3 no es necesario para la generación de viriones, esta secuencia se puede deletar y sustituir por un gen que permanece aún bajo el control del promotor del gen E3 en la generación de adenovirus recombinantes (Fernández, 1999).

#### **1.3.4.2 Eventos tardíos de la infección**

Los genes que codifican para las principales proteínas estructurales del virión, como son los constituyentes de los hexones, pentones y fibras, están bajo el control del promotor tardío principal (MLP) que genera un gran transcrito primario. Después de que ha concluido la síntesis del DNA, el MLP es fuertemente activado y el transcrito policistrónico es editado en mRNA's que codifican las distintas proteínas estructurales. Tres pequeños exones (TPL: "tripartite leader") son editados en el extremo 5' de todos los mRNAs tardíos virales, lo que asegura que se traduzcan preferencialmente los mRNAs virales sobre los mRNAs celulares, para generar altos niveles de proteínas virales estructurales. Estos elementos también han sido utilizados en la tecnología de los Adenovirus recombinantes para expresar altos niveles de proteínas (Fields, 1996; Fernández, 1999). Posteriormente se lleva a cabo el ensamblamiento de las partículas virales en el núcleo y son liberados mediante lisis celular, una célula puede producir 1000 o más viriones.

#### **1.4 VECTORES ADENOVIRALES**

Existen diversos protocolos para desarrollar Adenovirus recombinantes (Adr), desde aquellos que presentan una expresión constitutiva del transgen de interés hasta los que presentan una expresión inducible y finamente controlada.

**El sistema de expresión Adeno-X (CLONTECH, Cat. K1650-1) ofrece un método para construir Adenovirus recombinantes, mediante el uso de técnicas básicas de Biología Molecular.**

El proceso completo consiste de 3 etapas:

1. Generar una unidad de expresión mediante la clonación del gen de interés en el plásmido pShuttle.
2. Transferir la unidad de expresión al plásmido pAdeno-X.
3. Transfectar en la línea de células embrionarias de riñón humano "HEK 293" para generar a los adenovirus recombinantes.

Los Adenovirus recombinantes son cosechados al colectar el medio de los cultivos HEK 293 transfectados.

Para clonar el gen de interés y producir Adenovirus que no se replican, grandes porciones de los genes E1 ( $\Delta 342-3528$ ) y E3 ( $\Delta 27865-30995$ ) han sido deletadas del genoma de Ad5 de tipo silvestre. Ya que el gen E1 se ha eliminado,

*Lavem Nieto Flores*

se requiere de la línea celular HEK 293 para propagar a los Adr derivados de pAdeno-transgen. Esta línea celular expresa a las proteínas del gen E1 que son esenciales para la replicación y transcripción del pAdeno-transgen, este plásmido contiene el resto de la información necesaria para producir partículas virales completamente funcionales pero deficientes en la replicación.

Este sistema genera Adr que se propagan únicamente en aquellos tipos celulares que expresan a las proteínas codificadas por E1, para todos los demás tipos celulares susceptibles a la infección, el Adr genera una infección transitoria no citopática, donde el genoma viral se mantiene como un episoma dentro del núcleo celular (no se integra en el genoma celular), y no se replica ni se transcribe ningún producto viral ya que la célula carece de los factores de transcripción necesarios (productos del gen E1). Sin embargo, el gen de interés se expresa en altos niveles ya que se encuentra bajo el control del promotor constitutivo de Citomegalovirus (P<sub>CMV-IE</sub>) cuya actividad es independiente de la proliferación de la célula hospedera y tampoco depende de la presencia de cualquier otro producto viral.

Los Adenovirus son capaces de infectar un amplio rango de células en reposo y en proliferación de diferentes especies animales incluyendo al humano, primates, cerdos, ratones y conejos (ver tabla 1.6). Diversos reportes sugieren que casi todos los tipos celulares de humano -incluyendo piel, músculo, cerebro, hueso, nervio, hígado, etc.- son susceptibles a la infección por Ad.

**Tabla 1.6: Especies animales no humanas infectadas por Adenovirus.**

| TRANSFERENCIA DE GENES MEDIADA POR ADENOVIRUS EN ESPECIES NO HUMANAS |  |
|--|--|
| ESPECIES   | REFERENCIAS                            |
| Pollo  | Fisher & Watanabe, 1996                |
| Perro  | Fang, 1996                             |
| Mono   | Bout, 1994                             |
| Ratón  | Lee, 1996; Stratford-Perricaudet, 1990 |
| Cerdo  | French, 1994                           |
| Conejo   | Donahue, 1998; Riew, 1998              |
| Rata   | Mastrageli, 1993                       |
| Oveja  | Holzinger, 1995                        |



# CAPITULO 2 OBJETIVOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Generar un Adenovirus recombinante que permita expresar mediante su infección en células permisivas, al gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP).

## **2.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. A partir del plásmido pCMV/myc/nuc/GFP (invitrogen) clonar el gen GFP en el plásmido pShuttle para generar una unidad de expresión.
2. Subclonar la unidad de expresión en el vector pAdeno-X viral DNA.
3. Transfectar la construcción pAd-GFP en la línea celular HEK-293 para generar los adenovirus recombinantes que expresan a la proteína GFP
4. Infectar un cultivo celular con el Ad-GFP recombinante y determinar la expresión de la proteína GFP.



