



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTUDIO DEL ENSAMBLAJE DE CÁPSIDES DE AAV
EN CÉLULAS VIVAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

IBP. David Silverio Moreno Gutiérrez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Adán Guerrero Cárdenas
Instituto de Biotecnología

Dr. Ismael Bustos Jaimes
Facultad de Medicina

Cuernavaca, Morelos. Febrero, 2018



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.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría no. 583328 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT. Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada. Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IT200416 e IT200418. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Palomares por ser una excelente tutora, por todo su apoyo, su confianza y sus consejos durante todo el camino.

Al Dr. Tonatiuh Ramírez por sus consejos y sugerencias.

Al Dr. Adán Guerrero por su guía y atención en todo momento.

Al Dr. Ismael Bustos por sus comentarios y sugerencias en la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. Alberto Darszon, Dra. Susana López, Dr. Christopher Wood, Dr. Ramón González y Dr. Miguel Ángel Torres, por sus excelentes observaciones y aportaciones.

A las técnico del laboratorio: M. en C. Ruth Pastor, M. en C. Vanessa Hernández y M. en C. Martha Contreras, por todo su apoyo, sus consejos y sobretodo su paciencia.

A Karin Levy y Larissa Campos por su paciencia y atención siempre que lo requerí.

A todos los miembros del laboratorio, en especial a Carolina Gómez, Alberto Porras, Jaqueline Zuñiga, Esmeralda Cuevas, Enrique Paz, Michelle Gutiérrez, Lidia Piñones, Karina García, Diana Vázquez, Dubhe Bulte, Violeta Guadarrama, Ana Alcalá y a todos porque de todos aprendí un poco y gracias a ellos la estancia siempre fue muy amena.

A Xochitl por todo su apoyo y sus regaños.

A Joaquín Ramírez por su apoyo y enseñanzas en todo momento.

A mi familia por siempre estar dándome ánimos y apoyo siempre que lo necesité.

A la Unidad de Docencia del Instituto de Biotecnología, a Toño y Gloria por todo su apoyo y sus atenciones.

A la Dra. Guadalupe Zavala.

Índice

Agradecimientos	iii
Índice de figuras	vi
Índice de tablas	vii
Nomenclatura.....	viii
Resumen.....	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	3
Virus adeno-asociado (AAV).....	3
Generalidades	3
Ciclo de replicación de AAV2.....	4
Importancia biotecnológica de AAV.....	5
Producción de cápsides de AAV mediante el sistema de expresión célula de insecto-baculovirus	6
Estructura de la cápside de AAV	7
Estabilidad física de cápsides de AAV.....	9
Formación de cápsides de AAV	9
Proteína activadora de ensamblaje.....	10
Cápsides virales	11
Modelos teóricos de ensamblaje de cápsides icosaédricas.....	12
Estudios del ensamblaje de cápsides virales.....	12
Correlación de fluctuaciones de espectroscopía de fluorescencia	13
Correlación de espectroscopía de fluorescencia de un punto fijo.....	14
Correlación de espectroscopía de escaneo de imagen.....	17
Análisis de número y brillo.....	19
OBJETIVOS	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
Materiales y métodos	24
Líneas celulares, baculovirus recombinantes y condiciones de cultivo	24
Construcción de baculovirus recombinantes.....	24
Construcción de pFast-Bac.....	24

Generación de bácmidos recombinantes	25
Transfección de células Sf9	25
Ensayo en placa para aislamiento de placas virales.....	26
Amplificación de stocks virales.....	26
Titulación de baculovirus	26
Cuantificación de proteína total	27
Western Blot	27
Dot-Blot	28
Producción y purificación de PPV.....	28
Microscopía confocal	28
Correlación de espectroscopía de fluorescencia	29
Correlación de espectroscopía de escaneo de imagen.....	29
Análisis de número y brillo.....	30
Resultados y discusión	31
Amplificación y titulación de baculovirus recombinantes	31
Producción de cápsides fluorescentes de AAV2	31
Calibración de la respuesta del detector	34
Determinación de las condiciones necesarias para la adquisición de datos con microscopía confocal.....	35
Determinación del coeficiente de difusión de proteínas fluorescentes en células vivas	38
Localización y cantidad intracelular de las proteínas VP	41
Determinación de los cambios en el MW de complejos de VP durante su ensamblaje en cápsides	44
Determinación de la estequiometría de los complejos de las VPs durante su ensamblaje en cápsides.....	47
Estudio del papel de AAP durante el ensamblaje de cápsides de AAV.....	49
Construcción de pFastBac	50
Obtención de bácmidos	52
Producción de baculovirus recombinante y ensayo en placa para el aislamiento de placas virales	53
Producción de cápside con Bac-AAP y Bac- VP3	54
Conclusiones	56
Perspectivas	59
REFERENCIAS.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. GENES Y PROMOTORES DE AAV2.....	3
FIGURA 2. ENTRADA DE AAV A LA CÉLULA HUÉSPED.....	4
FIGURA 3. ESQUEMA DE PRODUCCIÓN, DESPLAZAMIENTO Y ENSAMBLAJE DE VPS DURANTE EL CICLO DE REPLICACIÓN DE AAV2. ...	5
FIGURA 4. PROBABILIDAD DE UNA CÉLULA DE SER INFECTADA CON N PARTÍCULAS INFECCIOSAS SEGÚN LA DISTRIBUCIÓN DE POISSON.	7
FIGURA 5. ESTRUCTURA DE CÁPSIDE DE AAV2.....	8
FIGURA 6. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE VP3.....	8
FIGURA 7. NÚMERO DE TRIANGULACIÓN CE CÁPSIDES ICOSAÉDRICAS.....	12
FIGURA 8. REPRESENTACIÓN DEL VOLUMEN CONFOCAL DEL SISTEMA UTILIZADO.	14
FIGURA 9. CORRELACIÓN DE ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA DE PUNTO FIJO.....	15
FIGURA 10. FUNCIÓN DE AUTOCORRELACIÓN DEL FLUORÓFORO ATTO 655 0.25 NM.....	16
FIGURA 11. CORRELACIÓN DE ESPECTROSCOPÍA DE ESCANEADO DE IMAGEN.	18
FIGURA 12. ANÁLISIS DE NÚMERO Y BRILLO.	21
FIGURA 13. CINÉTICA DE COINFECCIONES DE CÉLULAS Sf9 CON LOS BACULOVIRUS BEVP1 Y BVP3 A DISTINTAS MDI.	32
FIGURA 14. CONTROL DE ESPECIFICIDAD DE LOS MAB A20 Y B1.	33
FIGURA 15. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL EPÍTOPE CONFORMACIONAL CARACTERÍSTICO DE CÁPSIDES DE AAV2 CUANDO SE INFECTAN CÉLULAS Sf9 CON LOS BACULOVIRUS BAC-VP3 Y BAC-EGFP-VP1.	33
FIGURA 16. CALIBRACIÓN DE LA RESPUESTA DEL DETECTOR..	35
FIGURA 17. FUNCIÓN DE AUTOCORRELACIÓN DE FCS DE EGFP 10 NM EN PBS.....	36
FIGURA 18. FUNCIÓN DE AUTOCORRELACIÓN DE EGFP 50 NM EN PBS.	37
FIGURA 19. FUNCIÓN DE AUTOCORRELACIÓN DE EGFP 100 NM EN PBS A 2 μ S.	37
FIGURA 20. FUNCIÓN DE AUTOCORRELACIÓN DE EGFP 100 NM EN PBS A 4 μ S.	37
FIGURA 21. DETERMINACIÓN DE D DE EGFP MEDIANTE FCS.	39
FIGURA 22. DETERMINACIÓN DE D DE EGFP EN CÉLULAS CHO-S.	40
FIGURA 23. DETERMINACIÓN DE D DE EGFP EN CÉLULAS Sf9 MEDIANTE RICS.....	41
FIGURA 24. MICROSCOPIAS DE EPIFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL DE CÉLULAS Sf9 EXPRESANDO EGFP O EGFP-VP1	42
FIGURA 25. INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA CON RESPECTO AL TIEMPO EN DISTINTAS REGIONES INTRACELULARES.....	43
FIGURA 26. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE VP3 SOBRE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA FLUORESCENTE EGFP-VP1 EN DISTINTAS REGIONES INTRACELULARES.....	44
FIGURA 27. COEFICIENTE DE DIFUSIÓN DE SIMULACIONES DE CÁPSIDES CON EGFP-VP1 Y OLIGÓMEROS DE EGFP-VP1	45
FIGURA 28. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE D DE EGFP-VP1 EN CÉLULAS Sf9 MEDIANTE RICS..	46
FIGURA 29. ANÁLISIS DE N&B DE EGFP, EGFP-VP1 Y EGFP-VP1 CUANDO SE COEXPRESA VP3 EN CÉLULAS DE INSECTO.....	48
FIGURA 30. PCR DE INSERTOS	50
FIGURA 31. PCR DE COLONIA DE PFB1-AAP.	51
FIGURA 32. GEL DE LIGACIONES DE AAP Y VP3 CON EL PFASTBAC1.	52
FIGURA 33. PCR DE COLONIA DE CÉLULAS DH10BAC CON LOS OLIGOS M13.....	53
FIGURA 34. WESTERN-BLOT CON ANTI GP64 DE PELLETS DE CÉLULAS Sf9 INFECTADAS CON PLACAS VIRALES DE BAC-AAP.	54
FIGURA 35. DOT-BLOT DE CÉLULAS Sf9 CON LOS MABS B1 Y A20 PARA EVALUAR LA CAPACIDAD DE AAP DE PROMOVER EL ENSAMBLAJE DE CÁPSIDES DE VP3..	55

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICACIÓN DE AAP, EGFP, VP3, Y PCR DE COLONIA.	25
TABLA 2. TÍTULOS VIRALES	31
TABLA 3. VALORES DE D DE GFP O EGFP EN CÉLULAS CHO REPORTADOS EN LA LITERATURA.	39
TABLA 4. DETERMINACIÓN DEL MW DE COMPLEJOS DE EGFP-VP1 EN CÉLULAS Sf9.	46

NOMENCLATURA

<i>a</i>	Absorbancia máxima
AAP	Proteína activadora del ensamblaje
AAV	Virus Adeno-asociado
AAV2	Virus adeno-asociado-2
<i>B</i>	Brillo aparente
<i>b</i>	Pendiente de modelo sigmoide
Cit	Citoplasma
CI-VB	Célula de insecto-baculovirus
CRV	Centros de replicación viral
<i>D</i>	Coeficiente de difusión
<i>D₀</i>	Dilución a la cual se presenta el 50% de absorbancia
<i>d_H</i>	Diámetro hidrodinámico
<i>D_i</i>	Dilución
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada
<i>F</i>	Intensidad de fluorescencia
FAC	Función de autocorrelación
FCS	Correlación de espectroscopía de fluorescencia de un punto fijo
FGFR	Factor de crecimiento de fibroblastos
<i>G</i>	Magnitud de la función de autocorrelación
<i>h y k</i>	Coordenadas en un plano hexámero para el cálculo de T
HBV	Virus de hepatitis B
hpi	Horas post infección
HSPG	Receptor heparán sulfato proteoglicano
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

ITR	Regiones de repetidos invertidos en tandem
K	Relación entre ω_z y ω_0
K_B	Constante de Boltzman
<i>Mab</i>	Anticuerpo monoclonal
MDI	Multiplicidad de infección
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difenil tetrazolium bromuro
MW	Peso molecular
N	Número aparente
N&B	Análisis de número y brillo
NA	Apertura numérica
N_A	Número de Avogadro
N_p	Número de fotones en el volumen confocal
Nuc	Núcleo
<i>offset</i>	Desplazamiento en el valor de F debido a la contribución del detector
<i>PBS</i>	Buffer de fosfatos
PBSMK	Buffer fosfatos con $MgCl_2$ y KCl
<i>PBST</i>	Buffer de fosfatos con tween 20
<i>polh</i>	Polihedrina
PPV	Particulas pseudo-virales
<i>PVDF</i>	Polyvinylideno difluoride
R^2	Coefficiente de correlación lineal
RDI	Región de interés
R_h	Radio hidrodinámico
RICS	Correlación de espectroscopía de escaneo de imagen
RM	Relación de peso molecular
	Factor de proporcionalidad fotón/electrón
S	
SFB	Suero fetal bovino

SLN	Secuencia de localización nuclear
T	Número de triangulación
T	Temperatura
TCID ₅₀ /mL	Dosis de infección media
TCLD ₅₀ /mL	Dosis letal media para cultivo celular
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
UFP	Unidades formadoras de placa
ufp/cel	Unidades formadoras de placa/célula
V	Volumen
vAAV	Vectores de virus adeno-asociado
VPs	Proteínas virales
X	Concentración celular
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
Xv	Concentración de células vivas
Y	Absorbancia
Y ₀	Absorbancia mínima
γ	Factor geométrico del perfil del volumen confocal
δ_r	Tamaño de pixel
ϵ	Brillo molecular
η	Viscosidad aparente
ξ	Desplazamiento en x en RICS
σ^2	Varianza
σ^2_0	Varianza del ruido de la electrónica del detector
σ^2_d	Varianza del detector
σ^2_n	Varianza debida al movimiento de partículas fluorescentes a través del volumen de observación
τ	Tiempo de exposición
τ_l	Tiempo entre línea

τ_p	Tiempo de pixel
ψ	Desplazamiento en y en RICS
ω_0 y ω_z	Dimensiones del volumen confocal en los ejes x y z

RESUMEN

El ensamblaje de la cápside de un virus es un proceso en el cual una gran cantidad de proteínas interaccionan para dar lugar a la formación de complejos moleculares altamente ordenados. El entendimiento de los mecanismos de ensamblaje es de interés general debido a su potencial aplicación en áreas como virología, terapias antivirales, e incluso en biotecnología para el diseño de una producción más eficiente de vectores virales para terapia génica. Actualmente no existen metodologías experimentales que permitan el monitoreo del ensamblaje de un virus en tiempo real que cuenten con la resolución necesaria para determinar cuáles son los intermediarios durante el proceso de formación de la cápside.

En este trabajo propusimos el empleo de técnicas de espectroscopía de fluorescencia con el objetivo de evaluar si estas técnicas tienen la resolución suficiente para determinar la estequiometría de los intermediarios formados por las proteínas estructurales de la cápside. La correlación de espectroscopía de fluorescencia (FCS), la correlación espectroscopía de imagen escaneada (RICS) y el análisis de número y brillo (N&B), son metodologías que en conjunto permiten conocer la localización, el coeficiente de difusión, la estequiometría y la concentración de complejos fluorescentes en un volumen determinado. El fundamento principal de estas técnicas se basa en un análisis de las fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo y/o espacio en un volumen fijo, por lo cual, son técnicas no invasivas que se pueden aplicar para estudiar interacciones de complejos moleculares fluorescentes dentro de células vivas.

Se utilizó como modelo de estudio el virus adeno-asociado 2 (AAV2), el cual ha tenido un interés creciente debido a los resultados que se han observado en su uso como vector para terapia génica. Para la producción de las cápsides de AAV2 se empleó el sistema de expresión célula de insecto–baculovirus (CI-BV), el cual es la plataforma más usada a escala industrial para la producción de vectores virales de AAV2. Con el objetivo de seguir el ensamblaje de las cápsides de AAV2 utilizando espectroscopía de fluorescencia, se expresaron las proteínas: proteína verde fluorescente (EGFP), la proteína estructural de la cápside VP1 fusionada a EGFP, la proteína activadora del ensamblaje (AAP) y la proteína estructural VP3, las cuales son necesarias para la formación de cápsides de AAV2.

Se logró determinar el coeficiente de difusión de EGFP y la viscosidad aparente intracelular de células de insecto. Se determinó el peso molecular de complejos de EGFP-VP1 con base en su coeficiente de difusión, así como la cantidad de moléculas de EGFP-VP1 que conforman dichos complejos. Se determinó como afecta la expresión de VP3 el peso molecular y la estequiometría de EGFP-VP1 en las regiones intracelulares. Es en esta condición donde se favorece la formación de cápsides. Se demostró que EGFP-VP1 se encuentra en forma monomérica en el citoplasma mientras que en el núcleo se encuentra en forma de dímeros y trímeros. Además, fue posible observar complejos de un mayor orden de oligomerización en los centros de replicación viral (CRV), que corresponden a intermediarios tempranos en el proceso de ensamblaje de la cápside. Es en estas regiones del núcleo donde las proteínas VPs alcanzan su valor máximo de concentración. A pesar de que no fue posible esclarecer el proceso completo de ensamblaje, los resultados de este trabajo permiten el diseño de nuevas estrategias para el seguimiento del ensamblaje de la cápside de un virus en células vivas, así como una propuesta para el estudio del efecto de la proteína AAP sobre la localización, transporte, concentración y oligomerización de las proteínas estructurales de la cápside de AAV2 en células vivas.

INTRODUCCIÓN

Los virus son complejos macromoleculares nanométricos constituidos por ácidos nucleicos envueltos en una capa proteica denominada cápside; en algunos casos, a su vez recubierta por una capa lipoproteica. El ensamblaje de la cápside de los virus es un proceso que involucra la interacción de un gran número de subunidades para dar origen a la formación de estructuras altamente ordenadas (Caston & Carrascosa, 2013). Existen modelos teóricos que han logrado brindar un panorama acerca de los mecanismos moleculares involucrados en el ensamblaje de cápsides (Perlmutter & Hagan, 2014; Zlotnick & Stray, 2003; Zlotnick *et al.*, 2000). La importancia del entendimiento del ensamblaje de las cápsides permite el diseño de herramientas para nuevas estrategias antivirales o bien, para el empleo de virus como agentes de liberación dirigidos.

Hasta el momento, no se ha logrado desarrollar una metodología que cuente con la resolución suficiente para poder esclarecer el complejo proceso de ensamblaje de cápsides virales. Algunas estrategias propuestas han logrado observar intermediarios tempranos, tardíos o bien la descripción de los parámetros cinéticos del ensamblaje (Adu-Gyamfi *et al.*, 2012; Pierson *et al.*, 2014; Utrecht *et al.*, 2011). La mayoría de estas técnicas se ha enfocado en el estudio de cápsides *in vitro*. Debido a que estas condiciones no necesariamente reflejan las condiciones intracelulares en las que la formación de la cápside ocurre como parte del ciclo viral, en este trabajo se plantea el uso de metodologías de espectroscopía de fluorescencia como herramienta para el estudio del proceso de formación de cápsides de un virus con estructura icosaédrica en células vivas.

La correlación de fluctuaciones de espectroscopía de fluorescencia ha dado lugar a un conjunto de metodologías que permiten conocer la localización, concentración, transporte y estequiometría de complejos fluorescentes dentro de un volumen en el orden de micrómetros cúbicos. Estas técnicas se pueden aplicar de manera no invasiva en estudios de células vivas (Digman *et al.*, 2009; Digman *et al.*, 2008).

Como modelo de estudio se utilizó el virus adeno-asociado 2 (AAV2) debido a su creciente aplicación en biotecnología, sobre todo en terapia génica. Se utilizó el sistema de expresión células de insecto-baculovirus (CI-BV), que es la plataforma más utilizada a escala industrial para la producción de los vectores virales con base en AAV. A pesar del auge en el uso de vectores virales de AAV en medicina, que ha logrado el establecimiento de dos vectores de AAV en el mercado, aún no se conoce el proceso por el cual se forma la cápside de los vectores (Kastelein, Gaudet, & Me, 2012). El estudio del ensamblaje de AAV2 permitirá el diseño de estrategias más eficientes de producción de partículas infecciosas como de vectores virales.

ANTECEDENTES

Virus adeno-asociado (AAV)

Generalidades

El AAV es un virus de DNA de cadena sencilla (4.7 Kb) que pertenece al género *Dependovirus* de la familia *Parvoviridae*. La cápside de AAV tiene una estructura icosaédrica de alrededor de 25 nm de diámetro formada por 3 proteínas estructurales VP1 (87 KDa), VP2 (72 KDa) y VP3 (63 KDa) en una relación aproximada de 1:1:10, dando un total de 60 monómeros proteicos ensamblados con una geometría T=1. El genoma de AAV (fig. 1) está compuesto por dos genes (*rep* y *cap*) flanqueados por dos regiones repetidas invertidas (ITR), las cuales son esenciales en el proceso de replicación del genoma viral, así como para su empaquetamiento dentro de la cápside previamente formada (Ling et al., 2015). El gen *rep* codifica para cuatro proteínas no estructurales, Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40, las cuales juegan un papel importante en los procesos de replicación del genoma viral, y en el reconocimiento de las regiones ITRs para introducir el genoma viral dentro de la cápside (Bleker, Pawlita, & Kleinschmidt, 2006).

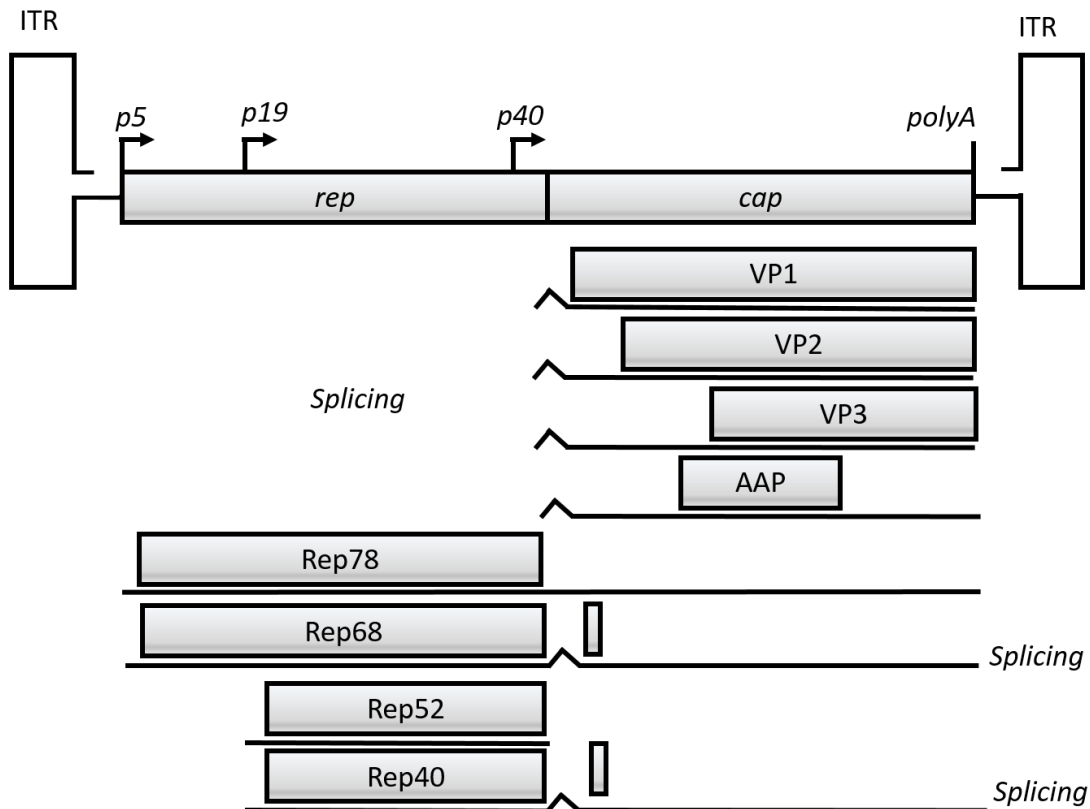


Figura 1. Genes y promotores de AAV2. Modificado de Van Vliet et al. 2008

Las proteínas de la cápside están codificadas en el gen *cap* y se expresan a partir del mismo marco de lectura de manera diferencial por corte y empalme alternativo del RNA mensajero y el uso de varios codones de inicio (Johnson et al., 1971; Rose et al., 1971). Las tres proteínas estructurales comparten su secuencia en el extremo carboxilo terminal y solo difieren en el extremo N-terminal.

VP1 contiene secuencias señales de localización nuclear (SLN) y un dominio fosfolipasa en su extremo N-terminal, el cual es indispensable durante el ciclo de replicación de AAV, por lo cual la presencia de VP1 es necesaria para la producción de partículas infecciosas. VP2 también posee SLN y se ha descrito que no es indispensable para la formación de cápsides. VP3 es el componente mayoritario de la cápside de AAV y no cuenta con SLN (Ruffing, Zentgraf, & Kleinschmidt, 1992; Steinbach *et al.*, 1997; Wistuba *et al.*, 1997; Grieger, Snowdy, & Samulski, 2006; Grieger, Snowdy, & Samulski, 2006). Dentro del gen *cap* se encuentra también el marco de lectura de una proteína no estructural denominada proteína activadora del ensamblaje (AAP), existen estudios que afirman que esta proteína tiene un papel fundamental durante el ensamblaje de cápsides de AAV2 (Sonntag, F. *et al.*, 2010).

Ciclo de replicación de AAV2

La entrada de AAV a la célula se lleva a cabo por endocitosis en vesículas recubiertas con clatrina. El receptor principal de AAV2 es el heparán sulfato (HSPG) que junto con otros receptores secundarios, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos y los receptores de laminina e integrinas, son los encargados de mediar el proceso de endocitosis de AAV2 (Summerford *et al.*, 1999). Posteriormente la acidificación del endosoma provoca cambios conformacionales en la cápside de AAV que provocan la exposición del dominio fosfolipasa de VP1 al exterior de la cápside, lo cual le permite salir del endosoma y llegar hasta el espacio perinuclear. El proceso por el cual el genoma viral se introduce al núcleo no ha sido completamente esclarecido, sin embargo existen reportes que sugieren que la cápside intacta entra en el nucleoplasma a través de los complejos de poros nucleares (Kelich *et al.*, 2015). El resto del ciclo celular depende de las condiciones de la célula huésped y de la presencia de otros virus auxiliares. El DNA de AAV puede integrarse en el genoma humano de manera sitio-específica en el cromosoma 19 (19q13.3) o permanece en forma episomal (Bartlett *et al.*, 2000; Kronenberg *et al.*, 2005).

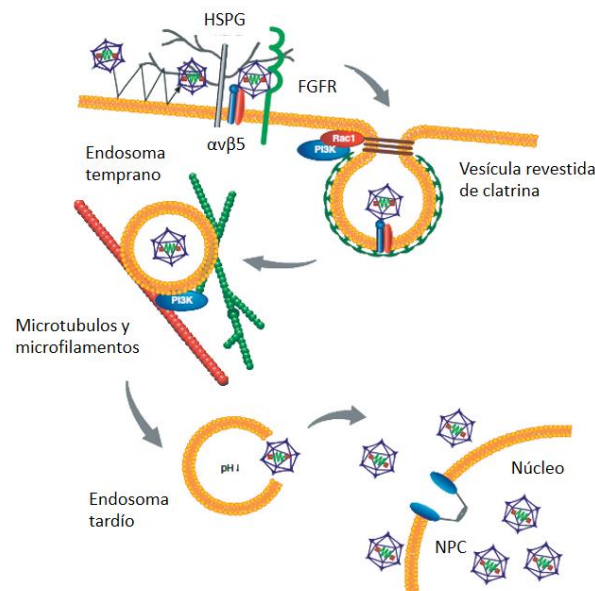


Figura 2. Entrada de AAV a la célula huésped. Modificado de Bunning *et al.* 2008.

En etapas tempranas del ciclo de replicación viral se producen las proteínas Rep78 y Rep68 bajo el promotor *p5*, y las proteínas Rep52 y Rep40 bajo el promotor *p19* en el citoplasma y son transportadas hacia el núcleo. En ausencia de un virus auxiliar, las cuatro proteínas Rep inhiben la transcripción de los RNA mensajeros bajo los promotores *p5* y *p19*, sin embargo, en presencia de un virus auxiliar como el adenovirus, se activa la transcripción de los RNA mensajeros bajo los promotores *p19* y *p40*. Así las proteínas estructurales de la cápside (VPs) de AAV2 se producen en el citoplasma y se desplazan hacia el núcleo. Se ha demostrado que las proteínas Rep y las proteínas VPs colocalizan en regiones denominadas centros de replicación viral (CRV) que son regiones dentro del núcleo de la célula donde ocurren los procesos de replicación del genoma viral, el ensamblaje de la cápside y el empaquetamiento del genoma de AAV2 (Pereira *et al*, 1997; Gallo-Ramírez *et al*, 2011; Mouw & Pintel, 2000; Witsuba *et al*. 1996).

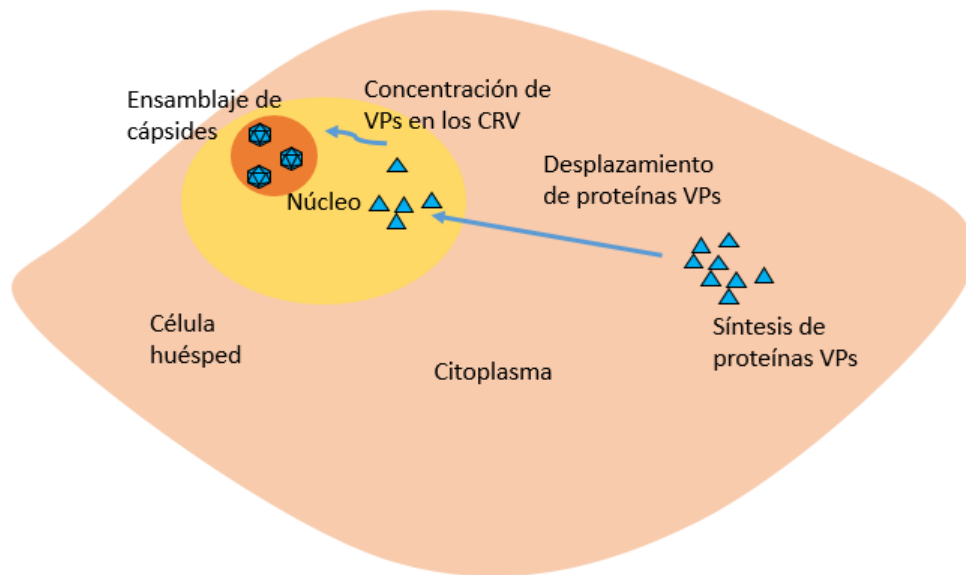


Figura 3. Esquema de producción, desplazamiento y ensamblaje de VPs durante el ciclo de replicación de AAV2 (Pereira *et al*, 1997; Gallo-Ramírez *et al*, 2011; Mouw & Pintel, 2000; Witsuba *et al*. 1996).

