



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**GENERACIÓN DE UN BACULOVIRUS
RECOMBINANTE PARA EL DESPLIEGUE DE
PEPTIDOS EN SU SUPERFICIE**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ALDO ROMÁN CAMACHO ZARCO



MÉXICO, D.F., **EXAMENES PROFESIONALES**
FAC. DE QUÍMICA

2005

m. 345613



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFRA. AIDA NAVAS PEREZ

VOCAL: PROFRA. BERTHA RESENDIZ VAZQUEZ

SECRETARIO: PROF. LUIS ALFONSO VACA DOMINGUEZ

1ER SUPLENTE: PROF. ROGELIO RODRIGUEZ SOTRES

2DO SUPLENTE: PROF. FELIPE CRUZ GARCIA

**LA PRESENTE TESIS FUE DESARROLLADA EN EL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL INSTITUTO DE
FISIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

ASESOR: LUIS ALFONSO VACA DOMINGUEZ



SUPERVISOR TECNICO: AGUSTÍN LUZ MADRIGAL



SUSTENTANTE: ALDO ROMÁN CAMACHO ZARCO



*Para mi familia:
Lili, Sergio, Joel y Eduardo
con infinito agradecimiento*

Quiero dar gracias al Dr. Vaca por haberme permitido realizar este trabajo en su laboratorio, al QFB Agustín Luz Madrigal por su constante supervisión a lo largo de este trabajo, así mismo a mis compañeros de la facultad de química y del laboratorio 126-N por su valioso apoyo.

INDICE

I.	JUSTIFICACIÓN	1
II.	MARCO TEORICO	4
	II.A Baculoviridae	4
	II.B Estructura del baculovirus AcMNPV	5
	II.C Ciclo de infección de AcMNPV	6
	II.D Despliegue de péptidos y proteínas en la superficie de baculovirus	10
	II.E El péptido bradisinina	16
	II.F Papel fisiológico y regulación de la bradisinina	17
	II.G Sitio de unión y transducción de señales del receptor B2	20
	II.H La proteína verde fluorescente	22
III.	HIPOTESIS	24
IV.	OBJETIVOS	25
V.	MATERIALES Y METODOS	26
	V.A Líneas celulares y medios utilizados	26
	V.B Construcción de los plásmidos de transferencia pBB4GP64GFP, pBB4GP64BRAD y pBB4CMVGFP	26
	V.C Generación de los baculovirus recombinantes	29
	V.D Amplificación y aislamiento de las clonas virales positivas	30
	V.E Ensayos de microscopía confocal y electrónica	31
	V.F Concentración y purificación de partículas virales	31
	V.G Ensayos de Western Blot	31
	V.H Ensayos de medición de Ca ²⁺ intracelular	32

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
VI.A Generación de los baculovirus BacCMVGFP, BacGP64GFP y BacGP64BRAD	36
VI.B Ensayos de actividad del baculovirus BacGP64GFP	41
VI.C Ensayos de actividad del baculovirus BacGP64BRAD en células Sf9 que no expresan el receptor B2	42
VI.D Ensayos de actividad del baculovirus BacGP64BRAD en células Sf9 que expresan el receptor B2	50
VII. CONCLUSIONES	61
VIII. PERSPECTIVAS	63
IX. BIBLIOGRAFIA	65

I. Justificación

La capacidad de varios virus de poder desplegar en su superficie proteínas exógenas y péptidos ha sido muy útil en diversas áreas de la ciencia, desde el estudio de la estructura de proteínas hasta en terapia génica. Tal vez, los mejores resultados de esta tecnología se han dado en el despliegue de péptidos o proteínas en la superficie en fagos filamentosos (Benhar I., 2001).

El despliegue en fagos se basa en la clonación de fragmentos de ADN que codifican para millones de variantes de un determinado ligando. Dicha clonación se lleva a cabo usualmente en el genoma del fago M13, fusionando los fragmentos a un gen que codifica para una de las proteínas de la capsida (principalmente pIII, pero también pIV, pVI o pVIII). Una vez expresada la proteína de fusión, esta es incorporada en las nuevas partículas virales que son ensambladas en el espacio periplásmico del huésped, que es la bacteria *Escherichia coli*. Esto trae como resultado que el ligando sea presentado en la superficie del fago, mientras que su material genético se encuentra dentro de la capsida.

Debido a que con este tipo de estrategia se producen bibliotecas aleatorias de ligandos con millones de opciones, es necesario una serie de pasos para identificar cual ligando es funcional dentro del ensayo experimental deseado. Esta conexión física entre genotipo y fenotipo permite el enriquecimiento de aquellos fagos que contengan ligandos con la actividad biológica deseada, a partir de una cantidad gigantesca de fagos irrelevantes, mediante los ensayos *in vitro* de selección o "taming".

Mediante esta tecnología se pueden generar bibliotecas de fagos que permiten seleccionar básicamente cualquier ligando con las características que se deseen. Principalmente se ha usado para el aislamiento de pequeños péptidos y anticuerpos (Griffiths y Duncan, 1998), aunque también para seleccionar substratos de enzimas (Pierce HH *et al.*, 1996) y manipular otras moléculas biológicamente activas, como por ejemplo, citosinas (Gram *et al.*, 1993; Buchli *et al.*, 1997), receptores (Lowman *et al.*, 1991), enzimas (Pedersen *et al.*, 1998),

inhibidores de enzimas (Huang *et al.*, 1998), anticuerpos catalíticos (Baca *et al.*, 1997) y proteínas de unión a ADN (Isalan M *et al.*, 1997), entre muchas otras.

A pesar de que el método de despliegue de péptidos y proteínas en la superficie de fagos ha probado ser de gran importancia en varios campos de la ciencia, también es cierto que tiene limitaciones en el despliegue de proteínas eucarióticas complejas, las cuales necesitan de un determinado plegamiento o modificación post-traducciona, debido a la naturaleza procarionótica del huésped donde son expresadas. Por lo tanto, un sistema eucariótico permitiría estudiar proteínas que requirieran tales modificaciones, ya las bacterias son incapaces de procesar adecuadamente muchas de estas proteínas.

Más recientemente, virus que infectan animales como los adenovirus y virus adeno-asociados, han sido modificados en su superficie para el despliegue de péptidos exógenos, aunque en este caso se ha hecho con fines aplicados a terapia génica. En este sentido, las proteínas desplegadas tienen la característica de ser ligandos (los cuales muchas veces son preseleccionados mediante su despliegue en fagos) de gran afinidad por receptores específicos en las células a donde se desea transferir la información genética. Mediante esta interacción específica, se puede redirigir la entrada y con ello aumentar la eficiencia de transferencia de material genético en las células blanco, tal y como se ejemplifica en la figura 1 (Reynolds PN. *et al.*, 2001; Perabo L. *et al.*, 2003).

En adenovirus, se ha logrado dirigir una entrada selectiva en células endoteliales vasculares (Nicklin *et al.*, 2004), células cancerígenas (Nicklin *et al.*, 2003), células de músculo esquelético (Cirielli C *et al.*, 2004) y dendríticas mediante la tecnología de despliegue (Mercier GT *et al.* 2004). Es la proteína llamada fibra del adenovirus en su región H1, donde se han realizado la mayoría de las fusiones a ligandos, sin embargo existen otras proteínas candidatas para la inserción de péptidos, tales como las proteínas base penton, hexon y pIX del mismo virus (Meulenbroek RA *et al.*, 2004; Dmitriev IP *et al.*, 2002). Sin embargo, conviene resaltar que las modificaciones en las proteínas de superficie de

adenovirus resultan, en la mayoría de las ocasiones, en virus que no pueden infectar células.

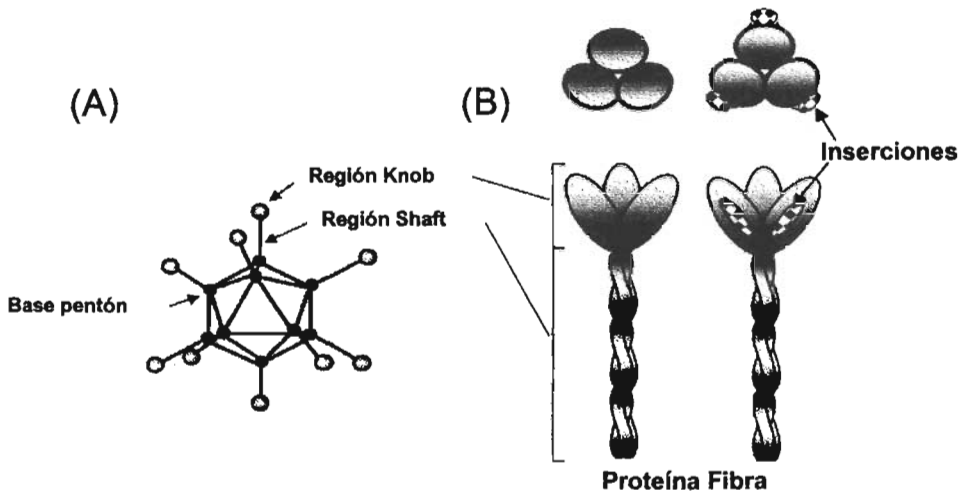


Figura 1. Diagrama mostrando el sitio principal de inserción de péptidos para redirigir la entrada de adenovirus recombinantes. (A) Partícula adenoviral del serotipo 5, mostrándose dos de las proteínas más comúnmente modificadas para dirigir la entrada selectiva de adenovirus: la proteína base penton y la proteína fibra (indicando sus regiones Knob y Shaft). En (B) se observa con más detalle la proteína fibra, mostrándose el loop H1, donde regularmente se llevan a cabo las inserciones.

Lo anterior ha dificultado enormemente el avance en el despliegue de proteínas en adenovirus y virus adeno-asociados, por lo que existen muy pocos trabajos en la literatura con este tipo de metodología.

Como se puede apreciar, el despliegue de péptidos y proteínas en superficie viral ha probado tener diversas aplicaciones. Sin embargo, debido a las limitaciones que poseen los distintos vectores virales actualmente utilizados, se continúa la búsqueda por nuevas opciones que tengan características útiles para los diferentes campos de la ciencia. En este sentido, recientemente se ha demostrado la posibilidad de desplegar péptidos en la superficie de Baculovirus recombinantes, los cuales son patógenos inherentes de insectos. Por tanto, el tema de estudio de esta tesis es analizar la posibilidad de desplegar tanto péptidos como proteínas conservando su actividad biológica en la superficie de Baculovirus recombinantes.

II. Marco Teórico

II.A Baculoviridae

Los Baculovirus son una gran familia de virus (*Baculoviridae*) de ADN circular de doble cadena, cuyos genomas tienen un tamaño que va de las 80 a las 180 kilobases (kb). Estos virus son principalmente patógenos para los artrópodos, predominantemente aquellos del orden *Lepidoptera* (como las mariposas) sin embargo; también han sido encontrados en crustáceos como es el caso del camarón. Hasta ahora, los baculovirus han sido identificados en más de 800 especies distintas de insecto, encontrándose en ríos, bosques, campos y zonas urbanas; sin embargo, la mayoría de los baculovirus tienen una muy limitada gama de hospederos y de hecho su infección puede llegar a estar restringida a una única especie de insecto (Federici, 1997; McClintock, 1991).

En un principio, los baculovirus llamaron la atención por su potencial para ser usados en el control de plagas, sobre todo en el caso de las larvas de mariposas, ya que estas causan gran daño en la producción de semillas importantes en la agricultura, plantas de ornato y bosques. Desafortunadamente, la infección de los baculovirus en estas larvas no es lo suficientemente rápida a pesar de que se han hecho distintas manipulaciones genéticas en el baculovirus para acelerar la muerte del insecto. Aunque se siguen realizando investigaciones (Moscardi 1999).

Además de su aplicación como agentes para el control de plagas, los baculovirus son ampliamente usados como vectores de expresión para producir grandes cantidades de proteínas recombinantes en células de insecto. La ventaja de este sistema baculovirus-célula de insecto es que se pueden producir proteínas de origen eucariótico (ya sea vertebrado o invertebrado) en una célula eucariótica. Debido a esto, la mayoría de las modificaciones post-traduccionales (por ejemplo fosforilación, acetilación, amidación, etc.) ocurren de la misma forma a como se da en sistemas de expresión en células de mamífero. Únicamente la glicosilación de las proteínas no es necesariamente igual a como se realiza en células de vertebrados, pero esto ya ha sido solucionado generando células

transgénicas que expresen los genes de las enzimas características de la vía de glicosilación en células de mamífero (Jarvis DL, 2003).

II.B Estructura del baculovirus AcMNPV

La mayor parte de lo que se conoce en la actualidad acerca de los baculovirus ha sido estudiando el baculovirus "*Autographa californica* múltiple nucleopolihedrovirus" (AcMNPV), el cual tiene un genoma de 134 kb (ya secuenciado por Ayres *et al.*, 1994) contenido en una nucleocapside en forma de bastón (de ahí el nombre de baculo-virus) de unos 25 nm x 260 nm.

La infección de los baculovirus se caracteriza por la producción de dos tipos de progenie tanto estructural como funcionalmente distintos (figura 2). La primera es llamada "cuerpos de oclusión" o polihedra, y consiste de una estructura de naturaleza proteica con forma poliédrica (compuesta predominantemente por una proteína llamada polihedrína de 29 kilodaltones), la cual contiene encapsulados a una o más partículas virales las cuales se denominan "viriones derivados de los cuerpos de oclusión" (VDO). Esta forma viral se encuentra naturalmente en el medio ambiente, y debido a la cubierta proteica se pueden mantener las partículas virales infectivas por grandes lapsos de tiempo gracias a su gran estabilidad. Esta forma viral es la responsable de la infección de insecto a insecto (infección primaria) como es representado en la figura 3.

La segunda forma viral no se encuentra ocluida, y es por eso que son llamados viriones libres (VL) o "gemados". Esta forma viral es la responsable de la infección de célula a célula dentro del insecto (infección secundaria) como se puede ver en la figura 3. Las partículas virales en ambos casos (tanto los VDO como los VL) están compuestas de una nucleocapside envuelta en una capa de naturaleza lipídica. Mientras que la composición de la nucleocapside aparentemente no varía, la composición de la envoltura lipídica sí es distinta entre estos dos fenotipos virales.