### **2.3 PROBLEMA**

Diseñar y construir un sistema Adenoviral que permita mediante la expresión de un gen reportero, analizar la eficiencia de infección, en diversas líneas celulares y cultivos primarios, con el fin de tener una herramienta para el uso de Adenovirus recombinantes

### **2.4 JUSTIFICACIÓN**

La construcción de este sistema Adenoviral tendrá la aplicación de:

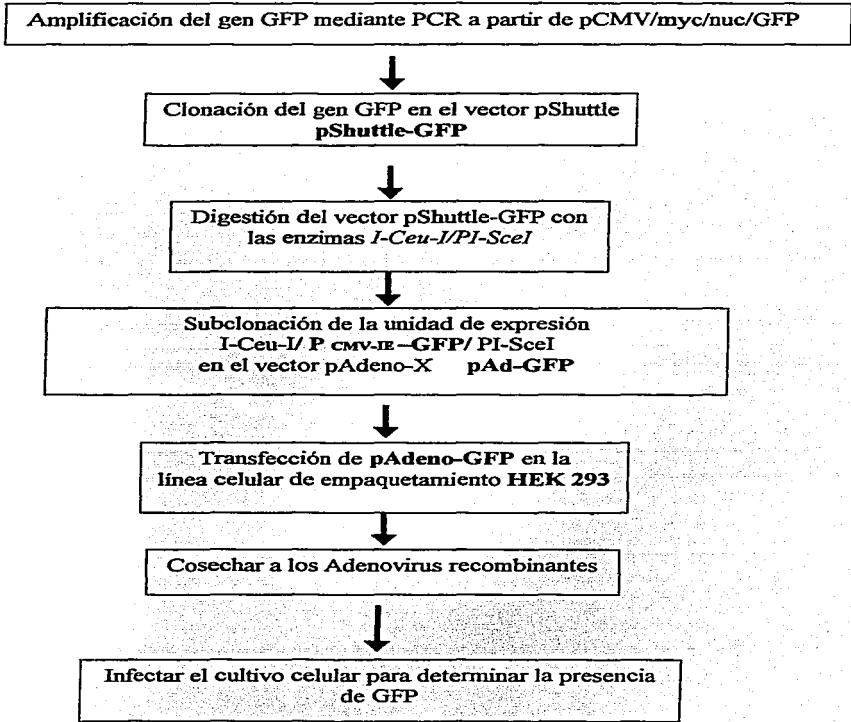
1. Determinación de la eficiencia de infección en líneas celulares.

Existen varias razones por las cuales se eligió esta metodología de "Adenovirus recombinantes" como sistema de transferencia y expresión de genes:

1. Es uno de los modelos virales más ampliamente estudiados y por lo tanto uno de los más conocidos, de tal manera que la tecnología para generación de Adenovirus recombinantes se encuentra muy desarrollada.
2. Con los sistemas actuales se pueden generar Adenovirus recombinantes que no se replican, por lo tanto no generan progenie viral. Además de que no presentan efecto citopático.

3. El genoma Adenoviral permanece en estado episomal, es decir no se integra en el genoma celular y solamente se expresa el gen de interés por un intervalo de entre 1 y 3 meses. Además de que en este sistema se han removido aquellas secuencias que podrían participar en un evento de recombinación homóloga con el genoma celular.
  
4. Por lo tanto este sistema nos permite cuantificar y determinar visualmente la eficiencia de infección en células primarias ó células transformadas, optimizar las condiciones de infección, permitirá observar el tiempo de expresión de la proteína despues de la infección, si la progenie celular expresará la proteína, por cuanto tiempo y si hay alguna alteración en la expresión de la proteína.

## 2.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Karen Nieto Flores

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



CAPITULO 3  
MATERIAL  
Y  
METODOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**PLÁSMIDOS**

**pCMV/myc/nuc/GFP (Invitrogen):** Plásmido que contiene el gen de GFP.

**pGEM-T (Promega):** Plásmido utilizado para clonar productos de PCR. Contiene en ambos extremos 3' del vector una timidina, lo que permite la eficiente ligación de productos de PCR que tienen en sus extremos adeninas adicionales. En la figura 3.1. se muestra el mapa correspondiente a este plásmido.

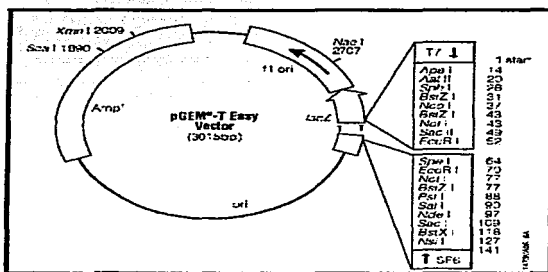


Figura 3.1. Mapa del plásmido pGEM-T.

**pShuttle (Clontech):** Vector del sistema Adenoviral, que contiene al promotor pCMV para expresar constitutivamente niveles elevados del gen de interés.

En este se clonará el gen GFP, para generar y liberar la unidad expresión. Presenta resistencia al antibiótico kanamicina, se observa su mapa en la figura 3.2.