Importancia biotecnológica de AAV

El empleo de AAV en medicina ha tenido grandes avances en cuanto a la generación de vectores para terapia génica. Los vectores de AAV (vAAV) tienen la capacidad de transducir células en división y aquellas que han dejado de dividirse. (Kastelein *et al.*, 2012). Durante la producción de vAAV, el genoma del vector es flanqueado por las regiones ITR, las cuales cuentan con regiones de unión a las proteínas Rep y sirven como señal para la introducción del genoma de interés a la cápside de AAV previamente formada mediante un arreglo de cambios conformacionales de las proteínas REP durante la interacción entre el genoma de interés, las proteínas Rep y la cápside de AAV2. Cuando se utilizan vAAV, el genoma de interés puede permanecer de forma episomal en la célula huésped, lo cual puede resultar en largos tiempos de expresión de transgenes en ciertos tejidos (Mingozzi & High, 2011; Wang *et al.*, 2005).

Existen por lo menos dos ejemplos de vAAV que han sido aprobados para su comercialización siendo parteaguas en el campo de uso medicinal de vectores virales. En 2012, la Agencia de Medicina

Europea aprobó la comercialización del fármaco Glybera® de la empresa uniQure, siendo el primer fármaco con autorización en el mercado europeo de uso en terapia génica. Glybera® es un fármaco para la restauración de la actividad de la enzima lipoproteína lipasa. Recientemente, en diciembre de 2017, la Food and Drug Administration aprobó el primer fármaco de terapia génica de administración dirigida en los Estados Unidos Americanos. Luxturna, es un fármaco de la compañía Spark Therapeutics que tiene la finalidad de brindar tratamiento a personas un desorden hereditario por una mutación en el gen RPE65 que resulta en pérdida de la visión.

A pesar de los beneficios que han tenido los vAAV en medicina génica, existen situaciones en las que se requiere direccionar algún fármaco, proteína u otro agente terapéutico o profiláctico en lugar de DNA a un tejido específico. Existe en la literatura un estudio en el cual se funcionalizó la superficie exterior de la cápside de AAV con el fármaco paclitaxel, utilizado en terapia contra cáncer. Sin embargo, no se observaron diferencias en la viabilidad celular de células HeLa tratadas con las partículas pseudo-virales de AAV (PPV) funcionalizadas con respecto al control. Lo anterior pudiera deberse a que al funcionalizar la superficie exterior del virus de forma inespecífica se pudiera estar generando un impedimento estérico entre la superficie de la cápside y los receptores en la membrana celular del huésped. Adicionado a lo anterior, no se realizaron estudios acerca de la dosis de paclitaxel empleadas en los ensayos (Wei *et al*, 2012). Una alternativa ante esta problemática sería la incorporación de la molécula de interés al interior de la cápside, sin embargo, aún no se han establecido estrategias para la introducción de moléculas distintas al DNA dentro de las cápsides de PPV de AAV.

La encapsidación de moléculas dentro de PPV requiere usualmente de una metodología de desensamble reversible de la cápside del virus *in vitro* que permita el recubrimiento de la molécula de interés con las proteínas de la cápside. Para ello, la producción de PPV para aplicaciones biotecnológicas necesita de una comprensión profunda del proceso de síntesis y del ensamblaje de estas partículas en una plataforma que permita su producción a escala industrial.

Producción de cápsides de AAV mediante el sistema de expresión célula de insecto-baculovirus

La plataforma más utilizada a nivel industrial para la producción de vectores de AAV es el sistema de expresión célula de insecto-baculovirus (CI-BV), el cual ofrece las ventajas de menores costos de producción, mayor productividad, fácil escalamiento y ausencia de posibles agentes patógenos. El CI-BV es un sistema de expresión transitorio que involucra la infección de células de insecto con baculovirus recombinantes. Los baculovirus son virus de DNA de doble cadena, con forma de bastón de 40 - 50 nm de diámetro y 200 – 400 nm de longitud. En la naturaleza, los baculovirus se encuentran embebidos en una matriz proteica de poliedrina. Debido a que la poliedrina no es necesaria para la propagación del virus en cultivo celular, es posible prescindir de ella e insertar la secuencia codificante para una proteína de interés bajo el promotor del gen de poliedrina (*polh*) generando baculovirus recombinantes. El promotor de *polh* es un promotor tardío y muy fuerte con el que se ha alcanzado una producción de proteína de interés de hasta el 70% de la proteína total y hasta 1 g de proteína por litro de medio de cultivo (Palomares & Ramírez, 2001).

Para la expresión de proteínas recombinantes mediante el uso de CI-BV, se realizan cultivos de células de insecto ya sea en suspensión o en adherencia y se infectan con baculovirus recombinantes

generalmente a principios de la fase exponencial del cultivo. Existen varios parámetros particulares del sistema CI-BV que se pueden modificar para optimizar la producción de proteínas recombinantes; la multiplicidad de infección (MDI) se define como el número de partículas infecciosas utilizadas por cada célula viva en el cultivo. Se ha descrito que el número de partículas que infectan una célula está determinado por una distribución probabilística que sigue el comportamiento de una distribución de Poisson representada en la ecuación 1, donde r representa el número de ocurrencias o del evento, es decir, el número de partículas que infectan una misma célula. La probabilidad de que una célula sea infectada por 1, 2 o 3 partículas virales en función de la MDI se encuentra representada en la figura 4. En los casos donde se requiere que todas las células en el cultivo produzcan la proteína de interés desde la infección primaria, se utiliza una MDI de 5 o más unidades formadoras de placa por célula (ufp/cel). Tal y como se observa en la figura 4, es con dicho valor cuando aproximadamente el 100 % de las células en el cultivo se encuentran infectadas con al menos una partícula infecciosa.

$$P = \frac{(MDI)^r e^{-MDI}}{r!} \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

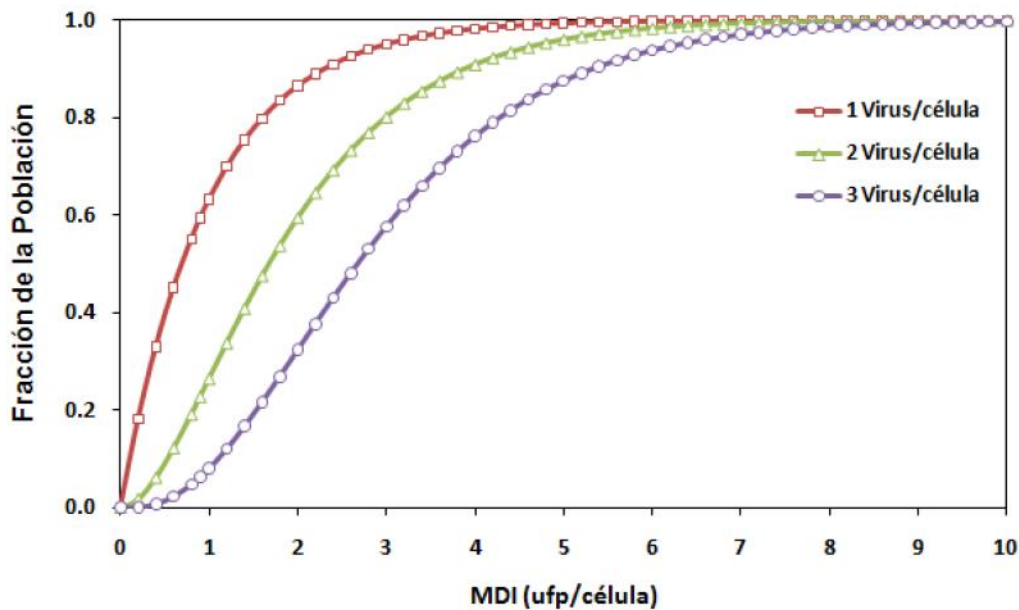


Figura 4. Probabilidad de una célula de ser infectada con n partículas infecciosas según la distribución de Poisson. Tomado de Rojas-Gómez, 2009.

Estructura de la cápside de AAV

La estructura atómica de la cápside de AAV se determinó mediante cristalografía de rayos X y modelado con criomicroscopía electrónica. En estos estudios se muestra que la cápside está conformada por 60 monómeros proteicos ensamblados en una estructura icosaédrica con un número de triangulación $T=1$, lo cual significa que todas las proteínas VPs se encuentran distribuidas en pentámeros contiguos a lo largo de toda la cápside. En la figura 5.A se muestra como se distribuye un pentámero de VPs dentro de la cápside. Cada uno de los monómeros que conforman el

pentámero se encuentran resaltados en un color distinto (amarillo, verde, azul, rojo y rosa). La estructura tridimensional de VP3 muestra una conformación β -barril formada por 9 estructuras laminares (nombradas con letras de la A a la I), tal y como se muestra en la figura 6. Las cadenas que conectan cada estructura laminar se denominan asas y haciendo referencia a las láminas que conectan. Estas estructuras podrían ser las responsables de la estabilidad de la cápside. Las posiciones con respecto a los ejes de simetría de la cápside para VP3 están representadas por tres líneas perpendiculares en la figura 6. El extremo C-terminal de VP3 se encuentra posicionado en la interfaz de la cápside (fig. 5.B), mientras que el extremo N-terminal al interior (fig. 5.C). En los ejes de simetría triaxiales se encuentran protuberancias de 2 nm correspondientes a la asociación de las asas G-H de las VPs; en los ejes de simetría pentaxiales existen canales de 1 nm formados por las asas D-E. Algunos estudios sugieren que las asas son regiones hipervariables con respecto a los distintos serotipos de AAV y son precisamente estas regiones las responsables de las interacciones entre la cápside y la célula huésped (Kronenberg *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2002).

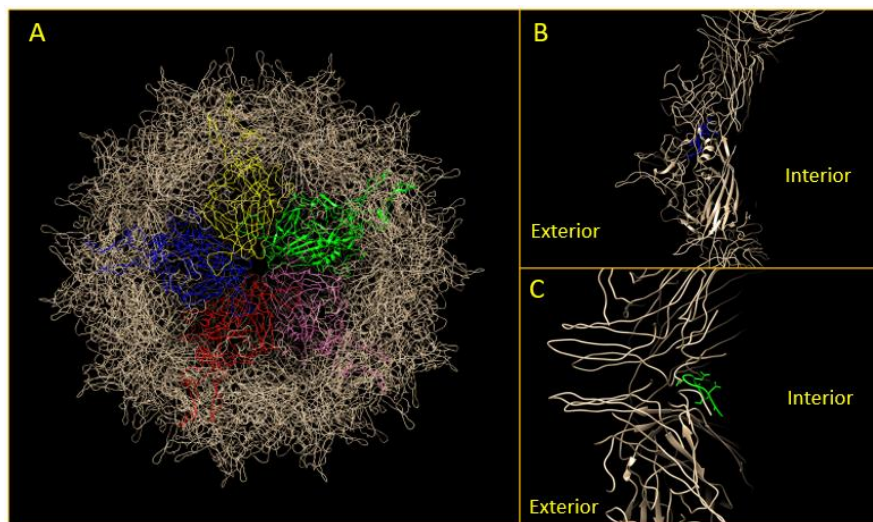


Figura 5. Estructura de cápside de AAV2. A) distribución de un pentámero de VP3 resaltado en colores (cada monómero de distinto color). B) Distribución del extremo C-terminal de VP3 en la cápside de AAV2. C) Distribución del extremo N-terminal de VP3 en la cápside de AAV2 (Xie *et al.*, 2002).

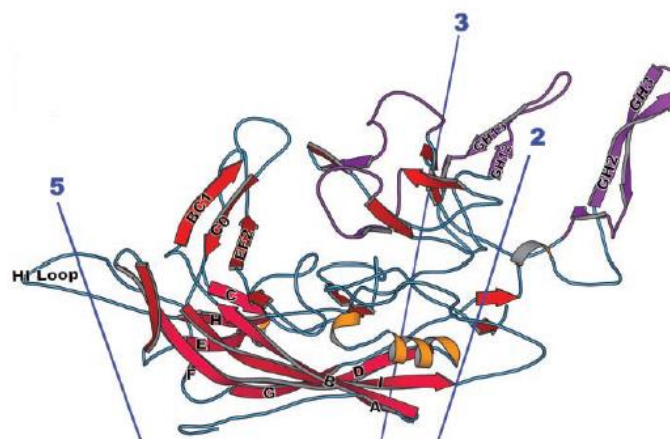


Figura 6. Estructura tridimensional de VP3. Se muestra la conformación de una estructura beta barril por 9 hebras paralelas nombradas desde la A a la I. Las asas se nombran de acuerdo a las hebras que las flanquean (Xie *et al.*, 2002).

Estabilidad física de cápsides de AAV

En 2013, Rayaprolu y colaboradores caracterizaron la estabilidad térmica en fase líquida de PPV de varios serotipos de AAV a través de calorimetría diferencial de barrido y fluorescencia diferencial de barrido, encontrando que para los serotipos AAV1, AAV2, AAV5 y AAV8 la temperatura de disociación de la cápside fue alrededor de 84, 68, 89 y 73 °C, respectivamente. Los resultados fueron corroborados por microscopía electrónica de transmisión (TEM), donde el desensamble de la cápside produce la formación irreversible de agregados de composición desconocida (Rayaprolu *et al.*, 2013). Esto podría deberse a que los complejos multiméricos tienden a poseer una mayor estabilidad térmica que los monómeros que los forman (Horton & Lewis, 1992). Estos resultados son consistentes con la evaluación de la estabilidad físico-química de PPV de AAV2 llevada a cabo por Chávez y colaboradores en 2011. Se encontró que las PPV son estables a 59°C, sin embargo, a 61°C ocurre un cambio conformacional relacionado con un aumento del tamaño de partícula y posteriormente, a 65°C se ocasiona el desensamble de la partícula y la agregación irreversible de las proteínas estructurales de la cápside (Chavez Peña & Palomares, 2011).

En el estudio llevado a cabo por Chávez y colaboradores se evaluó la estabilidad de cápsides de AAV2 exponiéndolas a diferentes condiciones realizando barridos de pH desde 4.5 hasta 8.0 y fuerza iónica (FI) de hasta 2 M. En general, en ninguna condición se observó el desensamble de las cápsides.(Chavez Peña & Palomares, 2011).

Formación de cápsides de AAV

El mecanismo más aceptado para explicar la formación de progenie de AAV consta de dos etapas; en la primera ocurre la formación de partículas virales vacías, y en la segunda etapa, el genoma viral es introducido dentro de éstas (Myers & Carter, 1991). Se ha demostrado que, en primer lugar, las proteínas VP se sintetizan en el citoplasma y posteriormente se transportan al núcleo, en donde se ensambla la cápside. Gallo-Ramírez y colaboradores estudiaron en 2011 la compartimentación de las proteínas de AAV en células de insecto High Five mediante técnicas de inmuno-localización. Al expresar únicamente los productos del gen *cap* (que codifica para las tres proteínas estructurales de AAV), se demostró que inicialmente las proteínas VP se encuentran en el citoplasma y posteriormente se transportan hasta el núcleo hacia zonas específicas. En estas zonas se concentran las proteínas virales y además ocurren los procesos de replicación del genoma viral, el ensamblaje de las cápsides y el empaquetamiento del genoma viral, por lo cual se han denominado centros de replicación viral. Cuando el AAV2 se replica en presencia de un adenovirus, se ha demostrado que el AAV ocupa los CRV de adenovirus para su propia replicación, utilizando proteínas de adenovirus y de la célula huésped. Hasta el momento, no se han realizado análisis profundos de la composición de los CRV de AAV2, sin embargo, se sabe que los CRV de adenovirus corresponden a cuerpos nucleares de proteína de leucemia promielocítica, los cuales son regiones de alta regulación en la transcripción de ciertos genes principalmente ligados a oncogénesis y la replicación de distintos virus. Lo anterior concuerda con lo encontrado en células de mamífero (Boisvert *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2014; Gallo-Ramírez *et al.*, 2011; Mouw & Pintel, 2000; Earley *et al.*, 2016).

Para conocer cuáles VPs son requeridas para la formación de PPV, Ruffing y colaboradores (1992) expresaron las proteínas VP de manera independiente en células de insecto con baculovirus recombinantes mediante mutaciones en los codones de inicio de VP2 y VP3, encontrando que VP2

es necesaria para la formación de PPV, sin embargo, en todos los casos en los que se infectaron las células Sf9 con el baculovirus para la expresión exclusiva de VP2, se detectaron por Western Blot bandas correspondientes al tamaño de VP3 (Ruffing *et al.*, 1992). Posteriormente, se encontró que existen 3 codones de inicio para VP3, con lo cual se explica la coexpresión de VP3 con VP2 en los estudios de Ruffing y colaboradores (Warrington *et al.*, 2004). Por el contrario, en un estudio más reciente se demostró la formación de PPV únicamente compuestas por VP3 o en combinación con VP1 o VP2 en células HEK 293, demostrando que es VP3, y no VP2, la proteína estructural esencial para la formación de cápsides (Warrington *et al.*, 2004). Sin embargo, en los estudios de Ruffing (1992) y Steinbach (1997), la expresión de únicamente VP3 no dio lugar a formación de cápsides, sugiriendo así que existe algún otro factor en el gen *cap* involucrado en el proceso de ensamblaje.

Proteína activadora de ensamblaje

En 2010 se descubrió un producto generado a partir del gen *cap* a través de un marco de lectura alternativo; la proteína activadora del ensamblaje (AAP). Sonntag y colaboradores (2010) sugirieron que AAP es indispensable para el ensamblaje de PPV, al encontrar que la expresión exclusiva de VP3 no forma PPV, aun cuando VP3 se fusionó con una secuencia de localización nuclear. La coexpresión de AAP y VP3 se requirió para la formación de PPV en células HEK 293, lo cual sugiere que, además de su localización en el núcleo, la presencia de AAP es necesaria para la activación del mecanismo de ensamblaje de PPV. El descubrimiento de esta proteína pudiera dar solución a las discrepancias existentes en cuanto a los requerimientos de VP para el ensamblaje de PPV. Sin embargo, en la literatura existen datos contradictorios, por lo cual, los mecanismos por los cuales AAP promueve la formación de las cápsides de AAV aún no son claros (Hoque *et al.*, 1999; Steinbach *et al.*, 1997; Sonntag *et al.*, 2010; Sonntag *et al.*, 2011).

El marco de lectura de AAP se encuentra entre los codones de inicio de las proteínas VP2 y VP1, exactamente 80 pares de bases río arriba del codón de inicio de VP3 (figura 1). AAP es una proteína de aproximadamente 22 kDa. Actualmente no se conoce la estructura tridimensional de AAP, sin embargo se sabe que contiene secuencias de localización nuclear y dos dominios hidrofóbicos ubicados en los extremos amino y carboxilo terminales, los cuales se han identificado como los sitios de interacción con las VPs de AAV2, siendo el dominio cercano al extremo N-terminal de VP3 de carácter esencial para dicha interacción (Naumer *et al.*, 2012). Estudios posteriores sobre el ensamblaje de AAV por Sonntag y colaboradores en 2011, han demostrado que AAP del AAV2 es capaz de promover el ensamblaje de distintos serotipos de AAV (F Sonntag *et al.*, 2011). En un estudio más reciente por Naumer y colaboradores en 2016, se descubrió que aparentemente, la necesidad de AAP en el proceso de ensamblaje varía con respecto a los distintos serotipos de AAV, siendo así el ensamblaje de los serotipos 4, 5 y 11 independiente de AAP en células HEK 293 (Earley *et al.*, 2016). Sin embargo en un estudio realizado en células HeLa, la expresión exclusiva de VP3 de AAV5 no dio lugar a la formación de cápsides (F Sonntag *et al.*, 2011).

A pesar de los esfuerzos realizados para entender el ensamblaje de la cápside de AAV, aún no se ha logrado dilucidar por completo este proceso. Los distintos factores intracelulares que afectan su ensamblaje, así como el potencial uso del virus en medicina, hacen de éste un modelo de estudio interesante. Es por ello que en este trabajo buscamos incrementar el conocimiento del ensamblaje

de AAV en células vivas mediante el uso de técnicas de microscopía de fluorescencia como FCS, RICS y N&B

Cápsides virales

La cápside es una cubierta proteica que envuelve el material genético de los virus confiriéndole protección de nucleasas o diversos factores que pudieran afectar su integridad. Está conformada por unas decenas o hasta cientos de copias de una o varias proteínas estructurales (VPs). En el caso de los virus no envueltos, las proteínas de la cápside son las encargadas de interactuar con la membrana de la célula huésped para llevar a cabo la internalización del virus al espacio intracelular. Generalmente, las proteínas de la cápside son también los blancos principales del sistema inmunológico (Caston & Carrascosa, 2013; Jane *et al.*, 2015). Debido a que las cápsides virales deben ser capaces de proteger el genoma viral y posteriormente desensamblarse para entregar dicho genoma dentro de la célula huésped, se ha determinado que son estructuras metaestables. La estabilidad de los ensamblados proteicos depende de las energías de contacto entre las subunidades así como de la energía libre de plegamiento de cada una de ellas (Ausar, 2006; Endres & Zlotnick, 2002; A. Zlotnick, 2003). Entre los factores que pueden alterar las propiedades de las proteínas virales se encuentran la temperatura, fuerza iónica (FI), pH y la presencia de agentes desnaturizantes.

El ensamblaje de la cápside de los virus es un proceso fundamental dentro del ciclo de replicación viral para dar lugar a la formación de nuevas partículas infecciosas denominadas viriones. En algunos casos, las proteínas de la cápside de un virus o fragmentos de ellas se han logrado autoensamblar en cápsides *in vitro* con características estructurales idénticas a las del virus nativo.

Uno de los parámetros para la clasificación de los virus es la estructura de su cápside. Existe en la naturaleza un número limitado de estructuras cuaternarias que pueden adoptar las VPs durante su ensamblaje. Entre las más comunes se encuentran las cápsides helicoidales y las icosaédricas.

Las cápsides helicoidales se observan como estructuras similares a rodillos o filamentos. Teóricamente existe un número infinito de capsómeros que pueden conformar una cápside helicoidal, y por lo tanto pudieran albergar una cantidad infinita de material genético. Las condiciones fisiológicas y biológicas son las que restringen la longitud de las cápsides helicoidales.

El tamaño de las cápsides virales con simetría icosaédrica se encuentra restringido de acuerdo al número de subunidades que las conforman. Generalmente, una cápside icosaédrica cuenta con $60T$ capsómeros, donde T es el número de triangulación. El número T hace referencia a la complejidad de la cápside de un virus icosaédrico. En un plano conformado por hexámeros con dimensiones h y k , el número T se calcula mediante la ecuación 2, donde se hace referencia a los valores de las coordenadas h y k que existen entre dos pentámeros de la cápside (figura 7).

$$T = h^2 + hk + k^2 \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

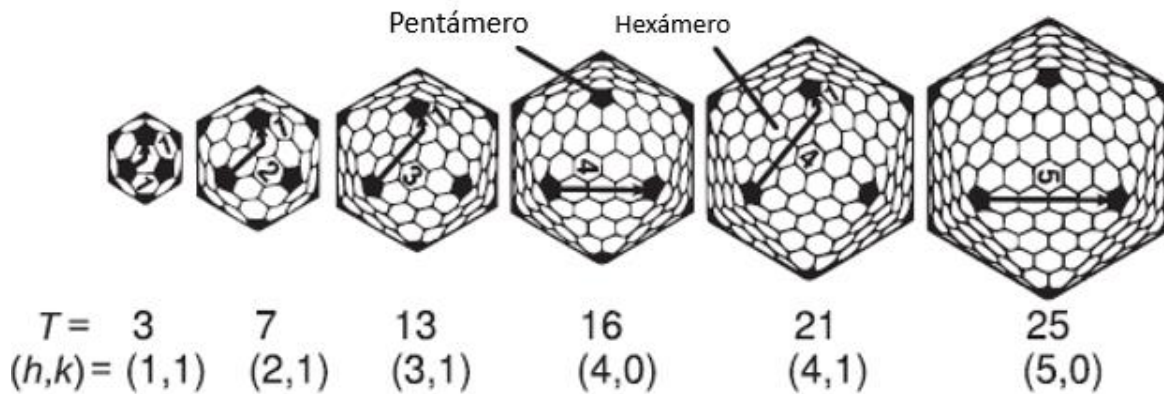


Figura 7. Número de triangulación de cápsides icosaédricas. Cápsides icosaédricas de distintos tamaños conformadas por 12 pentámeros (representados como pentágonos negros) y una cantidad variable de hexámeros. Modificado de Mannige et al 2010.

Modelos teóricos de ensamblaje de cápsides icosaédricas

Existen modelos que tratan de describir la cinética de ensamblaje de cápsides icosaédricas *in vitro*. Zlotnick y colaboradores propusieron modelos de nucleación en los cuales la formación de cápsides depende de la concentración de las subunidades presentes. En estos modelos se toma en cuenta la velocidad de reacción de ensamblaje con base en el cambio de la concentración de los intermediarios con respecto al tiempo. Existe una concentración crítica por encima de la cual la formación de núcleos de ensamblaje es termodinámicamente favorable, sin embargo, si la concentración de monómeros libres es muy elevada, el proceso de ensamblaje puede caer en trampas termodinámicas, resultado de un alto número de procesos de nucleación, de tal manera que al final se obtienen cápsides incompletas debido al rápido consumo de las subunidades presentes inicialmente. Estudios del ensamblaje de distintos virus han demostrado que en equilibrio, la concentración de monómeros libres y de partículas ensambladas son predominantes en comparación con los diversos intermediarios posibles de formación de cápsides (Zlotnick, 2005; Zlotnick et al., 2007; Zlotnick & Stray, 2003). Es justamente esta característica del ensamblaje la que demanda metodologías de alta resolución que sean capaces de identificar los intermediarios del ensamblaje.

Estudios del ensamblaje de cápsides virales

A pesar de que se han logrado grandes avances en el desarrollo de técnicas que permiten revelar la estructura de las cápsides de los virus, aún existen áreas de oportunidad en el diseño de metodologías que permitan caracterizar experimentalmente los mecanismos de formación de las cápsides. Es posible inducir el ensamblaje de algunas proteínas virales *in vitro* mediante el control de las condiciones del medio. Estas partículas cuentan generalmente con características estructurales muy similares a las del virus nativo y, por tanto, se han utilizado como modelos de estudio para el ensamblaje de cápsides virales.

Entre las metodologías que se han aplicado para el estudio de producción de cápsides virales se encuentran la cromatografía de exclusión por tamaño, que es una técnica semicuantitativa que permite conocer la cantidad de subunidades y de cápsides presentes en la muestra. Sin embargo, los límites de detección de esta técnica no permiten observar la presencia de los distintos intermediarios del ensamblaje. Otros acercamientos han utilizado técnicas de dispersión de luz para describir la cinética de formación de cápsides del virus de papiloma tipo 11 *in vitro* (Ceres & Zlotnick, 2002; Zlotnick *et al.*, 1999, Mena *et al.*, 2006). Este tipo de técnicas dan información resultante de una población de moléculas y por lo tanto pierden resolución de molécula única. En otro estudio se logró identificar la presencia de intermediarios tempranos de cápsides de hepatitis B (HBV) y norovirus en el equilibrio mediante espectrometría de masas de movilidad de iones (Utrecht *et al.*, 2011). Otro de los avances más significativos ha sido el desarrollo de dispositivos contadores de partículas que son responsivos a cambios o pulsos en la resistividad de soluciones de cápsides que pasan a través de nanocanales y que han logrado diferenciar partículas con estructuras T=3 de aquellas T=4 del virus de HBV así como algunos intermediarios (Harms *et al.*, 2015). A pesar de que se logró la detección de señales que corresponden a intermediarios del ensamblaje, no se ha determinado hasta ahora una relación para determinar el peso molecular de cada intermediario.

Los estudios realizados anteriormente *in vitro* no necesariamente reflejan los acontecimientos que se llevan a cabo dentro de una célula viva. Debido a lo anterior, existe un interés general en el desarrollo de técnicas no invasivas que permitan brindar información acerca de los procesos moleculares en tiempo real en estudios de células vivas. En 2012, Adu-Gyamfi y colaboradores utilizaron técnicas de espectroscopía de fluorescencia para determinar la presencia de oligómeros de VP40 del virus de ébola en la membrana citoplasmática de las células infectadas, demostrando así que es después de la interacción con la membrana cuando tiene lugar la formación de hexámeros y octámeros de VP40 (Adu-Gyamfi *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta el potencial de estas metodologías, en este trabajo propusimos el uso de un enfoque en el que se usa la correlación de fluctuaciones de fluorescencia para estudiar el ensamblaje de la cápside de AAV2 en células de insecto.

Correlación de fluctuaciones de espectroscopía de fluorescencia

El campo de las correlaciones de fluctuaciones de espectroscopía de fluorescencia (FFS) se desarrolló a partir del concepto de dispersión dinámica de luz (DLS). A diferencia de DLS, en FFS se obtienen señales de intensidad de fluorescencia de moléculas difundiendo a través del tiempo en un medio (L. Elson & Magde, 1974; Magde & L. Elson, 1974) . Entre las metodologías que se han desarrollado bajo el concepto de FFS se encuentran, la correlación de espectroscopía de fluorescencia de un punto fijo (FCS), la correlación de espectroscopía de escaneo de imagen (RICS) y recientemente el análisis de número y brillo (N&B). El uso de estas metodologías en conjunto permite conocer la localización celular, la concentración, el coeficiente de difusión (D) y la cantidad de fluoróforos en los complejos fluorescentes presentes en el volumen de observación (Rossow *et al.*, 2010).