Fenotipos Virales

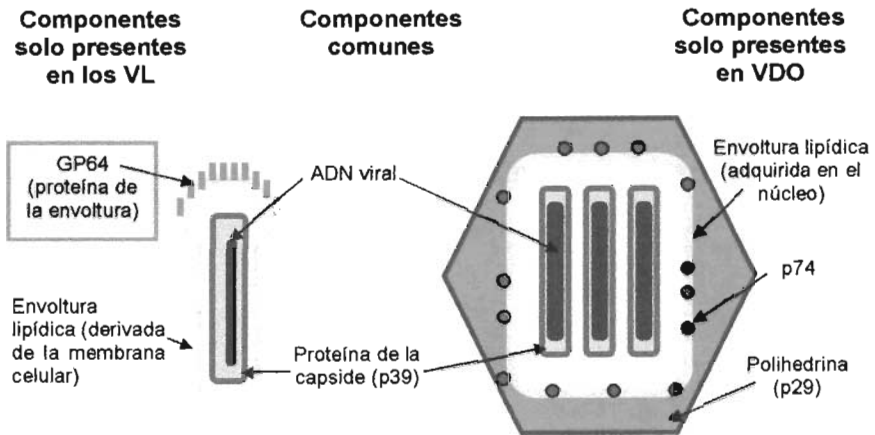


Figura 2. Componentes principales de la estructura de baculovirus. Los dos fenotipos virales son representados esquemáticamente, mostrándose tanto los componentes comunes, como los específicos de cada fenotipo viral. Este diagrama está basado en el baculovirus AcMNPV.

II.C Ciclo de infección de baculovirus AcMNPV

El ciclo de infección de los baculovirus inicia cuando el alimento del insecto está contaminado con virus ocluidos en la polihedra, y esta llega hasta el intestino del insecto, donde se disuelve la cubierta proteica de polihedrina debido al elevado pH (mayor a 10) liberándose de esta forma los VDO. Una vez liberados, los VDO se unen para posteriormente entrar a las células columnares epiteliales de la pared del intestino del insecto mediante fusión directa con su membrana. Esta unión de los VDO con las células epiteliales se lleva a cabo de una manera saturable y competitiva, indicando que algún receptor celular está involucrado. Se cree que la proteína p74 de la envoltura lipídica de los VDO es la responsable de esta unión, pues cuando se borra este gen, las partículas de polihedra ya no son infectivas al ser ingeridas por los insectos (Horton y Burand, 1993; Kuzio, J. *et al* 1989).

Una vez dentro, las nucleocapsides migran hacia el núcleo por un mecanismo dependiente de la formación de microfilamentos inducido por la proteína de la nucleocapside p39 (Charlton y Volkman, 1993; Lanier y Volkman, 1998) para después llegar hasta el núcleo a través de los poros nucleares (Nishimura *et al.*, 1994). Es en el núcleo donde las capsides son desensambladas y el ADN viral es liberado para poder iniciarse la transcripción de los genes virales, la replicación del genoma viral y el ensamblaje de las nuevas nucleocapsides.

La expresión génica de los baculovirus es regulada en forma de cascada, es decir, la activación de cada clase de genes depende de la síntesis de proteínas de la clase temporal previa de genes, pues estos se encargan de transactivarlos (ya sea directa o indirectamente).

Debido a esta regulación temporal, los genes se han clasificado en tres grupos: tempranos, tardíos y muy tardíos. En la fase temprana de infección, los genes virales son transcritos por la ARN polimerasa II del huésped, ya que sus promotores contienen elementos conservados que son reconocidos por factores de transcripción del huésped, como lo es la caja TATA (Rodems SM *et al.*, 1997). Los genes tardíos y muy tardíos son aquellos que empiezan a transcribirse una vez que se inicia la replicación del genoma viral, y su transcripción depende de una polimerasa que es codificada por el propio virus, la cual reconoce la secuencia consenso ATAAG que al parecer funciona como promotor y sitio de inicio de la transcripción (Guarino *et al.*, 1998).

La diferencia entre los genes tardíos y los muy tardíos, es que la expresión de los genes tardíos disminuye después de unas 36 hrs. de iniciado el ciclo de infección, mientras que los genes muy tardíos son hiper-expresados durante todo el tiempo restante del ciclo de infección, lo cual se cree que se debe a una secuencia consenso de 12 nucleótidos (AATAAGTATTTT) que es encontrada cerca del sitio de inicio de la transcripción. Un ejemplo de estos genes muy tardíos hiper-expresados es la polihedrina (p29), que en insectos infectados puede llegar a componer hasta el 18% del total de proteína soluble en solución alcalina.

Cuando se han producido suficientes proteínas estructurales, y el ADN viral ya se ha replicado, las nuevas nucleocapsides son ensambladas y pueden seguir uno de dos caminos distintos. La primera opción es que sean transportadas a través del poro nuclear y a lo largo del citoesqueleto hacia la membrana plasmática, para después brotar en sitios de la membrana donde la proteína GP64, la proteína mayor de la envoltura de los viriones libres, se ha acumulado (Blissard y Rohrmann, 1989; Keddie BA *et al*, 1986).

La segunda opción es que las nucleocapsides permanezcan en el núcleo, y ahí adquieran de novo su envoltura lipídica para después ser ocluidas dentro de la polihedra. Mientras que los viriones libres empiezan a brotar desde las 12 hrs. post-infección, los cuerpos de oclusión se empiezan a formar alrededor de las 36 post-infección, que es cuando se empieza a expresar la polihedrina. Es así como se forman los dos fenotipos virales.

El fenotipo libre es el responsable de la infección viral más allá del epitelio intestinal del insecto, lo cual como ya se mencionó, constituye la infección secundaria. Los viriones libres se unen a las células mediante la proteína GP64 utilizando un receptor aun no identificado. Se sabe que es mediante un receptor por que se ha podido demostrar competencia entre los viriones libres y una forma soluble de la GP64 por sitios de unión en las células de insecto (Hefferon *et al.*, 1999), y de hecho mediante tratamiento enzimático se ha llegado a postular que es de naturaleza proteica este receptor. La proteína GP64 se encuentra concentrada en uno de los extremos del virion (debido a la forma en la que "brotan" los virus) en forma de homotrímeros, donde los monómeros están unidos entre sí por puentes disulfuro, además de estar fosforilados, acetilados y glicosilados (Oomens *et al.*, 1995).

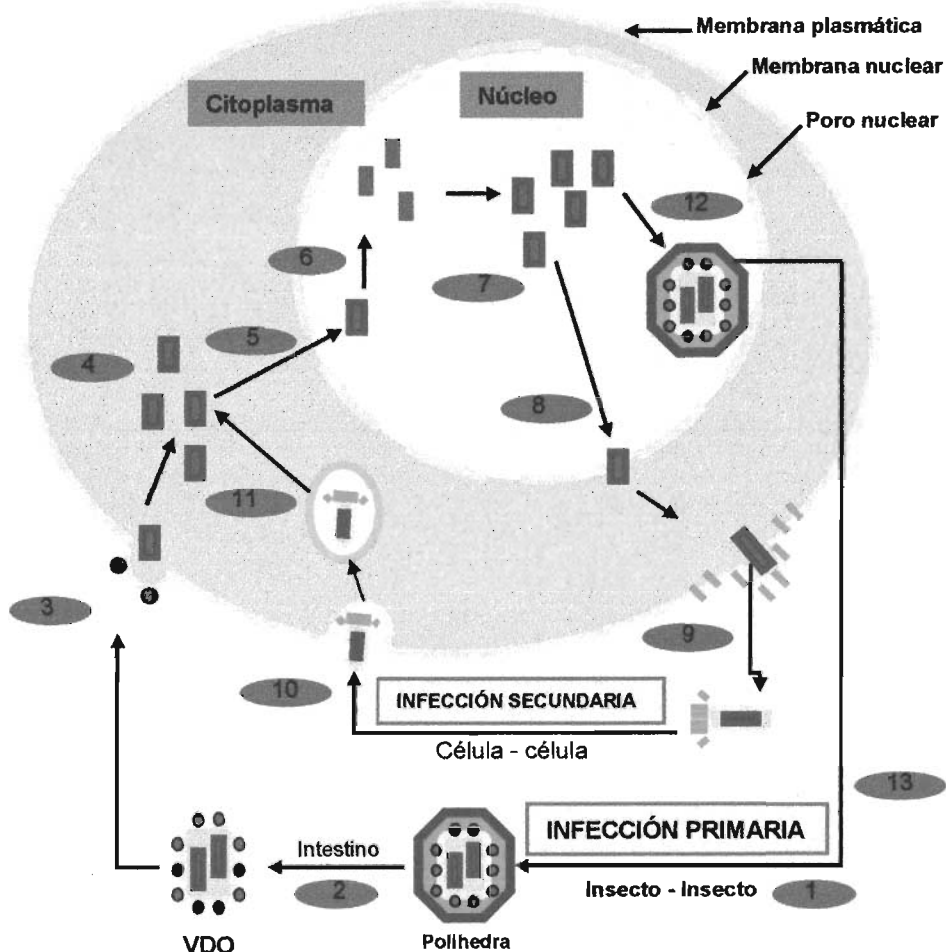


Figura 2. Ciclo de infección de baculovirus AcMNPV. La infección primaria inicia cuando las partículas de polihedra son ingeridas por el insecto (1) y al llegar al intestino se disuelven debido al ambiente alcalino, liberándose (2) los viriones derivados de los cuerpos de oclusión (VDO). La envoltura lipídica de los VDO se une mediante la proteína p74 para posteriormente fusionarse (3) a la membrana de las células epiteliales intestinales, liberando las nucleocápsides al citosol. Una vez dentro, son transportadas a través del citoplasma (4) y entran al núcleo por poros nucleares (5); ahí se dismantelan y liberan el ADN viral para comenzar la transcripción y replicación del genoma viral (6). En el núcleo también se ensamblan las nuevas nucleocápsides (7); algunas salen (8) y brotan de la célula en lugares donde la proteína GP64 se ha acumulado (9), adquiriendo de esta forma su envoltura lipídica formándose así los viriones libres (VL). Los VL infectan células vecinas (infección secundaria) entrando por endocitosis (10). Al acidificarse el endosoma, la proteína GP64 induce la fusión de la membrana del endosoma y la viral, liberándose las cápsides en el citoplasma (11). Los siguientes eventos son similares a los de los VDO (4-7). A tiempos tardíos de infección, algunas nucleocápsides adquieren de novo su envoltura lipídica en el núcleo, para después ser ocluidas por la polihedrina (12). Cuando se lisa la célula y el insecto muere, las partículas de polihedra son liberadas al medio ambiente a la espera de ser ingeridas y comenzar un nuevo ciclo de infección (13).

En contraste con los VDO, los viriones libres entran a las células por endocitosis una vez que se han unido a la membrana. Cuando el endosoma se acidifica, se dispara la fusión entre la envoltura viral y la membrana del endosoma; este proceso de fusión está mediado por GP64, liberándose de esta forma las nucleocapsides al citoplasma (Kingsley *et al.*, 1999; Plonsky *et al.*, 1999). De hecho, una propiedad interesante de la proteína GP64 es que cuando se expresa en células no infectadas, esta es suficiente para inducir fusión de membranas plasmáticas de células vecinas, de una manera pH dependiente (fenómeno llamado formación de sincicios), lo cual es consistente con el papel que ejerce la GP64 en el escape del baculovirus del endosoma (Blissard y Wenz, 1992).

Aunque la forma de entrada a las células de los viriones libres y de los VDO es distinta, una vez que las nucleocapsides están ya libres en el citoplasma los pasos finales de la infección al parecer son iguales, formándose partículas de ambos fenotipos virales en cada célula que infectan. Mientras que los viriones libres siguen infectando otras células del insecto, las partículas de polihedra se mantendrán en las células hasta que estas se rompan y el insecto muera, para ser liberadas de esta manera en el medio ambiente esperando a ser ingeridas por otro insecto para dar inicio a otro ciclo de infección (Blissard GW y Rohrmann GF, 1990; Vialard JE, Arif BM y Richardson CD, 1995).

II.D Despliegue de péptidos y proteínas en la superficie de baculovirus.

A mediados de los 90's, dos grupos reportaron que baculovirus recombinantes conteniendo genes reporteros como luciferasa o β -galactosidasa, bajo el control de promotores reconocidos en células de mamífero tales como el promotor de CMV, eran capaces de transferir ADN para su expresión (fenómeno conocido como transducción) en hepatocitos primarios y una variedad de líneas celulares no hepáticas. Se observó que se podían obtener altos niveles de expresión de los genes reporteros en hepatocitos primarios y en líneas celulares derivadas de hepatomas como la línea HepG2 (Hofmann C. *et al.* 1995; Boyce FM y Bucher N.,

1996). En suma, estos dos artículos mostraron que los baculovirus no solo podrían ser ocupados como bio-insecticidas, o como un sistema de producción de proteínas eucarióticas como tradicionalmente se usaban; sino que también podrían ser utilizados para manipular genéticamente hepatocitos, y quizá otros tipos celulares de mamíferos. A partir de esos reportes, los tipos de células que se sabe que pueden ser transducidos por baculovirus han ido en aumento. Una compilación de los tipos celulares susceptibles se muestra en la tabla 1. Se sabe que la entrada de los baculovirus se da mediante una interacción no específica, y de hecho se ha demostrado que interacciones electrostáticas con moléculas como heparan sulfato y ciertos fosfolípidos son importantes para la entrada de los baculovirus en células de mamífero (Duisit G. *et al.* 1999; Tani H. *et al.* 2001). Además, los baculovirus tienen otras propiedades muy deseables como vector de transferencia de genes como: 1) es incapaz de replicarse en células de mamífero, 2) pueden insertarse grandes cantidades de ADN en su genoma (hasta 38 kb), 3) la expresión de los genes puede darse de una manera tanto estable como transitoria, 4) pueden transducir células que no se estén dividiendo y 5) son fáciles de producir y se obtienen grandes títulos al ser replicados en células de insecto.

Otra propiedad muy interesante que se ha demostrado recientemente en el baculovirus AcMNPV, es el hecho de que se pueden desplegar péptidos o proteínas en su superficie viral. Este despliegue se ha realizado principalmente mediante fusiones de dichos péptidos o proteínas a una segunda copia de la proteína GP64 de la envoltura viral, aprovechando que esta proteína se encuentra abundantemente en esta estructura (Oker-Blom C., *et al.* 2003; Grabherr R. *et al.* 2001).