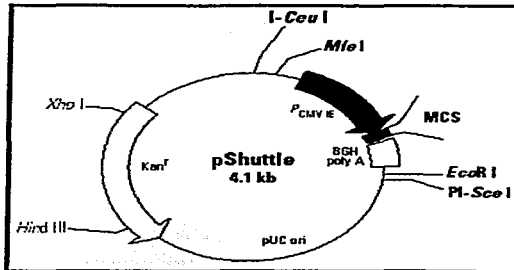


Figura 3.2. Mapa del plásmido pShuttle.

**pAdeno-X viral (Clontech):** Plásmido que contiene el genoma de Ad5, con la región E1 y E3 deletadas, con resistencia al antibiótico ampicilina, su mapa se observa en la figura 3.3.

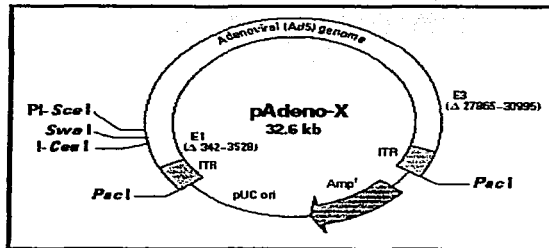


Figura 3.3. Mapa del plásmido pAdeno-X.

## OLIGONUCLEOTIDOS

En la siguiente tabla se muestran las secuencias de oligonucleótidos que fueron utilizados para amplificar al gen GFP a partir del plásmido pCMV/myc/nuc/GFP.

| OLIGONUCLEOTIDOS                         |  |
|--|--|
| <b>GFPnuc-S</b><br>sentido (5'-3')       | GAG AGG GCC CGC CAC CAT GGC TAG CAA AGG AGA AGA AC |
| <b>GFPnuc-as</b><br>Anti-sentido (3'-5') | CTG TGG TAC CCT AGC GGC CGT ATC TAC CTA CCT TT     |

## REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)

La PCR es un método rápido y simple para copiar y amplificar secuencias específicas de DNA de hasta 1Kb de longitud. Para utilizar este método, es necesario conocer la secuencia de una región corta de DNA en cada extremo de la secuencia de mayor tamaño que se quiere copiar; estas secuencias cortas se utilizan para especificar cebadores de oligonucleótidos. El método consiste en realizar ciclos repetidos de separación de las cadenas de ADN, asociación y síntesis.

El DNA de doble cadena que contiene la secuencia que se va a copiar y amplificar se mezcla con un gran exceso molar de dos oligonucleótidos de DNA de cadena sencilla (los cebadores). El primer cebador es idéntico al extremo 5' de la cadena

sentido del DNA que se va a copiar y el segundo es idéntico a la cadena antisentido en el extremo 3'.

La reacción se inicia separando la doble cadena de DNA a alta temperatura y enfriando la mezcla para permitir la asociación del DNA. Durante la asociación, el primer cebador se hibridará con el extremo 3' de la cadena antisentido y el segundo cebador se hibridará con el extremo 3' de la cadena sentido. La mezcla fría se incuba con la DNA polimerasa I y los cuatro dNTP's permitiendo la síntesis de un nuevo DNA.

**CONDICIONES DE PCR PARA AMPLIFICAR GFP**

| REACTIVOS                               | CANTIDAD                                  |
|---|---|
| DNA templado (pCMV/myc/nuc/GFP)         | 100 ng                                    |
| dNTP's                                  | 100 µM                                    |
| MgCl <sub>2</sub>                       | 2,5 mM                                    |
| Oligonucleotido sentido (GFPnuc-S)      | 1 µM                                      |
| Oligonucleotido antisentido (GFPnuc-as) | 1 µM                                      |
| Enzima Taq polimerasa                   | 1 µ                                       |
| Buffer de Taq polimerasa 10x            | 1x  |
| H <sub>2</sub> O                        | Suficiente para un volumen final de 25 µl |

**PERFIL TERMICO**

1. Desnaturalización del DNA      95°C durante 8 min.
2. Amplificación del DNA
 

|  |   |          |
|--|---|----------|
| a)95°C durante 30seg<br>b)64°C durante 45seg<br>c)72°C durante 45seg | } | 30ciclos |
|--|---|----------|
3. Extensión de la amplificación      72°C durante 10min.



## **CULTIVO CELULAR**

La línea celular HEK-293 (células embrionarias de riñón humano) (Clontech) son células transformadas con los genes adenovirales E1A y E1B, requeridos para la propagación del Adenovirus.

La línea celular se cultiva a 37°C en atmósfera húmeda, 5% de CO<sub>2</sub>, con medio DMEM (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50 u/ml de penicilina G, 50 µg/ml de estreptomycin y 4mM de L-Glutamina.

La línea celular C33-A se cultiva a 37°C en atmósfera húmeda, 5% de CO<sub>2</sub>, con medio DMEM-F12 (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50 u/ml de penicilina G, 50 µg/ml de estreptomycin y 4mM de L-Glutamina.

## **TRANSFECCIÓN TRANSITORIA**

Se siembran 1x10<sup>6</sup> células HEK-293 en cajas p60 (60mm de diámetro), cuando se presenta una confluencia de entre 50 y 70%, se transfectan con Lipofectamina (Invitrogen), 30min antes de la transfección se cambia el medio de cultivo, con medio mínimo esencial (OPTIMEM) y 6hrs post-transfección se realiza otro cambio de medio de cultivo, con medio de mantenimiento (DMEM suplementado con 1.5% de suero fetal bovino, 50 u/ml de penicilina G, 50 µg/ml de estreptomycin y 4mM de L-Glutamina).