Para el estudio del ensamblaje de la cápside de AAV2 en células vivas, se planteó una combinación de técnicas; FCS, RICS y N&B. Debido a que hasta el momento no se ha reportado la formación de cápsides de AAV2 compuestas completamente por VPs fusionadas a proteínas fluorescentes (EGFP-VP), se hace uso de una combinación entre VPs fusionadas o no con proteínas fluorescentes. En

algunos estudios se ha logrado la formación de cápsides de AAV2 con hasta 10 proteínas fluorescentes (Judd et al., 2012; Rojas-Gómez & Palomares, 2009). El análisis de N&B únicamente brinda información acerca de la cantidad de fluoróforos que forman parte de un complejo. El uso de esta técnica no es suficiente para diferenciar entre complejos con la misma cantidad de VPs fusionadas a proteínas fluorescente con una cantidad distinta de VPs totales, es decir, N&B es incapaz de diferenciar entre un hexámero de EGFP-VP de una cápside de 60 VPs compuesta por 54 VPs y 6 EGFP-VP. Es por ello que se decidió realizar una combinación de análisis con RICS y FCS. Así, un hexámero de EGFP-VPs pudiera diferenciarse de una cápside con 6 EGFP-VPs mediante el análisis de su coeficiente de difusión.

Correlación de espectroscopía de fluorescencia de un punto fijo

Esta metodología se desarrolló originalmente por Magde et al en 1974 para determinar la unión de bromuro de etidio al DNA de doble cadena. Posteriormente se demostró el potencial de esta metodología para describir el espectro temporal de las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia debidas a moléculas fluorescentes difundiendo a través de un volumen confocal utilizando la aproximación de la función de autocorrelación (FAC). Esta técnica se puede utilizar para el estudio de sistemas en el equilibrio, en los cuales se asume que las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia se deben al movimiento difusivo de las partículas a través del volumen de observación. En esta técnica se adquieren datos de intensidad de fluorescencia de un volumen pequeño dentro de la muestra, en el orden de micrómetros cúbicos, de manera intermitente hasta contar con un gran número de mediciones. Si el tiempo de adquisición de los datos es lo suficientemente pequeño, se puede estimar el tiempo que tarda un fluoróforo en atravesar el volumen de observación. Para la adquisición de los datos de intensidad de fluorescencia se emplea microscopía confocal, con la cual es posible obtener un volumen de las dimensiones adecuadas. Este volumen, denominado volumen confocal, depende de la configuración del equipo y el láser utilizado (figura 8).

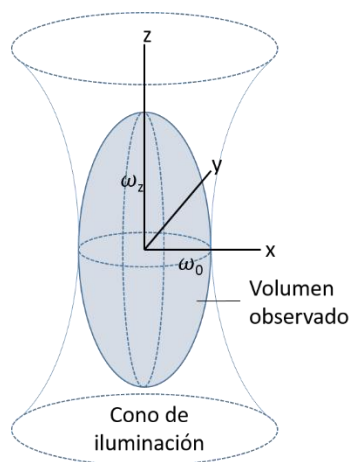


Figura 8. Representación del volumen confocal del sistema utilizado. Modificado de Lakowicz, 2006.

Posteriormente, para analizar las fluctuaciones de las moléculas difundiendo a través del volumen confocal, se calcula la correlación entre los valores de intensidad de fluorescencia a través del tiempo tal y como se muestra en la ecuación 3, la cual describe la FAC de FCS

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \dots\dots\dots \text{Ecuación 3}$$

Donde:

$F(t)$: intensidad de fluorescencia al tiempo t .

τ : desplazamiento en el tiempo (tiempo de exposición).

G : magnitud de FAC.

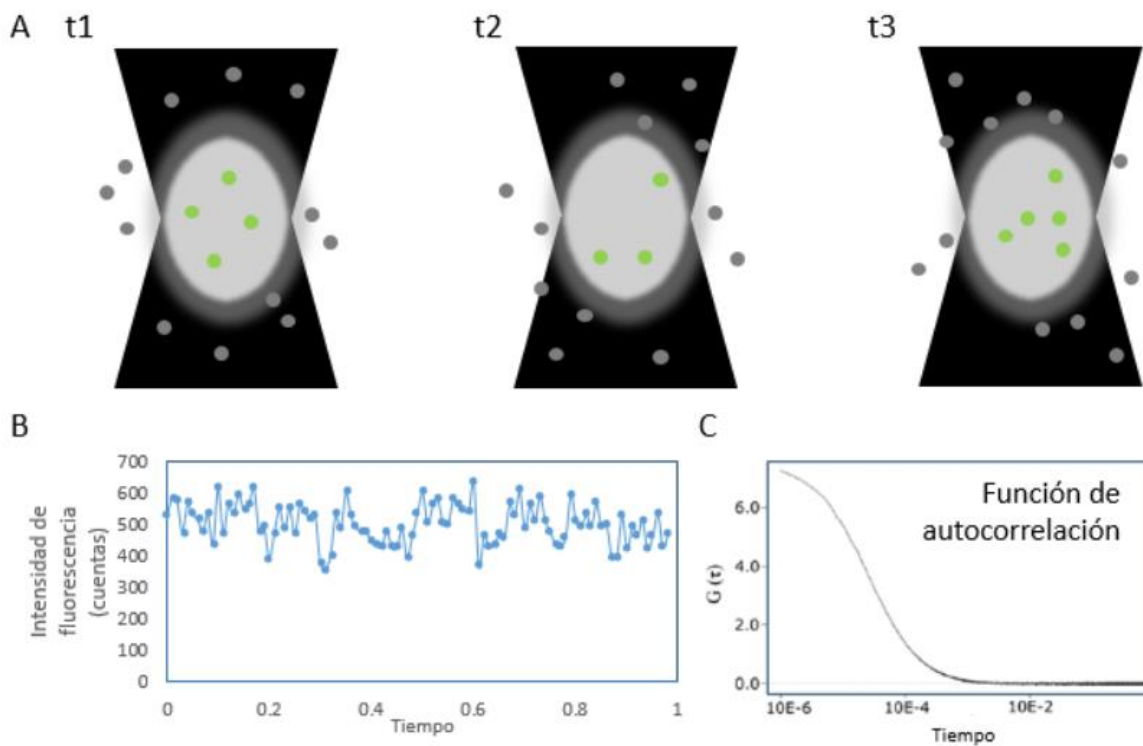


Figura 9. Correlación de espectroscopía de fluorescencia de punto fijo. A) Moléculas fluorescentes difundiendo a través de la muestra (puntos grises) y dentro del volumen de excitación (puntos verdes) a distintos tiempos de adquisición de datos de fluorescencia. B) Se recolectan datos en un periodo determinado para obtener un vector largo con las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia a través del tiempo debido al movimiento difusivo de las partículas. C) Mediante un algoritmo matemático se obtiene la FAC de los datos previamente obtenidos. Modificado de Migueles-Ramírez, 2017.

En la figura 9.C se muestra cómo debería ser una curva de FAC para FCS. Se observa como el valor de G disminuye con respecto al tiempo (τ) siguiendo un comportamiento sigmoideo. La caída de la FAC contiene información sobre el coeficiente de difusión. La función de autocorrelación hace referencia a qué tan parecido es el valor F al tiempo τ con respecto al valor inicial de F , es decir, si una molécula permanece en el volumen confocal al tiempo τ , habrá una contribución positiva al valor de G . En el momento en el que la molécula fluorescente abandone el volumen confocal como consecuencia de su desplazamiento difusivo, dejará de contribuir al valor de G y, por tanto,

provocará una caída en su valor. Así, cuando el D de la molécula fluorescente disminuye, se espera un incremento en el valor de τ en el cual se presenta la caída del valor de G . Por el contrario, a valores mayores de D , la caída de la FAC se presentará a un tiempo τ menor. Cuando τ tiende al infinito, el valor de G se aproxima a 0.

La FAC de los datos experimentales se ajusta al modelo teórico representado en la ecuación 4, en la cual está involucrado el valor de D , el cual nos interesa conocer para saber el tamaño de los complejos formados y por lo tanto su peso molecular (MW). En la figura 10 se muestra el ejemplo de un ajuste de los datos experimentales obtenidos mediante FCS al modelo de la ecuación 4.

$$G(\tau) = G(0) \left(1 + \frac{\tau}{\frac{\omega_0^2}{4D}}\right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{\omega_0}{\omega_z}\right)^2 \frac{\tau}{\frac{\omega_0^2}{4D}}\right)^{-1/2} \dots\dots\dots \text{Ecuación 4}$$

Donde:

$G(0)$: amplitud de FAC al tiempo 0.

τ : desplazamiento en el tiempo.

D : coeficiente de difusión

ω_0 y ω_z = dimensiones del volumen confocal

El modelo teórico de la ecuación 4 es el resultado del análisis del comportamiento de las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia a través del tiempo, debidas al movimiento difusivo de las moléculas fluorescentes a través de un volumen abierto de dimensiones definidas. Este modelo considera un proceso de difusión simple y un volumen de una Gaussiana en tres dimensiones.

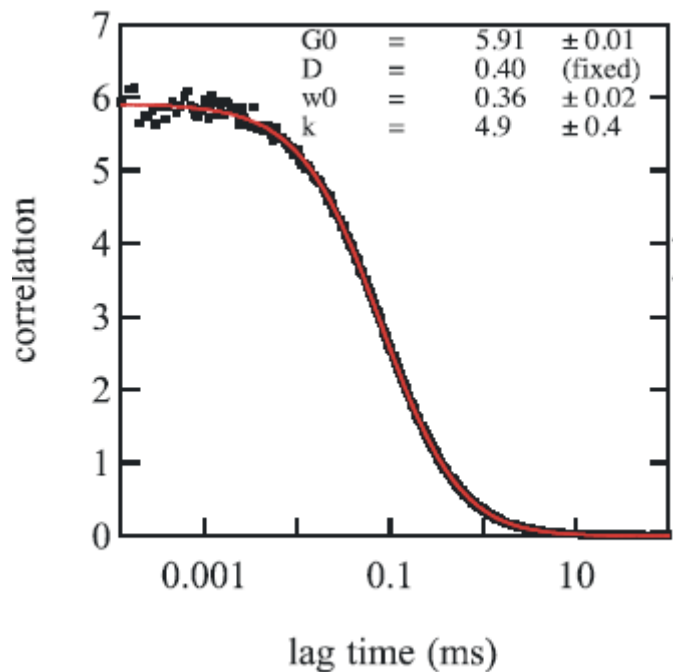


Figura 10. Función de autocorrelación del fluoróforo ATTO 655 0.25 nM (Buschmann et al., 2007).

Mediante el uso de la ecuación de Stokes-Einstein es posible determinar el radio hidrodinámico de partícula (R_H) a partir del conocimiento de su D .

$$R_H = \frac{K_B T}{6\pi\eta D} \dots\dots\dots \text{Ecuación 5}$$

Donde:

K_B : es la constante de Boltzman.

T : temperatura (Kelvin).

η : viscosidad aparente del medio.

D : coeficiente de difusión de la partícula.

Y tomando en cuenta la aproximación de la relación entre el radio hidrodinámico de proteínas globulares con respecto a su peso molecular (MW) descrita en la ecuación 6, es posible utilizar FCS para estimar la oligomerización de la molécula de interés mediante el análisis en los cambios en su coeficiente de difusión (Dross et al., 2009; L. Elson & Magde, 1974; Magde & Elson, 1974).

$$R_h = \sqrt[3]{\frac{3vMW}{10\pi N_A}} \dots\dots\dots \text{Ecuación 6}$$

Donde:

N_A : Número de Avogadro

Correlación de espectroscopía de escaneo de imagen

A diferencia de FCS, que únicamente brinda información temporal acerca de un solo punto, RICS es una técnica que permite brindar información espacial y temporal de la región de interés analizada (RDI). En la literatura se ha descrito que al desplazar el volumen confocal a través de la muestra siguiendo un patrón definido de una forma periódica y a una velocidad tal que una molécula fluorescente no se mueve demasiado durante un periodo de escaneo, es posible conocer la localización espacial y temporal de la fluctuación de fluorescencia. La adquisición de datos para su análisis mediante RICS involucra la obtención de imágenes en modo de escaneo, por lo cual una sola imagen contiene tanto información espacial como temporal, en el orden de microsegundos en una dimensión y milisegundos en otra dimensión (figura 11). Se escanea repetidas veces la misma RDI para obtener un apilado temporal de imágenes.

De forma similar a FCS, RICS utiliza el modelo de FAC para obtener el coeficiente de difusión de complejos fluorescentes. En el caso de RICS, la FAC se calcula de acuerdo a la ecuación 7.

$$G(\xi, \psi) = \frac{\langle \delta F(x,y) \delta F(x+\xi, y+\psi) \rangle_{x,y}}{\langle F(x,y) \rangle_{x,y} \langle F(x,y) \rangle_{x,y}} \dots\dots\dots \text{Ecuación 7}$$

ξ : incremento en x

ψ : incremento en y

$F(x, y)$: intensidad de fluorescencia de cada pixel

$$\delta(F) = F - \langle F \rangle$$

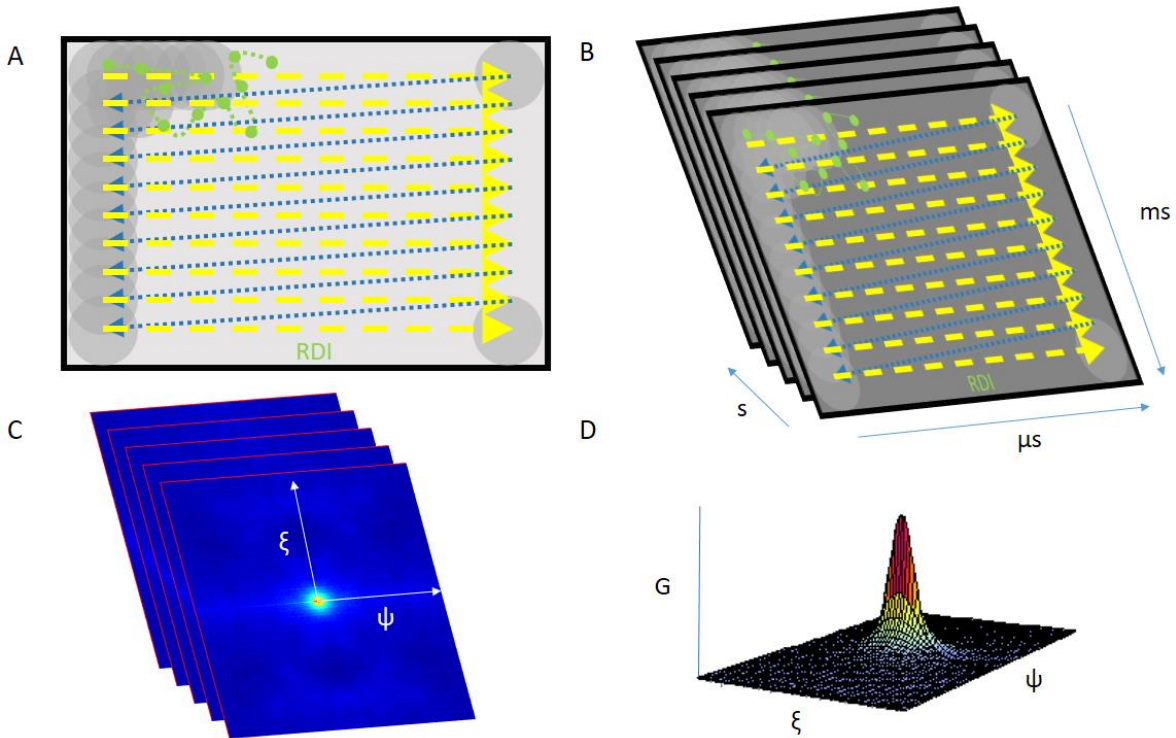


Figura 11. Correlación de espectroscopía de escaneo de imagen. A) Modo de escaneo de una imagen de RICS, dónde el volumen de observación (círculo gris) se desplaza de forma periódica en dirección a las flechas amarillas (cuando se están recolectando datos) y azules (no se recolectan datos). Se muestra el ejemplo de una molécula fluorescente (puntos verdes) difundiendo en la región de interés (RDI) a través del tiempo mientras se escanea la imagen. B) Se escanea múltiples veces la misma RDI para obtener un apilado de imágenes. C) Se obtiene la FAC de RICS para cada imagen la cual es función del desplazamiento en las direcciones ξ y ψ . D) Representación en tres dimensiones de la FAC promedio de RICS, donde G es el valor de su magnitud. Modificado de Migueles-Ramírez, 2017.

En la ecuación 7 se puede observar que el análisis utilizado para obtener la FAC de RICS tiene un enfoque espacial y temporal y, por lo tanto, hace una comparación entre los píxeles adyacentes de una misma imagen, por lo que la resolución a un píxel se pierde. Se obtiene la FAC para cada imagen del apilado temporal y al final se calcula la FAC promedio. Posteriormente, las FAC promedio de cada apilado temporal se ajusta al modelo teórico de RICS descrito en la ecuación 8.

$$G_{RICS}(\xi, \psi) = S(\xi, \psi)G(\xi, \psi) + b \dots\dots\dots \text{Ecuación 8}$$

Donde:

$$G(\xi, \psi) = \frac{\gamma}{N_p} \left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi)}{\omega_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi)}{\omega_z^2} \right)^{-1/2} \dots\dots\dots \text{Ecuación 9}$$

y

$$S(\xi, \psi) = \exp\left(-\frac{\frac{1}{2}\left[\left(\frac{2\xi\delta_r}{\omega_0}\right)^2 + \left(\frac{2\psi\delta_r}{\omega_0}\right)^2\right]}{\left(1 + \frac{4D(\tau_p\xi + \tau_l\psi)}{\omega_0^2}\right)}\right) \dots \dots \dots \text{Ecuación 10}$$

Donde:

N_p : número de fotones en el volumen confocal

γ : factor geométrico que depende del perfil del volumen confocal. Para un perfil de una Gaussiana 3D, $\gamma = 0.35$

D : coeficiente de difusión

τ_p : tiempo de pixel

τ_l : tiempo de traveso de línea

δ_r : tamaño de pixel

ω_0 y ω_z = dimensiones del volumen confocal

En el modelo teórico de RICS (ecuación 8), el término $G(\xi, \psi)$ contiene información sobre el movimiento difusivo de la molécula de interés, mientras que el término $S(\xi, \psi)$, involucra información acerca del modo de las condiciones de adquisición de los datos.

Esta metodología se ha utilizado para el estudio de la interacción de factores de transcripción con sus blancos en células de *Arabidopsis* mediante el análisis en los cambios del coeficiente de difusión de los complejos (Clark *et al.*, 2016).

Análisis de número y brillo

Este análisis proporciona información acerca de la concentración y el estado de oligomerización de complejos fluorescentes para cada pixel en un apilado temporal de imágenes. Se obtiene el valor del brillo aparente, el cual se define como la cantidad de fotones que emite un fluoróforo por unidad de tiempo, mediante el análisis de varianza y promedio de las intensidades de fluctuaciones de un pixel a través del tiempo. Los datos generados para RICS pueden ser utilizados para su análisis mediante N&B. La limitante de esta técnica es que es incapaz de resolver una mezcla de distintos grados de oligomerización en un pixel dado. Esta metodología se ha utilizado para conocer la oligomerización de diversas proteínas de interés en células vivas como factores de transcripción en plantas, proteínas de citoesqueleto y concavalina A en fibroblastos de embrión de ratón (Clark *et al.*, 2016; Digman *et al.*, 2009; Vetri *et al.*, 2011).

En la figura 12 se muestra el fundamento del análisis de N&B, dónde se encuentran graficados los datos de fluctuaciones de intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo de tres muestras, (75 monómeros, 150 monómeros y 75 dímeros), donde podemos observar que el promedio de intensidad de fluorescencia de las muestras con 75 dímeros y 150 monómeros es el mismo, ya que existe la misma cantidad de moléculas promedio en el volumen de observación, y corresponde al doble del promedio de la muestra con 75 monómeros, ya que esta contiene en promedio la mitad de moléculas fluorescentes en el volumen de observación comparado con las otras dos (figura 12.A). Cuando se grafica un histograma de las tres muestras, se observa que los valores de intensidad de fluorescencia más frecuentes para las muestras con 75 dímeros y 150 monómeros son los mismos, y una vez más, corresponden al doble de aquellos valores con mayor frecuencia en la muestra con 75 monómeros. Sin embargo, al observar la distribución de cada histograma se puede apreciar como en las muestras que contienen monómeros, la distribución es similar, mientras que en la muestra

que contiene dímeros, la distribución es más grande (dos veces mayor en comparación con la distribución de las muestras con monómeros). Lo anterior es debido a que la variación resultante de dos moléculas fluorescentes entrando o saliendo del volumen de observación al mismo tiempo (dímeros) será el doble con respecto a aquella provocada por una molécula independiente (monómeros). De esta forma, el análisis de varianza y promedio de las intensidades de fluorescencia de cada pixel permite conocer la estequiometria y concentración de los complejos difundiendo en la muestra.

En esta metodología se calculan los valores promedio de brillo aparente (B) y número aparente (N) a partir del promedio ($\langle F \rangle$) y varianza (σ^2) de las intensidades de fluorescencia para cada pixel de un apilado temporal de imágenes, tal y como se muestra en las ecuaciones 11 y 12.

$$B = \frac{\sigma^2}{\langle F \rangle} = \varepsilon + 1 \dots \dots \dots \text{Ecuación 11}$$

$$\langle N \rangle = \frac{\langle F \rangle^2}{\sigma^2} = \frac{\varepsilon n}{\varepsilon + 1} \dots \dots \dots \text{Ecuación 12}$$

Donde:

ε : brillo molecular, número de fotones emitidos por una molécula fluorescente por segundo en el centro del volumen de observación.

n : Promedio del número de moléculas fluorescentes en el volumen de observación.

En este análisis, se utiliza la varianza como indicador del grado de estequiometria del complejo fluorescente, por lo cual, B brinda información acerca de la cantidad de fluoróforos que forman parte de un mismo complejo mientras que N brinda información acerca del número de moléculas promedio, y por tanto la concentración promedio, en un pixel determinado.

Es necesario realizar varios pasos de calibración durante el análisis de $N&B$ y establecer una relación entre la σ^2 de la señal de F , el valor de B y, por tanto, el estado de oligomerización del complejo fluorescente.

La adquisición de datos se realiza operando el detector en modo de conteo de fotones. Básicamente, el detector consta de un fotomultiplicador (PMT), el cual consta de un fotocátodo que emite electrones (e^-) cuando recibe los fotones provenientes de la emisión de fluorescencia de la muestra, un campo eléctrico, que acelera los e^- y los dirige a un ánodo, un arreglo de dínodos (multiplicador de electrones), y un ánodo que funciona como colector de e^- , en un tubo al vacío.

En el modo de conteo de fotones, el detector se utiliza a su nivel máximo teórico de sensibilidad. Cada pulso del ánodo originado por un e^- desprendido del fotocátodo como respuesta a la llegada de un fotón, es detectado y contado. Si dos pulsos llegan al ánodo en un intervalo muy pequeño de tiempo, serán contados como un solo pulso. Es por ello que el rango lineal del detector se limita su velocidad de conteo. Cuando se recolectan datos de conteo de fotones provenientes de una fuente constante de luz, la varianza de los datos es proporcional a su media en el rango de linealidad del detector. Un enfoque utilizado para la delimitación del rango de linealidad del detector es la recolección de datos de F de una fuente constante de luz a distintos niveles de señal. Posteriormente se gráfica la varianza con respecto al promedio de los valores de F de cada pixel a través del tiempo

y finalmente, se determina el rango de la curva donde se obtiene un coeficiente de correlación lineal superior a 0.99.

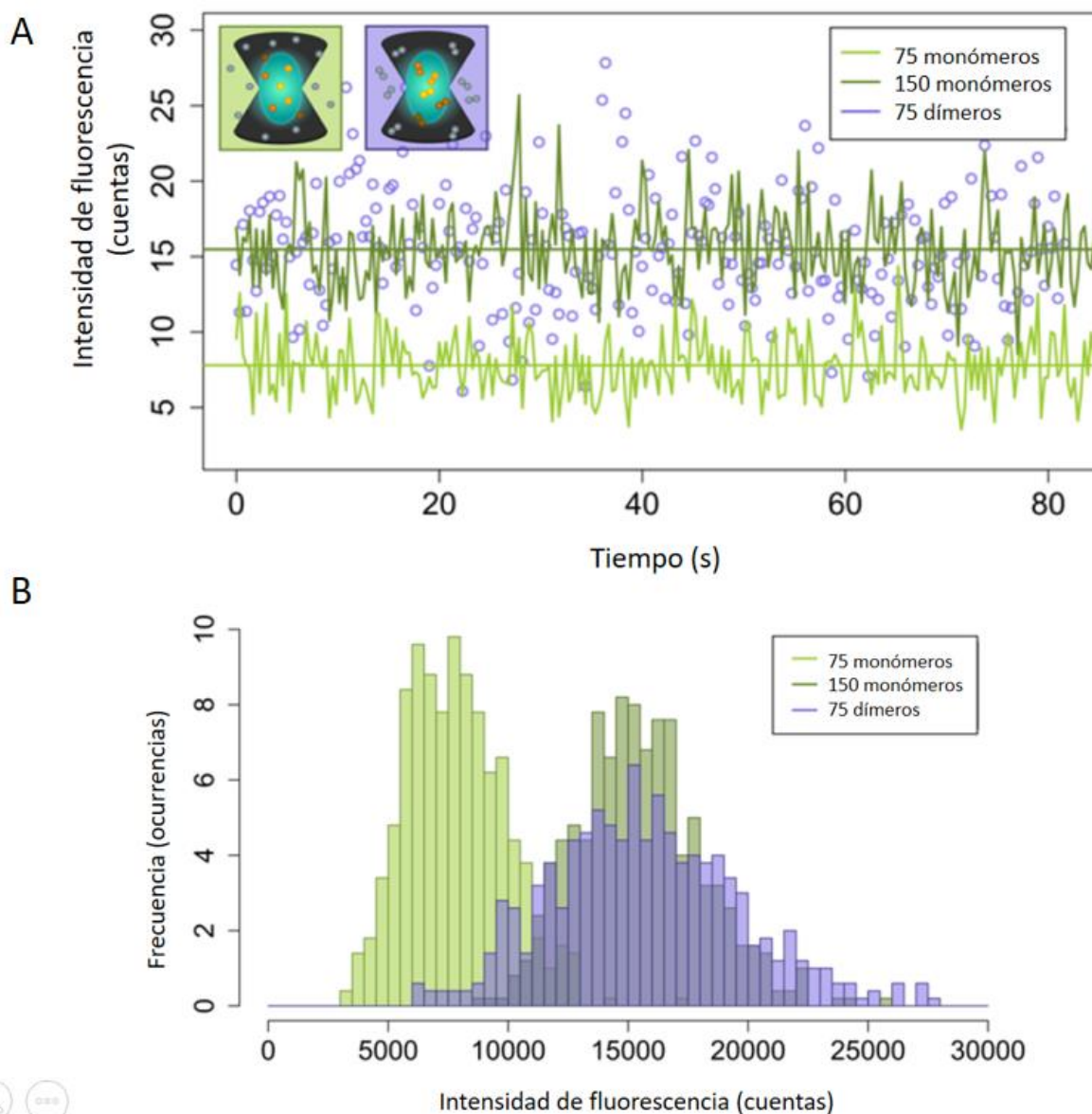


Figura 12. Análisis de número y brillo. A) Fluctuaciones de intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo de 3 muestras con 75 monómeros, 150 monómeros o 75 dímeros. B) Histograma de Intensidades de fluorescencia de 3 muestras con 75 monómeros, 150 monómeros o 75 dímeros. Tomado de Migueles-Ramírez, 2017.

Otro factor importante es determinar el valor del factor de proporcionalidad fotón/electrón (S) del detector. Este factor puede ser extraído del valor de la pendiente de la gráfica de varianza con respecto a la media de F de datos adquiridos para la determinación del rango de linealidad del detector, o bien, realizar una calibración durante cada experimento. En el modo de conteo de fotones, la varianza de los datos de F se debe a la suma de la varianza debida al movimiento de

partículas fluorescentes a través del volumen de observación (σ_n^2) y la varianza del detector (σ_d^2), las cuales se definen en las siguientes ecuaciones:

$$\sigma_n^2 = S^2 \varepsilon^2 n \dots\dots\dots \text{Ecuación 13}$$

$$\sigma_d^2 = S^2 \varepsilon n + \sigma_0^2 \dots\dots\dots \text{Ecuación 14}$$

Donde:

σ_0^2 : varianza del ruido de la electrónica del detector.

En estas condiciones, el valor promedio de la intensidad F se define como:

$$\langle F \rangle = S \varepsilon n + offset \dots\dots\dots \text{Ecuación 15}$$

Donde:

$offset$: desplazamiento en el valor de F debido a la contribución del detector.

Tomando en cuenta las ecuaciones 13, 14 y 15, el B y N se redefinen según las ecuaciones 16 y 17 de la siguiente manera:

$$\langle N \rangle = \frac{(\langle F \rangle - offset)^2}{\sigma^2 - \sigma_0^2} = \frac{\varepsilon n}{\varepsilon + 1} \dots\dots\dots \text{Ecuación 16}$$

$$B = \frac{\sigma^2 - \sigma_0^2}{\langle F \rangle - offset} = S(\varepsilon + 1) \dots\dots\dots \text{Ecuación 17}$$

OBJETIVOS

Objetivo general

Estandarizar una estrategia para dilucidar la formación de complejos moleculares de las VPs durante la formación de cápsides de AAV en células vivas.