Tipo celular	Tipo celular
Células humanas	Células de conejo
HeLa	Hepatocitos primarios
Huh7	Células de primate no humanas
HEK 293	COS-7
HepG2	CV-1
KATO-III	Vero
IMR32	Células porcinas
MT-2	CPK
Células β pancreáticas	FS-L3
Queratinocitos	PK-15
Fibroblastos de medula ósea	Células de roedor
CHP212	CHO
Células neuronales primarias	BHK
W12	RGM1
SK-N-MC	PC12
Saos-2	Células β pancreáticas de ratón
WI38	N2a
Hepatocitos primarios	Hepatocitos primarios de rata
FLC4	L929
143TK-	Células de bovino
DLD-1	MDB
Fibroblastos pulmonares embrionicos	BT
MRC5	Células de ovino
MG63	FLL-YFT

Tabla 1. En esta tabla no aparecen todos los tipos celulares que se sabe que pueden ser transducidos por baculovirus. Lo que se pretende en cambio, es reflejar la gran variedad de tipos celulares que han sido transducidos exitosamente. Modificado de Kost T.A. *et al.* 2002.

Como ya se mencionó, la proteína GP64 se incorpora a los viriones libres cuando estos brotan de la célula. La proteína GP64 es una proteína integral de membrana tipo 1, en cuyo amino terminal se encuentra el péptido señal y próximo al carboxilo terminal se encuentra el dominio transmembranal. Además se han hecho estudios estructurales de la proteína gp64 que han identificado dominios separados de oligomerización y de fusión.

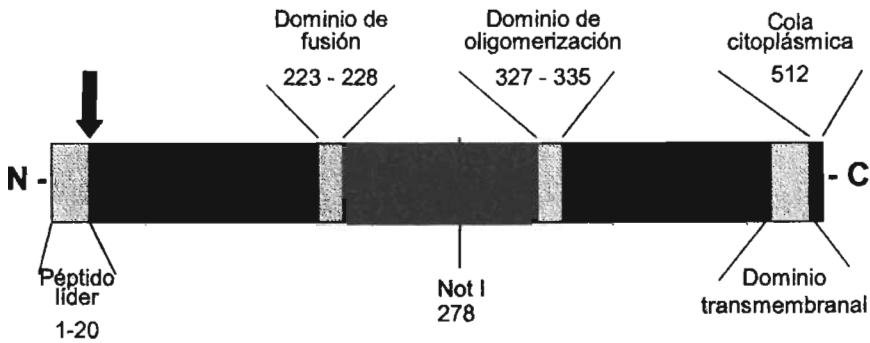


Figura 4. Mapa esquemático de la proteína GP64. La proteína GP64 de AcMNPV consiste de 512 aminoácidos. Con una flecha negra se indica el sitio de corte del péptido líder, que es donde son clonadas más comúnmente la proteínas que se pretenda desplegar en la superficie viral. El extremo carboxilo terminal contiene una región transmembranal y una cola citoplásmica. Además, dos regiones más se han caracterizado: un dominio que es responsable de la fusión entre la membrana viral y de la membrana del endosoma, y un dominio de oligomerización que es necesario para el transporte y trimerización de la proteína GP64.

En el primer reporte de despliegue de proteínas en la superficie de baculovirus, los genes exógenos fueron clonados justamente después del sitio de corte del péptido líder, el cual es mostrado con una flecha en la figura 4. En este reporte se demostró que las proteínas de fusión fusiones glutation S transferasa-GP64 y GP120-GP64 estaban efectivamente presentes en la superficie de las partículas virales. Lo que llamo la atención en este artículo, fue que la GP120 retenía aun sus propiedades biológicas, pues podía unirse a su ligando que es el CD4. Esto demostró que proteínas grandes y complejas podían ser desplegadas en la superficie de los baculovirus de una manera funcional (Boublik Y. *et al.*, 1995). Otras proteínas que ha sido desplegadas son la proteína verde fluorescente y las glicoproteínas del virus Rubella E1 y E2 (Mottershead D. *et al.*, 1997).

Debido al interés en los baculovirus como vector de transferencia de información genética en células de mamífero, se ha desplegado la fracción variable de anticuerpos en la superficie de baculovirus para poder dirigir su entrada específica a ciertos tipos celulares utilizando sus receptores endógenos específicos. Es así como se ha logrado mejorar la eficiencia de transducción en

células de adenocarcinoma (PC-3) y células de riñón de hámster (Ojala K. *et al.* 2001).

Otra de las aplicaciones que se ha demostrado del despliegue en la superficie de baculovirus es la producción de anticuerpos. Tradicionalmente la generación de anticuerpos depende de la disponibilidad de la proteína o péptido purificado que es utilizado como inmunógeno, debido al tiempo necesario para producirlo y purificarlo, además de que muchas veces no se puede obtener en su configuración original. Sin embargo, al utilizar baculovirus que desplieguen la proteína o péptido deseado como inmunógeno, se elimina la necesidad de purificar las proteínas, pues la inmunización de los animales puede realizarse directamente con las partículas virales completas. Es así como se han podido producir anticuerpos contra los receptores humanos nucleares LXR β y FXR (Lindley KM. *et al.* 2000). En este sentido, también han sido utilizados como vacunas al desplegar la glicoproteína de fusión F del virus *Peste des petitis ruminants*, la proteína H del virus peste Rider, y la proteína CSP del *Plasmodium berghei* (Rahman R. *et al.* 2003; Yoshida S. *et al.* 2003).

Además de hacer fusiones a una segunda copia de la proteína GP64 como en los ejemplos anteriores, se ha demostrado la fusión de péptidos en la copia original de la GP64. Este método tiene la ventaja de que todas las copias presentes de la GP64 en la superficie viral se encuentran modificadas. Sin embargo, tiene la desventaja de que no existe GP64 sin modificar (WT), y por lo tanto no se puede garantizar que las partículas virales resultantes sean aun infectivas. Debido a esto, su amplificación en cultivos celulares puede verse afectada. Hasta el momento solo se han podido insertar péptidos de hasta 23 aminoácidos, siendo uno de ellos el péptido ELDKWA de la proteína GP41 del virus del VIH (Spenger A. *et al.* 2002; Ernst WJ. *et al.* 2000). En estos reportes se demostró que la posiciones 274 y 283 de la GP64 se encuentran en la superficie viral, y además que cuando proteínas enteras como la proteína verde fluorescente (GFP) son insertadas, la formación de las partículas virales decrece drásticamente, obteniéndose títulos virales similares a aquellos de mutantes que

no contienen ninguna copia del gen de la GP64 (Oker-Blom C. *et al.* 2003, Oomens, AG *et al.* 1999).

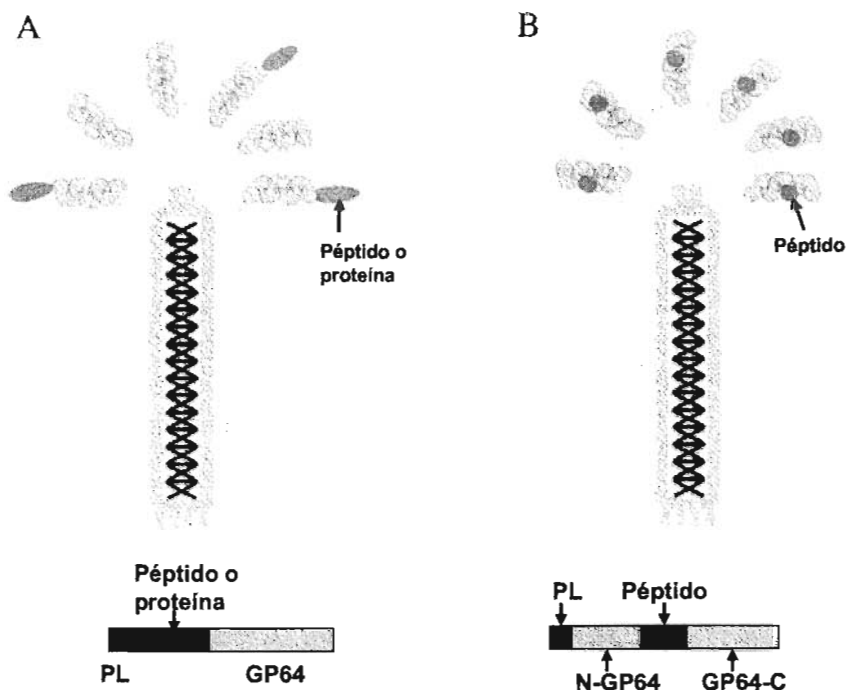


Figura 5. Representación esquemática de las diferentes estrategias de despliegue en baculovirus. (A) Fusión a una segunda copia de la proteína GP64. La proteína de interés es fusionada al extremo amino terminal de la proteína madura, es decir, entre el péptido líder de la GP64 y el resto de la proteína. En estos casos, la proteína de fusión es expresada bajo el control de un promotor viral fuerte como lo es el de la polihedrina (P_{PH}). (B) Inserciones en la copia original de la GP64. Los péptidos son clonados dentro de la secuencia madura de la GP64 bajo el promotor original de la GP64, de tal manera que todas las proteínas presentes son proteínas de fusión a GP64 en las partículas virales.

Recientemente también se ha podido generar una biblioteca de baculovirus para la identificación de antígenos para las células T reactivas al MHC clase I D^d (Wang Y. *et al.* 2005). Esto es bastante relevante, ya que la identificación de antígenos en enfermedades autoinmunes o cáncer es bastante

complicada, debido a que pueden ser derivados de cualquier proteína de las células del tejido afectado. Sin embargo, para poder identificar uno de estos antígenos, se necesita que estén unidos a la molécula apropiada de MHC. Es por eso que se necesitaba de un sistema eucariótico de despliegue en superficie: para poder presentar una proteína compleja como lo es el MHC-I D^d asociado a una biblioteca de posibles antígenos, y encontrar de esta manera cual es el antígeno que puede unirse y reaccionar con las células T reactivas al MHC I D^d.

Todos estos reportes han hecho ver a los baculovirus como una opción real en el despliegue de proteínas en superficie, y por lo tanto un sistema versátil en la biología molecular en general. Teniendo en mente estas características del despliegue de proteínas en superficie de baculovirus, es como en esta tesis se estudio la posibilidad de desplegar en la proteína GP64 un péptido con importantes funciones fisiológicas como lo es el péptido bradiginina, y una proteína con propiedades bio-luminiscentes como lo es la proteína GFP, sin que pierdan su actividad biológica.

II.E El péptido bradiginina

El nonapéptido bradiginina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) es producido en nuestro organismo en respuesta a distintas clases de daño tisular e insultos inflamatorios, y de hecho, es el inductor de dolor más potente que se conoce. La bradiginina (Bk) y sus homólogos forman un importante grupo de hormonas peptídicas pro-inflamatorias llamadas cininas (figura 6).

Estas hormonas ejercen su efecto a través de receptores acoplados a proteínas G conocidos comúnmente como receptores para bradiginina, los cuales se han clasificado tradicionalmente en dos grupos llamados B1 y B2 de acuerdo a su afinidad por distintos agonistas (Regoli *et al* 1980; Farmer *et al* 1992). La afinidad por estos agonistas en el caso de los receptores B1 tiene el siguiente orden de potencia: [desArg¹-Bk > Tyr[Me⁶]Bk > Bk, mientras que en los B2 tienen un orden Tyr(Me⁶)Bk > Bk > des-Arg⁹-Bk (Hall, 1997).

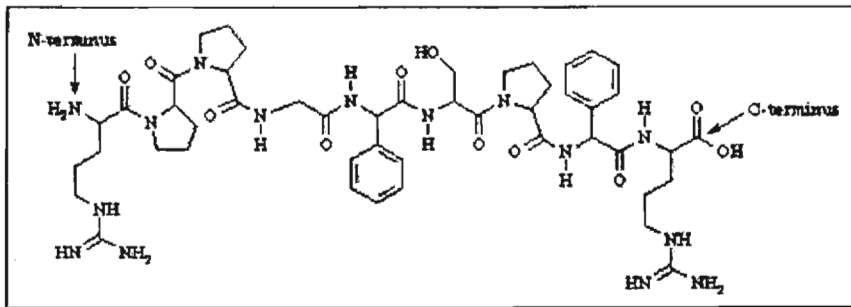


Figura 6. La Bradicinin es un nonapéptido que tiene en ambos extremos residuos de arginina y forma parte de un grupo de hormonas peptídicas llamadas cininas.

Los receptores B1 y B2 comparten una homología del 36% en su secuencia de aminoácidos (Menke *et al*, 1994). Los receptores B1 tienen una expresión muy limitada, pero el gen del receptor es prendido cuando existe inflamación crónica. Los receptores B2 (B2R) se expresan de manera constitutiva en numerosas preparaciones *in vitro* de tejidos de tracto intestinal, genitourinario, respiratorio, aparato cardiovascular y en tejidos oculares así como neuronales; es decir, el receptor B2 se puede decir que se expresa en numerosos tejidos de nuestro organismo (Hall, 1997). Mediante electroforesis desnaturizante se obtiene una banda ancha de 60 a 80 kDa como resultado de la glicosilación compleja que sufre post-traduccionalmente este receptor, mientras que al desglicosilarse enzimáticamente se obtiene una banda fina de 40 kDa (Blaukat *et al*, 1996). El receptor B2 típicamente se encuentra expresado en cultivos primarios en el rango de 10 a 400 fmol de receptor por miligramo de proteína.

II.F Papel fisiológico y regulación de la bradicinin

La activación de los receptores B1 ocasiona respuestas rápidas y agudas, tales como la contracción o relajación del músculo liso; así como efectos retardados como lo es la síntesis de colágena (figura 7). Los receptores B2 son los responsables de la mayoría de los efectos biológicos, pues se expresan de manera constitutiva en una gran variedad de tejidos, además de ser mucho más afines que los B1 por la bradicinin. Entre los tejidos que expresan B2 se incluyen relajación de músculo liso en el intestino, útero, y tractos urogenital y respiratorio;

efectos en el transporte de iones en el epitelio, la circulación y presión sanguínea, y se cree que puedan tener un efecto transmisor en el sistema nervioso central y un papel modulador en el control de la mitogénesis (Regoli y Barabé, 1980; Hall, 1992).