### **PROPAGACIÓN DE PLÁSMIDOS**

Utilizando bacterias competentes *E. coli* (DH5 $\alpha$ ), se adicionan 100ng del plásmido en cuestión a una alícuota de 200 $\mu$ l de bacterias competentes. Se incuban 20min en hielo, se aplica un choque térmico de 1½ min a 42°C e inmediatamente después se incuban 2min en hielo. Estas células se cultivan en placas de medio LB con el antibiótico adecuado y solamente las bacterias que incorporaron el plásmido presentan la resistencia que les confiere éste. Se seleccionan las colonias resistentes al antibiótico específico.

### **PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS**

El DNA plasmídico se purifica a través del método de lisis alcalina, mediante una solución de fenol:cloroformo 24:1, y centrifugaciones posteriores, siguiendo el protocolo de CLONTECH, Cat. K1650-1.

### **COSECHA DEL VIRUS**

Los ADR se cosechan cuando los cultivos presentan un efecto citopático claro. Se colecta el medio de cultivo (sobrenadante) y la monocapa celular, lisando las células para liberar a los viriones mediante tres ciclos de congelamiento-descongelamiento (hielo seco-37°C). Posteriormente se colecta la fracción soluble que contiene a las partículas virales. Este stock viral se suplementa con MgSO<sub>4</sub> 100mM y se almacena a -70°C.

*Raven Nieto Flores*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

### **INFECCIÓN VIRAL**

Se infecta un cultivo de células C33-A (80-90% de confluencia) con el 10% del stock viral durante 30min a 37°C en atmósfera húmeda, 5% de CO<sub>2</sub>, y con agitación suave. Posteriormente se adicionan 4ml de medio de cultivo DMEM-F12 (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50 u/ml de penicilina G, 50µg/ml de estreptomina y 2mM de L-Glutamina.

### **ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA**

Se analizan las células infectadas con el virus, mediante microscopía de fluorescencia, en un microscopio Marca Leica, modelo Diastar.



# CAPITULO 4 RESULTADOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pShuttle-GFP

- AMPLIFICACIÓN DEL GEN GFP

A partir del plásmido pCMV/myc/nuc/GFP amplificamos al gen GFP mediante PCR y analizamos el producto mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, encontrando un producto específico cercano a 900 pb que corresponde al tamaño del gen de GFP esperado (figura 4.1).

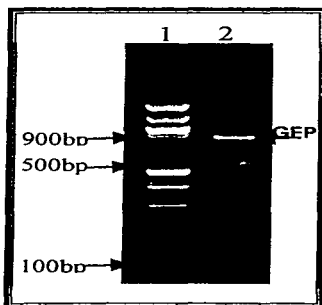
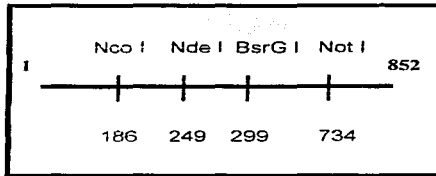


Fig.4.1: Amplificación del gen GFP. Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. Carriles:  
1) Marcador de peso molecular de 100pb, 2) Producto de PCR, fragmento correspondiente a GFP.

Para corroborar que el producto amplificado corresponde al gen GFP, el fragmento amplificado se caracterizó mediante análisis de restricción, utilizando las enzimas *BrsG I*, *Not I*, *Nco I* y *Nde I*. En la figura 4.2 se muestran los sitios de corte de estas enzimas dentro del gen de GFP, y en la figura 4.3 se muestran los productos de la digestión correspondientes a cada una de las restricciones.

## Resultados



| ENZIMA        | Tamaño de los productos de digestión (bp) |
|---------------|---|
| Nde I y Nco I | 603                                       |
|               | 186                                       |
| BsrG I        | 553                                       |
|               | 299                                       |
| Not I         | 734                                       |
|               | 118                                       |

Fig.4.2: Gen GFP (852bp). En la izquierda se muestran los sitios de corte de las enzimas Nde I, Nco I, BsrG I y Not I dentro del gen GFP, en la derecha se muestra una tabla que nos indica el número y el tamaño de las bandas generadas por la restricción del gen GFP.

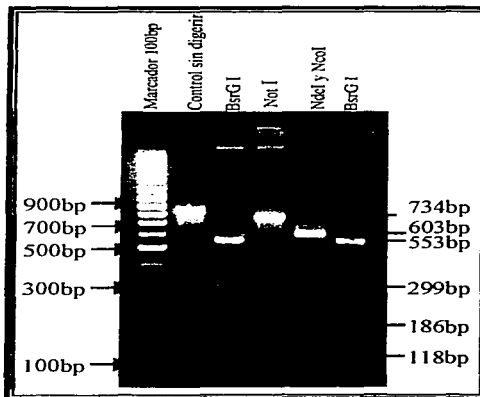


Fig.4.3: Análisis de restricción del producto de PCR (GFP). Gel de agarosa al 2,5% teñido con Bromuro de Etidio.

Debido al porcentaje del gel y al corrimiento para observar las bandas de mayor tamaño, no es posible observar el fragmento correspondiente a 63 bp en la digestión con las enzimas Nde I y Nco I. Sin embargo se observan las bandas de 603 y 186 bp.