Objetivos específicos

- Producir cápsides de AAV con proteínas VPs fusionadas a una proteína fluorescente.
- Estandarizar las condiciones para el análisis de correlación de fluctuaciones de fluorescencia en el sistema CI-BV.
- Comparar la localización, concentración y desplazamiento intracelular de las VPs durante su ensamblaje en células Sf9.
- Evaluar los cambios en el coeficiente de difusión de las VPs durante su ensamblaje en cápsides en la línea celular Sf9.
- Caracterizar los cambios intracelulares en el brillo aparente de los complejos de las VPs de AAV2 en células Sf9.
- Evaluar el efecto de AAP sobre la estequiometría y transporte de las VPs de AAV2 en células Sf9.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares, baculovirus recombinantes y condiciones de cultivo

Se utilizaron células de insecto Sf9 para la amplificación y determinación de títulos de baculovirus, los ensayos del ensamblaje y producción de cápsidas de AAV2, incubadas en medio SF900-II a 27°C. Para la transfección y aislamiento de baculovirus recombinantes se utilizaron células Sf9 en medio de cultivo Grace's. La amplificación de baculovirus recombinantes se realizó en cultivos en matraz agitado a 270 rpm mientras que los demás ensayos se realizaron en cultivos en adherencia en placas de 6 pozos.

Los baculovirus recombinantes Bac-VP3, Bac-EGFP, Bac-EGFP-VP1 y Bac-Cap que codifican para las proteínas VP3, EGFP, EGFP fusionada al extremo N-terminal de VP1 y el gen *cap* completo respectivamente, fueron construidos previamente por miembros del laboratorio. Los baculovirus recombinantes se amplificaron y se determinó el título viral conforme al protocolo detallado más adelante. Para la construcción del baculovirus recombinante Bac-EGFP-VP1, se utilizó un fragmento con la secuencia codificante completa de VP1, pero con mutaciones en los codones de inicio de las proteínas VP2 y las distintas isoformas de VP3. De esta forma se aseguró que no se expresarán las otras proteínas VP. Sin embargo, en ese momento no se consideró la presencia de la secuencia codificante para AAP dentro la secuencia de VP1, por lo cual, este baculovirus, además de expresar la proteína quimera EGFP-VP1 también cuenta con la capacidad de expresar la proteína AAP.

Construcción de baculovirus recombinantes

Se planteó la construcción de 3 baculovirus recombinantes, Bac-AAP, Bac-EGFP-AAP y Bac-EGFP-VP3 con el objetivo de evaluar el efecto de la proteína AAP sobre la localización y oligomerización de las VPs. Para ello se utilizó el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen, 10359-016), en el cual es necesario crear un vector de transferencia denominado pFastBac. Las secuencias codificantes para las proteínas AAP y VP3 se amplificaron a partir del plásmido pVL-VP1, mientras que la secuencia de EGFP se amplificó a partir del pFastBac-EGFP-VP1. Ambos plásmidos fueron construidos por Rojas en 2009 en nuestro laboratorio (Rojas & Palomares, 2009).

Construcción de pFast-Bac

Para la construcción del pFastBac-AAP se diseñaron los oligos F-AAP y R-AAP con secuencias reconocidas como sitios de restricción por las enzimas BamHI y XbaI respectivamente en sus extremos 5'. La secuencia codificante de AAP se clonó posteriormente en el vector pFastBac™1 (ThermoFisher) bajo estos sitios de restricción llevando a cabo una reacción de digestión con BamHI y XbaI por dos horas a 37°C, utilizando una relación de 10 unidades de cada enzima por cada microgramo de DNA. Se realizó purificación de banda con el Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit y posteriormente se realizó la ligación con la enzima T4 DNA ligasa (M0202S) de NEB. La ligación se utilizó para transformar células electrocompetentes de *E. coli* DH5α.

La construcción del pFastBac-AAP se corroboró mediante PCR de colonia y secuenciación con los oligonucleótidos F-polh y R-SV40, los cuales delimitan la región en la que se insertó el gen de interés; de esta manera, un PCR de colonia del plásmido sin inserto proporcionará un amplicón de aproximadamente 400 pb, mientras que para un vector con inserto será de aproximadamente 400

pb más el tamaño del inserto. El DNA plasmídico de las colonias positivas para el plásmido con inserto se purificó con el kit Zippy™ Plasmid Miniprep Kit (Qiagen).

Para la construcción del pFB-EGFP-AAP y el pFB-EGFP-VP3 se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen de EGFP que adicionan sitios de restricción *BamHI* y *XbaI* en el extremo 5' y 3' respectivamente de la secuencia de EGFP y se eliminó el codón de paro de EGFP. Para los genes de AAP y VP3 se diseñaron oligonucleótidos que adicionan sitios de restricción para las enzimas *XbaI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3' de las secuencias codificantes respectivamente. Los oligonucleótidos se diseñaron para generar un linker de 9 aminoácidos (GSGSRGGAS) entre las cadenas codificantes para EGFP y las proteínas AAP o VP3. Se fusionaron las secuencias codificantes para los genes de EGFP y AAP utilizando el sitio de restricción *XbaI* y una T4 DNA ligasa de NEB. Cada una de los productos amplificados se insertó en el vector pFastBac™1 utilizando los sitios de restricción adicionados con los oligonucleótidos.

Generación de bácmidos recombinantes

Una vez construido el pFastBac-AAP, se prosiguió a transformar células de *E. coli* DH10bac quimiocompetentes, las cuales contienen un vector auxiliar que codifica para las enzimas necesarias para llevar a cabo la recombinación entre las regiones *Tn7* del pFastBac y el bácmido, el cual se encuentra de forma episomal dentro de la bacteria y contiene los genes para poder generar el baculovirus recombinante. El bácmido recombinante fue purificado mediante miniprep y analizado por PCR utilizando los oligonucleótidos M13 y secuenciación.

Todos los oligonucleótidos utilizados durante el desarrollo de este trabajo se encuentran enlistados en la tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificación de AAP, EGFP, VP3, y PCR de colonia.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
F-AAP	TAG GAT CCG TAT GGA GAC GCA GAC
R-AAP	CGT CTA GAT TTC AGG GTG AGG TAT CCA T
F-EGFP-BamHI	TTC GGA TCC AAG ATG GTG AGC AAG GGC
R-EGFP-XbaI	GCC TCT AGA TCC TGA ACC CTT GTA CAG CTC
F-AAP-XbaI	TTA TCT AGA GGC GGA GCA AGC ATG GAG ACG CAG
R-AAP-XhoI	GGC CTC GAG AGA TCA GGG TGA GGT ATC CAT
F-VP3-XbaI	TTA TCT AGA GGC GGA GCA AGC ATG GCT ACA GGC
R-VP3-XhoI	GCC CTC GAG AGA TTA CAG ATT ACG AGT CAG GTA TCT
F-polh	AAATGATAACCATCTCGCA
R-SV40	GGTATGGCTGATTATGATC
M13 forward	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
M13 reverse	AGCGGATAACAATTCACACAGG

Transfección de células Sf9

Los bácmidos recombinantes se utilizaron para transfectar células Sf9 utilizando el reactivo Flyfectin (OZ biosciences). La transfección se llevó a cabo en placas de 6 pozos en las cuales se adhirieron 1×10^6 células por pozo en fase exponencial y a viabilidad mayor del 95% en medio Grace's. Las

células fueron incubadas con la mezcla de 1 µg de bácmido/20 µL de Flyfectin durante 4 horas y posteriormente se añadió medio Grace's hasta un volumen final de 2 mL. Las células se incubaron a 27 °C a 270 rpm protegidas de la luz por 96 hrs o hasta presentar signos de infección (células grandes de aproximadamente 18 µm de diámetro, núcleos que abarcan la mayor parte del citoplasma y presencia de vesículas).

Ensayo en placa para aislamiento de placas virales

El sobrenadante de la transfección se recolectó y se almacenó como stock viral a 4°C con 0.5% de suero fetal bovino (SFB). El stock viral se utilizó para realizar el ensayo en placa. Se adherieron 1×10^6 células por pozo en fase exponencial y viabilidad mayor al 95% en medio Grace's. Se prepararon diluciones seriadas de los stocks virales (10^{-1} - 10^{-5}) en medio Grace's sin SFB y se incubaron las células adheridas con 1 mL de cada dilución por una hora a 27 °C. Posteriormente, se retiró el medio y se adicionó 2 mL de medio de plaqueo (25 mL Grace's 2x, 12.5 mL de agarosa de bajo punto de fusión al 4%, 2.5 mL de SFB y 10 mL de agua estéril) a una temperatura de 37 °C. Las cajas se incubaron por 96 horas a 27 °C en ambiente húmedo. Posteriormente se adicionó una segunda capa de medio de plaqueo con rojo neutro (16.5 mL de medio Grace's 2X, 1.5 mL de rojo neutro 1 mg/mL, y 6 mL de agarosa de bajo punto de fusión al 4%). Las placas se incubaron 4 horas en ambiente húmedo a 27 °C y una vez que el rojo neutro difundió por todo el pozo se procedió a la selección de placas virales denotadas por la formación de halos translucidos. Las placas se colectaron picando con micropipeta y resuspendiendo en 900 µL de medio Grace's.

Con el fin de seleccionar las placas virales para producir el stock viral se adherieron 1×10^6 células por pozo en fase exponencial y a una viabilidad mayor al 95% en medio Grace's sin SFB en placas de 6 pozos durante una hora. Posteriormente se retiró el medio y las células se incubaron durante 4 horas con las diluciones de las placas seleccionadas. Se adicionaron 2 mL de medio SF900-II a cada pozo y se incubaron durante 5 días a 27 °C en ambiente húmedo. Finalmente, el pellet y sobrenadante se recolectaron para su análisis de expresión de proteína recombinante y para la amplificación del stock viral.

Amplificación de stocks virales

La amplificación de los baculovirus recombinantes se llevó a cabo en cultivos de células SF9 en fase exponencial y a una viabilidad mayor al 95% en medio SF900-II a una concentración de 1×10^6 células/mL infectadas con 500 µL de los stocks de baculovirus en un volumen de trabajo de 50 mL a 27 °C y 270 rpm. El baculovirus recombinante se recuperó del sobrenadante tras centrifugar a 650 g por 10 min y almacenado a 4°C en 0.5% de SFB.

Titulación de baculovirus

La titulación de baculovirus recombinantes se llevó a cabo mediante un ensayo de viabilidad celular basado en la degradación de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difenil tetrazolium bromuro (MTT, Sigma-Aldrich M5655) por una deshidrogenasa activa en células viables (Mena *et al.*, 2003). Se hicieron diluciones seriadas de los baculovirus (10^{-1} - 10^{-10}) en medio SF900-II y se infectaron 0.8×10^6 células Sf9 en 50 µL de medio SF900-II con 10 µL las distintas diluciones (16 pozos por cada dilución), se incubaron durante 6 días en ambiente húmedo a 27 °C protegidas de la luz. Posteriormente se realizó el revelado con MTT adicionando a cada pozo 10 µL de 5 g/L de MTT. Las cajas se incubaron durante dos horas en agitación y protegidas de la luz, se centrifugaron a 2000 g por 10 minutos y se

descartó el sobrenadante. Los cristales precipitados se solubilizaron con 50 µL de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, 34869-1) y se leyó la absorbancia a 570 nm. Los datos de absorbancia se ajustaron a un modelo sigmoide de 4 parámetros utilizando el programa SigmaPlot:

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{D_i}{D_{i0}}\right)^b} \dots\dots\dots \text{Ecuación 18}$$

Donde Y es la absorbancia, Y_0 es la absorbancia mínima, a es la absorbancia máxima, D_i es la dilución, D_0 es la dilución a la cual la respuesta fue del 50% y b es la pendiente. A partir de estos parámetros y el volumen de la dilución añadida a cada pozo (V) se calculó la dosis letal media para cultivo celular ($TCLD_{50}/mL$), dosis de infección media ($TCID_{50}/mL$) y el título viral representado por las unidades formadoras de placa (UFP) utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\frac{TCLD_{50}}{mL} = \frac{1}{D_0 V} \dots\dots\dots \text{Ecuación 19}$$

$$\log\left(\frac{TCID_{50}}{mL}\right) = 0.912 \log\left(\frac{TCLD_{50}}{mL}\right) + 1.674 \dots\dots\dots \text{Ecuación 20}$$

$$UFP = 0.69 \frac{TCID_{50}}{mL} \dots\dots\dots \text{Ecuación 21}$$

Cuantificación de proteína total

La cuantificación de proteína total de todas las muestras se determinó mediante el método de Bradford en placa adicionando 10 µL de diluciones de muestra en 200 µL de reactivo de Bradford (Bio-Rad) diluido 1:5 en agua mQ. Se utilizó una curva estándar en un rango de 5 a 80 µg/mL. Cada estándar y muestra se analizaron por triplicado. Las muestras se incubaron 5 min protegidas de luz y posteriormente se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (FLUOstar Omega, BMG Labtech).

Western Blot

Se mezclaron 20 µg de proteína total con buffer de carga 4X (1 mL de Tris 0.5 mM pH 6.8, 1.6 mL de SDS 10%, 200 µL de azul de bromofenol 0.2%, 800 µL de glicerol y 400 µL de β-mercaptoetanol) y se incubaron 10 minutos a 99 °C. Las muestras se cargaron en geles de acrilamida 12 % en condiciones desnaturalizantes utilizando buffer de corrida Tris-glicina (24.8 mM tris, glicina 0.192 mM, EDTA 2 mM, SDS 0.1%, pH 8.8). Posteriormente se realizó la electrotransferencia a membranas de PVDF (Cat. IPVH304F0, Millipore) previamente activadas con metanol en un sistema semiseco Trans-Blot® Turbo™ Bio-Rad utilizando buffer de transferencia (buffer de corrida + 20 % de metanol) aplicando un voltaje de 25 V durante 30 minutos. El bloqueo se realizó incubando la membrana de PDVF con leche descremada (Carnation Nestle, USA), al 5% durante toda la noche a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con buffer PBS con Tween 20 0.1 % (PBST) por 10 minutos cada uno. Posteriormente las membranas se incubaron en presencia del anticuerpo primario durante 90 minutos a temperatura ambiente en agitación para la detección de la proteína de interés; Anti-BV-GP64 (Bioscience), a una dilución 1:3000 para la detección de la proteína GP64 de baculovirus, anti-GFP (Merck Millipore, MAB1083) a una dilución 1:20000 para la detección de EGFP, el anticuerpo monoclonal (MAb) A20 (Progen Biotechnik N° Cat. 61055) o el MAb B1 (cat. 61058 Progen) a una dilución 1:1000 para la

detección de cápsides o de proteínas estructurales de AAV no ensambladas. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBST de 10 minutos cada uno. Posteriormente la membrana se incubó durante una hora y media con el anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón el cual esta conjugado a una peroxidasa. Se realizaron tres lavados y finalmente se hizo el revelado con luminol (MILIPORE, no WBLUF0500).

Dot-Blot

La membrana de PVDF previamente activada con metanol se montó en un equipo Trans-Blot de Bio-Rad y se adicionaron a cada pozo 20 µg de proteína total de cada muestra se cargaron en un volumen de 200 µL. Las muestras se inmovilizaron en la membrana con ayuda de vacío. Posteriormente la membrana se bloqueó durante toda la noche con leche descremada al 5%, se realizaron 3 lavados con PBST por 10 minutos cada uno. La membrana se incubó con anticuerpo primario, utilizando las mismas diluciones empleadas en Western Blot, durante una hora. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBST y finalmente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa durante una hora. La membrana se lavó 3 veces con PBST y se reveló con luminol (MILIPORE, no WBLUF0500).

Producción y purificación de PPV

La producción de cápsides de AAV se llevó a cabo en un cultivo de células Sf9 a una concentración de 2×10^6 células/mL en medio SF900-II con un volumen de trabajo de 200 mL en un matraz de 500 mL. Las células se infectaron con el baculovirus Bac-Cap, el cual codifica para el gen *cap* de AAV2, a una MDI de 5 ufp/cel. El cultivo se detuvo cuando la viabilidad celular llegó a un 60 %, el pellet celular se recolectó centrifugando a 2000 g por 10 min y se solubilizó en buffer de lisis (Tris 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 2 mM, Benzonase 50 U/mL) a una relación de 1 mL de buffer de lisis por cada 10×10^6 células en el pellet. El pellet solubilizado se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en agitación y se adicionó MgSO₄ a una concentración final de 0.275 mM. La mezcla se incubó 30 minutos más a temperatura ambiente y finalmente se realizaron 3 ciclos de congelado/descongelado con hielo seco y baño María a 37 °C. La mezcla se centrifugó a 650 g por 15 min y se recuperó el sobrenadante.

Para la purificación de las cápsides, se utilizó un gradiente de iodixanol (15, 25, 40 y 60%) en PBS con MgCl₂ 1 mM y KCl 2.5 mM (PBSMK). Se utilizaron tubos Ultra-clear (38.5 mL 25x89 mm, Corning) adicionando 7 mL de iodixanol 60%, 7 mL de idixanol al 40%, 10.5 mL de iodixanol 25%, 10.5 mL de iodixanol 15% y 3 mL de pellet clarificado. Los tubos se centrifugaron a 28000 g por 6 horas utilizando el rotor SW28 en una Ultracentrifuga (Beckman). Una vez terminada la centrifugación se recolectaron las distintas fracciones y se realizó un cambio de buffer para eliminar el iodixanol utilizando diafiltración y buffer E (Tris 10 mM, Citrato de Sodio 100 mM pH 8.0). Las muestras se almacenaron a -20 °C y se analizaron para encontrar en cual se encontraba presentes las PPV de AAV por medio de Dot-Blot y microscopía electrónica de transmisión.

Microscopía confocal

Se expresaron las proteínas EGFP, EGFP-VP1 y/o VP3 en células Sf9 utilizando baculovirus recombinantes. Se realizaron cultivos de células Sf9 en placas de 3.5 mm de diámetro a una concentración de 1×10^6 células/mL. Las células se infectaron a distintas MDI con combinaciones de los baculovirus recombinantes. Las placas fueron observadas mediante microscopía confocal 36 horas post-infección (hpi) utilizando un microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico Upright BX61WI del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA), en colaboración con el

Dr. Adán Guerrero. Los datos se analizaron utilizando metodologías que se basan en las fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia. Las técnicas utilizadas fueron: FCS, RICS y N&B.

El microscopio se manipuló en modo de conteo de fotones y se recolectaron los datos de intensidad de fluorescencia en el volumen confocal. Las dimensiones del volumen confocal dependen de parámetros instrumentales del sistema como apertura del pinhole así como la longitud de onda del láser. En todas las mediciones de fluctuaciones de fluorescencia se ajustó la apertura del pinhole a una unidad de Airy. La determinación de las dimensiones del volumen confocal del sistema empleado se realizó cada día de sesión experimental utilizando EGFP 100 nM en buffer PBS a distintas concentraciones (Buschmann *et al.*, 2007).

Correlación de espectroscopía de fluorescencia

Se realizaron 5000 mediciones de una serie de tiempo de un punto fijo utilizando el objetivo LUMFLN 60X/1.10 W. Como primer acercamiento, se utilizó EGFP en solución a distintas concentraciones (10, 50 y 100 nM), se manipularon varios parámetros con el fin de obtener aquellas condiciones adecuadas para el análisis de los datos por FCS. La potencia del láser se varió desde 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 hasta 10.0 %. El tiempo de exposición en cada pixel fue de 2 ó 4 μ s.

Correlación de espectroscopía de escaneo de imagen

Se realizaron mediciones de intensidad de fluorescencia en modo de escaneo en apilados temporales de 100 imágenes de una región de 256 x 256 pixeles con tamaño de pixel de 50 nm utilizando el objetivo LUMFLN 60X W NA:1.1, de células individuales. El tiempo de exposición por pixel fue de 2, 4, 8 ó 12.5 μ s y un tiempo de traveso de línea de 1.608, 2.12, 3.152 y 4.325 ms, respectivamente.

Debido a que el análisis mediante RICS involucra una evaluación de la correlación entre pixeles adyacentes adquiridos en distinto tiempo, las vibraciones celulares podrían afectar en cierta medida el resultado de la correlación. Por tal razón, únicamente se analizan células que tienen un desplazamiento menor a 1 pixel durante 10 imágenes del apilado temporal. Este valor asegura que las vibraciones celulares son mínimas y no afectaran considerablemente al valor de D calculado. Para determinar el desplazamiento de una célula en pixeles a través de las imágenes del apilado temporal se utilizó un plugin de la aplicación ImageJ. En primer lugar, se hace un duplicado del apilado temporal a analizar y se aplica un filtro de desenfoque gaussiano con un radio de 4 pixeles. Posteriormente se utiliza el plugin NanoJ-SRRF desarrollado por Henriques y colaboradores. Este último utiliza el método de correlación cruzada para estimar el desplazamiento de una imagen a través de una serie de tiempo. Solo aquellos apilados temporales que tengan un desplazamiento menor a 1 pixel durante 10 imágenes del apilado temporal se analizaron mediante RICS.

Otro factor crítico en el análisis mediante RICS es la eliminación de la fracción de moléculas inmóviles en la imagen. El enfoque que más se ha utilizado para hacer esto es sustraer el valor promedio de intensidad de fluorescencia a cada pixel de la imagen. Para ello se puede utilizar el promedio del apilado temporal completo o bien, un promedio móvil. Este último consiste en sustraer a cada imagen del apilado temporal el promedio de solo cierto número de imágenes adyacentes en la serie temporal. De esta forma es posible eliminar pequeñas perturbaciones debidas a vibraciones celulares o bien, eliminar el efecto de fotoblanqueo a través del tiempo. La

determinación del promedio móvil a sustraer es crucial, ya que este no debe de ser tan pequeño como para eliminar la fracción de moléculas móviles en cada pixel, ni tan grande como para no eliminar por completo la fracción inmóvil. En general un promedio móvil a sustraer de 10 imágenes en la serie de tiempo ha sido aceptado para el caso del análisis de mediciones en células. La sustracción del promedio móvil, así como el análisis de RICS se realizó con el programa SimFCS desarrollado por Gratton en 2010. La FAC de RICS de los datos experimentales se calculó a partir de la ecuación 7, la cual se ajustó al modelo descrito en la ecuación 8.

Análisis de número y brillo

Para el análisis de N&B se determinó el rango de linealidad del detector. Para ello se adquirieron datos con las condiciones para RICS de esferas de 6 μm (F36909 FocalCheck™ fluorescence microscope test slide #1, muestra 1B). Se escanearon apilados temporales de 100 imágenes de una región de 256 x 256 pixeles con un tamaño de pixel de 50 nm y un tiempo por pixel de 8 μs a distintas potencias de láser. Posteriormente se graficó la varianza con respecto al promedio de los valores de *F* de cada pixel a través del tiempo de todos los conjuntos de apilados temporales adquiridos a distintas potencias de láser. Finalmente, se determinó el rango de la curva donde se obtiene un coeficiente de correlación lineal superior a 0.99.

Para la determinación de los valores de σ^2_o y *offset* se expuso el detector a oscuridad completa y se recolectó un apilado temporal de 100 imágenes escaneadas de 256 x 256 pixeles y un tamaño de pixel de 50 nm durante 8 μs por pixel. Se terminó el valor de la media y varianza de los datos de *F* obtenidos, los cuales corresponden al valor del *offset* y σ^2_o respectivamente.

El análisis de *N&B* se realizó con el software SimFCS utilizando los mismos datos adquiridos para RICS. Para el caso del análisis de células es importante utilizar la opción “detrending”, con la cual se hace una deducción de la tendencia de los valores de fluorescencia de cada pixel a través de la serie de tiempo provocados posiblemente por fotoblanqueo o bien por el movimiento lento de las células.

En regiones de la imagen donde no existe fracción móvil, la varianza en la señal de *F* se debe únicamente a la varianza del detector. De acuerdo a la ecuación 14, en estas regiones, el valor de *B* debe ser igual a 1.0. Así, en cada apilado temporal que será analizado mediante *N&B* se debe de contar con una región que únicamente contenga fracción inmóvil, es decir, una región del fondo. Así se determina el valor de *S* donde el valor de *B* de los pixeles correspondientes al fondo sea igual a 1.0.

Posteriormente se procedió a determinar el valor de ϵ para EGFP monomérica. Para lo anterior se realizó el análisis de *N&B* en células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante Bac-EGFP. En el software SimFCS se proporcionan los valores de *S*, *offset* y σ^2_o previamente determinados, y se extrae el valor de *B* correspondiente a EGFP de la gráfica de puntos generada de *B* con respecto al promedio de *F* para cada pixel. Finalmente, se calcula el valor de ϵ de acuerdo a la ecuación 17. El valor de ϵ aumenta de forma lineal con respecto a la cantidad de moléculas fluorescentes que forman parte de un mismo complejo. De esta forma se puede determinar la estequiometría de moléculas fluorescentes en un complejo de la siguiente manera:

$$\text{Estequiometria} = \frac{B-1}{\epsilon} \dots\dots\dots \text{Ecuación 22}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación y titulación de baculovirus recombinantes

En este trabajo se utilizaron baculovirus recombinantes producidos previamente en el laboratorio por Rojas en 2009 y Gallo-Ramírez en 2012. Los baculovirus recombinantes Bac-VP3, Bac-EGFP-VP1 y Bac-Cap, que codifican para las proteínas VP3, EGFP fusionada extremo N-terminal de VP1 y AAP, y el gen *cap* completo respectivamente, se amplificaron para obtener los stocks de trabajo (Gallo-Ramírez & Palomares, 2012; Rojas-Gómez & Palomares, 2009). Los títulos virales obtenidos se encuentran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Títulos virales

Baculovirus	TCLD ₅₀ /mL (UFP)	TCID ₅₀ /mL (UFP)	Título (UFP/mL)
Bac-VP3	1E+08	5.97E+08	4.12E+08
Bac-EGFP-VP1	9E+08	4.41E+08	3.04E+08
Bac-Cap	1E+08	1.11E+09	7.63E+08

Producción de cápsides fluorescentes de AAV2

Con el objetivo de estudiar el ensamblaje de la cápside de AAV2 en células vivas mediante el uso de técnicas de fluorescencia, es necesario determinar las condiciones necesarias para producir cápsides que contengan proteínas VP fusionadas a una proteína fluorescente. Estudios anteriores han demostrado que VP3 es la única VP necesaria para la formación de cápsides, esto se debe a un impedimento estérico de las otras proteínas estructurales (VP1 y VP2) que, al ser más grandes hacia su extremo N-terminal, no pueden ensamblarse en cápsides, ya que es esta región la que queda hacia el interior. Además, algunos estudios indican que VP3 por sí sola no es suficiente para la generación de cápsides, ya que es necesario que se transporte hacia el núcleo, mediante su interacción con cualquiera de las otras VPs o con AAP, y posteriormente AAP promueva el ensamblaje de la cápside. Para poder generar cápsides con VPs fluorescentes, se planteó expresar 3 proteínas recombinantes en el CI-BV. Las proteínas EGFP-VP1 y AAP se producen con el baculovirus Bac-EGFP-VP1 y la proteína VP3 con el Bac-VP3. De esta forma, se espera que sólo cuando una célula se infecte con los dos baculovirus recombinantes exista la formación de cápsides.

Se realizaron cultivos de 30 mL de 2×10^6 células Sf9 /mL infectadas con distintas combinaciones de los baculovirus Bac-EGFP-VP1 y Bac-VP3. En la figura 13 se muestra el seguimiento de la cinética de estos cultivos donde se monitoreó la concentración (X) y viabilidad celular, así como la fluorescencia del cultivo cada 12 hrs. Se utilizaron como controles un matraz de células sin infectar (Sf9), y dos matraces infectados con los baculovirus Bac-EGFP-VP1 (BEVP1) y Bac-VP3 (BVP3) de manera independiente a una MDI de 5 ufp/cel. Las coinfecciones para la producción de cápsides se realizaron con el Bac-EGFP-VP1 a una MDI de 5 ufp/cel y con tres distintas MDI del Bac-VP3 (0.1, 1.0 y 5.0 ufp/cel).

Tal y como se esperaba, los cultivos celulares infectados con una MDI total más elevada presentaron los valores más bajos de viabilidad celular cuando se comparan a un mismo tiempo. Se puede observar también que los cultivos celulares infectados no rebasaron una concentración de células vivas de 4×10^6 células/mL, alcanzando una concentración máxima a las 36 hpi. El cultivo infectado solamente con Bac-EGFPVP1 fue el que presentó una mayor fluorescencia a lo largo del tiempo de cultivo, y dicho valor decrece conforme aumenta el valor de la MDI en las coinfecciones con Bac-VP3.

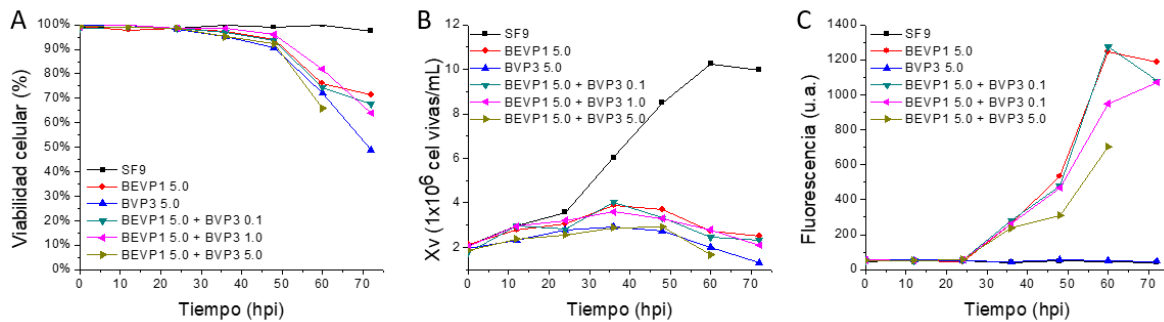


Figura 13. Cinética de coinfecciones de células Sf9 con los baculovirus BEVP1 y BVP3 a distintas MDI. El valor de MDI utilizado en cada cultivo se muestra junto al nombre de cada baculovirus en ufp/cel.