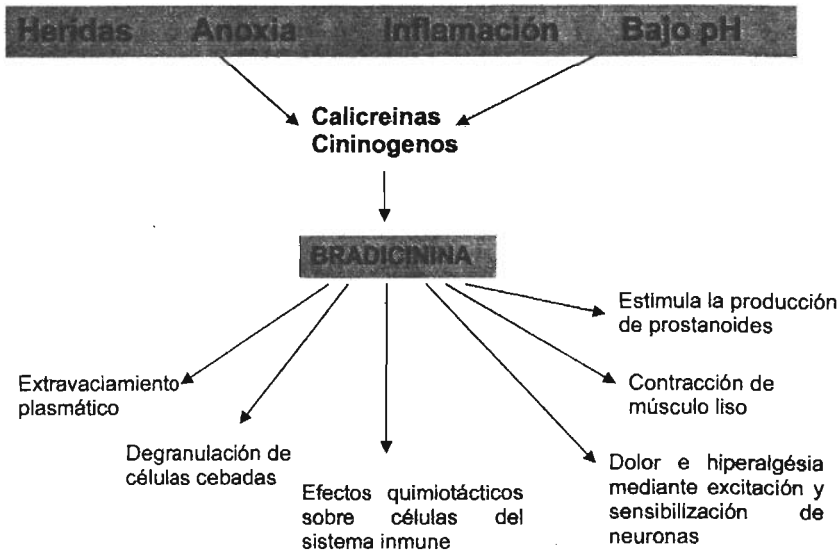


Figura 7. Principales actividades biológicas de la Bradicinina. Modificado de Dray y Perkins, 1993.

Por mucho, la acción más extensamente caracterizada de las cininas son aquellas que tienen que ver con sus efectos pro-inflamatorios. Las cininas son potentes agentes vasoactivos en la microvasculatura, donde tienen acción sobre el músculo liso y las células endoteliales promoviendo vasodilatación arteriolar y extravaciamiento plasmático como resultado de un insulto inflamatorio o daño tisular (Hall, 1992). Además, mediante estimulación directa de las terminales nerviosas sensoriales, la bradicinina activa vías que inducen dolor y promueven inflamación neurogénica mediante la liberación periférica de taquicinas pro-inflamatorias como la sustancia P y neurocinina A (Dray y Perkins, 1993; Hall, 1997; Couture R *et al*, 2001).

En la actualidad existe gran cantidad de evidencia que demuestra un papel de las cininas en la patofisiología de diversas enfermedades inflamatorias, incluyendo pancreatitis, artritis, enfermedades cardiovasculares, desordenes del tracto urinario, desordenes de vías respiratorias tanto altas como bajas incluyendo rinitis y asma, así como el dolor y la hiperalgésia que acompañan a los insultos inflamatorios (Steranka LR *et al* 1991).

Dados los importantes efectos fisiológicos de la bradicinina, es obvio que la acción de estas hormonas debe de estar altamente regulada, y de hecho lo esta a múltiples niveles. En primer lugar, la bradicinina solo es localmente generada y tiene una vida media muy corta pues varias enzimas la destruyen activamente. Tal vez la más importante es la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA), la cual se localiza principalmente en la vasculatura pulmonar, siendo ahí donde se destruye más del 99% de la bradicinina circulante. La bradicinina que llegara a escapar de la ECA es hidrolizada en la circulación por la carboxipeptidasa N (CPN), la cual remueve la arginina del extremo carboxilo terminal de la bradicinina (Bhoola *et al*, 1992) formándose [des-Arg⁹]-Bk, la cual es inactiva en los receptores B2, pero no en los B1.

Sin embargo, al parecer la forma más importante de regulación es mediante la desensibilización del receptor; esto es, cuando los agonistas lo estimulan de manera continúa o repetitiva, la respuesta celular es disminuida o completamente apagada. Esto se debe a que la unión de los agonistas con el receptor induce su fosforilación en una región conservada rica en serinas y treoninas (SMGTLRTSIS) que se encuentra en el extremo carboxilo terminal, lo cual ha podido observarse tanto en receptores endógenos como recombinantes (Blaukat, 1996, Kalatskaya *et al*. 2004,).

Además, utilizando mutagénesis dirigida se ha podido demostrar que la fosforilación del receptor a bradicinina B2 induce su internalización en vesículas de caveolina, dejando inaccesible al receptor para cualquier posterior unión con su agonista (Pizard, 1999). Es en estas vesículas donde el complejo receptor-ligando se disocia, y la bradicinina es hidrolizada rápidamente (Muñoz CM y

Leeb-Lundberg L.M.F., 1992). Los receptores secuestrados ($t_{1/2} = 15$ min.) regresan a la membrana una vez que se ha liberado la bradicinina sugiriendo que solo son secuestrados superficialmente en la célula (Muñoz C.M., Cotecchia S., 1992; de Weerd WF y Leeb-Lundberg L.M.F., 1997).

II.G Sitio de unión y transducción de señales del receptor B2.

Varios estudios utilizando ensayos farmacológicos clásicos, entrecruzamiento químico y mutagénesis dirigida han proporcionado un modelo de interacción receptor-ligando. Se ha sugerido que la bradicinina cuando esta unida al receptor B2 coloca su extremo amino terminal adyacente a las Cys²⁰ y Cys²⁷⁷ que se encuentran en los dominios 1 y 4 extracelular del receptor (Herzig MC y Leeb-Lundberg 1995; Herzig MC *et al* 1996) así como a las asparaginas 266 y 284 que se localizan en el extremo de los segmentos transmembranales 6 y 7, desplegándose la molécula a lo largo de la cara interior de los segmentos transmembranales 3, 4, 5 y 6 (Nardone y Hogan , 1994; Leeb T *et al.*, 1997), y localizando su extremo carboxilo terminal adyacente a la Ser¹¹¹ que se encuentra en la tercera región transmembranal (Fathy et al., 1998). Por lo tanto, se puede decir que el sitio de unión para la bradicinina en el receptor B2 esta aparentemente formado tanto por regiones extracelulares como transmembranales. Esto indica que los agonistas o antagonistas competitivos parecen sumergirse en el corazón hidrofóbico del receptor B2, y es ahí donde se disparan los cambios conformacionales necesarios para modular las proteínas G heterotrimericas a las cuales se encuentra acoplado el receptor.

Gracias a los estudios hechos en relación del sitio de unión del receptor B2, es que se ha logrado la síntesis de tres generaciones de antagonistas competitivos: des-Arg⁹[Hyp³, Dphe^{5,8}, Leu⁷]-Bk, WIN 64438 y HOE 140 (Stewart J.M., 2004). De los tres, el antagonista más ampliamente usado es el HOE 140 debido a que es el más potente ($pA_2 = 8.5 \pm 0.1$).

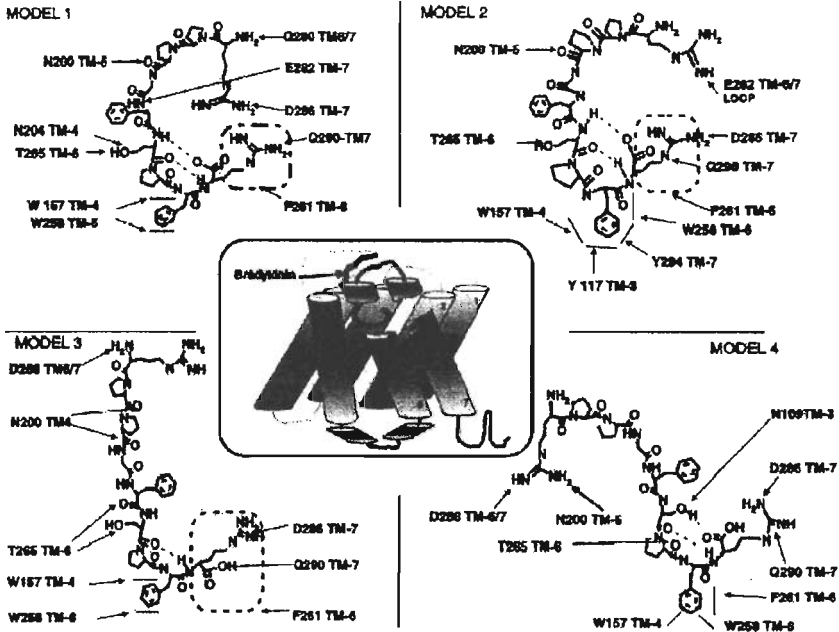


Figura 8. Representaciones en dos dimensiones de cuatro modelos de la unión de la bradicinina a su receptor (B2R). En los modelos 1 y 2 los extremos amino y carboxilo están muy cerca uno de otro, mientras que en los modelos 3 y 4 los extremos se encuentran alejados. Cada modelo tiene una vuelta β entre los residuos 6 y 9 (líneas punteadas). Otros puentes de hidrógeno intramoleculares también son representados con líneas punteadas. Los contactos propuestos entre el receptor y la Bradicinin también son marcados con flechas (dipolo-dipolo e interacciones iónicas). Tomado de Jarnagin K. et al., 1996.

En la mayoría de las células analizadas hasta ahora, los receptores a bradicinina están acoplados a proteínas $G\alpha_{q/11}$, provocando una activación de la fosfolipasa C- β (PLC β) con la subsecuente generación de los segundos mensajeros inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). A su vez, el IP3 activa a su receptor, el cual se localiza en retículo endoplásmico provocando una liberación de Ca^{2+} , resultando en un aumento de la concentración del calcio intracelular. El aumento en el Ca^{2+} puede activar la vía $NO_2/GMPc$, la cual es la principal responsable de la fuerte actividad hipotensiva de la bradicinina en la vasculatura. Además, el DAG y el Ca^{2+} , juntos o por separado, activan distintas isoformas de la proteína cinasa C (PKC), la cual participa en varias vías de

señalización, incluyendo aquellas que controlan la proliferación celular (Nishizuka, 1992; Blaukat y Dikic, 2001).

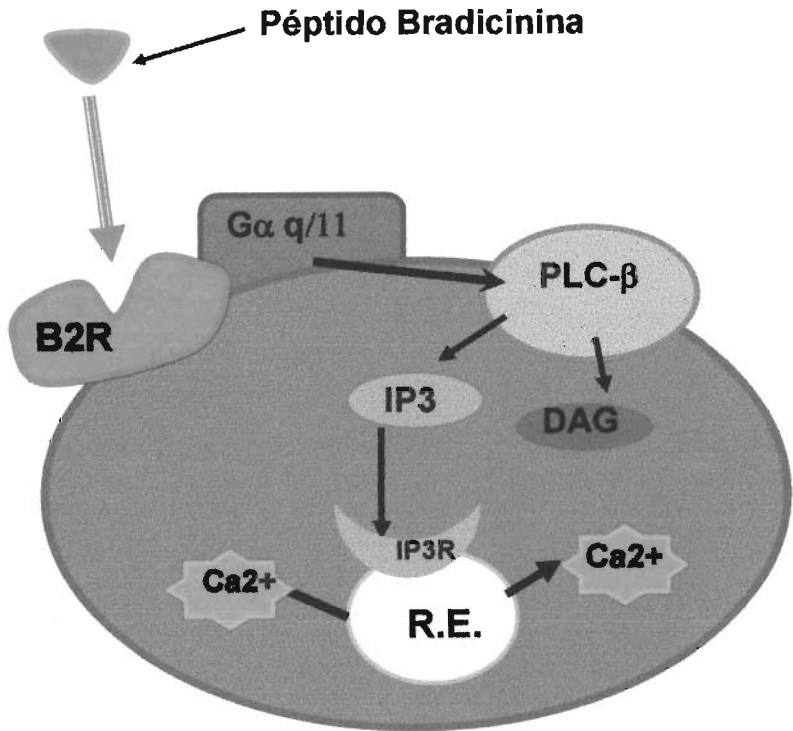


Figura 9. El péptido bradicinina al unirse a su receptor (B2R) activa a la fosfolipasa C (PLC-β), la cual a su vez produce los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). La unión de IP3 con su receptor dispara la liberación de Ca²⁺ de retículo endoplásmico.

II.H La proteína verde fluorescente

En los últimos 10 años la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) se ha convertido en una herramienta comúnmente utilizada en la biología molecular, medicina y biología celular. Esta proteína tiene la característica de ser bio-luminiscente, es decir, cuando es excitada mediante una determinada longitud de onda, emite luz de una longitud de onda mayor. Una de las aplicaciones más útiles que se le ha dado a esta proteína es la determinación de la localización

subcelular de distintas proteínas, ya que cuando estas se fusionan a la proteína verde fluorescente, su función y localización regularmente no se ve afectada.

La proteína verde fluorescente se aisló originalmente de la medusa llamada *Aequorea victoria*. Esta proteína tiene una estructura en forma de barril formada por 11 hojas β , y dentro de esta estructura se encuentra una α hélice que corre en forma diagonal a lo largo del barril. El cromóforo de esta proteína se encuentra en el centro de esta estructura en forma de barril, precisamente contenido en la α hélice (Zimmer Marc, 2002).

Los estudios de esta proteína muestran que el cromóforo es formado por una reacción de ciclación intramolecular entre los residuos Ser 65 y Gly67. Esta reacción es auto-catalítica y el único requerimiento externo es la presencia de oxígeno. Se han hecho distintas mutaciones para aumentar la eficiencia de formación del cromóforo, siendo tal vez la más empleada la llamada GFPmut1 variante 4. Esta variante de la GFP, que fue la que se utilizó en esta tesis, contiene una doble sustitución de Phe-64 a Leu y de la Ser-65 a Thr. Esta variante específicamente tiene un máximo de excitación a 488 nm y un máximo de emisión a 507 nm (Cormack BP et al. 1996).

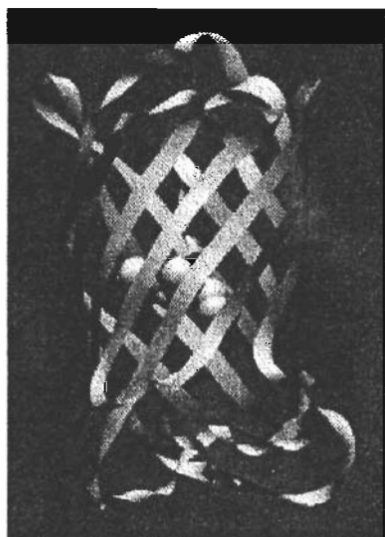


Figura 10. Representación en listones de la estructura de la proteína GFP. El cromóforo se encuentra en el centro del barril formado por las 11 hojas β y es mostrado en forma de esferas.