#### • CLONACIÓN DE GFP EN EL VECTOR pGEM-T

La enzima Taq polimerasa tiene la propiedad de adicionar una Adenina (A) al inicio y final del producto amplificado, independientemente del templado de tal forma que la A sin aparearse nos permite clonar productos de PCR (independientemente de su secuencia) en un vector pGEM-T, que se encuentra lineal y posee en sus extremos una Timidina (T) sin aparearse.

Realizamos la reacción de ligación, de GFP con pGEM-T, utilizando una proporción 4:1 (Inserto:Vector), en un volumen de 10ul e incubación toda la noche a 4°C. Transformamos bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  y seleccionamos las colonias resistentes a ampicilina, purificando a partir de ellas el DNA plasmídico mediante lisis alcalina (figura 4.4).

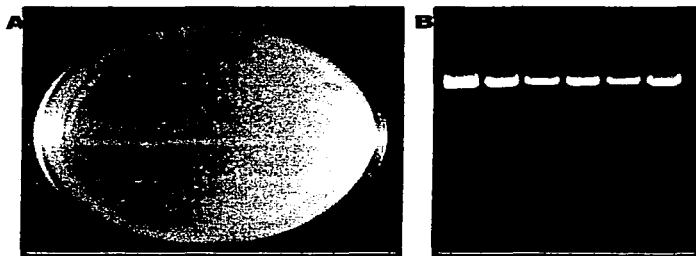


Figura 4.4. Clonación del gen GFP en el vector pGEM-T. A) colonias de bacterias resistentes a ampicilina obtenidas de la ligación pGEM-T-GFP en cajas LB-ampicilina. B) Candidatos purificados de pGEM-T-GFP, gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio.

El gen de GFP clonado en pGEM-T se encuentra flanqueado en ambos extremos por un sitio de corte para la enzima Not I. Realizamos la digestión con la enzima Not I y liberamos al gen de GFP con extremos cohesivos para Not I. El análisis del producto de la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa (figura 4.5) nos muestra un fragmento específico menor de 800bp (debido a que se eliminaron algunas bases en el corte que se realizó) que purificamos con el Kit GENECLAN (Bio101).

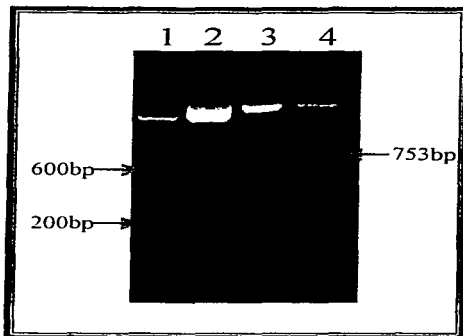


Fig.4.5: Liberación de GFP del vector pGEM-T. Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio.

Carriles:

- 1) Marcador de peso molecular de 100bp
- 2) pGEM-T-GFP sin digerir
- 3) clona 1 digerida con Not I
- 4) clona 2 digerida con Not I

Simultáneamente linealizamos al plásmido p-Shuttle con Not I para poder clonar el gen GFP purificado. La reacción de ligación se realizó con una proporción Inserto:Vector 10:1, en un volumen de 15ul y se incubó a 16°C durante toda la



noche. Transformamos bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  seleccionando las colonias resistentes a kanamicina y purificamos el DNA plasmidico (figura 4.7).

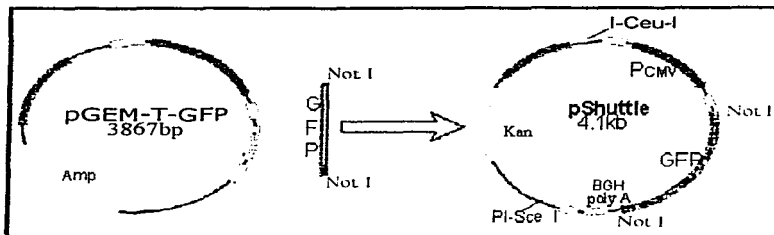


Figura 4.8. figura esquemática de la clonación del gen GFP en el vector pShuttle.

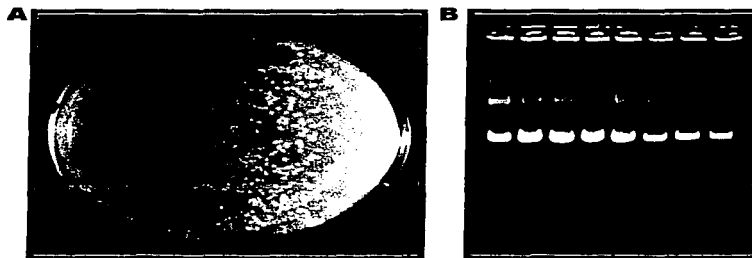


Figura 4.7. Clonación del gen GFP en el plásmido pShuttle. A) colonias de bacterias resistentes a kanamicina obtenidas de la ligación pShuttle-GFP en cajas LB-kanamicina. B) DNA plasmidico purificado a partir de colonias candidato pShuttle-GFP, gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio.