El pellet de cada cultivo se recolectó mediante centrifugación a 2000 rpm por 10 min cuando la viabilidad celular alcanzó aproximadamente el 60%, el cual fue a las 60 hpi para el cultivo infectado con ambos baculovirus, mientras que para el resto fue hasta las 72 hpi. Los pellets se lisaron conforme al protocolo descrito en métodos y se procedió a realizar ensayos de Dot-Blot para corroborar la presencia de cápsides.

Para la detección de formación de cápsides de AAV2 mediante Dot-blot se utilizaron dos anticuerpos monoclonales, el MAb B1 que reconoce aun epítipo conformacional presente en las 3 proteínas VPs de AAV2 desensambladas y el MAb A20 que reconoce un epítipo conformacional de las VP presente únicamente cuando se encuentran ensambladas en cápsides. Para corroborar la especificidad de los MAbs A20 y B1, se realizó un ensayo control utilizando como muestra pellets lisados de células Sf9 infectadas con los baculovirus Bac-VP3, Bac-Cap o con un baculovirus irrelevante (no codifica para ninguna proteína de AAV). En la figura 14 se observa que con el MAb B1 si hay una señal del pellet infectado con el Bac-VP3 con respecto a los controles, mientras que el MAb A20 únicamente presenta señal con el pellet infectado con el Bac-Cap, es decir, únicamente en el pellet infectado con el Bac-Cap existe la presencia del epítipo conformacional característico de cápsides de AAV2. Se muestra además que, tras desnaturalizar la muestra, el MAb A20 es incapaz de interactuar con el pellet del Bac-Cap, esto es debido a que se indujo el desensamble de las cápsides.

Una vez corroborada la especificidad de los MAb B1 y A20, se procedió a la detección de cápsides de los pellets infectados con combinaciones de los baculovirus Bac-EGFP-VP1 y Bac-VP3. En la figura 15 se muestran los resultados de Dot-Blot de estos cultivos y a la derecha se encuentra una tabla describiendo la MDI utilizada para cada uno de los baculovirus en cada caso. Se cargaron 20 μ g de proteína total en cada uno de los pozos. Se puede observar la detección de las proteínas VPs con el MAb B1 en todos los casos donde se infectaron las células ya sea con el Bac-EGFP-VP1 o con el Bac-VP3, sin importar la MDI. En la detección de cápsides con el MAb A20 se observó que, tal y como se

esperaba, solo hay presencia de cápsides cuando se coinfecta con ambos baculovirus. Además, conforme aumentó la MDI de Bac-VP3, hubo una mayor presencia de cápsides. Para los experimentos de microscopía confocal se decidió utilizar una MDI de 5 ufp/cel para cada baculovirus debido a que es con dicha combinación cuando existe una mayor presencia de cápsides, y adicionado a lo anterior, tomando en cuenta la distribución de Poisson para la relación entre la MDI y el número de partículas que infectan cada célula, es con un valor de 5 ufp/cel cuando aproximadamente el 100% de las células se encuentran infectadas con al menos una partícula del baculovirus en cuestión. De esta manera nos aseguramos que todas las células están coinfectadas con ambos baculovirus y, por tanto, producirán cápsides.

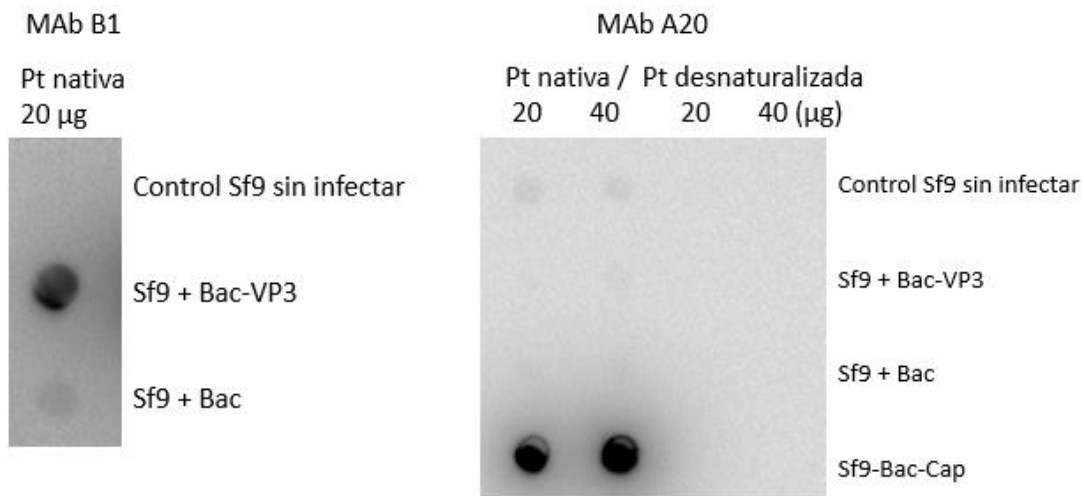


Figura 14. Control de especificidad de los MAb A20 y B1. Dot-Blot de pellets de células Sf9 sin infectar o infectados con baculovirus recombinantes expresando las proteínas VP3 (Bac-VP3), el gen cap completo (Bac-Cap) o un baculovirus recombinante (Bac). Pt: proteína total.

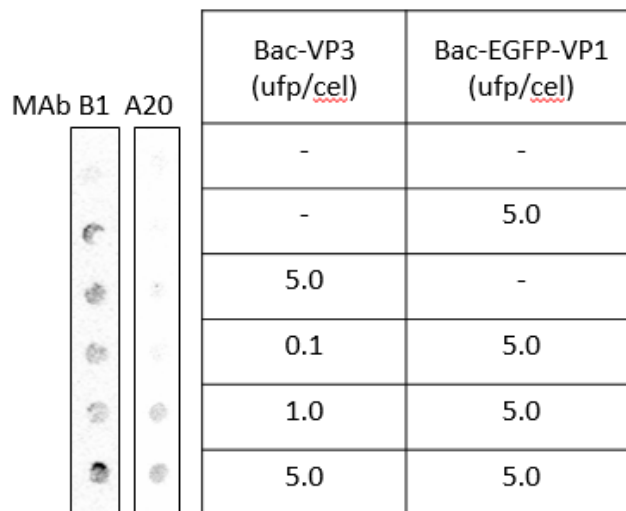


Figura 15. Determinación de la presencia del epítipo conformacional característico de cápsides de AAV2 cuando se infectan células Sf9 con los baculovirus Bac-VP3 y Bac-EGFP-VP1 mediante Dot-Blot.

Calibración de la respuesta del detector

Los datos de F para el análisis de FCS, RICS y N&B, fueron adquiridos mediante microscopía confocal utilizando el modo de conteo de fotones. Por lo cual se caracterizó la respuesta del detector sobre la señal de fluorescencia. Se determinaron los valores del *offset* y σ^2_o , así como el rango de linealidad del detector utilizado.

Se adquirieron datos de un apilado temporal de 100 imágenes de 256 x 256 píxeles utilizando el objetivo LUMFLN 60X/1.10 W con un tamaño de píxel de 50 nm y un tiempo adquisición de 8 μ s por píxel, cuando es expuesto a oscuridad completa (0.0% potencia de láser). Se tomó una región de 32 x 32 píxeles y se calculó el promedio y la varianza, los cuales corresponden al valor del *offset* y σ^2_o respectivamente (figura 16.A).

Posteriormente se determinó el rango de linealidad del detector. Para ello se utilizó una muestra de referencia fluorescente en verde. Se adquirieron apilados temporales de 100 imágenes de 256 x 256 píxeles, un tamaño de píxel de 50 nm y un tiempo de píxel de 8 μ s, de esferas de 6 μ m fluorescentes a distintas potencias de láser (desde 0.1 hasta 20.0 %). De cada imagen de cada apilado temporal se seleccionó una región de 32 x 32 píxeles y se determinó el promedio y varianza de cada píxel a través del tiempo. Se graficó la varianza con respecto al promedio de la intensidad de fluorescencia de cada píxel y se determinó el rango lineal de la curva resultante. En la figura 16.B se observa que en todo el rango analizado el detector tuvo una respuesta lineal que corresponde hasta un valor de intensidad de fluorescencia de aproximadamente 320 conteos. Este rango es muy pequeño comparado con los valores de F que usualmente se obtienen al momento de analizar células que expresan proteínas fluorescentes. Por lo cual se adquirieron apilados temporales con las mismas condiciones utilizando como muestra células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante Bac-EGFP a una MDI de 5 ufp/cel para la expresión de la proteína EGFP. Se analizó una región de 32 x 32 píxeles de cada apilado temporal y se determinó la varianza y el promedio de cada píxel a través del tiempo. En la figura 16.C se puede apreciar que, durante el rango analizado, el detector presentó un comportamiento lineal hasta valores de intensidad de fluorescencia de aproximadamente 1700 conteos. Es importante mencionar que en este caso hubo una contribución a la varianza debida al movimiento de las moléculas de EGFP en la muestra. A pesar de ello, tanto el valor de la pendiente de las curvas de las esferas de referencia como el de las células es muy similar (7.8 y 7.9 respectivamente). Este valor corresponde a la magnitud del factor de proporcionalidad S , por lo cual se consideró que los datos obtenidos mediante conteo de fotones con las mismas condiciones y que estuvieran por debajo de 1700 conteos, estuvieron dentro del rango de linealidad del detector.

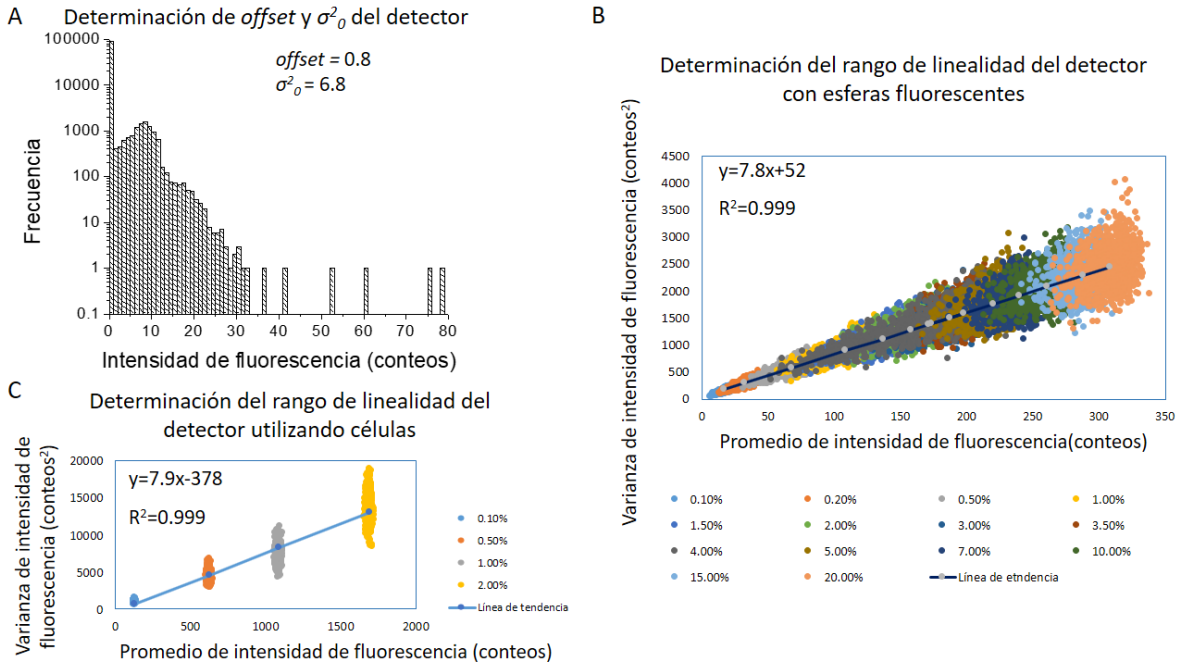


Figura 16. Calibración de la respuesta del detector. A) Histograma de intensidad de fluorescencia cuando el detector es expuesto a oscuridad para la determinación del $offset$ y σ_0^2 . B) Gráfica de la varianza con respecto al promedio de F de cada pixel de una región de 32×32 pixeles de apilados temporales de esferas fluorescentes de $6 \mu m$ adquiridos con un tamaño de pixel de $50 nm$, un tiempo por pixel de $8 \mu s$ y distintos niveles de potencia de láser para la determinación del rango de linealidad del detector. C) Gráfica de la varianza con respecto al promedio de F de cada pixel de una región de 32×32 pixeles de apilados temporales de células Sf9 infectadas con el baculovirus Bac-EGFP. Los datos fueron adquiridos utilizando un tamaño de pixel de $50 nm$, un tiempo por pixel de $8 \mu s$ y distintos niveles de potencia de láser.

Determinación de las condiciones necesarias para la adquisición de datos con microscopía confocal

Previo a realizar experimentos de microscopía confocal con células, fue necesario determinar cuáles son las condiciones necesarias para la adquisición de datos para su análisis mediante correlación de fluctuaciones de espectroscopía de fluorescencia. Una vez que se determinaron dichas condiciones, fue necesario calcular el volumen confocal de nuestro sistema. Para cumplir con ambos objetivos se realizaron pruebas con EGFP en buffer PBS a distintas concentraciones (10, 50, 100 y 260 nM) y se obtuvo la FAC para cada uno de estos casos de acuerdo a la ecuación 3.

En la figura 17 se muestran las FAC de EGFP 10 nM en PBS cuando se adquirieron los datos con un tiempo de exposición de $2 \mu s$ y analizando distintas potencias de láser: 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 y 20.0 %. En ninguna de las condiciones analizadas se obtiene una curva característica de una FAC ya que la señal de fluorescencia de EGFP a tal concentración no es suficiente para distinguirse del ruido de fondo.

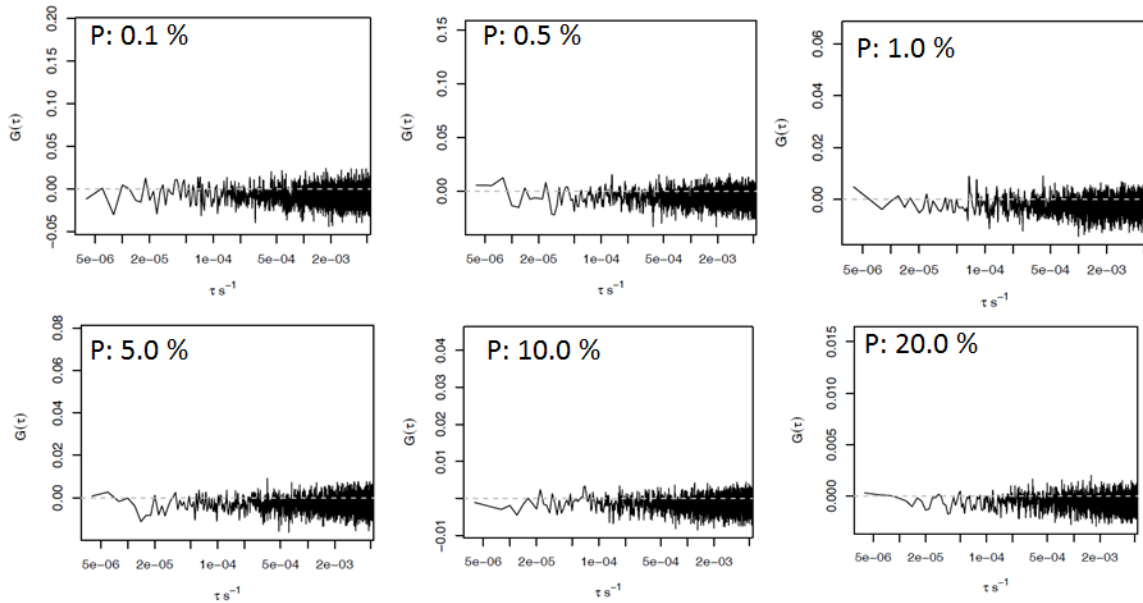


Figura 17. Función de autocorrelación de FCS de EGFP 10 nM en PBS. Se utilizaron distintos valores de potencia de láser (0.01, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 ó 20.0 %) y un tiempo de adquisición de 2 μ s.

Para aumentar la relación señal/ruido se optó por utilizar una concentración de EGFP más alta. En la figura 13 se muestran las FAC de EGFP 50 nM en PBS con un tiempo de adquisición de 2 μ s y potencial de láser de 0.1, 1.0, 5.0 ó 10.0 %. Cuando se utilizó una potencia de 0.1 ó 1.0% no fue posible detectar una señal de autocorrelación. Sin embargo, al aumentar la potencia de láser a 5.0% se puede observar como la función de autocorrelación adquirió valores más altos a τ más pequeños y presentó una forma sigmoidea conforme a lo esperado. Cuando se utilizó una potencia de láser de 10 %, la curva de la función de autocorrelación se levantó y dejó de ser una curva sigmoidea, formando una línea recta con pendiente negativa. Dicho efecto se debe a la sobre exposición del fluoróforo al láser, provocando un efecto de fosforescencia en lugar de fluorescencia. Debido a que dicho fenómeno no se toma en cuenta en el modelo de ajuste de la FAC (ecuación 4), no es posible utilizar estos datos con dicho modelo.

Finalmente, se determinó la FAC para EGFP 100 nM en PBS, variando la potencia del láser y utilizando un tiempo de adquisición de 2 μ s (fig. 14), donde, a una potencia de 5.0 % se observa una curva de tipo sigmoidea. Al igual que cuando se utilizó EGFP 50 nM, una potencia de láser de 10.0% para EGFP 100 nM también resultó en una función de autocorrelación con un efecto de triplete.

Con el objetivo de amplificar la señal de fluorescencia de EGFP, se decidió aumentar el tiempo de adquisición. En la figura 20 se muestran las curvas de autocorrelación para EGFP 100 nM cuando se adquieren los datos a un tiempo de adquisición de 4 μ s, donde se puede observar que desde una potencia de láser de 1.0 % se empieza a observar un pequeño levantamiento de la FAC a valores pequeños de τ . Utilizando una potencia de láser de 5.0% se observa una curva sigmoidea característica de una FAC de FCS. Tal y como se observó en los resultados anteriores, utilizar una potencia de láser de 10.0 %, resultó en una función de autocorrelación con un efecto de triplete.

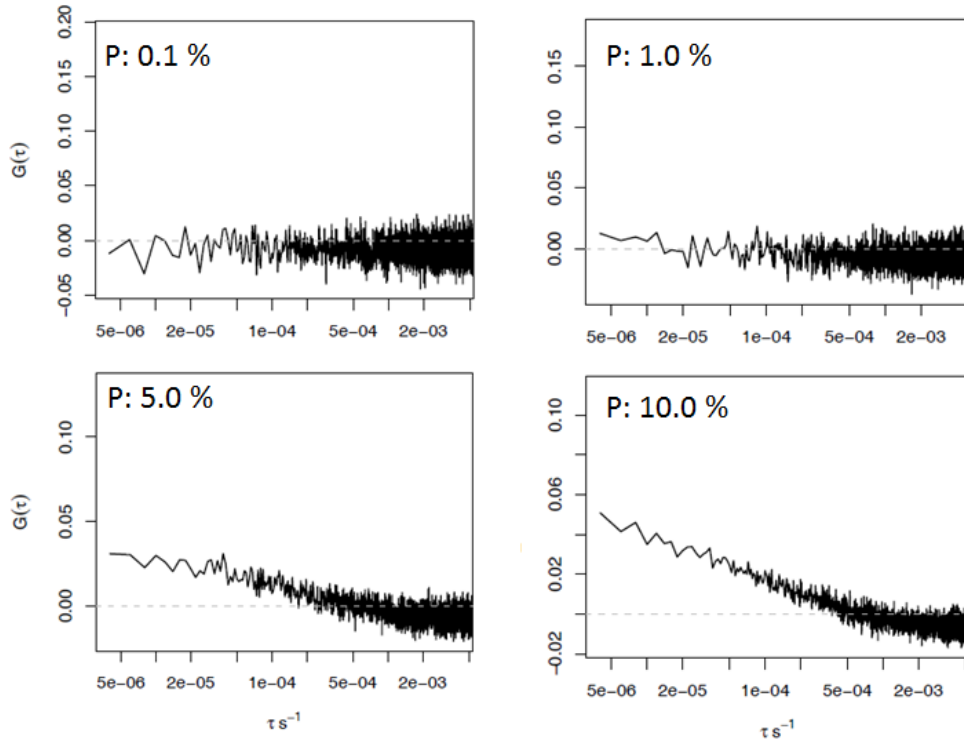


Figura 18. Función de autocorrelación de EGFP 50 nM en PBS. Se utilizó un tiempo de adquisición de $2\mu\text{s}$ y se varió la potencia de láser desde 0.1, 1.0, 5.0 hasta 10.0 %.

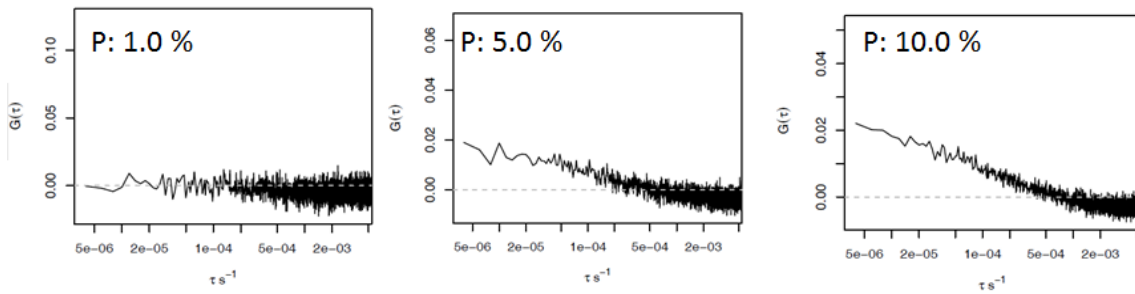


Figura 19. FAC de EGFP 100 nM en PBS. Se utilizó un tiempo de adquisición de $2\mu\text{s}$ y valores de potencia de láser de 1.0, 5.0 ó 10.0 %.

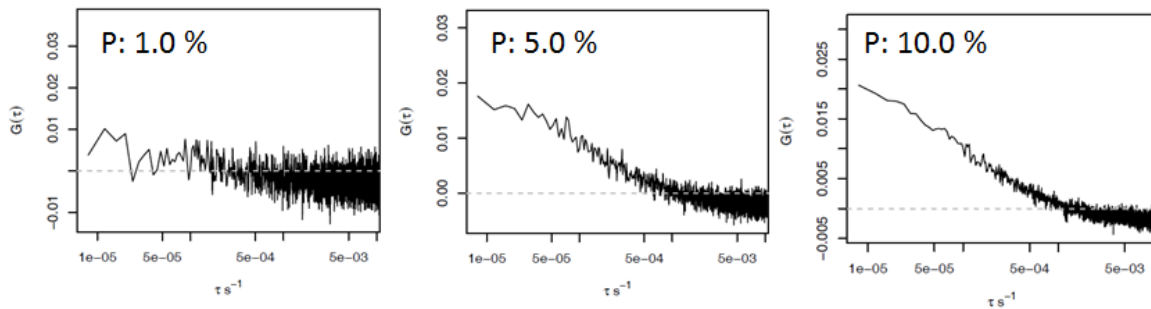


Figura 20. FAC de EGFP 100 nM en PBS. Se utilizó un tiempo de adquisición de $4\mu\text{s}$ y valores de potencia de láser de 1.0, 5.0 ó 10.0 %.

Determinación del coeficiente de difusión de proteínas fluorescentes en células vivas

Para poder determinar el coeficiente de difusión de complejos fluorescentes mediante FCS y RICS es necesario conocer cuáles son las dimensiones del volumen confocal. Para ello es necesario contar con un fluoróforo con un coeficiente de difusión conocido. En este estudio se utilizó EGFP en solución. Se adquirieron datos de FCS para EGFP en buffer PBS y se obtuvo la FAC de los datos experimentales, la cual se ajustó al modelo de la ecuación 4 proporcionando el valor del coeficiente de difusión y finalmente se determinaron las dimensiones w_0 y w_z . El valor de EGFP en solución reportado en la literatura es de $88 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Arrio-Dupont, et al, 2000; Terry & Matthews, 1995).

La determinación del volumen se debe realizar en cada sesión de adquisición de datos de microscopía confocal. A continuación, se muestra un ejemplo representativo de la determinación de las dimensiones del volumen confocal; Se realizaron 5 réplicas de FCS de EGFP 100 nM en PBS con una potencia de láser de 5.0 % de y 4 μs de tiempo de exposición. Se obtiene la FAC promedio de las réplicas. Con la ecuación 23 es posible determinar w_0 sabiendo que la apertura numérica del objetivo utilizado es 1.1 y los datos se recolectaron a una $\lambda = 510 \text{ nm}$. El valor de w_0 obtenido en este estudio fue de $0.282 \mu\text{m}$. Posteriormente, la ecuación 23 se sustituyó en la ecuación 24, y la FAC promedio de los datos experimentales se ajustó al modelo de FCS, tal y como se muestra en la figura 21.A (línea verde) para poder conocer el valor de K , que en este caso fue igual a 6.073. Se ha determinado que los valores típicos de K oscilan entre 4 y 7 (Buschmann et al., 2007). Finalmente, el volumen confocal se pudo determinar mediante la ecuación 25, el cual tuvo en este caso un valor de $0.766 \mu\text{m}^3$.

$$w_0 = \frac{0.61\lambda}{na} \dots\dots\dots \text{Ecuación 23}$$

$$K = \frac{w_z}{w_0} \dots\dots\dots \text{Ecuación 24}$$

$$V = \pi^{3/2} w_0^3 K \dots\dots\dots \text{Ecuación 25}$$

Una vez determinado el volumen confocal es posible calcular el coeficiente de difusión de EGFP en células Sf9. Se realizaron mediciones de FCS de 5 células infectadas con el baculovirus Bac-EGFP a una MDI de 5 ufp/cel con un tiempo de exposición de 4 μs y una potencia de láser de 0.1 %. Se calculó la FAC para cada réplica y se determinó el valor de D para cada réplica. En la figura 21.C se muestra la distribución de valores de D de EGFP en células Sf9 teniendo un promedio de $D = 45 \pm 8 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Hasta donde sabemos, este es el primer valor de un coeficiente de difusión reportado para el interior de células de insecto. Actualmente, ya se han reportado valores para el coeficiente de difusión de EGFP en varios tipos de células que varían desde 2 hasta $13 \mu\text{m}^2/\text{s}$ para bacterias, mientras que en células de mamífero que oscilan entre 10 y $60 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Dross et al., 2009; Elowitz et al., 1997; Mullineaux et al., 2006).

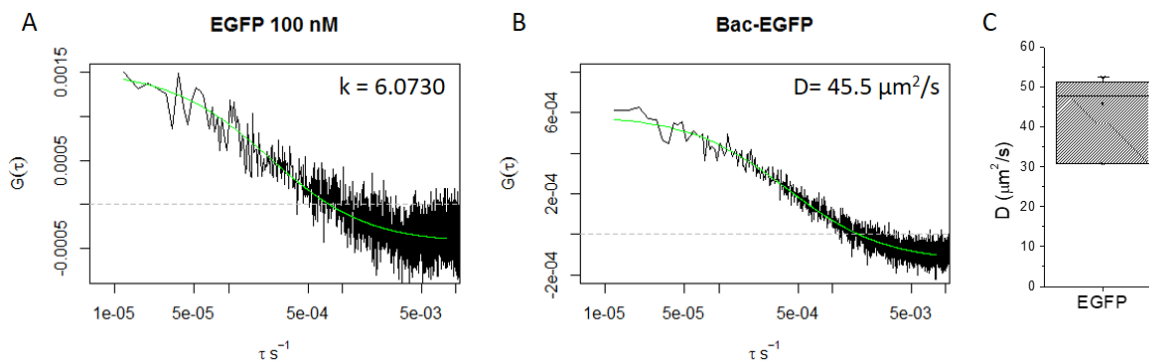


Figura 21. Determinación de D de EGFP mediante FCS. A) FAC promedio de 5 réplicas de FCS de EGFP 100 nM a una potencia de láser de 5.0 % y un tiempo de exposición de $4\mu\text{s}$ (línea en color negro) y ajuste al modelo de FCS para determinar el valor de k (línea verde). B) FAC promedio de 5 células Sf9 infectadas con Bac-EGFP a una MOI de 5.0 $u\text{fp}/\text{cel}$ (línea en negro) y ajuste al modelo de FCS para determinar el valor de D de EGFP. La recolección de datos se realizó utilizando una potencia de láser de 0.1 % y un tiempo de exposición de $4\mu\text{s}$. C) Distribución de D de EGFP en células Sf9 determinado mediante FCS.

Debido a que FCS únicamente permite el análisis de la muestra en un pixel determinado, se optó por analizar las siguientes muestras mediante RICS, con la cual, a pesar de que se pierde la resolución a nivel de pixel único, es posible obtener información espacial, por lo cual se disminuyó el tiempo de adquisición de datos representativos para una célula.