III. Hipótesis

Si se despliega el péptido bradicinina o la GFP en la superficie del baculovirus AcMNPV mediante su fusión con la proteína viral gp64, estos virus podrán desplegar las proteínas mencionadas de manera que se mantengan sus propiedades biológicas.

IV. Objetivo General

Generar dos baculovirus recombinantes que desplieguen el péptido bradicinina o la proteína GFP en su superficie, y comprobar que se conserve su actividad biológica.

Objetivos particulares

- Clonar la secuencia codificante de la proteína GP64 a partir del ADN genómico del baculovirus AcMNPV.
- Construir dos plásmidos de transferencia que contengan las proteínas de fusión GP64BRAD y GP64GFP bajo el control del promotor viral de polihedrina (P_{PH}).
- Construir un plásmido de transferencia que contenga la secuencia de la proteína GFP bajo el control del promotor de CMV.
- Generar por recombinación homologa en células Sf9 de insecto los baculovirus BacGP64BRAD y BacGP64GFP, y el baculovirus control BacCMVGFP.
- Comprobar que la proteína de fusión GP64GFP este siendo incorporada en la superficie del virus BacGP64GFP.
- Comprobar farmacológicamente que el péptido bradicinina desplegado en la superficie del virus Bacgp64BRAD este interaccionando con el receptor a bradicinina B2.

V Materiales y métodos

V.A Líneas celulares y medios utilizados

- Se utilizaron las líneas celulares de insecto Sf9 y Sf21, que son derivadas de ovario del insecto *Spodoptera frugiperda* fueron obtenidas de Invitrogen (San Diego, CA). Estas células de insecto fueron mantenidas en suspensión en medio líquido TNM-FH pH 6.2 (Invitrogen) suplementado con 3330 mg/L de hidrolizado de lacto-albúmina, 3330 mg/L de yeastolate (Gibco), 4.11 mM de L-glutamina, suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v) y ácido plurónico F-68 al 0.1%. Para aquellos experimentos realizados en medio sin suero, las células fueron mantenidas en el medio SF-900 II SFM. En ambos medios, las células fueron crecidas en una incubadora rotatoria a 100 rpm y 27°C; manteniéndose a una densidad de 0.7 a 3.5 x 10⁶ células por mililitro.

Las líneas celulares CHO (ovario de hámster chino), HeLa (derivadas de cáncer cervical humano), RIN-m5F (insulinoma de rata) y C6 (derivadas de glioma de rata) fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC) y mantenidas de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

V.B Construcción de los plásmidos de transferencia pBB4GP64GFP, pBB4GP64BRAD y pBB4CMVGFP.

Lo que primero se realizó fue la amplificación y aislamiento del gen de la glicoproteína de la envoltura viral GP64. Con este fin, se utilizó la secuencia ya reportada del genoma de AcMNPV, que corresponden del nucleótido 108172 al 109949 [Entrez nucleotide NC_001623 (Ayres et al., 1994)]. Los oligonucleótidos utilizados fueron gp64rev1 (5'-AGTACATGAAGTTGCGCGTG-3') y gp64for3 (5'-ATTACATTTAATATTGTCTATTACGGTTT-3'). Para el PCR se utilizaron 100 ng de ADN genómico de AcMNPV como molde, obtenido al infectar alrededor de 30 x 10⁶ células Sf21 a una MOI de 2 con un baculovirus recombinante que contiene el gen de la GFP bajo el promotor de la polihedrina (Valdés et al, 2003). Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, 30 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 2 min, 72 °C por 3 min y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Este fragmento de ADN amplificado, fue sujeto a electroforesis en

gel de agarosa y purificado utilizando el método llamado Quick Gel Extraction (Qiagen, Chatsword California). Ya purificado, fue ligado directamente utilizando técnicas estándar en el plásmido pDrive (QIAGEN) construyéndose así el plásmido pDgp64.

Para construir las proteínas de fusión, se construyó un plásmido llamado pGP64display de la siguiente forma: primero se clonó la secuencia madura de la gp64, es decir, aquella que se encuentra después del péptido líder y abarca los aminoácidos 21 al 512. Esto se realizó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos gp64sig2 (5'-TATAGTCGACGAGCACTGCAACGCGCAAATG-3') y gp64for4 (5'-TGTGGGTACCTTAATATTGTCTATTACG-3'), los cuales tienen un sitio *SaI* y *KpnI* respectivamente. Para este PCR se utilizaron 10 ng del plásmido pDgp64 que fue utilizado como molde. Las condiciones de reacción fueron las mismas que se utilizaron en la reacción con los oligonucleótidos gp64rev1 y gp64for3. Este producto de PCR fue cortado y ligado en el plásmido pBluescript SK+ (Stratagen) en los sitios *SaI* y *KpnI*, formando el plásmido pSKGP64C. Posteriormente fue clonado un fragmento de 296 pb, que contiene 212 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción de la gp64, así como la secuencia codificante de los primeros 20 aminoácidos de la gp64 que corresponden al péptido líder, utilizando otra vez el plásmido pDgp64 como molde. Para amplificar se utilizaron los oligonucleótidos gp64rev1 (5'-AGTACATGAAGTTGCGCGTG-3') y gp64sig1 (5'-TAATCCCGGGCGCCGCAAAGGCAGAATG-3'), el cual incluye un sitio *SmaI* que se encuentra subrayado. Este fragmento fue clonado en los sitios *SmaI* y *SpeI* del plásmido pSKGP64C para formar pGP64display. Este plásmido llamado pGP64display contiene un sitio múltiple de clonación entre el péptido líder y la región madura de la GP64, con el propósito de fusionar péptidos o proteínas para su despliegue en la superficie de baculovirus. La predicción del sitio de corte del péptido líder de la proteína GP64 fue hecha utilizando un software disponible en Internet (www.expasy.ch).

Para construir la proteína de fusión GP64GFP, se amplificó la secuencia codificante de la proteína GFP, excluyendo el codón de termino de esta proteína

(primeros 237 a.a.). Como molde se utilizaron 10 ng del plásmido pEGFP-N1 (ClonTech). Esta amplificación se llevó a cabo usando los oligonucleótidos GFPforward (5'-ATATCCCGGGATGGTGAGCAAGGGCGAG-3') y GFPreverse (5'-GCTCAAGCTTCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'), los cuales contienen los sitios *Sma*I y *Hind*III respectivamente. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 1 min; 35 ciclos de 95°C por 1 min, 56°C por 2 min, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min. Mediante la clonación de este fragmento en los sitios *Sma*I y *Hind*III del plásmido pGP64display, se construyó el plásmido pSKGP64GFP, el cual contiene la secuencia de la proteína de fusión GP64GFP. La secuencia de esta proteína de fusión fue extraída cortando en los sitios *Spe*I/*Kpn*I y posteriormente clonada en los sitios *Nhe*I/*Kpn*I del plásmido de transferencia pBlueBac4.0 y así formar pBB4GP64GFP, para su incorporación en el genoma viral.

Para construir la proteína de fusión GF64BRAD, se amplificó un fragmento usando como molde pDgp64 y los oligonucleótidos gp64BRAD1 (5'-ATATAAGCTTGCGAAACGGGCTAAAGCCGGGCGGACGCGCAAAGGCAG-3') que tiene un sitio *Hind*III y gp64rev1 (ya descrito). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 1 min; 35 ciclos a 95°C por 1 min, 54°C por 2 min, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min. Este fragmento contiene 212 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción de GP64, y además incluye la secuencia de los primeros 20 aminoácidos de la GP64 (péptido líder) fusionados al péptido bradicinina, (que se encuentra codificado dentro del primer) además de un sitio *Hind*III para su clonación en los sitios *Spe*I/*Hind*III del plásmido pSKGP64C generándose la proteína de fusión GP64BRAD en este plásmido llamado pSKGP64BRAD. La secuencia de esta proteína de fusión también fue extraída con las enzimas *Spe*I/*Kpn*I y clonada en los sitios *Nhe*I/*Kpn*I del plásmido pBlueBac4.0 (Invitrogen) para generar pBB4GP64BRAD.

El plásmido de transferencia pBlueCMVGFP, con el cual se generó el baculovirus BacCMVGFP fue construido de la siguiente forma: se insertó un fragmento *Hind*III/*Sma*I de 1166 pb extraído del plásmido pcDNA3.1+ (Invitrogen)

en el plásmido pBluescript SK+ (Stratagen) para generar el plásmido pSKpoliA. Después, un fragmento *EcoRI/BamHI* de 1130 pb proveniente de pSKpoliA, fue clonado en los sitios *EcoRI/BglII* del plásmido de transferencia pBlueBac 4.0 (Invitrogen) en orientación opuesta al promotor de polihedrina (P_{PH}) para generar pBB4poliA. Un fragmento *SalI/EcoRI* de 954 pb proveniente de pcDNA 3.1+ llevando el promotor de citomegalovirus (CMV) fue clonado en el plásmido pBB4poliA para generar el plásmido pBlueCMV. Por último, un fragmento de 772 pb *EcoRI/NotI* que contiene la secuencia completa de la eGFP, proveniente del plásmido pEGFP-N1 (Clontech), fue clonado en el plásmido pBlueCMV para generar el plásmido de transferencia pBB4CMVGFP.

V.C Generación de los baculovirus recombinantes

La generación de los baculovirus recombinantes a partir de los plásmidos de transferencia se llevó a cabo utilizando el kit Bac-N-Blue (Invitrogen, CA). Este kit de generación de baculovirus trabaja de la siguiente forma: el plásmido de transferencia deseado, y el genoma viral linearizado (Bac-N-Blue) son co-transfectados células de insecto. Este genoma viral fue linearizado mediante su digestión en tres sitios *Bsu36I*, lo cual provocó la remoción del extremo carboxilo terminal del ORF1629, del promotor de polihedrina (P_{PH}) y del ORF de la polihedrina (poly H). Es importante señalar que en células en cultivo, la polihedrina no es esencial para la propagación del virus, sin embargo, el ORF1629 sí es esencial. La única forma de producir y aislar virus infectivos, es si la secuencia ORF1629 es recobrada, y esto se lleva a cabo mediante recombinación homóloga (en las células de insecto transfectadas) entre el ADN viral linearizado y el vector de transferencia, ya que este último contiene el ORF1629. La recombinación entre secuencias homólogas se realiza usualmente entre el ORF603 y el ORF1629 o la secuencia codificante de la β -Galactosidasa (figura 11). El resultado es la propagación únicamente de los baculovirus recombinantes, los cuales pueden ser observados como placas de color azul en medios que contengan el reactivo X-gal debido a la β -galactosidasa que producen.

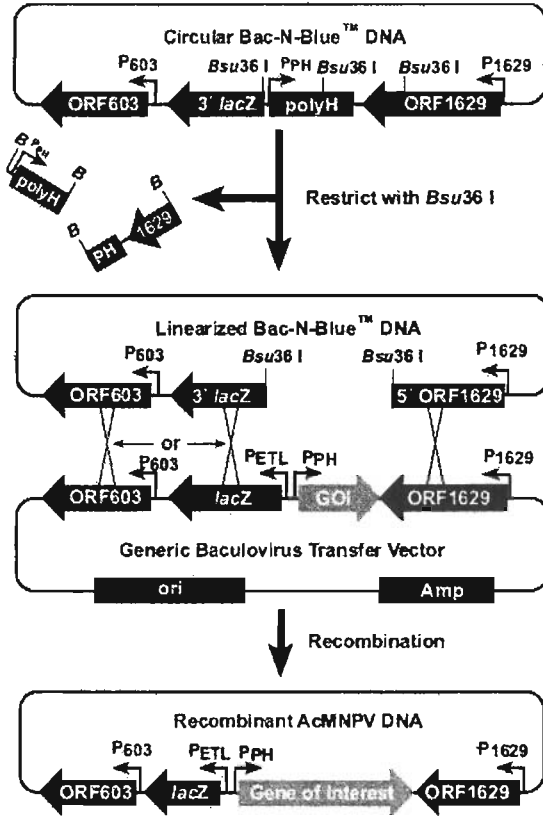


Figura 11. Generación de baculovirus recombinantes mediante recombinación homologa entre el genoma viral linealizado y el plásmido de transferencia. Para detalles ver el texto. GOI significa Gene Of Interest, que en esta tesis serían las proteínas de fusión.

Después de 10 días de haberse llevado a cabo la transfección de las células de insecto, los viriones libres recombinantes son liberados al medio. Este medio es recolectado y usado posteriormente para aislar clonas virales.

V.D Aislamiento y amplificación de las clonas virales positivas

El aislamiento de las clonas virales positivas se lleva a cabo con las indicaciones del kit Bac-N-Blue.

V.E Ensayos de microscopía confocal y electrónica

Todas las observaciones realizadas mediante microscopía confocal o electrónica fueron hechas en la unidad de microscopía electrónica del Instituto de

Fisiología Celular. Para los ensayos de determinación de la localización de proteínas expresadas en células de insecto infectadas con BacGP64GFP, 6×10^6 células Sf9 contenidas en 3 mL del medio TNM-FH fueron infectadas a una MOI de 1 durante 32 horas en agitación rotatoria a 27°C. Pasado este tiempo de infección, se tomó una muestra de estas células infectadas para observarse en el microscopio confocal. El microscopio confocal utilizado fue un Bio-Rad 1024 con un láser de Kr-Ar con líneas en 488, 568 y 647 nm acoplado a un microscopio invertido Nikon TMD 300

Los ensayos de transducción de células de mamífero con BacGP64GFP, fueron realizados de la siguiente forma: 250 000 células se dejaron adherir durante 12 horas en una caja petri de 35 mm, para obtener una confluencia de alrededor del 30%. Una vez adheridas, se retiró el medio rápidamente, y se adicionó una cantidad de partículas virales correspondientes a 250 MOI. Para después ser incubadas durante 30' o 1h 30'. Al término de la incubación, las células fueron llevadas para su observación al microscopio confocal, o tratadas para ser observadas en el microscopio electrónico. Los marcadores celulares Brefeldina y FM 4-64 fueron adquiridos de Molecular Probes Inc. El microscopio de transmisión electrónica utilizado fue un Jeol 1200EXII.