• ORIENTACIÓN DE GFP EN EL PLÁSMIDO pShuttle-GFP

Puesto que GFP fue clonado utilizando el mismo sitio de corte en ambos extremos, se obtuvo el gen de GFP clonado en ambos sentidos. Para determinar la orientación con sentido de GFP, se realizó la restricción del DNA de varios candidatos de pShuttle-GFP con la enzima Nde I.

La restricción nos libera un fragmento de 702pb cuando GFP se encuentra en orientación sentido y un fragmento de 927pb si GFP se encuentra en orientación antisentido, analizamos el peso de los fragmentos liberados por medio de electroforesis en gel de agarosa (figura 4.8).

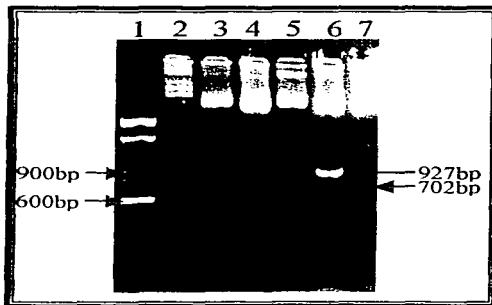


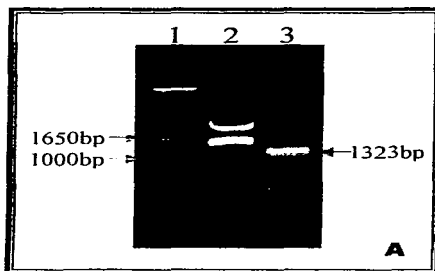
Fig.4.8: Orientación de GFP dentro del vector pShuttle-GFP. Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. Carriles: 1) Marcador de peso molecular de 100bp 2) pGEM-T-GFP sin digerir 3-7) Candidatos digeridos con Nde I

## GENERACIÓN DEL ADENOVIRUS RECOMBINANTE (Adr)

- SUBCLONACIÓN DE LA UNIDAD DE EXPRESIÓN EN EL VECTOR pAdeno-X DNA viral

Se realizó la digestión del plásmido pShuttle-GFP con las enzimas P1-Sce-I y I-Ceu-I para liberar la unidad de expresión (UNITEX-GFP) (figura 4.9) y subclonarla en el vector pAdeno-X DNA viral.

La reacción de ligación se realizó mediante una relación Inserto:Vector 6:1, en un volumen de 30ul y se incubó a 16°C durante toda la noche. Se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  y se seleccionaron las colonias resistentes a ampicilina. Se propagó el plásmido y se purificó el DNA plasmídico, para restringirlo y liberar la UNITEX-GFP (figura 4.10).



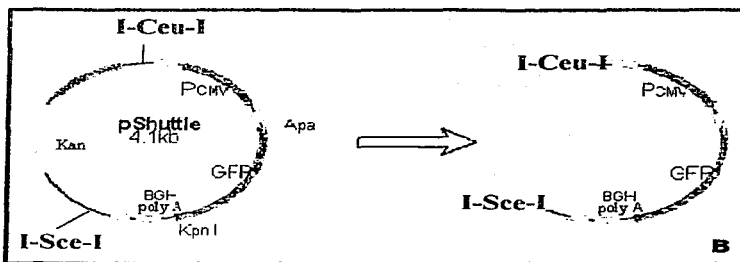


Figura 4.9. UNITEG-GFP. A) Liberación de UNITEG-GFP, gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio. B) figura esquemática de la liberación de UNITEG-GFP.

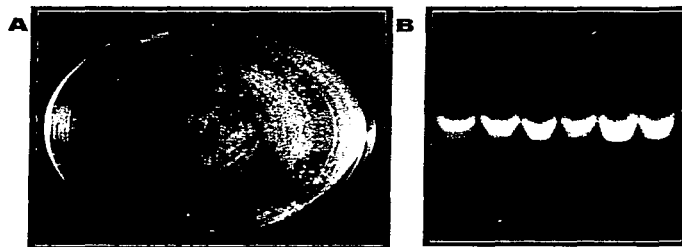


Figura 4.10. Subclonación de UNITEG-GFP en pAdenoX viral. A) Colonias obtenidas de la ligación pAd-GFP en cajas LB-ampicilina, C) candidatos purificados de pAd-GFP, gel de agarosa al 0.5%, teñido con Bromuro de Etidio.

Para corroborar la clonación pAd-GFP realizamos un PCR utilizando oligonucleotidos específicos, el oligo sentido hibrida en el extremo 3' de la UNITEG-GFP y el oligo antisentido hibrida en el vector pAdenoX. Es decir,

unicamente en el vector que se clonó la UNITEX-GFP se amplificará un producto de 370 bp, en la figura 4.11. se observan los candidatos analizados.

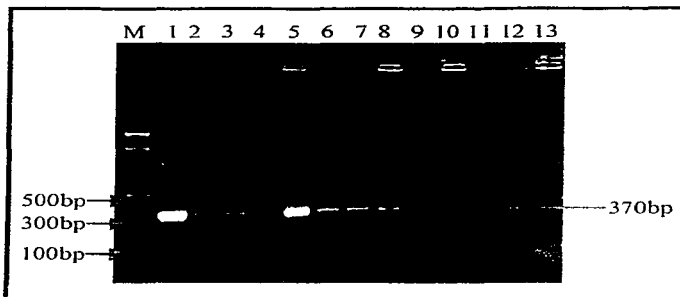


Figura 4.11. Corroboración de la clonación pAdeno-GFP. Gel de agarosa al 2%, teñido con Bromuro de Etidío, Carriles: M) Marcador de peso molecular de 100bp, 1) control positivo, 3-13) candidatos pAd-GFP.