Con el objetivo de validar tanto la adquisición de datos, así como su análisis mediante RICS utilizando un sistema biológico, se determinó el coeficiente de difusión de EGFP en una línea celular ya reportado en la literatura. Se utilizaron células CHO-S que expresan EGFP de manera constitutiva, cultivadas en placas de 3.5 cm de diámetro tratadas con poli-lisina a una densidad celular de 0.5×10^6 células por pozo en medio FortiCHO™. La adquisición de datos se realizó 48 h después de haber iniciado el cultivo. En la figura 22 se muestra una imagen representativa extraída de los apilados temporales obtenidos para su análisis mediante RICS y el ajuste a la FAC obtenida (A y B respectivamente). Se analizaron 8 células para determinar D en 10 regiones de 64×64 pixeles para cada célula. El valor promedio de D fue de $19 \mu\text{m}^2/\text{s}$, el cual concuerda con el valor obtenido por Digman en 2005, utilizando la misma técnica. En la tabla 3 se muestran valores de D reportados en la literatura por diversos autores, donde se muestra que los valores obtenidos mediante RICS son similares a éstos (Abu-Arish, *et al.*, 2010; Digman *et al.*, 2005; Swaminathan, *et al.*, 1997).

Tabla 3. Valores de D de GFP o EGFP en células CHO reportados en la literatura.

Proteína	$D(\mu\text{m}^2/\text{s})$	Metodología	Referencia
EGFP	20 (± 5)	RICS	Gratton, 2005
GFP	27	Photo-activation	Swaminathan, 1997
NLS-EGFP	24 (± 1)	FCS	Abu-Arish, 2010

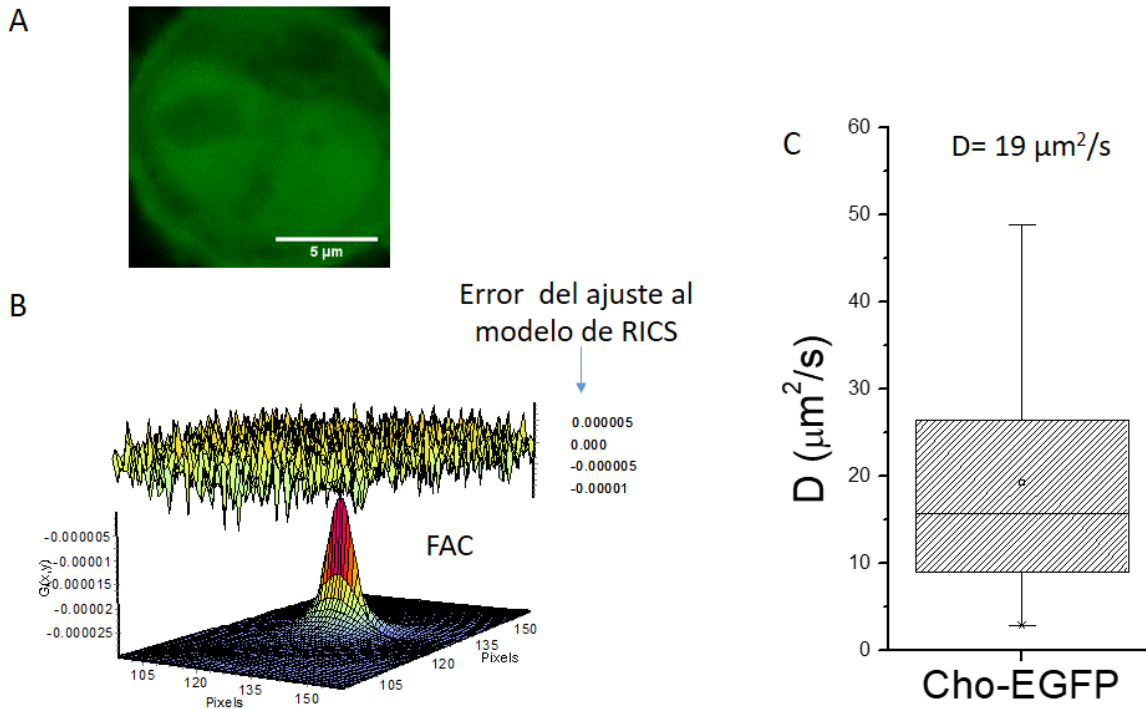


Figura 22. Determinación de D de EGFP en células CHO-S. A) Imagen representativa extraída de un apilado temporal adquirido mediante RICS para células CHO-S expresando EGFP. B) FAC representativa del ajuste de los datos experimentales al modelo de RICS de EGFP expresada en CHO-S. C) Distribución de valores de D de EGFP de 12 células CHO-S.

La estrategia planteada para el estudio del ensamblaje de AAV en células vivas con el sistema CI-BV involucra la coinfección de las células de insecto con al menos dos baculovirus. Tomando en cuenta la distribución de Poisson para la cantidad de partículas que infectan una célula dependiente de la MDI, es posible que en el cultivo celular no todas las células sean infectadas con el mismo número de viriones. Debido a que es posible que la cantidad de partículas virales que infectan una célula pudiera alterar en diferente medida el ambiente intracelular como parte del ciclo viral, y por tanto modificar su viscosidad aparente, se determinó el efecto de la MDI sobre el coeficiente de difusión de una proteína fluorescente control tanto en el citoplasma como en el núcleo de células Sf9.

Se determinó el valor de D de EGFP tanto en el citoplasma como en el núcleo de células Sf9. Para ello se infectaron las células a distintas MDI (5, 10 y 15 ufp/célula) con el baculovirus Bac-EGFP. En la figura 23 se muestran los valores de D obtenidos para cada condición. Los valores de D de EGFP en el núcleo fueron 9.2 ± 1.5 , 15.5 ± 1.3 y $11.3 \pm 2.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mientras que en el citoplasma fueron 3.7 ± 1.9 , 2.6 ± 0.8 y $2.7 \pm 1.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ para cada MDI de 5, 10 y 15 ufp/célula y una n de 10, 5 y 5 células respectivamente. Los resultados anteriores muestran que no existe una relación aparente entre el coeficiente de difusión y el rango de MDI utilizado a un tiempo de 36 hpi. Se puede observar también que, de forma general, el valor de D en el citoplasma es aproximadamente 4 veces menor comparado con el valor en el núcleo celular. Debido a que no hay evidencia de que EGFP presente distintos grados de oligomerización o interacción de forma específica con algún otro factor ya sea en el citoplasma o en el núcleo, y retomando la ecuación de Stokes-Einstein, las diferencias entre el D en el núcleo y en el citoplasma de EGFP pudieran deberse a diferencias en las condiciones

citoplasmáticas con respecto a la nucleares que provoquen cambios en la viscosidad aparente del medio. Tomando en cuenta el valor de D promedio para las 3 MDI tanto en citoplasma o núcleo celular (3 y $12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ respectivamente) y un R_h de EGFP de 4.8 nm (Hink *et al.*, 2000), se calculó la viscosidad aparente del medio, siendo de 29.6 cP para el citoplasma y 7.4 cP para el núcleo. De la misma forma, se calculó la viscosidad aparente intracelular de células CHO-EGFP con el valor de D obtenido mediante RICS obteniendo un valor de 4.7 cP . Dicho valor es superior al reportado por Swaminathan y colaboradores en 1997 de 3.2 cP para células CHO (Swaminathan *et al.*, 1997). Esta diferencia podría deberse a variaciones en la temperatura al momento de recolectar los datos. Todas las adquisiciones de datos en este trabajo se realizaron a $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Hasta ahora, esta es la primera vez que se reportan valores de coeficientes de difusión intracelulares y viscosidad aparente en células de insecto.

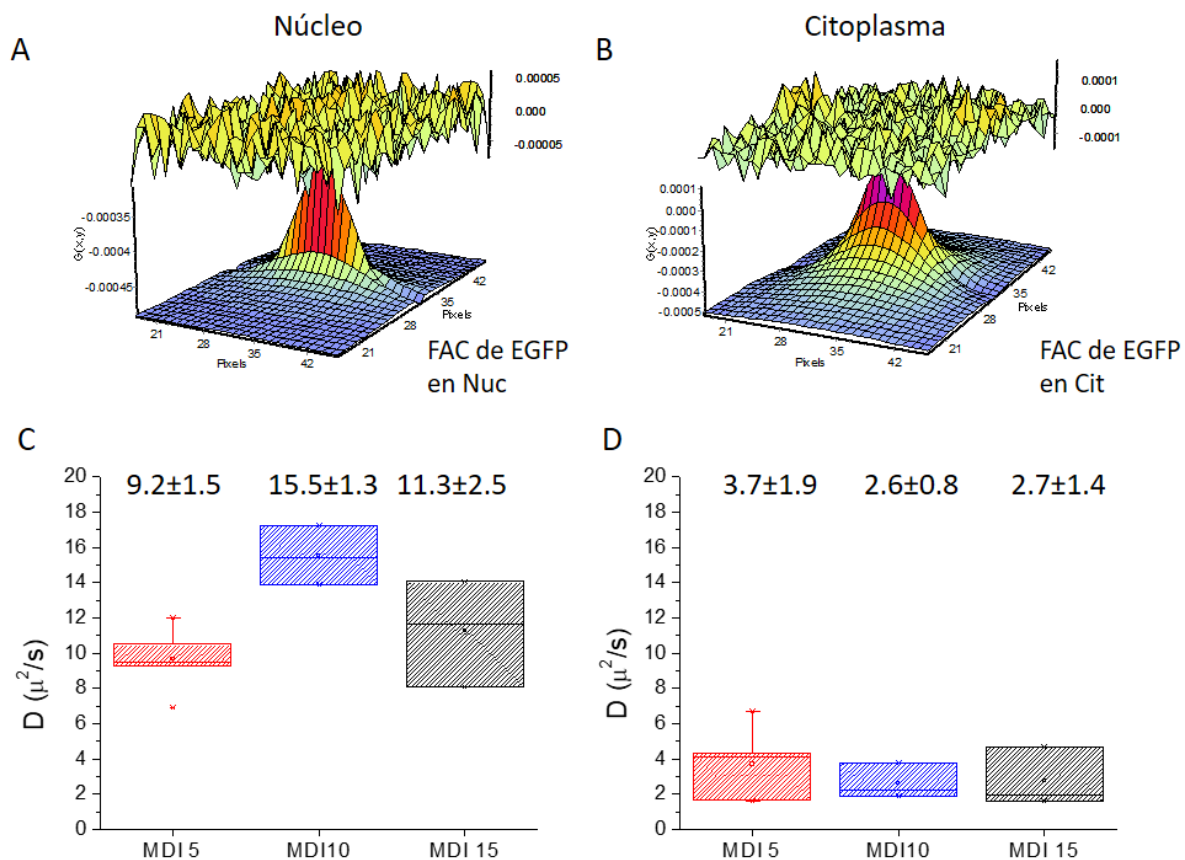


Figura 23. Determinación de D de EGFP en células Sf9 mediante RICS. Imágenes representativas de FAC de EGFP en el núcleo (A) y citoplasma (B) de células Sf9. Distribuciones de D en el núcleo (C) y citoplasma (D) de células Sf9 cuando son infectadas a una MDI de 5, 10 y 15 ufp/célula con el baculovirus Bac-EGFP ($n=10, 5$ y 5).

Localización y cantidad intracelular de las proteínas VP

Estudios anteriores han reportado que VP1 cuenta con una señal de localización nuclear (SLN) y que las proteínas VPs se concentran en sitios discretos del núcleo celular que se denominan centros de replicación viral (CRV) durante el proceso de ensamblaje de la cápside, es en estas regiones donde

ocurre la formación de cápsides así como el empaquetamiento del DNA viral dentro de las cápsides previamente formadas (Gallo-Ramírez et al., 2011; Popa-Wagner *et al.*, 2012; Wistuba *et al.*, 1995). Para corroborar lo anterior, se infectaron células Sf9 en cultivo en placa a una MDI de 5 ufp/célula con los baculovirus Bac-EGFP como control y Bac-EGFP-VP1. Se evaluó la expresión de las proteínas fluorescentes mediante epifluorescencia utilizando el objetivo Plan Fluor 10X/0.3 y se tomaron micrografías en campo claro y en el canal verde (filtro de excitación azul y filtro de emisión verde), en la figura 24 se observa también una imagen representativa extraída de los apilados temporales obtenidos mediante microscopía confocal con las condiciones de adquisición de datos para RICS de células Sf9 expresando EGFP (A, B y C) o EGFP-VP1 (D, E y F) respectivamente. En estas imágenes se puede observar que EGFP se encuentra distribuida en todas las regiones de las células Sf9, mientras que EGFP-VP1, se observa una señal predominante en el núcleo celular, la cual se acentúa en los CRV.

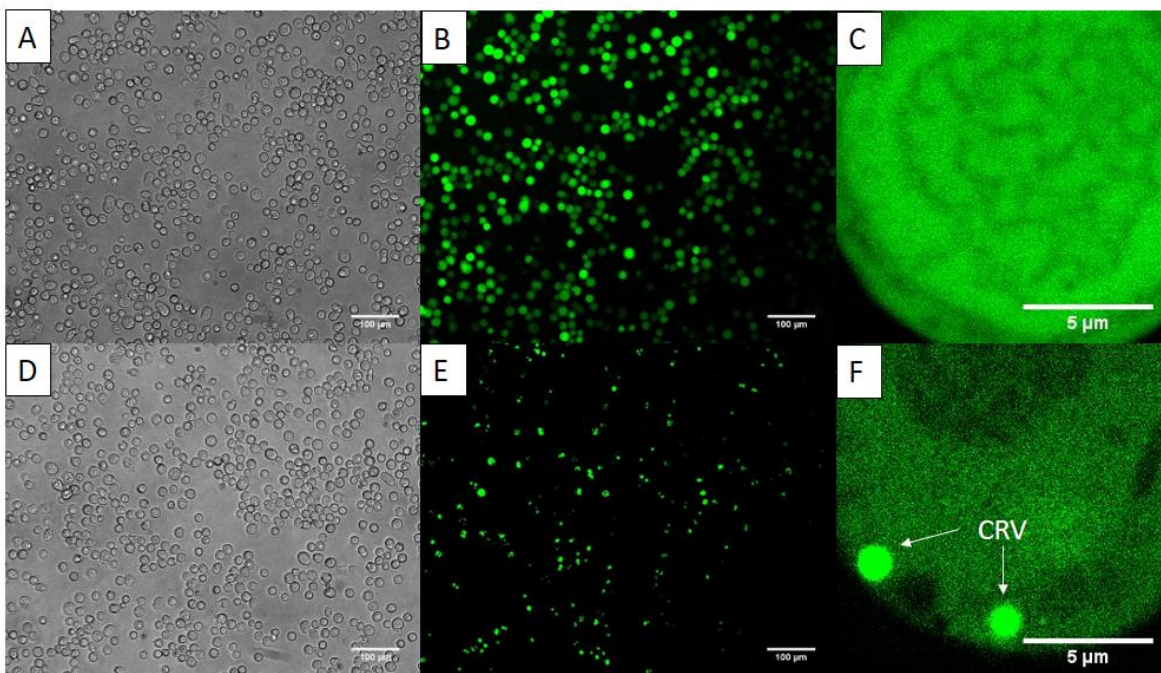


Figura 24. Microscopías de epifluorescencia y microscopía confocal de células Sf9 expresando EGFP (A, B y C) o EGFP-VP1 (D, E y F). A y D corresponden a imágenes de campo claro obtenidas con el objetivo Plan Fluor 10x/0.30, mientras que B y E corresponden a el mismo campo observado en A y D respectivamente, pero mediante epifluorescencia utilizando el cubo de filtros para observar fluorescencia en el canal verde. C y F corresponden a imágenes adquiridas mediante microscopía confocal con las condiciones de adquisición para RICS descritas en métodos.

Se realizaron comparaciones de los valores de intensidad de fluorescencia en distintas regiones celulares durante la ventana de tiempo de adquisición de los datos para RICS. Debido a que para su adquisición se utilizó el modo de conteo de fotones, la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de proteínas fluorescentes en el volumen confocal, siempre y cuando los valores de intensidad de fluorescencia se encuentren dentro del rango de linealidad del detector.

En la figura 25 se muestran datos representativos de al menos 5 pixeles de cada región intracelular extraído de los apilados temporales adquiridos para RICS para células infectadas con los baculovirus recombinantes Bac-EGFP, Bac-EGFP-VP1 y Bac-EGFP-VP1 y Bac-VP3 simultáneamente, respectivamente a 36 hpi. En esta figura se muestra que, en todos los casos, los valores de

intensidad de fluorescencia del citoplasma (Cit) y núcleo celular (Nuc) se mantienen constantes a lo largo de la ventana de tiempo de adquisición de datos para RICS. Además, estos datos se encuentran dentro del rango de linealidad del detector (por debajo de 1700 conteos). Los valores de intensidad de fluorescencia en los CRV se encontraron cercanos al límite del rango de linealidad del detector e incluso algunos valores sobresalieron de este rango. Se observó también una ligera tendencia de aumento en el valor promedio de F en los CRV con respecto al tiempo, sin embargo, este aumento no sobrepasó el rango de las barras de error durante la ventana de tiempo analizado.

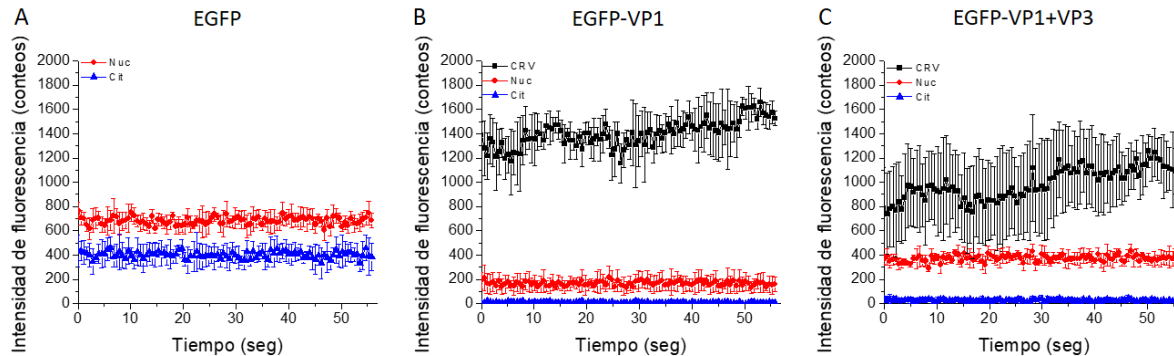


Figura 25. Intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo en distintas regiones intracelulares (citoplasma en azul, núcleo en rojo y CRV en negro). Datos representativos de al menos 5 píxeles por región intracelular extraídos de los apilados temporales de RICS de una célula Sf9 infectada con baculovirus recombinante para la expresión de EGFP (A), EGFP-VP1 (B) o bien EGFP-VP1 y VP3 (C). Los datos fueron extraídos de apilados temporales para RICS tomados a un tiempo de píxel de 8 μ s y una potencia de láser de 0.5 %.

Se determinó si la expresión de VP3 tiene un efecto sobre la expresión y/o localización de EGFP-VP1 en células Sf9. Para ello se analizaron los valores de F en las distintas regiones celulares analizadas. En la figura 26 se muestran las distribuciones de promedios de F en citoplasma (Cit) núcleo celular (Nuc) y CRV (CRV) de células Sf9 infectadas con los baculovirus recombinantes, Bac-EGFP, Bac-EGFP-VP1 y coinfectadas con los baculovirus Bac-EGFP-VP1 y Bac-VP3 a 36 phi. En la figura 26.A se observa una distribución amplia en los niveles de expresión de proteína fluorescente recombinante en todas las regiones intracelulares. Cuando se analiza el cociente entre la intensidad de fluorescencia de EGFP-VP1 en el núcleo con respecto al citoplasma de cada célula, no se observaron diferencias cuando hay o no coexpresión de VP3, sin embargo, en el cociente entre los valores de F de CRV con respecto al citoplasma si se observó una disminución (figura 26.B).

Se ha reportado en la literatura que cuando se utiliza el sistema CI-BV para la expresión de más de una proteína recombinante utilizando coinfecciones con distintos baculovirus, el rendimiento de la expresión de una proteína recombinante disminuye cuando se compara con el rendimiento resultante cuando no hay coinfección (Palomares *et al.*, 2012). Sin embargo, los datos de F en la figura 26 no mostraron evidencia de alguna disminución en la cantidad de EGFP-VP1 cuando se coexpresa VP3. Solo se observó una disminución aparente entre el cociente entre los valores F en CRV con respecto al citoplasma, aunque se debe de tomar en cuenta que algunos valores de F sobresalieron del rango de linealidad del detector. Asumiendo que la disminución en el cociente CRV/Cit de F al coexpresar VP3 es verdadera, esto se puede explicar como parte de una competencia entre EGFP-VP1 y VP3 en la localización en los CRV, por lo cual, la cantidad total de VPs pudiera permanecer constante en ambas condiciones, mientras que la cantidad total de EGFP-VP1 se vería

disminuida cuando hay presencia de VP3. Se deben de realizar experimentos más específicos para poder corroborar esto.

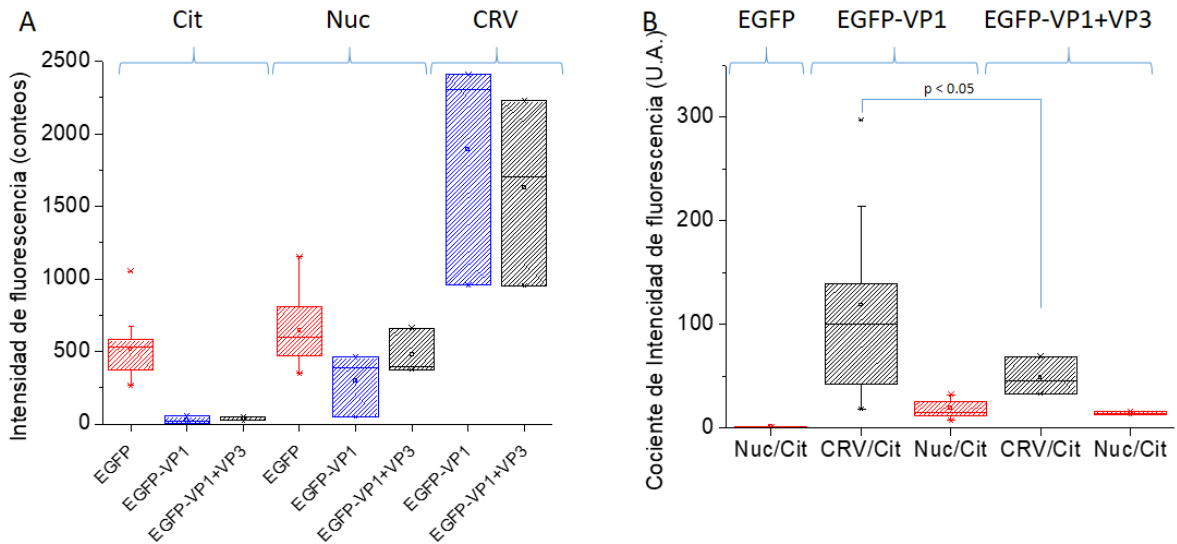


Figura 26. Efecto de la expresión de VP3 sobre la cantidad de proteína fluorescente EGFP-VP1 en distintas regiones intracelulares. A) Distribución de promedios de F de células Sf9 expresando EGFP, EGFP-VP1 o EGFP-VP1 junto con VP3, en citoplasma (Cit), núcleo celular (Nuc) y CRV (CRV). B) Distribución de los cocientes de F entre núcleo/citoplasma (Nuc/Cit) y CRV/citoplasma (CRV/Cit) de células Sf9 expresando EGFP, EGFP-VP1 o EGFP-VP1 junto con VP3 (n=20, 10 y 5). Únicamente en la comparación entre los cocientes CRV/Cit cuando se coexpresa o no VP3 se observó un valor de $p < 0.05$.

Determinación de los cambios en el MW de complejos de VP durante su ensamblaje en cápsides

FCS y RICS permitieron conocer el coeficiente de difusión de los complejos fluorescentes presentes en la muestra. Tomando en cuenta el valor de D y la ecuación de Stokes- Einstein (ecuación 5), se pudo determinar el radio hidrodinámico (R_h) de la molécula fluorescente. Considerando la aproximación de la dependencia del peso molecular (MW) de una proteína con respecto a su R_h (ecuación 6), fue posible estimar el valor de MW del complejo fluorescente. Es importante aclarar que en la ecuación 6 se asumió una estructura esférica de la proteína.

Es posible estimar el MW de una proteína si se conoce su valor de D siempre y cuando exista conocimiento de otra proteína de referencia con valores de MW y D en el mismo medio. Es decir, las condiciones de viscosidad y temperatura a la que se determinaron ambos D son las mismas. Utilizando las ecuaciones 5 y 6, teniendo en cuentas las condiciones antes mencionadas, es posible llegar a la ecuación 26.

$$D_2 = D_1 \sqrt[3]{\frac{MW_1}{MW_2}} \dots \dots \dots \text{Ecuación 26}$$

Uno de los enfoques para determinar la oligomerización de proteínas fluorescentes mediante RICS, es analizando cambios en D que se relacionen con una modificación en el MW de un complejo fluorescente. Siguiendo este acercamiento, tomando en cuenta la relación entre D y MW derivada

de la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 26) y un valor de $D = 12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ de EGFP en el núcleo de células de insecto, se calculó el valor de D de simulaciones de cápsides que contengan desde 1 hasta 60 proteínas EGFP-VP1, así como el de oligómeros formados únicamente por EGFP-VP1. En la figura 27 se muestra que, sin importar el número de moléculas de EGFP-VP1 en una cápside, el valor de D esperado se encuentra en un rango de 2 a $2.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Lo anterior se debe a la relación cúbica que existe entre el MW y el D . Debido a que el peso molecular de una cápside es muy grande (aproximadamente 4,000 kDa), la adición de moléculas de EGFP no tiene un efecto importante sobre el valor de D . Se observa además que es hasta un número de 6 moléculas de EGFP-VP1 donde el valor de D es lo suficientemente distinto para distinguir entre cada uno de los estados de oligomerización de EGFP-VP1.

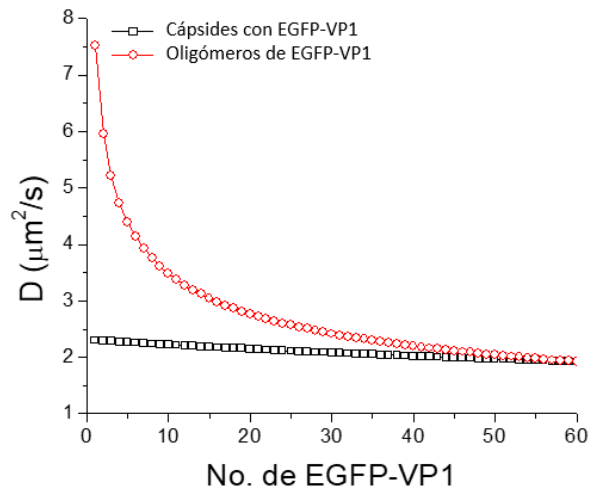


Figura 27. Coeficiente de difusión de simulaciones de cápsides con EGFP-VP1 (línea en negro) y oligómeros de EGFP-VP1 (línea en rojo) en el núcleo de células Sf9.

De acuerdo a las simulaciones, es posible diferenciar valores de D entre cápsides y los intermediarios tempranos del ensamblaje de la cápside (oligómeros pequeños). Se determinó el valor de D para EGFP-VP1 en las distintas regiones de células Sf9 en presencia o ausencia de la coexpresión con VP3. La adquisición de datos para RICS se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología utilizando un tiempo de adquisición de $8 \mu\text{s}$ y una potencia de láser de 0.5%. En la figura 28 se muestran las distribuciones de valores de D de EGFP-VP1 en citoplasma, núcleo y CRV, siendo para cada uno 2.6 ± 1.1 , 2.4 ± 0.9 y $1.3 \pm 0.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ respectivamente, y de 2.1 ± 0.5 , 1.8 ± 0.4 y $0.8 \pm 0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ en las mismas regiones cuando hay coexpresión de VP3. Estos valores sugieren que la coexpresión de VP3 no tiene un efecto significativo sobre el valor de D de EGFP-VP1.

Tomando en cuenta la relación entre D y MW derivada de la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 26) y un valor de $D = 12$ y $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ de EGFP en el núcleo y citoplasma de células Sf9 respectivamente (valores promedio de los obtenidos para las 3 condiciones de MDI), se calcularon los valores teóricos de D esperados para la fusión EGFP-VP1. Sabiendo que el MW de EGFP es de aproximadamente 27 kDa y EGFP-VP1 monomérica de aproximadamente 110 kDa, se espera un valor de $D = 1.88 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y $D = 7.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ para EGFP-VP1 en citoplasma y núcleo respectivamente. De acuerdo a la distribución de valores de D de EGFP-VP1 en el citoplasma cuando hay o no coexpresión de VP3, los datos

experimentales son cercanos al valor esperado para EGFP-VP1, lo cual sugiere que EGFP-VP1 se encuentra de forma monomérica en el citoplasma.