V.F Concentración y purificación de partículas virales

La concentración de las partículas virales se llevó mediante ultra centrifugación en gradiente de sacarosa, con el protocolo desarrollado y reportado Facciabene A. y colaboradores en el 2004.

En este protocolo, los restos celulares de la amplificación viral son removidos por centrifugación durante 10 min a 2000 rpm. El sobrenadante resultante es adicionado cuidadosamente sobre una solución de sacarosa al 27% (P/V) y centrifugado a 24 000 rpm durante 75 minutos en tubos SW28. El botón viral es cuidadosamente resuspendido en amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.5, para después someter las partículas virales un vez más a centrifugación en tubos

SW28 a 27 000 rpm durante 150 minutos. El botón viral obtenido es finalmente resuspendido en amortiguador PBS.

V.G Ensayos de Western Blot

Los ensayos de western blot para la detección de la proteína GP64, fueron realizados como se reporta en Valdés VJ, *et al.* 2003, pero utilizando como muestra partículas virales purificadas y concentradas por ultra centrifugación. En cada pozo fueron cargados 50 µg de proteína.

V.H Ensayos de medición de Ca²⁺ intracelular

Fueron infectadas 11 mL de células a una densidad de 2×10^6 cel/mL a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.0 con el baculovirus B2R (Reyes-Cruz *et al.*, 2000) durante un lapso de tiempo de 36 a 40 horas en agitación a 27°C. Lo que se obtiene mediante esta infección, es una sobre-expresión funcional del receptor tipo 2 a bradicinina (B2), de tal manera que estas células infectadas pueden disparar la cascada de transducción de señales típica del receptor. Pasado el tiempo de infección, 3 mL de esta suspensión fue expuesta al indicador fluorescente selectivo a Ca²⁺ Fura-2AM a una concentración final de 5mM durante 1 hora. Después de la incubación, fueron agregados 10 mL de amortiguador para células de insecto (NaCl 10mM, KCl 60mM, MgCl₂ 25 mM, glucosa 4 mM, HEPES 15 mM, manitol 100 mM, albúmina 0.1%, CaCl₂ 1.8 mM y ajustado a pH 6.2) y esta suspensión de células fue centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante es desechado, y el paquete celular es resuspendido en 4.5 mL de amortiguador para células de insecto, obteniéndose una densidad de 1.5 a 2.0 millones de células por mililitro.

Se toman 1.5 mililitros de esta suspensión de células y se vierten en una cuba, la cual es colocada dentro de un espectrofluorómetro SLM Aminco-Bowman Series 2 (SLM series II). Para determinar la concentración intracelular de calcio en tiempo real, este espectrofluorómetro lo que realizo fue incidir un haz de luz sobre la muestra, que cada segundo alternaba entre una longitud de onda de 340 nm y 380 nm, mientras que recolectaba la luz resultante de las propiedades

fluorescentes del indicador Fura-2AM a una longitud de 510nm. Es posible determinar de esta manera la concentración intracelular de Ca^{2+} libre mediante este método, ya que la longitud de onda de máxima excitación del Fura 2-AM que se encuentra libre (380nm) y la especie que se encuentra unida a Ca^{2+} (340nm) se encuentra lo suficientemente separada como para aseverar que la luz de emisión recolectada es proporcional a la concentración de la especie de Fura 2-AM que haya sido excitada (Grynkiewicz G. *et al* en 1985). Cada experimento fue individualmente calibrado para obtener el máximo de fluorescencia después de romper las células con Triton X-100 al 0.1%; el mínimo de fluorescencia fue obtenido después de quelar el calcio en solución con EGTA 20 mM. Para poder demostrar diferencias significativas entre los distintos experimentos, se realizaron pruebas t de student.

La bradicinina fue comprada de Sigma (St. Louis, MO), el Fura-2 AM de Molecular Probes (Eugene, OR) y el HOE-140 de Invitrogen (California, EUA).

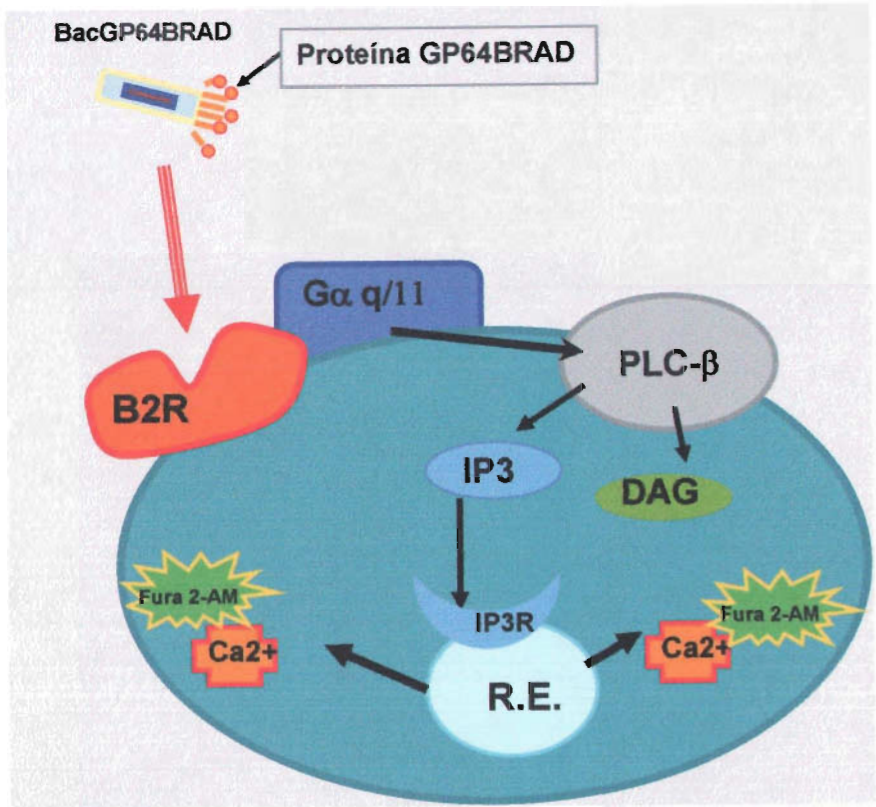


Figura 12. Representación de la interacción esperada entre BacGP64BRAD y el receptor B2. Células Sf9 son infectadas con el baculovirus B2R para que expresen el receptor a bradicinina del tipo 2. Tras 36 horas de infección, las células son permeabilizadas con el marcador fluorescente selectivo a calcio Fura 2-AM. Cuando estas células son expuestas a un estímulo como el péptido bradicinina libre (control positivo), o probablemente el baculovirus BacGP64BRAD, se podrá estudiar su interacción con el receptor B2 mediante la liberación consecuente de Ca²⁺ de retículo endoplásmico, el cual puede ser detectado a través de su unión con el Fura 2-AM mediante espectroscopia de fluorescencia.

VI Resultados y discusión

En esta tesis, lo que se realizó fue la generación de dos baculovirus recombinantes, uno que despliega en su superficie el nonapéptido bradicinina (BacGP64BRAD) y otro la proteína GFP (BacGP64GFP). El método utilizado para desplegar tanto el péptido como la proteína, fue su fusión con el extremo amino terminal de la región madura de la proteína GP64 de la envoltura viral. Se realizó de esta forma la fusión, por que este método ha sido el más exitoso para desplegar proteínas desde pequeñas como la GFP, hasta grandes como la GP120 del VIH (Oker-Blom C. *et al*, 2003). Una vez generados los baculovirus, se comprobó si aun después de su fusión y despliegue en superficie, tanto la bradicinina como la GFP seguían reteniendo su actividad biológica. En el caso de la GFP se estudiaron sus propiedades bio-luminiscentes, y en el del péptido bradicinina su unión al receptor tipo B2 a bradicinina y por lo tanto la activación de la cascada de transducción de señales característica de esta interacción.

Debido a que en el genoma de AcMNPV se encuentra solo una copia del gen de gp64, y este es esencial para su propagación, todas las manipulaciones fueron hechas en una segunda copia del gen. Esta segunda copia (GP64BRAD o GP64GFP) fue integrada en el genoma viral mediante recombinación homóloga. De esta forma, se obtuvieron dos baculovirus recombinantes, cada uno con dos copias de gp64: la original que no presenta modificaciones (WT), y la proteína de fusión que se encuentra bajo el control del promotor viral fuerte de polihedrina (P_{PH}).

Una vez generados los baculovirus, primero se comprobó que las proteínas de fusión realmente se encontraran en la superficie de los baculovirus recombinantes. Pero existe un problema, la proteína GP64BRAD no puede ser detectada, o más bien dicho, no puede ser diferenciada de la proteína GP64 WT que aun sigue expresando e incorporando ambos baculovirus recombinantes. Esto fue resuelto haciendo uso del baculovirus BacGP64GFP, esto es: como GFP y bradicinina se encuentran fusionados de la misma forma con la proteína GP64, si la fusión con GFP llega la membrana de células infectadas y por lo tanto a la

superficie viral, también lo estaría realizando la proteína de fusión GP64BRAD. Por lo tanto esta fusión con GFP permitiría entre otras cosas (aunque indirectamente) saber si realmente la proteína GP64BRAD es desplegada en la superficie viral. Es de esta forma que se estudió por microscopia confocal y ensayos de Western Blot la localización de ambas proteínas de fusión. Como control se generó un baculovirus llamado BacCMVGFP, el cual a diferencia de BacGP64GFP, produce una forma soluble de la GFP que no debería de llegar a superficie viral. Ya demostrada la localización de las proteínas de fusión, posteriormente se comprobó, si realmente existe interacción entre BacGP64BRAD y el receptor a bradicinina del tipo B2. Esto se llevo a cabo midiendo la concentración de Ca²⁺ intracelular, ya que este ion es liberado al citosol cuando se activa la cascada de transducción de señales disparada por el receptor B2 a bradicinina cuando se une con este mismo péptido.

VI.A Generación de los baculovirus BacCMVGFP, BacGP64GFP y BacGP64BRAD

Para generar los baculovirus recombinantes BacGP64GFP y BacGP64BRAD, en primer lugar se amplificó y clonó la secuencia de la proteína GP64 en el plásmido pDrive, tomando como molde el ADN genómico del baculovirus AcMNPV, generándose el plásmido pDgp64. A partir de este plásmido, la construcción de las proteínas de fusión GP64BRAD y GP64GFP fue llevada a cabo en varios pasos. Esencialmente los que se realizó fue dividir el gen *gp64* en dos partes separadas por un sitio múltiple de clonación: el péptido líder de la *gp64* y la región madura, siendo esta ultima lo que permanece anclado en la membrana después de ser cortado el péptido líder. Esta división fue lograda en el plásmido pGP64display, en el cual se puede clonar la secuencia de cualquier proteína y así construir proteínas de fusión con GP64 para su posterior despliegue en baculovirus (figura 14). Fue de esta forma como la proteína GFP y el péptido bradicinina fueron insertadas entre estas dos regiones (Figura 14 y 15).

Las secuencias de las proteínas de fusión fueron subclonadas en el sitio múltiple de clonación del plásmido de transferencia pBlueBac4.0 (figuras 14 y 15), donde su expresión se encontrara controlada por el promotor fuerte de

polihedrina (P_{PH}). Para generar el baculovirus BacCMVGFP, se clonó la secuencia de la proteína GFP adicionándole la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (figura 13). De esta forma se formaron los plásmidos de transferencia pBB4GP64BRAD, pBB4GP64GFP y pBB4CMVGFP.

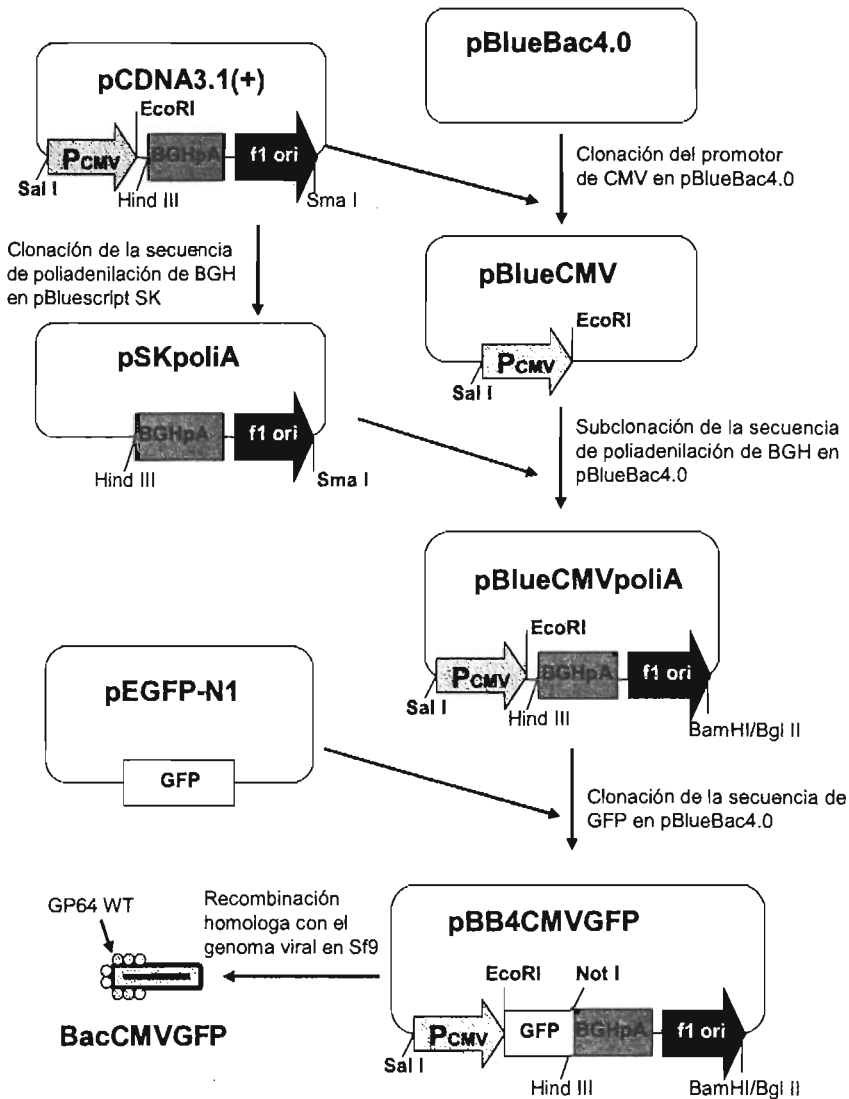


Figura 13. Generación del baculovirus recombinante BacCMVGFP. La proteína verde fluorescente fue clonada en el plásmido de transferencia pBlueBac4.0 bajo el control del promotor de CMV y adicionando la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH).