- TRANSFECCIÓN DE pAdeno-GFP EN LA LINEA DE EMPAQUETAMIENTO HEK-293

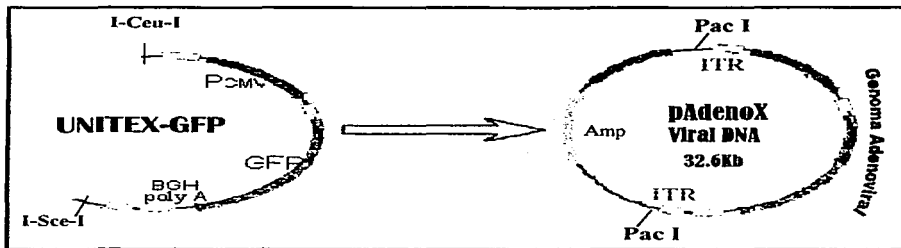


Figura 4.12. Figura esquemática de la clonación de UNITEX-GFP en el plasmido pAdenoX viral.

En la figura 4.12. se observa de manera esquemática el procedimiento para la producción de pAd-GFP, y en la figura 4.13. se muestra el esquema de la estrategia utilizada para la generación del adenovirus recombinante.

En primer lugar linearizamos el plásmido pAdr-GFP con la enzima Pac I, antes de transfectarlo a la línea celular de empaquetamiento HEK-293. Para generar los Adr transfectamos el plásmido lineal pAd-GFP en la línea celular HEK-293, observamos el efecto citopático a los 7 días postransfección (figura 4.14.), posteriormente infectamos células HEK-293 (figura 4.15.) observamos la fluorescencia, aunque esta no fue muy intensa, tanto de células transfectadas con el plásmido pCMV/myc/nuc/GFP (figura 4.15.), con el plásmido pShuttle-GFP (figura 4.16.) y con el Adr-GFP (figura 4.17.).

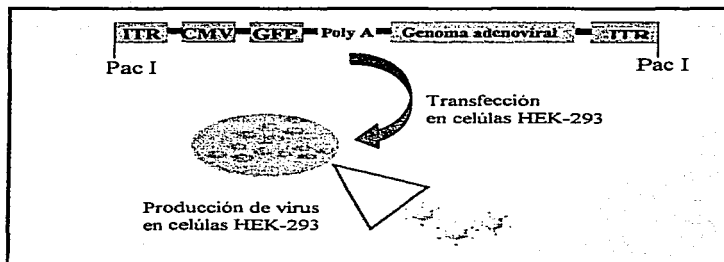


Figura 4.13. figura esquemática de la generación de pAd-GFP.

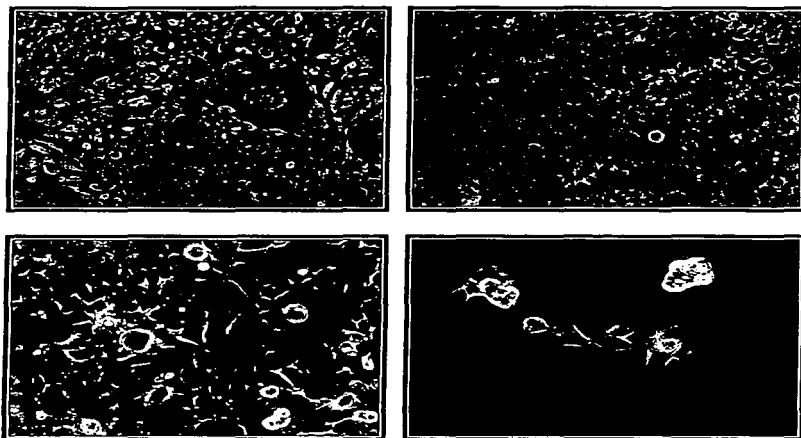


Figura 4.14. Transfección del plásmido pAdr-GFP en células HEK-293. A) Células HEK-293 sin transfección B, C y D) Se observa el efecto citopático debido al virus en células HEK-293 transfectadas con pAdr-GFP, células redondas de gran tamaño con granularidad en su interior y cambio en la morfología celular.



figura 4.15 Transfección de células HEK293 con el plásmido pCMV/myc/nuc/GFP. Imágenes en campo claro (izq) y campo oscuro (der).

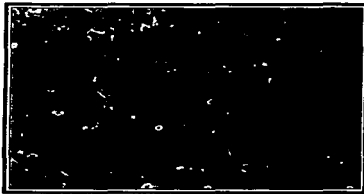


Figura 4.16 Transfección de células HEK293 con el plásmido pShuttle-GFP. Imágenes en campo claro (izq) y campo oscuro (der).

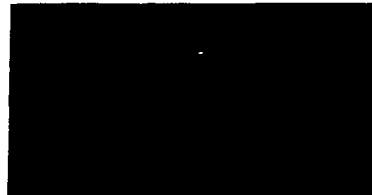


Figura 4.17. Infección de células HEK293 con el Adr-GFP. Imágenes en campo claro (izq) y campo oscuro (der).