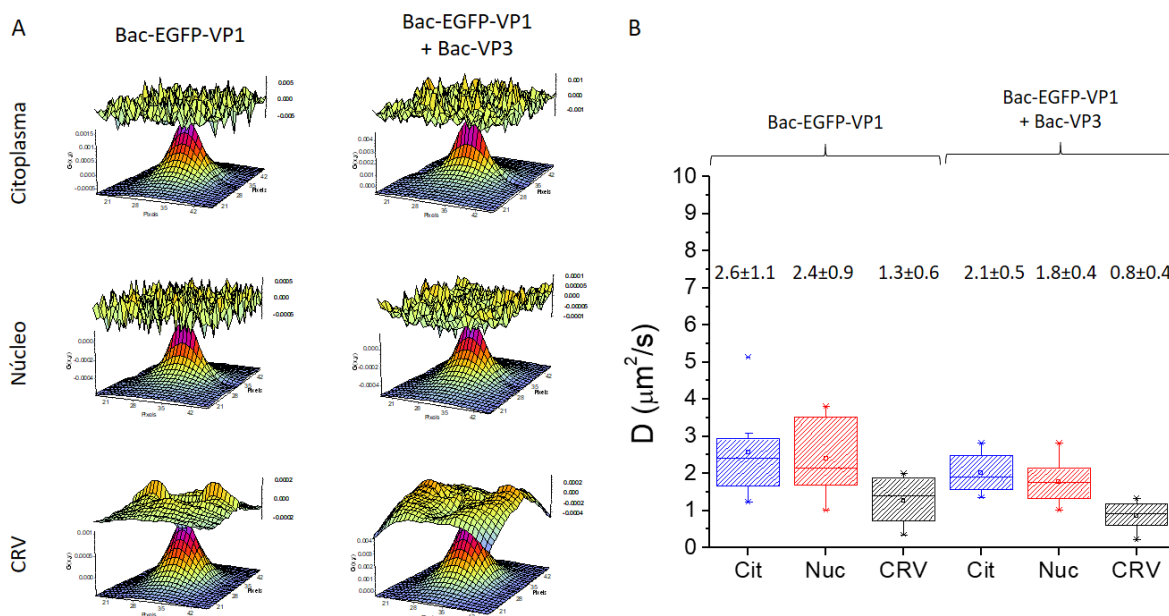


Figura 28. Determinación del coeficiente de D de EGFP-VP1 en células Sf9 mediante RICS. A) FAC de los datos de RICS de EGFP-VP1 en citoplasma, núcleo y CRV cuando se expresa o no VP3, la gráfica superior de cada FAC representa el error de los datos experimentales al ajuste. B) valores de D en citoplasma, núcleo y CRV de EGFP-VP1 cuando se expresa únicamente EGFP-VP1 o en combinación con VP3.

En el núcleo celular se espera un valor de $D = 7.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ para EGFP-VP1 monomérica. Dicho valor es aproximadamente 3 veces más alto que el obtenido experimentalmente en el núcleo y aproximadamente 5 veces mayor que el obtenido en los CRV. Esta diferencia entre el valor teórico esperado y el valor observado experimentalmente pudiera sugerir a un proceso de oligomerización entre varias moléculas de EGFP-VP1 o bien que EGFP-VP1 interacciona con alguna otra proteína en el núcleo celular.

Asumiendo que la disminución del D de EGFP-VP1 en el núcleo se debe a la formación de complejos multiméricos, y tomando como referencia los valores de D y MW previamente reportados para EGFP, se estimó el valor de MW correspondiente al promedio de los valores de D de EGFP-VP1 para cada región intracelular con la ecuación 26. Con el objetivo de brindar una idea acerca del impacto de los valores de D obtenidos experimentalmente sobre el cambio en el MW de los complejos de EGFP-VP1, se calculó el cociente entre el MW calculado de acuerdo a cada D y el MW de EGFP-VP1 monomérica (RM). Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Determinación del MW de complejos de EGFP-VP1 en células Sf9.

Región	EGFP-VP1		EGFP-VP1 + VP3	
	MW (kDa)	RM	MW (kDa)	RM
Cit	41	0.4	79	0.7
Nuc	3375	21.5	8000	72.7
CRV	21236	245.5	91125	828.4

Tomando en cuenta los valores de D encontrados experimentalmente en el núcleo y a que se ha demostrado que únicamente existe formación de cápsides en los CRV, se puede afirmar que EGFP-VP1 podría estar interaccionando con alguna otra proteína en el espacio nuclear o bien que se forman complejos muy grandes de EGFP-VP1. La disminución drástica en el valor de D en los CRV podría indicar también la formación de complejos muy grandes de EGFP-VP1 con o sin VP3 que no necesariamente involucren su ensamblaje en cápsides o bien, que la concentración elevada de las proteínas VPs en esta región provoquen cambios en la viscosidad aparente del medio que, al aumentar, provoque una disminución en el D aparente de los complejos que contengan EGFP-VP1.

La determinación de la estequiometría de los complejos fluorescentes presentes utilizando una aproximación a partir del D pudiera no ser tan exacta debido a varios factores; existe una desviación considerable entre el valor promedio de D y el conjunto de datos experimentales para cada condición, la dependencia de D con respecto al MW es cúbica, por lo cual se requieren cambios importantes en MW para apreciar cambios en el valor de D , y finalmente, el análisis de RICS representa un valor general de la RDI analizada, perdiendo resolución y enmascarando la presencia de las poblaciones de oligómeros menos representadas.

Determinación de la estequiometría de los complejos de las VPs durante su ensamblaje en cápsides

Los datos adquiridos para RICS se utilizaron para el análisis de N&B. Este análisis permitió conocer la estequiometría y concentración de la proteína fluorescente conservando la resolución a nivel de pixel mediante el cálculo del promedio y varianza de las intensidades de fluorescencia para cada pixel a través del tiempo. El N y B se calcularon conforme a las ecuaciones 16 y 17 con el software SimFCS. El valor de B permitió conocer el estado de oligomerización de las proteínas fluorescentes difundiendo a través del volumen de observación en cada pixel. El valor de N representa el promedio de complejos en cada pixel mediante la relación entre el valor de intensidad promedio y B . Se determinaron los valores de S , $offset$ y σ^2_0 , de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología, y se introdujeron al software SimFCS para generar las gráficas de la figura 29.

En la figura 29 se muestran imágenes representativas de los resultados de N&B de células Sf9 infectadas con los baculovirus Bac-EGFP, Bac-EGFP-VP1 o coinfectadas con los baculovirus Bac-EGFP-VP1 y Bac-VP3. En el panel A se muestran las imágenes resultantes del promedio de F de cada pixel a través del apilado temporal, en el panel B se muestra nuevamente la imagen promedio de cada apilado temporal con los pixeles sobresaltados según las regiones seleccionadas en las gráficas de puntos del panel C. Estas gráficas de puntos muestran los valores de B (eje izquierdo) y el valor de estequiometría que, en este caso, únicamente considera la cantidad de moléculas fluorescentes en un complejo, en el eje derecho, con respecto al valor promedio de F para cada pixel (eje horizontal). El valor de B de EGFP se utilizó como referencia para determinar el valor de ϵ de un monómero, y posteriormente se determinaron los valores de B que corresponden a cada estado de oligomerización (eje derecho de las gráficas del panel C) de acuerdo a la ecuación 17.

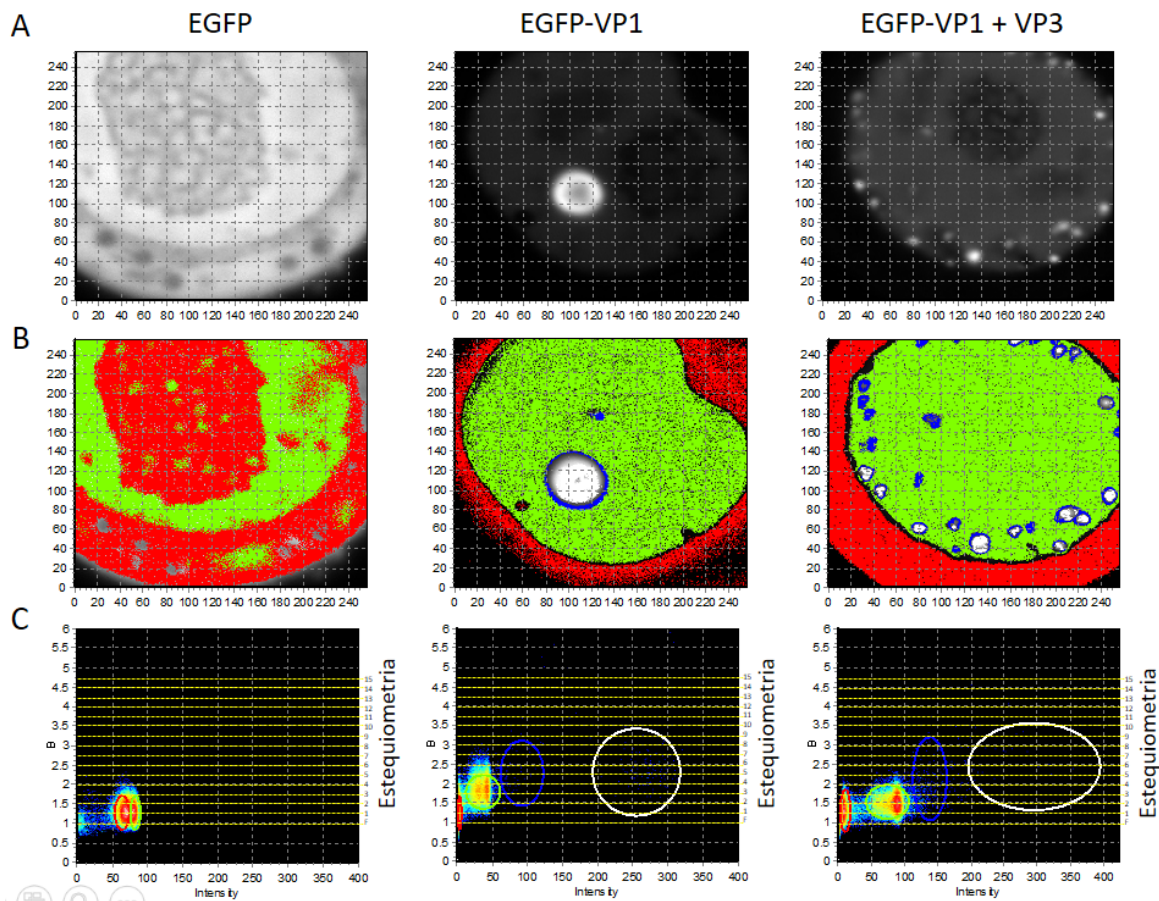


Figura 29. Análisis de N&B de EGFP, EGFP-VP1 y EGFP-VP1 cuando se coexpresa VP3 en células de insecto. A) Imagen promedio de cada apilado temporal. B) Imagen promedio de cada apilado temporal con los pixeles resaltados según el código de colores de las gráficas en el panel C. C) Gráfica de puntos de B contra F promedio seleccionando en óvalos las distintas poblaciones de pixeles. Imágenes representativas de apilados temporales de 100 imágenes de 256 x 256 pixeles, un tamaño de pixel de 50 nm, un tiempo de 8 μ s por pixel y 0.5 % de potencia de láser.

En la figura 29 se puede observar que los pixeles de las células que expresaron EGFP se encuentran distribuidos en dos poblaciones que corresponden al mismo valor de B pero distinto valor de F , las cuales representan al citoplasma y el núcleo celular respectivamente. La población de pixeles correspondiente al núcleo celular tiene valores de intensidad más altos comparados con los del citoplasma. También se puede observar que ambas poblaciones se encuentran distribuidas alrededor del mismo valor de B , corroborando así el estado monomérico de EGFP en todas las regiones intracelulares.

Para el caso de la expresión de EGFP-VP1 en ausencia de VP3, se observaron varias poblaciones de pixeles. Los pixeles correspondientes al citoplasma (rojo) se encuentran en el grupo con valores F y de B menores, éste último corresponde al valor esperado para EGFP-VP1 monomérica, lo cual concuerda con los resultados obtenidos mediante RICS, donde se obtuvo un valor de D correspondiente al MW de monómeros de EGFP-VP1. La población de pixeles que corresponden al núcleo (verde) se encuentra distribuida en dos subpoblaciones con valores distintos de F , pero mismo valor de B . Lo anterior sugiere que existe una heterogeneidad en cuanto a la concentración

de EGFP-VP1 en distintas regiones del núcleo. La distribución de valores de B en el núcleo sugiere la presencia de formación de complejos de EGFP-VP1 que podrían ser trímeros. En cuanto a EGFP-VP1 en los CRV (azul y blanco), se observa una amplia distribución en los valores de F y B , que son los valores más altos comparados con los observados en citoplasma y núcleo. La distribución de valores de B para EGFP-VP1 sugiere la presencia de oligómeros que posiblemente corresponden desde trímeros hasta nonámeros de EGFP-VP1 en estas regiones.

En la figura 29 se puede observar que la coexpresión de VP3 con EGFP-VP1 únicamente tiene un efecto notorio sobre la distribución de los valores de B de EGFP-VP1 en el núcleo. En esta condición se presentaron valores de B que sugieren la presencia de dímeros de EGFP-VP1 en esta región. Es importante destacar que el valor de B únicamente brinda información acerca de la cantidad de moléculas de EGFP-VP1 y no acerca de la cantidad total de proteínas VPs que forman parte de un mismo complejo. La presencia aparente de dímeros en lugar de trímeros en el núcleo celular pudiera deberse a la interacción entre EGFP-VP1 y VP3. Debido a que VP3 no está fusionada a una proteína fluorescente, no contribuye al valor de B . Así, un complejo formado por dos moléculas de EGFP-VP1 y una de VP3 tendrá el mismo valor de B que un dímero conformado por dos EGFP-VP1.

En el estudio llevado a cabo por Rojas en 2009 se determinó que las cápsides conformadas por EGFP-VP1, VP2 y VP3 contaban con una relación 1:1:10 de cada una de ellas (Rojas & Palomares, 2009). Trasladando esa relación a las cápsides conformadas por EGFP-VP1 y VP3, en este estudio se esperaría que las cápsides estuvieran conformadas por 6 o hasta 12 EGFP-VP1. Teniendo esto en cuenta, cuando se coexpresan EGFP-VP1 y VP3 no es posible diferenciar entre un hexámero de EGFP-VP1 y una cápside con 6 proteínas EGFP-VP1.

Estudio del papel de AAP durante el ensamblaje de cápsides de AAV

Los valores de D de EGFP-VP1 en el núcleo y CRV obtenido en este trabajo, no concuerdan con los valores de estequiometría sugeridos mediante el análisis de N&B. Es decir, los valores encontrados para el D de EGFP-VP1 en estas regiones sugieren que existe la formación de complejos de mayor peso molecular comparados con el resultante de la cantidad de moléculas de EGFP-VP1 en un mismo complejo determinada mediante N&B. Tomando en cuenta que este efecto se observa en ausencia de la coexpresión de VP3, se propone que existe otra proteína que pudiera estar interaccionando con EGFP-VP1 en estas regiones. Existen estudios donde se ha propuesto que la proteína AAP es necesaria para la formación de cápsides de AAV2. Recientemente, un estudio realizado por Große y colaboradores demostró que AAP evita la degradación de las VPs posiblemente debido a la interacción con ellas y promover la formación de cápsides (Große et al., 2017).

Siguiendo este enfoque, se planteó investigar cuál es el efecto de la proteína AAP dentro del proceso completo de ensamblaje de cápsides de AAV2, debido a que estudios anteriores, realizados principalmente con técnicas de inmunocitoquímica, han presentado ciertas contradicciones acerca del papel de esta proteína durante el ensamblaje de los distintos serotipos de AAV (Sonntag *et al.*, 2010; Sonntag *et al.*, 2011; L. F. Earley *et al.*, 2016). Se propuso un estudio en el cual la determinación de la concentración, desplazamiento y estequiometría de complejos formados por las VPs mediante técnicas de espectroscopía de fluorescencia, pudieran brindar información más detallada acerca del panorama de las condiciones intracelulares donde se logró la producción de cápsides de AAV2.

Para realizar este estudio se planteó la expresión independiente de las proteínas VP y la proteína AAP fusionadas o no a proteínas fluorescentes. Para ello se propuso la construcción de 3 baculovirus recombinantes; Bac-AAP, Bac-EGFP-AAP y Bac-EGFP-VP3, los cuales expresen la proteína AAP, la proteína AAP con EGFP fusionada en su extremo N-terminal y la proteína VP3 con EGFP fusionada en su extremo N-terminal respectivamente.

Construcción de pFastBac

Los plásmidos utilizados como templados para la amplificación de los genes de las proteínas AAP, EGFP y VP3 fueron construidos previamente en nuestro laboratorio por Rojas en 2009. El gen de AAP se amplificó a partir del vector pVL-VP1, el gen de EGFP a partir del plásmido pFastBac-EGFP-VP1 y el gen de VP3 a partir del pFastBac-VP3. Para la construcción del pFB-AAP, se realizó una PCR de AAP utilizando los oligonucleótidos F-AAP y R-AAP, esperando un fragmento de 632 pb, tal y como se muestra en la figura 30.A.

Para el caso de los plásmidos pFB-EGFP-AAP y pFB-EGFP-VP3, se amplificó el gen de EGFP con los oligos F-EGFP-BamHI y R-EGFP-XbaI (747 pb), el gen de AAP con los oligos F-AAP-XbaI y R-AAP-XhoI (648 pb) y el gen de VP3 con los oligos F-VP3-XbaI y R-VP3-XhoI (1635 pb) tal como se muestra en la figura 25.B. El conjunto de oligos fueron diseñados para generar un linker entre la proteína EGFP y AAP o VP3 de 9 aminoácidos con la secuencia GSGSRGGAS (figura30.B).

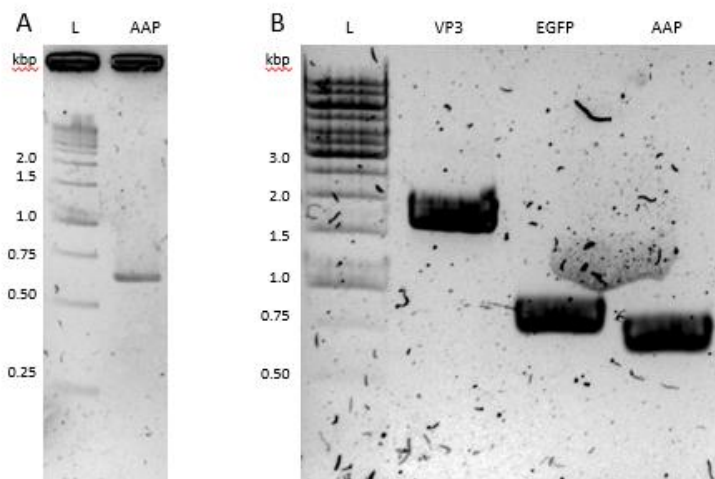


Figura 30. A) PCR de AAP con los oligonucleótidos F-AAP y R-AAP. B) PCR de los genes de VP3 con los oligos F-VP3-XbaI y R-VP3-XhoI (1635 pb), el gen de EGFP con los oligos F-EGFP-BamHI y R-EGFP-XbaI (747 pb) y el gen de AAP con los oligos F-AAP-XbaI y R-AAP-XhoI (648pb).

Se realizaron reacciones de digestión con las enzimas correspondientes para cada caso (BamHI, XbaI o XhoI) tanto de los insertos como del vector pFastBac1 y se llevaron a cabo reacciones de ligación a 17 °C durante 8 horas con la enzima T4 DNA ligasa de New England Biolabs utilizando una relación de 3:1 inserto:vector.

Las ligaciones se purificaron mediante un protocolo de extracción con solventes para eliminar las sales del buffer y se resuspendieron en H₂O mQ. Una vez purificadas, las ligaciones se utilizaron para

transformar células electro-competentes de *E. coli DH5α*. Las colonias obtenidas se analizaron mediante PCR de colonia con los oligonucleótidos F-polh y R-SV40, los cuales delimitan la región del polilinker del pFastBac donde se insertan los genes de interés. Realizando un PCR con estos oligos se espera un amplicón de aproximadamente 1036 pb para el pFastBac-AAP. En la figura 31 se muestra el gel de agarosa para el PCR de colonia del pFB1-AAP donde se puede observar que las colonias 3 y 4 contienen el inserto de interés.

Para el caso de los pFastBac correspondientes a las fusiones de AAP y VP3 con EGFP, no se logró obtener colonias. En un segundo intento de la reacción de ligación se utilizaron relaciones de 5:1 o 20:1 de inserto:vector. En este segundo intento no se obtuvieron colonias, cabe mencionar que solo se obtuvieron dos colonias para el control de ligación (pFastBac-VP1 digerido con BamHI y XbaI, posteriormente purificado de banda de gel de agarosa), mientras que para el control de plásmido súper enrollado (pFastBac1) sin digerir, se obtuvieron un gran número de colonias. Lo anterior muestra que pudiera haber ocurrido algún error en la reacción de ligación. En la figura 32 se muestra un gel de agarosa de las reacciones de ligación donde se observa que no hubo reacción de ligación en ninguno de los casos. LA5 y LA20 representan las reacciones ligación de AAP con relaciones 5:1 y 20:1 respectivamente mientras que LV20 representa la reacción de ligación a una relación 20:1 de VP3 con el pFastBac.

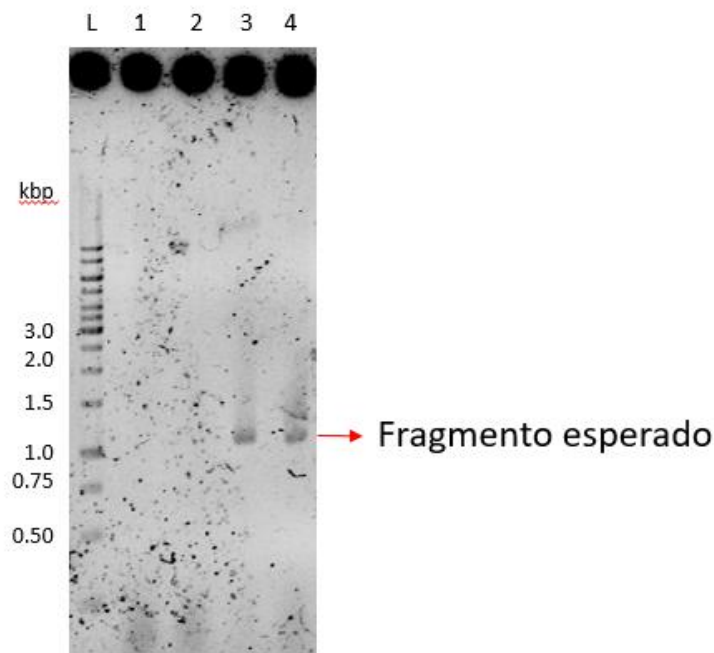


Figura 31. PCR de colonia de pFB1-AAP con los oligonucleótidos Forward poliedrina y Reverse SV40 esperando un fragmento de 1036 pb. Las colonias 3 y 4 muestran el fragmento del tamaño esperado.

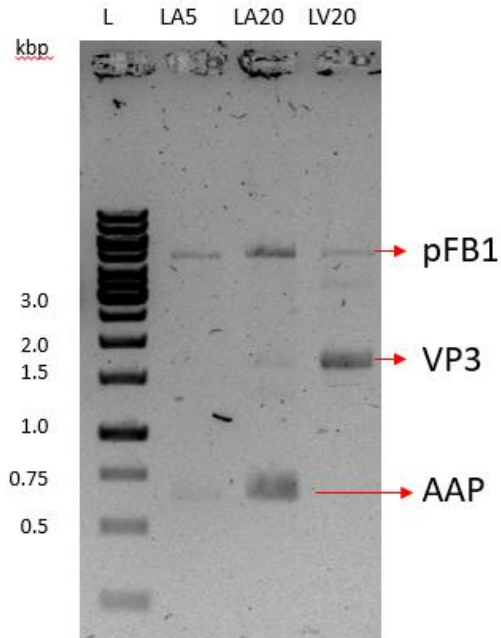


Figura 32. Gel de ligaciones de AAP y VP3 con el pFastBac1.

Se realizaron variaciones en las condiciones de la reacción de ligación, como agregar ATP 1 mM, calentar los insertos y vector a 65 °C antes de la reacción, así como el uso de una enzima nueva sin obtener mejoras en los resultados de ligación. Hasta el momento, no se ha logrado obtener los pFastBac necesarios para la expresión de EGFP-AAP o EGFP-VP3, pero si para AAP.

Obtención de bácmidos

Una vez obtenido el pFB-AAP, se procedió a la generación del bácmido recombinante mediante la transformación de células quimio-competentes de *E. coli* DH10Bac™. Esta cepa contiene un vector helper que codifica para las enzimas necesarias para llevar a cabo la recombinación entre el pFastBac y el bácmido en las regiones *Tn7*. Dicha recombinación da lugar a la generación del bácmido recombinante y a la interrupción del gen *LacZ* dentro del bácmido, por lo cual, es posible distinguir las colonias recombinantes mediante el escrutinio entre colonias blancas y azules cuando se incuban con IPTG y X-gal. Se seleccionaron las colonias blancas (que tienen interrupción en el gen *LacZ*) y se realizó PCR de colonia con los oligos F-M13 y R-M13, los cuales flanquean regiones adyacentes al sitio de recombinación en el bácmido. Para el caso de un bácmido que no recombinó, se obtendrá un amplicón de alrededor de 300 pb, en el caso del bácmido con el inserto para AAP se espera de alrededor de 3000 pb. En la figura 33 se puede observar la presencia del amplicón esperado de alrededor de 3000 pb. Se seleccionó la colonia 1 para purificar el bácmido Bac-AAP.

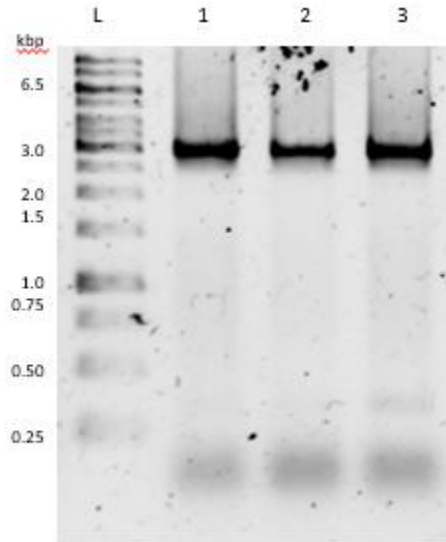


Figura 33. PCR de colonia de células DH10Bac con los oligos M13.

Producción de baculovirus recombinante y ensayo en placa para el aislamiento de placas virales

Se realizó la transfección de células Sf9 con el Bac-AAP en medio Grace's sin SFB mezclando 1 µg de DNA con 20 µL el reactivo Flyfectin. Se adhirieron 1×10^6 células por pozo en placas de 6 pozos durante una hora y posteriormente se incubaron durante 4 horas con la mezcla de DNA/Flyfectin en 1 mL de medio de cultivo. Posteriormente se adicionó 1 mL de medio Grace's. Las placas se incubaron durante 96 horas protegidas de la luz en ambiente húmedo a 27 °C. Una vez que las células presentaron signos de infección se recolectó el sobrenadante del cultivo y se utilizó para hacer un ensayo en placa.

Para este, se adhirieron 1×10^6 células/pozo en placas de 6 pozos durante una hora. Se realizaron diluciones seriadas del sobrenadante de transfección (10^{-1} - 10^{-5}) en 1 mL de medio Grace's. Las células se incubaron con las diluciones durante 4 horas y posteriormente se removió el sobrenadante del cultivo y se adicionó medio de plaqueo. Las placas se incubaron durante 96 horas a 27 °C en ambiente húmedo y posteriormente se adicionó una segunda capa de medio de plaqueo con rojo neutro. Tras 4 horas de incubación se observó la formación de placas virales por la formación de halos incoloros. Se seleccionaron 5 placas virales y se picaron con micropipeta resuspendiendo en 1 mL de medio Grace's. La amplificación de las placas virales se realizó en cultivos de células Sf9 a 1×10^6 células por pozo en placas de 6 pozos en un volumen final de 2 mL. Las placas se incubaron por 5 días y el sobrenadante del cultivo se almacenó como stock viral mientras que el pellet se utilizó para hacer un análisis de Western-Blot utilizando el anticuerpo primario anti-GP64 con el fin de identificar la presencia de baculovirus recombinantes. En la figura 34, haciendo un análisis de Western-Blot utilizando un anticuerpo primario anti-GP64, se puede observar que en todas las placas virales hay presencia de baculovirus. Como control positivo se utilizó un baculovirus recombinante previamente confirmado mientras que como control negativo se utilizó un pellet de células Sf9 sin baculovirus. Se seleccionó la placa 1 para amplificar y titular el stock de trabajo de Bac-AAP.

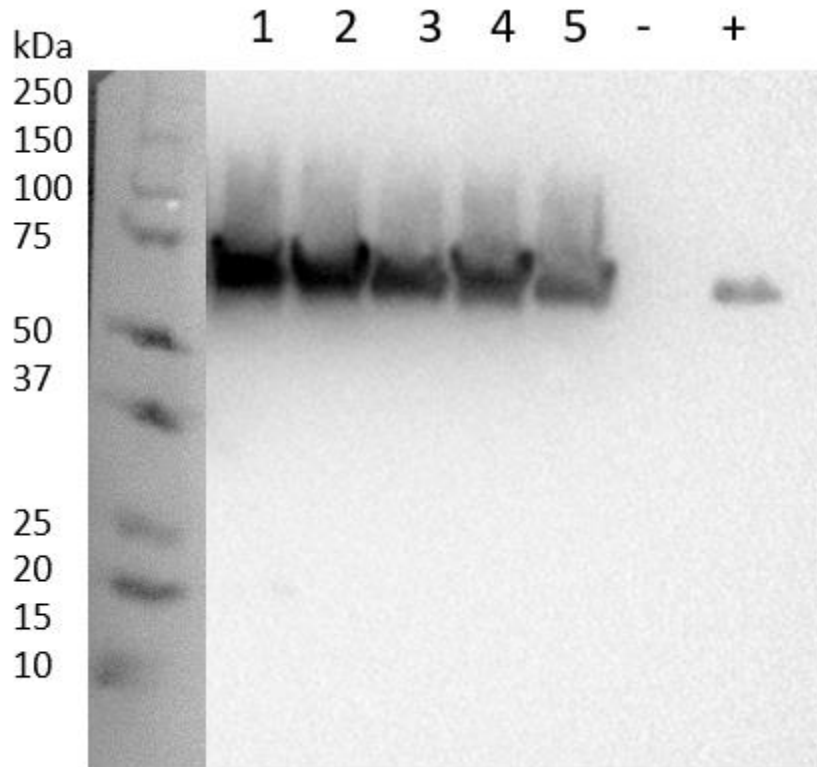


Figura 34. Western-Blot con anti GP64 de pellets de células Sf9 infectadas con placas virales de Bac-AAP. Pellet de células Sf9 sin infectar se utilizó como control negativo (-), mientras que un baculovirus recombinante previamente confirmado se utilizó como control positivo (+).