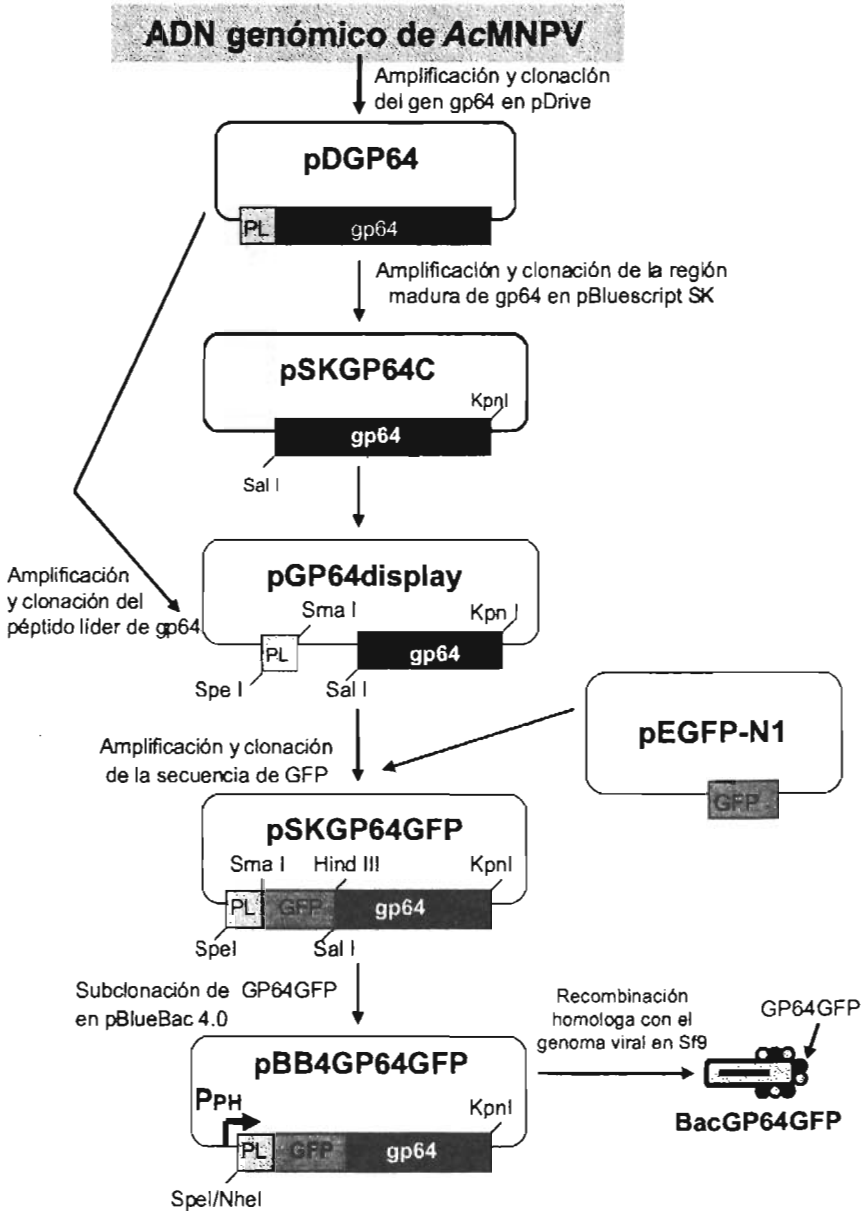


Figura 14. Generación del baculovirus recombinante BacGP64GFP. La proteína GFP fue fusionada en marco de lectura a la proteína viral GP64, después del sitio de corte del péptido líder en múltiples pasos (para detalles, vea materiales y métodos). Esta proteína de fusión fue clonada en el plásmido de transferencia pBlueBac4.0, para su inserción mediante recombinación homologa en el genoma de AcMNPV.

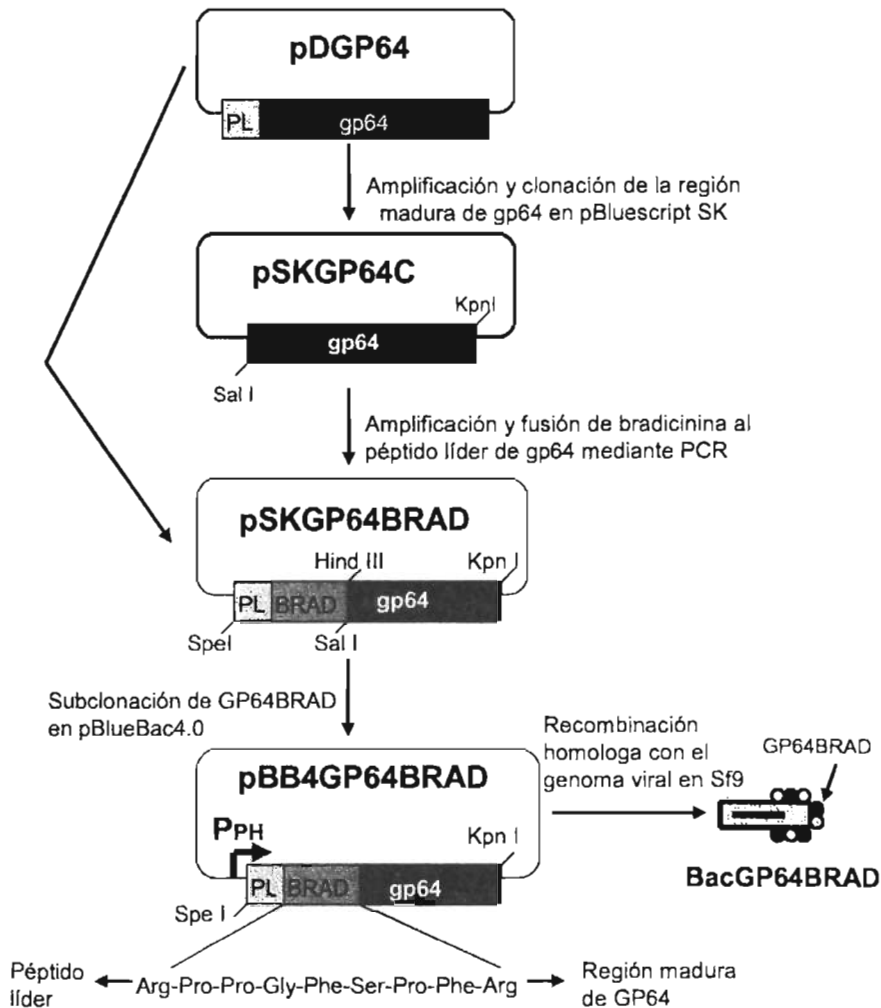


Fig. 15. Generación del baculovirus recombinante BacGP64BRAD. El péptido bradicinina fue fusionado a la proteína GP64 exactamente después del sitio de corte del péptido líder en múltiples pasos (para detalles, ver materiales y métodos). Esta proteína fue construida en el plásmido pBluescript SK(+) y transferida al plásmido pBlueBac4.0 para su posterior integración en el genoma viral.

El sitio múltiple de clonación del plásmido pBlueBac4.0 se encuentra flanqueado por secuencias homologas al genoma viral, de tal forma que se puede llevar a cabo una recombinación con el genoma viral y así integrarse las

secuencias de las proteínas de fusión. La recombinación se llevo a cabo co-transfectando uno de los plásmidos de transferencia (por ejemplo pBB4GP64BRAD) y el genoma viral en células de insecto de la línea Sf9. Una vez llevada a cabo la recombinación, se aislaron clonas virales y a continuación se amplificaron los distintos virus en células de insecto Sf9, obteniéndose alicuotas virales con títulos de $10^7 - 10^8$ partículas virales infectivas por mililitro, lo cual esta dentro de los rango normales de acuerdo con la literatura. Esto nos indica que la incorporación de las proteínas de fusión al parecer no alteró la duplicación de los viriones libres, sin embargo. En la figura 16 se muestra una foto de uno de los ensayos de placa que se realizaron para la determinación del titulo viral.



Figura 16. Ensayo de placa para la determinación del título viral. Mediante ensayos de placa se aislaron clonas virales y se determino el titulo viral de las distintas alicotas virales producidas. En la foto se muestra un ensayo realizado para una alicota del baculovirus BacGP64BRAD. En la dilución mayor (10^{-6}) se observan placas virales aisladas.

Para corroborar que las secuencias de las proteínas de fusión se encontraran integradas en el genoma viral, este fue aislado y secuenciado. Los resultados de las secuencias de los casetes de expresión de los tres baculovirus recombinantes generados muestran que las proteínas fueron correctamente integradas como se

esperaba. En la figura 17 se muestra un resumen de los casetes de las proteínas de fusión de los baculovirus recombinantes BacGP64BRAD y BacGP64GFP.

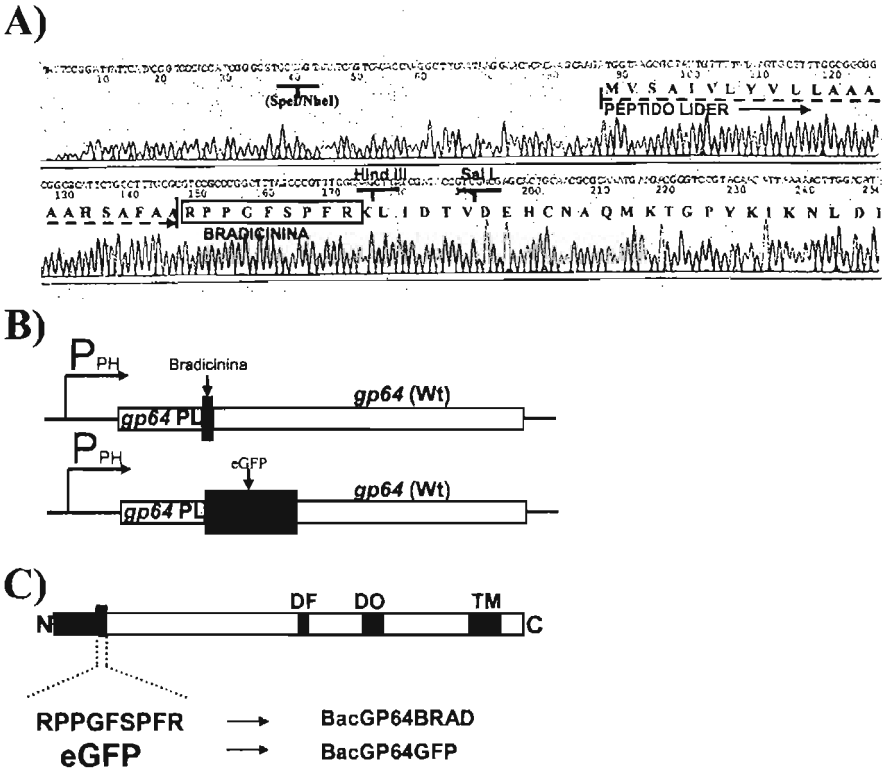


Figura 17. Diagrama de los casetes de expresión de los baculovirus recombinantes. A) Fragmento de la secuenciación del gen de la proteína GP64BRAD integrada en el genoma viral, remarcándose el sitio de clonación de la bradicinina con respecto al péptido líder. B) Diagrama que muestra que tanto la GFP como Bradicinina fueron clonados entre el péptido líder (*gp64 PL*) y la región madura de la proteína *gp64*, la cual no fue modificada (*gp64 Wt*). C) Esquema que muestra la posición del sitio de inserción con respecto a los demás dominios de la GP64 (DF: dominio de fusión, DO: dominio de oligomerización y TM: dominio transmembranal).

VI.B Ensayos de actividad del baculovirus BacGP64GFP

Los primeros ensayos realizados con el baculovirus BacGP64GFP fueron hechos infectando células de insecto Sf9 con este baculovirus. La razón de realizar estos ensayos fue poder observar mediante microscopía confocal si la proteína de fusión GP64GFP era expresada y anclada en la membrana de las

células infectadas. Como se recordara, los baculovirus al brotar de las células infectadas se llevan consigo parte de la membrana celular, y junto con esta la proteína GP64 (WT o de fusión), para adquirir de esta forma su envoltura viral. Es por esta razón que era importante hacer este tipo de ensayos, ya que si la proteína de fusión llega a la membrana de las células infectadas, era casi seguro que se estuvieran incorporando en la superficie de los baculovirus recombinantes que se estuvieran produciendo dentro de dichas células (Mottershead D *et al*, 1997).

Lo que se encontró fue que efectivamente la proteína GP64GFP si podía detectarse en la membrana de células infectadas con una multiplicidad de infección de una partícula viral por célula (MOI de 1). Para poder comprobar la localización de la proteína de fusión, se marcó la membrana de estas células con FM 4-64, un marcador de membrana celular. Al usar este marcador (rojo), podríamos saber si GP64GFP (verde) se encuentra en la membrana, pues si lo esta, aparecerían regiones amarillas debido al sobrelapamiento de ambas señales. En la figura 18 se pueden observar algunas imágenes obtenidas en este tipo de ensayos, donde se pueden observar claramente señales de co-localización que indican que efectivamente la proteína GP64GFP si encuentra en la membrana de las células infectadas.