CAPITULO 5  
CONCLUSIONES  
Y  
PERSPECTIVAS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONCLUSIÓN

Por medio del sistema pAdeno-X y con técnicas de Biología Molecular, se construyó un sistema Adenoviral recombinante (Adr-GFP) que es capaz de expresar al gen GFP en distintos cultivos celulares.

Utilizando el Adr-GFP se puede determinar de manera rápida y fácil la eficiencia de infección en diversas líneas celulares, además de que puede ser cuantificada y permite optimizar las condiciones de infección utilizándolo como un virus control. Con la transfección de pAd-GFP a células HEK-293 se observó la expresión de GFP, a partir del cuarto día posttransfección, aunque la expresión de GFP no fue muy intensa ni prolongada se puede considerar al Adr que construimos como un marcador .

## **PERSPECTIVAS**

Este sistema permitirá visualizar y cuantificar la eficiencia de infección en una gran variedad de células primarias y células transformadas, observar el tiempo de expresión de la proteína después de la infección, si la progenie celular expresa la proteína y por cuanto tiempo, si hay una alteración en la expresión de la proteína.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

*Loren Nieto Flores*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



# BIBLIOGRAFÍA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Anderson, R. D., Haskell, R. E., Xia, H., Roessler, B. J., Davidson, B. L. (2000). **A simple method for the rapid generation of the recombinant adenovirus vectors.** Gene therapy, 7: 1034-1038.
- Biofeedback (1993). **Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis.** Biotechniques , 15: 868-871.
- Cody, C. W., Ward, W., Prasher, D., Westler, W. M., Prendergast, F. G. (1993). **Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea Green fluorescent protein.** Biochemistry, 32,5: 1212-1218.
- Colosimo, A., Goncz, K. K. , Holmes, A. R., Kunzelmann, K. , Novelli, G., Malone, R. W. , Bennet, M. and Gruenert, D.C. (2000). **Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian.** Biotechniques , 29: 314-331.
- Chalfie, M. (1995). **Green fluorescent protein.** Photochemistry and Photobiology, 62,4: 651-656.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W., Prasher, D.(1994). **Green fluorescent protein as marker for gene expression.** Science, (Feb)263: 802-804.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Krug, R. M., Racaniello ,V. R., Skalka, A. M. (2000). **Principles of Virology Molecular Biology, Pathogenesis and control.** Pp: 771-773. Ed. American Society for Microbiology Press, Washington, DC. USA.
- Jones, P. (1998) **Vectors: Expression Systems.** pp 122-135. Ed.

- Kain, S. R. , Adams, M. , Kondepudi, A. , Yang, T. T. , Ward, W. W. , Kitts, P. (1995). **Green Fluorescent Protein as a Reporter of Gene Expression and Protein Localization**. *Biotechniques* , 19: 650-655.
- Kalejta, R., Shenk, T., Beavis, A. (1997). **Use of a membrane-localized Green fluorescent protein allows simultaneous identification of transferred cells and cell cycle analysis by flow cytometry**. *Cytometry*, 29: 286-291.
- Kozarsky, K. F., Wilson, M. J. (1993). **Gene therapy: adenovirus vectors**. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3: 449-503.
- Mizuguchi, H., Kay, A. M. (1998). **Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved *in vitro* ligation method**. *Human gene therapy*, 9: 2577-2583.
- Nishikawa, M., Huang, L. (2001). **Nonviral vectors in the new millennium : Delivery barriers in gene transfer**. *Human gene therapy*, 12: 861-870.
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. G., Remington, S. J. (1996). **Crystal structure of the *Aequorea victoria* Green fluorescent protein as marker for gene expression**. *Science*, (Sept) 273: 1392-1395.
- Prasher, D., Eckenrode, V., Ward, W., Westler, W. M., Prendergast, F. G., Cormier, M. J. (1992). **Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein**. *Gene*, 111: 229-233.
- Sambrook, J. Fritsch, E. F. Maniatis, T. (1989) **Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2a Ed. Ed. Cold Spring Harbor Press, USA.**

- Shenk, T. E. (2001) **Adenoviridae: the viruses and their replication**. Fundamental Virology 4a Ed. ( Kribe, D. M., Howley, P. M., eds.) pp 1053-1088. Ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.
- Von Seggern, D. J. and Nemerow, G. R. (1999). **Adenoviral vectors for protein expression**. In Gene expression systems (Fernández, J. M., Hoeffler, J. P. eds). Pp: 112-145. Ed. Academic Press, USA.
- White, D. O., Fenner, F. J. (1994). **Medical Virology: Adenoviridae**. Pp: 306-315. Ed. Academic Press USA, 4a Ed.
- Wang, Y., Huang, S. (2000). **Adenovirus technology for gene manipulation and functional studies**. DDT, 5 (1):10-16.
- Yang, F., Moss, L. G., Phillips G. N. (1996). **The molecular structure of green fluorescent protein**. Nature Biotechnology, 14: 1246-1251.
- Yeh, P., Beninhound, K., and Perricaudet, M. (1999). **Adenovirus vectors for gene delivery**. Current Opinion in Biotechnology, 10: 440-447.
- Zhang, G., Gurtu, V., and kain, S.T. (1996). **An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in Mammalian cells**. Biochemical and biophysical research communications, 227: 707-711.