Producción de cápside con Bac-AAP y Bac-VP3

Se analizó la expresión de AAP funcional mediante el baculovirus Bac-AAP en relación con su capacidad de formación de cápsides. Se realizó un Dot-Blot de pellets de células Sf9 infectadas con los baculovirus, Bac-AAP en combinación o no con el Bac-VP3 o un baculovirus irrelevante (Bac). Todos los baculovirus se utilizaron a una MDI de 5 ufp/cel. Los pellets se recolectaron a las 72 hpi y se lisaron de acuerdo al protocolo descrito en métodos.

En la figura 35 se puede observar que únicamente hay una señal clara en el pellet de células infectadas con el Bac-VP3 y una señal más tenue cuando se coinfecta con los baculovirus Bac-AAP y Bac-VP3 en la membrada incubada con el MAb B1. Mientras tanto en la membrana incubada con el MAb A20 se observa señal en los pellets de la coinfección con los baculovirus Bac-AAP y Bac-VP3, así como con el pellet infectado con el Bac-Cap utilizado como control positivo para la formación de cápsides. Estos resultados concuerdan con lo ya reportado en la literatura por Sonntag y colaboradores en 2010 que muestra que es necesaria la presencia de AAP para la formación de cápsides de AAV2.

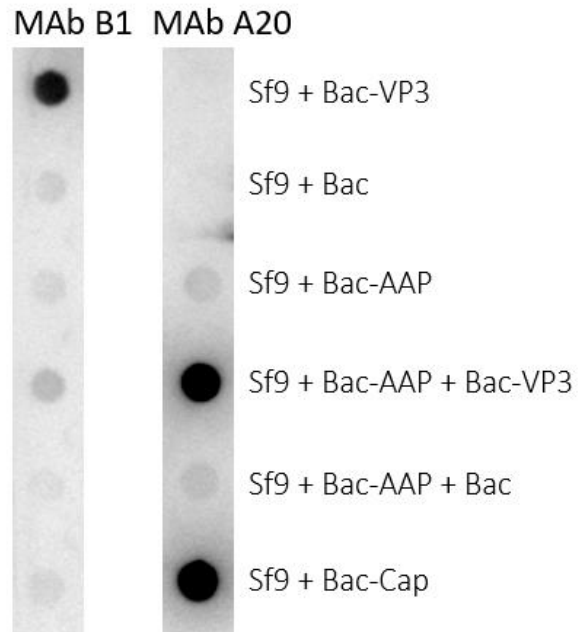


Figura 35. Dot-Blot de células Sf9 con los mAbs B1 y A20 para evaluar la capacidad de AAP de promover el ensamblaje de cápsides de VP3. Se analizaron pellets de células Sf9 infectadas con los distintos baculovirus recombinantes a una MOI de 5.0 ufp/cel a 72 hpi. Se cargaron 20 µg de proteína total en cada pozo.

CONCLUSIONES

En este trabajo se logró la formación de cápsides de AAV2 utilizando el sistema de expresión CI-BV al infectar células Sf9 con los baculovirus recombinantes Bac-EGFP-VP1 y Bac-VP3. La formación de cápsides compuestas por proteínas VPs fusionadas a EGFP permitió el estudio del transporte, y oligomerización de éstas durante su ensamblaje en células vivas.

Para el análisis del coeficiente de difusión de EGFP en solución mediante FCS, fue necesario adquirir los datos a una potencia de láser de 5 % y un tiempo de adquisición de 4 μ s. Este análisis permitió realizar la calibración para obtener las dimensiones del volumen confocal del sistema utilizado. Estas dimensiones se utilizaron durante el ajuste al modelo de difusión de FCS y RICS para el análisis del ensamblaje de cápsides de AAV2. En la prueba control del sistema, que consistió en determinar el valor del coeficiente de difusión de EGFP previamente reportado en una línea celular mediante RICS, se obtuvieron resultados muy similares a los comunicados anteriormente por Gratton en 2005, lo cual permitió tener un mayor grado de confianza en nuestros resultados.

Se determinó que en el rango de multiplicidades de infección utilizado durante el desarrollo de este trabajo (5 – 15 ufp/cel), no se observó un efecto directo sobre el valor del coeficiente de difusión de EGFP cuando las células Sf9 se infectaron con baculovirus recombinantes y se analizaron a las 36 hpi. En este tiempo la viabilidad celular aún se encontró en valores por encima del 95%, por lo cual se puede concluir que a pesar de que hubo la expresión de proteína recombinante, lo que indicó una fase adelantada del ciclo viral de baculovirus, aún no se habían presentado cambios importantes en las propiedades mecánicas intracelulares.

El coeficiente de difusión de EGFP en el citoplasma fue aproximadamente 4 veces menor comparado con el observado en el núcleo celular de células de insecto, lo que reveló la diferencia en el ambiente intracelular entre los dos compartimentos, por lo cual se puede sugerir que en el citoplasma existe una mayor viscosidad comparada con la del núcleo. Hasta donde sabemos, estos son los primeros reportes de la determinación de difusión de proteínas y viscosidad del medio intracelular en células de insecto.

De acuerdo a los modelos descritos para el ensamblaje de la cápside *in vitro*, existe una concentración crítica de subunidades a partir de la cual se favorece el ensamblaje. Por esa razón se analizaron cambios espaciales y temporales en la concentración intracelular de EGFP-VP1. En los resultados del análisis de localización y cantidad de las proteínas EGFP y EGFP-VP1 se determinó que existe una localización preferencial en el núcleo celular. Dicho aspecto es esperado para EGFP-VP1 ya que se ha reportado que cuenta con una secuencia de localización nuclear, sin embargo, no se ha reportado que EGFP cuente con alguna secuencia señal. Cabe destacar que la translocación de EGFP-VP1 hacia el espacio nuclear fue considerablemente mayor que aquella presentada para EGFP. Además, los niveles más altos de cantidad de proteína EGFP-VP1 se observaron en los CRV. La coexpresión de VP3 provocó una disminución en la relación de cantidad de proteína EGFP-VP1 en los centros de replicación viral con respecto al citoplasma. Lo cual se pudo deber a una competencia en el desplazamiento entre EGFP-VP1 y VP3 hacia los centros de replicación viral.

Los valores del coeficiente de difusión de EGFP-VP1 en el citoplasma correspondieron al esperado para EGFP-VP1 monomérica, mientras que, en el núcleo, se observaron valores que corresponden

a complejos con un peso molecular más elevado, que incluso llegaron a superar el valor correspondiente de una cápside completa, por lo cual, considerando que este efecto se presentó en ausencia de la expresión de VP3, concluimos que EGFP-VP1 podría estar interaccionando o formando complejos por varias moléculas de EGFP-VP1 o bien, con alguna otra proteína.

Mediante el cálculo de la cantidad de proteínas fluorescentes en los complejos conformados por VPs partir de su brillo aparente, se sugirió que EGFP-VP1 se encuentra en forma monomérica en el citoplasma. Lo cual concuerda con los resultados de coeficiente de difusión obtenidos mediante RICS. Cuando únicamente se expresó EGFP-VP1, no fue posible obtener cápsides completas de AAV2 debido a un impedimento estérico. En esta condición se pudo apreciar que EGFP-VP1 se encuentra en forma de dímeros o trímeros en el núcleo celular, mientras que en los CRV se observó una distribución amplia que sugiere la presencia desde trímeros hasta nonámeros. Estos complejos podrían ser los intermediarios más tempranos en el proceso de formación de la cápside de AAV2.

La coexpresión VP3 con EGFP-VP1 fue necesaria para la obtención de cápsides completas, en este caso, se observó una disminución notoria en el brillo aparente de EGFP-VP1 en el núcleo, lo que se puede deber a la competición de la interacción entre EGFP-VP1 con otra molécula de EGFP-VP1 o VP3. Debido a este fenómeno no fue posible determinar la estequiometría exacta de los complejos formados por las VPs cuando se ensamblan en cápsides completas.

Mediante el análisis de N&B no fue posible determinar la composición de VPs totales de los intermediarios en el proceso de ensamblaje de cápsides de AAV2 debido a que estos se encuentran conformados por combinaciones de VPs fusionadas o no a una proteína fluorescente. Una posible alternativa sería producir cápsides formadas únicamente por VPs fusionadas a proteínas fluorescentes, sin embargo, no se ha desarrollado hasta el momento una estrategia para lograr obtener cápsides con estas características. Adicionado a lo anterior, la concentración de las proteínas VPs en los CRV es tan elevada que, en algunos experimentos, los valores de intensidad superaron el rango de linealidad del detector, por lo cual, la expresión de VP3 fusionada a una proteína fluorescente y capaz de ensamblarse en cápsides muy probablemente superará en mayor medida el rango lineal del detector utilizado.

A pesar de que no se logró esclarecer por completo el proceso de formación de cápsides de AAV2 en células vivas, se obtuvo información acerca de la localización, concentración, desplazamiento, así como la identificación de intermediarios tempranos de las VPs durante su ensamblaje en células vivas.

En los experimentos donde únicamente se expresó EGFP-VP1, el valor de peso molecular de los complejos de EGFP-VP1 estimado mediante el coeficiente de difusión determinado por RICS en el núcleo o en los centros de replicación viral, no concuerda con el valor del peso molecular sugerido por la cantidad de proteínas EGFP-VP1 en un complejo según el valor del brillo aparente en las mismas regiones. Lo anterior sugiere que EGFP-VP1 pudiera estar interaccionando con alguna otra proteína además de VP3. Se ha determinado que AAP es capaz de interaccionar con las proteínas VPs por lo cual, se podría explicar esta diferencia por la formación de grandes complejos moleculares formados por EGFP-VP1 y AAP. Para poder estudiar el efecto de AAP sobre el proceso de transporte y oligomerización de las VP, se construyó un baculovirus recombinante que expresa la proteína AAP.

Hasta el momento, no ha sido posible obtener los baculovirus recombinantes necesarios para poder realizar el estudio sobre el efecto de la expresión de AAP sobre el coeficiente de difusión y oligomerización de las proteínas VP en células de insecto.

PERSPECTIVAS

Buscar alternativas que permitan analizar las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia de las VPs en los centros de replicación viral sin sobrepasar el rango de linealidad del detector. Para ello se propone el uso de filtros entre la fuente de luz y la muestra o bien el uso de detectores con un rango de linealidad más amplio.

Será necesario establecer una metodología para poder diferenciar complejos que cuenten con el mismo número de proteínas fluorescentes, pero no necesariamente el mismo peso molecular. En este sentido, dos complejos que presenten el mismo valor de brillo, no necesariamente tendrán el mismo valor de coeficiente de difusión. Haciendo esta distinción es probable que se puedan diferenciar entre una cápside compuesta por 6 EGFP-VP1 y 54 VP3 de un hexámero de EGFP-VP1. Recientemente se ha desarrollado una metodología que combina características de las tres técnicas empleadas en este proyecto denominada “correlación de pares sobre el brillo molecular” (pCOMB). Los datos para pCOMB son adquiridos de forma similar a RICS, sin embargo, en esta técnica solo se escanea una línea de un número de píxeles definido repetidamente. Esto permite que cada pixel sea analizado en un menor tiempo comparado con RICS y por lo tanto se puede hacer una correlación temporal a cada pixel o entre combinación de ellos. El análisis de los datos de esta metodología permite separar poblaciones con base en su brillo y posteriormente de acuerdo a su coeficiente de difusión.

Se deberán construir los baculovirus recombinantes para la expresión de las proteínas VP3 o AAP fusionadas a proteínas fluorescentes para el estudio del papel de AAP sobre la concentración, localización y oligomerización de las VPs en células de insecto.

REFERENCIAS

- Abu-Arish, A., Porcher, A., Czerwonka, A., Dostatni, N., & Fradint, C. (2010). High mobility of bicoid captured by fluorescence correlation spectroscopy: Implication for the rapid establishment of its gradient. *Biophysical Journal*, *99*(4), 33–35. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.05.031>
- Adu-Gyamfi, E., Digman, M. A., Gratton, E., & Stahelin, R. V. (2012). Investigation of Ebola VP40 assembly and oligomerization in live cells using number and brightness analysis. *Biophysical Journal*, *102*(11), 2517–2525. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.022>
- Arrio-Dupont, M., Foucault, G., Vacher, M., Devaux, P. F., & Cribier, S. (2000). Translational diffusion of globular proteins in the cytoplasm of cultured muscle cells. *Biophysical Journal*, *78*(2), 901–907. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76647-1](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76647-1)
- Ausar, S. F. (2006). Conformational Stability and Disassembly of Norwalk Virus-like Particles: EFFECT OF pH AND TEMPERATURE. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(28), 19478–19488. <http://doi.org/10.1074/jbc.M603313200>
- Bartlett, J. S., Wilcher, R., & Samulski, R. J. (2000). Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *Journal of Virology*, *74*(6), 2777–2785. <http://doi.org/10.1128/JVI.74.6.2777-2785.2000>
- Bleker, S., Pawlita, M., & Kleinschmidt, J. A. (2006). Impact of Capsid Conformation and Rep-Capsid Interactions on Adeno-Associated Virus Type 2 Genome Packaging Impact of Capsid Conformation and Rep-Capsid Interactions on Adeno-Associated Virus Type 2 Genome Packaging. *Journal of Virology*, *80*(2), 810–820. <http://doi.org/10.1128/JVI.80.2.810>
- Buschmann, V., Krämer, B., Koberling, F., Macdonald, R., & Rüttinge, S. (2007). Quantitative FCS: Determination of the Confocal Volume by FCS and Bead Scanning with the MicroTime 200. *AppNote Quantitative FCS*, 1–8.
- Caston, R. J., & Carrascosa, J. L. (2013). *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook. Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook* (Vol. 68). <http://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8>
- Ceres, P., & Zlotnick, A. (2002). Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids. *Biochemistry*, *41*(39), 11525–11531. <http://doi.org/10.1021/bi0261645>
- Chavez Peña, C., & Palomares, L. A. (2011). *DESARROLLO DE UN SISTEMA DE ENTREGA DE SUSTANCIAS PARA CÉLULAS UTILIZANDO PARTICULAS PSEUDOVIRALES DE VIRUS ADENO-ASOCIADO*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Clark, N. M., Hinde, E., Winter, C. M., Fisher, A. P., Crosti, G., Blilou, I., ... Sozzani, R. (2016). Tracking transcription factor mobility and interaction in arabidopsis roots with fluorescence correlation spectroscopy. *eLife*, *5*(JUN2016), 1–25. <http://doi.org/10.7554/eLife.14770>
- Digman, M. A., Brown, C. M., Sengupta, P., Wiseman, P. W., Horwitz, A. R., & Gratton, E. (2005). Measuring Fast Dynamics in Solutions and Cells with a Laser Scanning Microscope. *Biophysical Journal*, *89*(2), 1317–1327. <http://doi.org/10.1529/biophysj.105.062836>
- Digman, M. A., Dalal, R., Horwitz, A. F., & Gratton, E. (2008). Mapping the Number of Molecules and Brightness in the Laser Scanning Microscope. *Biophysical Journal*, *94*(6), 2320–2332. <http://doi.org/10.1529/biophysj.107.114645>
- Digman, M. A., Wiseman, P. W., Choi, C., Horwitz, A. R., & Gratton, E. (2009). Stoichiometry of molecular complexes at adhesions in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(7), 2170–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.0806036106>
- Dross, N., Spriet, C., Zwerger, M., Müller, G., Waldeck, W., & Langowski, J. (2009). Mapping eGFP oligomer mobility in living cell nuclei. *PLoS ONE*, *4*(4), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005041>
- Elowitz, M. B., Surette, M. G., Wolf, P. E., Stock, J., & Leibler, S. (1997). Photoactivation turns green fluorescent protein red. *Curr. Biol.*, *7*(10), 809–812. [http://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00342-3](http://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00342-3)
- Endres, D., & Zlotnick, A. (2002). Model-based analysis of assembly kinetics for virus capsids or other spherical polymers. *Biophysical Journal*, *83*(August), 1217–1230. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75245-4](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75245-4)
- Gallo-Ramírez, L. E., & Palomares, L. A. (2012). *Estudio de los factores que afectan la replicación y empaquetamiento de DNA en cápsides de virus adeno-asociado 2 en células de insecto*. IBt, UNAM.
- Gallo-Ramírez, L. E., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2011). Intracellular localization of adeno-associated viral proteins expressed in insect cells. *Biotechnology Progress*, *27*(2), 483–493. <http://doi.org/10.1002/btpr.565>
- Gangaraju Vamsi K. Lin Haifan. (2009). NIH Public Access. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, *10* (2)(1), 116–125. <http://doi.org/10.1038/nrm2621>
- Große, S., Penaud-Budloo, M., Herrmann, A. K., Börner, K., Fakhiri, J., Laketa, V., ... Grimm, D. (2017). Relevance of assembly-activating protein for Adeno-associated virus vector production and capsid protein stability in mammalian and insect cells. *Journal of Virology*, (August), JVI.01198-17. <http://doi.org/10.1128/JVI.01198-17>
- Harms, Z. D., Selzer, L., Zlotnick, A., & Jacobson, S. C. (2015). Monitoring Assembly of Virus Capsids with Nanofluidic Devices. *ACS Nano*,

- 9(9), 9087–9096. <http://doi.org/10.1021/acsnano.5b03231>
- Hink, M. A., Griep, R. A., Borst, J. W., Van Hoek, A., Eppink, M. H. M., Schots, A., & Visser, A. J. W. G. (2000). Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain Fv protein. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17556–17560. <http://doi.org/10.1074/jbc.M001348200>
- Hoque, M., Ishizu, K., Matsumoto, A., Han, S. I., Arisaka, F., Takayama, M., ... Handa, H. (1999). Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation. *Journal Virology*, 73(9), 7912–7915.
- Horton, N., & Lewis, M. (1992). Calculation of the free energy of association for protein complexes. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 1(1), 169–181. <http://doi.org/10.1002/pro.5560010117>
- Jane, F., R. Racaniello, V., F. Rall, G., Skalka, A. M., & W. Enquist, L. (2015). *Principles of Virology* (4th ed.). Washington, D.C.: ASM PRESS.
- Johnson, F. B., Ozer, H. L., & Hoggan, M. D. (1971). Structural proteins of adenovirus-associated virus type 3. *Journal of Virology*, 8(6), 860–63.
- Judd, J., Wei, F., Nguyen, P. Q., Tartaglia, L. J., Agbandje-McKenna, M., Silberg, J. J., & Suh, J. (2012). Random Insertion of mCherry Into VP3 Domain of Adeno-associated Virus Yields Fluorescent Capsids With no Loss of Infectivity. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 1(11), e54. <http://doi.org/10.1038/mtna.2012.46>
- Kastelein, J., Gaudet, D., & Me, J. (2012). Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency, 23(4), 310–320. <http://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283555a7e>
- Kelich, J. M., Ma, J., Dong, B., Wang, Q., Chin, M., Magura, C. M., ... Yang, W. (2015). Super-resolution imaging of nuclear import of adeno-associated virus in live cells. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development*, 2(August), 15047. <http://doi.org/10.1038/mtm.2015.47>
- Kronenberg, S., Böttcher, B., Der, C. W. Von, Bleker, S., Kleinschmidt, J. A., Bo, B., & Lieth, C. W. Von Der. (2005). A Conformational Change in the Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Leads to the Exposure of Hidden VP1 N Termini A Conformational Change in the Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Leads to the Exposure of Hidden VP1 N Termini. *Journal of Virology*, 79(9), 5296–5303. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5296>
- Kronenberg, S., Kleinschmidt, J. A., Böttcher, B., & Kronenberg J. A. Kleinschmidt, and B. Bottcher, S. (2001). Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids. *EMBO Rep*, 2(11), 997–1002. <http://doi.org/10.1093/embo-reports/kve234>
- L. Elson, E., & Magde, D. (1974). Fluorescence Correlation Spectroscopy . I . Conceptual Basis and Theory. *Biopolymers*, 13, 1–27.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy. Principles of fluorescence spectroscopy, Springer, New York, USA, 3rd edn, 2006.* <http://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Lauriel F. Earley, John M. Powers, Kei Adachi, Joshua T. Baumgart, Nancy L. Meyer, Qing Xie, Michael S. Chapman, and H. N. (2016). Adeno-Associated Virus Assembly-Activating Protein 1 Is Not an Essential Requirement for Capsid Assembly of AAV Serotypes 4, 5 and 11. *Journal of Virology*, (November). <http://doi.org/10.1128/JVI.01980-16>
- Ling, C., Wang, Y., Lu, Y., Wang, L., Jayandharan, G. R., Aslanidi, V., ... Muzyczka, N. (2015). The Adeno-Associated Virus Genome Packaging Puzzle. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 9(3). <http://doi.org/10.4172/1747-0862.1000175>
- Magde, D., & L. Elson, E. (1974). Fluorescence Correlation Spectroscopy. II. An Experimental Realization. *Biopolymers*, 13, 29–61.
- Mingozzi, F., & High, K. A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nature Reviews Genetics*, 12(5), 341–355. <http://doi.org/10.1038/nrg2988>
- Mouw, M. B., & Pintel, D. J. (2000). Adeno-associated virus RNAs appear in a temporal order and their splicing is stimulated during coinfection with adenovirus. *Journal of Virology*, 74(21), 9878–88. <http://doi.org/10.1128/JVI.74.21.9878-9888.2000>
- Mullineaux, C., Nennering, A., & Ray, N. (2006). Diffusion of green fluorescent protein in three cell environments in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3442–3448. <http://doi.org/10.1128/JB.188.10.3442>
- Naumer, M., Sonntag, F., Schmidt, K., Nieto, K., Panke, C., Davey, N. E., & Popa-wagner, R. (2012). Properties of the Adeno-Associated Virus Assembly-Activating Protein. *Journal of Virology*, 86(23), 13038–13048. <http://doi.org/10.1128/JVI.01675-12>
- Palomares, L. A., Mena, J. A., & Ramírez, O. T. (2012). Simultaneous expression of recombinant proteins in the insect cell-baculovirus system: Production of virus-like particles. *Methods*, 56(3), 389–395. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.01.004>
- Palomares, L. A., & Ramírez, O. T. (2001). El sistema células de insecto-baculovirus: Una alternativa poderosa para la producción de pseudopartículas virales y otras proteínas recombinantes. *BioTecnología*, 6.
- Pereira, D. J., McCarty, D. M., & Muzyczka, N. (1997). The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol*, 71(2), 1079–1088.
- Perlmutter, J. D., & Hagan, M. F. (2014). Mechanisms of virus assembly, (1), 217–239. <http://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040214->

- Pierson, E. E., Keifer, D. Z., Selzer, L., Lee, L. S., Contino, N. C., Wang, J. C. Y., ... Jarrold, M. F. (2014). Detection of late intermediates in virus capsid assembly by charge detection mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, *136*(9), 3536–3541. <http://doi.org/10.1021/ja411460w>
- Popa-Wagner, R., Sonntag, F., Schmidt, K., King, J., & Kleinschmidt, J. A. (2012). Nuclear translocation of adeno-associated virus type 2 capsid proteins for virion assembly. *The Journal of General Virology*, *93*(Pt 9), 1887–98. <http://doi.org/10.1099/vir.0.043232-0>
- Rayaprolu, V., Kruse, S., Kant, R., Venkatakrishnan, B., Movahed, N., Brooke, D., ... Bothner, B. (2013). Comparative Analysis of Adeno-Associated Virus Capsid Stability and Dynamics. *Journal of Virology*, *87*(24), 13150–13160. <http://doi.org/10.1128/JVI.01415-13>
- Rojas-Gómez, R., & Palomares, L. A. (2009). ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE UNIÓN Y TRANSPORTE DE CÁPSIDES DE VIRUS ADENOASOCIADO TIPO 2 EN CÉLULAS DE MAMIFERO.
- Rose, J. A., Maizel, J. V., Inman, J. K., & Shatkin, A. J. (1971). Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *Journal of Virology*, *8*(5), 766–770.
- Rossow, M. J., Sasaki, J. M., Digman, M. A., & Gratton, E. (2010). Raster image correlation spectroscopy in live cells. *Nature Protocols*, *5*(11), 1761–1774. <http://doi.org/10.1038/nprot.2010.122>
- Ruffing, M., Zentgraf, H., & Kleinschmidt, J. A. (1992). Assembly of Viruslike Particles by Recombinant Structural Proteins of Adeno-Associated Virus Type 2 in Insect Cells. *Journal of Virology*, *66*(12), 6922–6930.
- Sonntag, F., Ko, K., Schmidt, K., Weghofer, M., Raupp, C., Nieto, K., ... Kleinschmidt, J. A. (2011). The Assembly-Activating Protein Promotes Capsid Assembly of Different Adeno-Associated Virus Serotypes. *Journal of Virology*, *85*(23), 12686–12697. <http://doi.org/10.1128/JVI.05359-11>
- Sonntag, F., Schmidt, K., & Kleinschmidt, J. A. (2010). A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus, 2010. <http://doi.org/10.1073/pnas.1001673107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1001673107>
- Steinbach, S., Wistuba, A., Bock, T., Kleinschmidt, A., Krebsforschungszentrum, D., Tumorstudiologie, F. A., & Feld, I. N. (1997). Assembly of adeno-associated virus type 2 capsids in vitro. *Journal of General Virology*, *78*, 1453–1462.
- Summerford, C., Bartlett, J. S., & Samulski, R. J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nature Medicine*, *5*(1), 78–82. <http://doi.org/10.1038/4768>
- Swaminathan, R., Hoang, C. P., & Verkman, A. S. (1997). Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophysical Journal*, *72*(4), 1900–7. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78835-0](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78835-0)
- Terry, B. R., Matthews, K. E., & Haseloff, J. (1995). Molecular characterisation of recombinant green fluorescent protein by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *217*, 21–27.
- Utrecht, C., Barbu, I. M., Shoemaker, G. K., van Duijn, E., & Heck, A. J. R. (2011). Interrogating viral capsid assembly with ion mobility–mass spectrometry. *Nature Chemistry*, *3*(2), 126–132. <http://doi.org/10.1038/nchem.947>
- Vetri, V., Ossato, G., Militello, V., Digman, M. A., Leone, M., & Gratton, E. (2011). Fluctuation methods to study protein aggregation in live cells: Concanavalin a oligomers formation. *Biophysical Journal*, *100*(3), 774–783. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.11.089>
- Wang, Z., Zhu, T., Qiao, C., Zhou, L., Wang, B., Zhang, J., ... Xiao, X. (2005). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nature Biotechnology*, *23*(3), 321–328. <http://doi.org/10.1038/nbt1073>
- Warrington, K. H., Gorbatyuk, O. S., Harrison, J. K., Opie, S. R., Zolotukhin, S., & Muzyczka, N. (2004). Adeno-Associated Virus Type 2 VP2 Capsid Protein Is Nonessential and Can Tolerate Large Peptide Insertions at Its N Terminus. *Journal of Virology*, *78*(12), 6595–6609. <http://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6595>
- Wei, F., McConnell, K. I., Yu, T. K., & Suh, J. (2012). Conjugation of paclitaxel on adeno-associated virus (AAV) nanoparticles for co-delivery of genes and drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *46*(3), 167–172. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.02.022>
- Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D., Kleinschmidt, R. A., Krebsforschungszentrum, D., & Tumorstudiologie, F. A. (1997). Subcellular Compartmentalization of Adeno-Associated Virus Type 2 Assembly. *Journal of Virology*, *71*(2), 1341–1352.
- Wistuba, A., Weger, S., Kern, A., & Kleinschmidt, J. A. (1995). Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins. *Journal of Virology*, *69*(9), 5311–5319. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=189369&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A., & Chapman, M. S. (2002). The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(16), 10405–10410. <http://doi.org/10.1073/pnas.162250899>
- Zlotnick, A. (2003). Are weak protein–protein interactions the general rule in capsid assembly? *Virology*, *315*(2), 269–274.

[http://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00586-5](http://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00586-5)

- Zlotnick, A. (2005). Theoretical aspects of virus capsid assembly. *Journal of Molecular Recognition*, 18(6), 479–490. <http://doi.org/10.1002/jmr.754>
- Zlotnick, A., Johnson, J. M., Wingfield, P. W., Stahl, S. J., & Endres, D. (1999). A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly. *Biochemistry*, 38(44), 14644–14652. <http://doi.org/10.1021/bi991611a>
- Zlotnick, A., Lee, A., Bourne, C. R., Johnson, J. M., & Paul, L. (2007). In vitro screening for molecules that affect virus capsid assembly. *Nature Protocols*, 2(3), 490–498. <http://doi.org/10.1016/j.bb.2008.05.010>
- Zlotnick, A., & Stray, S. J. (2003). How does your virus grow? Understanding and interfering with virus assembly. *Trends in Biotechnology*, 21(12), 536–542. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.09.012>
- Zlotnick, A., Aldrich, R., Johnson, J. M., Ceres, P., & Young, M. J. (2000). Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus. *Virology*, 277(2), 450–456. <http://doi.org/10.1006/viro.2000.0619>