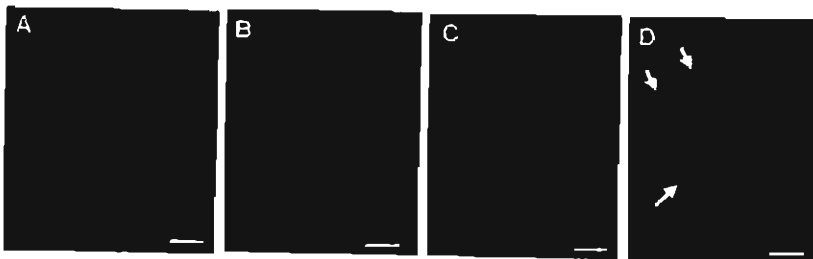


Figura 18. Imágenes de microscopia confocal de células de insecto infectadas con BacGP64GFP (A) Vistas a un aumento de 10X. (B) Acercamiento a una célula mostrando la localización de la proteína GP64GFP. (C) Misma célula que en B, pero teñida con el marcador de membrana celular FM 4-64. (D) Co-localización de B y C donde se muestran puntos amarillos debido a que se sobrelapan. Las células fueron infectadas a una MOI de 0.5 e incubadas durante 30 hrs. La barra en la figura A representa 100 μ m, mientras que en B, C y D son 5 μ m.

A continuación se realizaron ensayos también con BacGP64GFP y BacCMVGFP, pero ahora utilizando células de mamífero. Los baculovirus no pueden replicarse en células de mamífero, pero si pueden transducirlas, es decir, pueden entrar a las células y llegar hasta núcleo para liberar ahí su información genética. El objetivo inicial era averiguar si se podían observar las partículas virales por si mismas, tomando en cuenta que estas deberían de tener en su envoltura viral la proteína de fusión GP64GFP.

Primero se tomaron fotos de microscopía electrónica de células C6 (glioma de rata) incubadas con BacCMVGFP durante 2 horas a una MOI de 250 (figura 19).

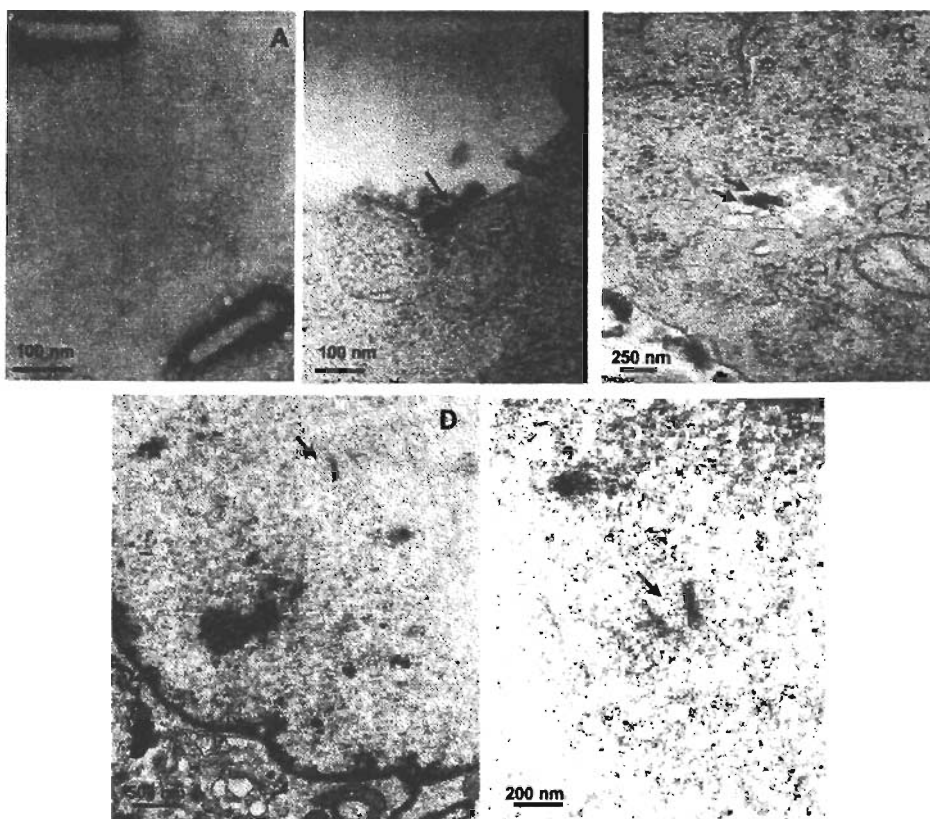


Figura 19. Fotos de microscopía electrónica de BacCMVGFP. Células C6 fueron incubadas durante 2 horas con el baculovirus recombinante BacCMVGFP a una MOI de 500 (para después ser fijadas y procesadas). (A) Dos partículas virales libres en las cuales se puede observar la característica forma de báculo por la cual reciben su nombre los baculovirus. (B) Partícula viral (indicadas por flechas) entrando en una célula. (C) Dos partículas virales encontradas en un mismo endosoma. (D) Partícula viral encontrada dentro del núcleo; en (E) se puede ver un acercamiento hecho a esa misma partícula.

En estas fotos se pudieron observar partículas virales en tres distintas regiones de la célula: adheridas a la membrana celular, dentro de endosomas, ya que como se sabe las partículas virales entran mediante endocitosis absorptiva, y finalmente se pudieron observar nucleocapsides dentro del núcleo. En la literatura se habla de que en células de mamífero de la línea PK1 los baculovirus escapan del endosoma en unos 50 minutos en promedio (van Loo *et al*, 2001), y de que se observan ya nucleocapsides en el núcleo de las células que transducen en 4 horas. Lo que nos indican estas fotografías de microscopía electrónica es que el baculovirus BacCMVGFP, es capaz de entrar en células de mamífero como lo es la línea C6, y que además puede llegar hasta el núcleo de dichas células. Esto es importante, ya que como sabemos, el baculovirus BacCMVGFP no presenta modificaciones en su superficie, de tal manera que es para nosotros un control positivo: si BacCMVGFP pudo transducir células C6, también debería de poder BacGP64GFP, y si se observa que no puede, muy probablemente podría deberse a las modificaciones hechas en su superficie sobre la GP64 (Tani H *et al*, 2001).

Posteriormente se realizaron estudios también en células de mamífero, pero ahora utilizando microscopía confocal aprovechando las propiedades fluorescentes que debería de tener BacGP64GFP si es que realmente se incorporo GP64GFP en su envoltura viral. Lo que se encontró, fue que efectivamente si se podían observar las partículas virales cuando estas eran adicionadas en grandes cantidades (MOI de 500). Fueron observadas en distintas regiones de las células de acuerdo al lapso de tiempo durante el cual fueron expuestas al virus. A tiempos cortos de exposición (30') los baculovirus podían observarse adheridos a la membrana celular, lo cual fue evidente al añadir FM 4-64 (figura 17 A-F) debido a la presencia de regiones amarillas. Al pasar una hora y media de incubación, las partículas virales fueron observadas dentro de las células. Para poder confirmar la localización de estos baculovirus, se utilizó un marcador de retículo endoplásmico llamado Brefeldina para ayudarnos a determinar si realmente las partículas virales se encontraban en el citoplasma (figura 17 G-L).

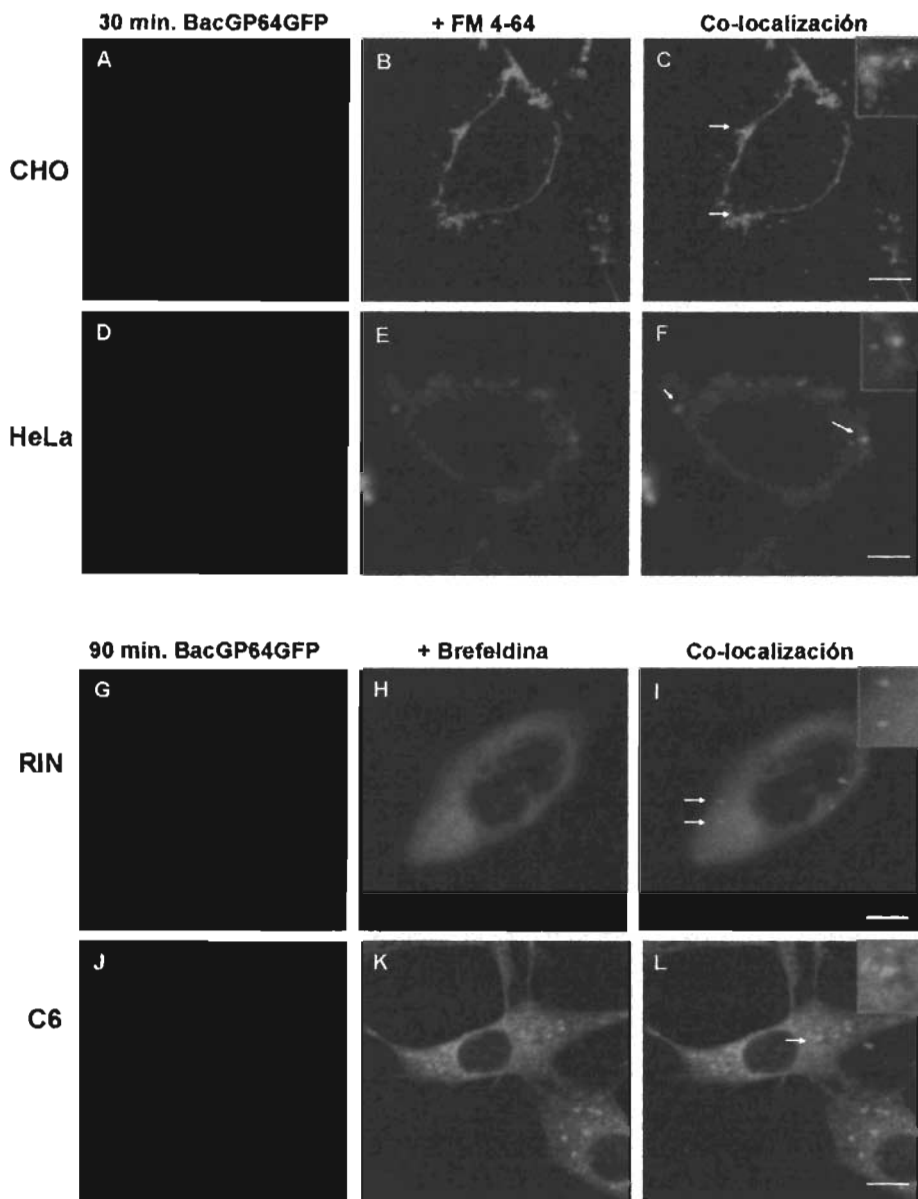


Figura 20. Células de mamífero de las líneas CHO, HeLa, RIN y C6 fueron incubadas a distintos tiempos con BacGP64GFP. (A-F) Se muestran los experimentos hechos al incubar durante 30 minutos BacGP64GFP en células CHO y HeLa. En la última columna se muestra la co-localización hecha con el marcador de membrana celular FM 4.64. (G-L) Experimentos realizados también hechos a una MOI de 500 con BacGP64GFP, pero incubados durante 90 minutos. En la última columna se muestra co-localización con Brefeldina. La barra representa 10 μ m.

Al realizar la co-localización con brefeldina, se pudo observar que realmente las partículas virales si se encontraban dentro de la célula, tanto en células RIN, como en C6, CHO y HeLa (figura 17, G-L).

Lo que estas muestran, es que BacGP64GFP efectivamente si incorporo en su envoltura viral la GP64GFP. Prueba de esto son las señales de color verde fluorescente que se pudieron observar a los largo de todos los experimentos hechos mediante microscopia confocal. Esto indica que no solo la GFP conservó sus propiedades como se pretendía, sino que la fusión de GFP a GP64 no interfirió gravemente la capacidad de esta ultima proteína por formar trimeros con la GP64 WT, ya que se sabe que este es la forma mediante la cual se incorporan las proteínas de fusión en los baculovirus recombinantes. (Boublik Y. *et al*, 1995).

Finalmente, para confirmar que la proteína de fusión si estuviera presente en las partículas virales, se realizó un Western Blot contra GP64, tomando como muestra partículas virales de BacGP64GFP purificadas y concentradas mediante gradiente de sacarosa al 27%. Como control negativo del Western Blot, se utilizo el baculovirus BacCMVGFP (figura 21).

Como se esperaba, si se pudieron observar dos bandas en el carril de BacGP64GFP, una correspondiente a la proteína de fusión y otra a la forma sin modificar GP64 WT. En el carril de BacCMVGFP se observó solo una banda, la correspondiente a la GP64 WT.

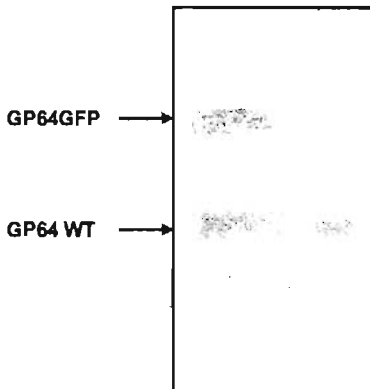


Figura 21. Western Blot hecho contra GP64, utilizando como muestra partículas virales purificadas y concentradas de BacGP64GFP en el carril 1 y BacCMVGFP en el carril 2.

VI.C Ensayos de actividad del baculovirus BacGP64BRAD en células Sf9 que no expresan el receptor B2.

Ya comprobada la localización de las proteínas de fusión en la superficie viral, se realizaron los ensayos de determinación de la concentración de Ca^{2+} intracelular en tiempo real, para poder determinar si existe una interacción específica entre el baculovirus BacGP64BRAD y el receptor a bradicinia tipo 2 (B2). Con este fin, fueron utilizadas células Sf9 previamente infectadas con el baculovirus BacB2R (Reyes-Cruz et al., 2000), el cual produce una sobre-expresión funcional del receptor B2. Como control positivo se utilizó el péptido bradicinina libre y como control negativo el baculovirus BacGP64GFP, el cual no debería de disparar una liberación de Ca^{2+} .

Sin embargo, para demostrar que los cambios que pudieran ser inducidos en el Ca^{2+} intracelular, se deben estrictamente a una interacción con los receptores B2, primero se realizaron tres experimentos control para demostrar que en células Sf9 que no expresan el receptor B2 no se da ningún tipo de interacción no específica que resulte en un cambio en el Ca^{2+} intracelular. En la figura 22 se muestra un experimento representativo donde células Sf9 que no expresan B2, no responden al péptido bradicinina libre en concentraciones saturantes como era de esperarse. Esto indica que el péptido bradicinina libre (el cual será nuestro control positivo en células que si expresen B2) no interacciona de ninguna forma con la célula Sf9 de tal forma que se induzca una liberación de Ca^{2+} intracelular.

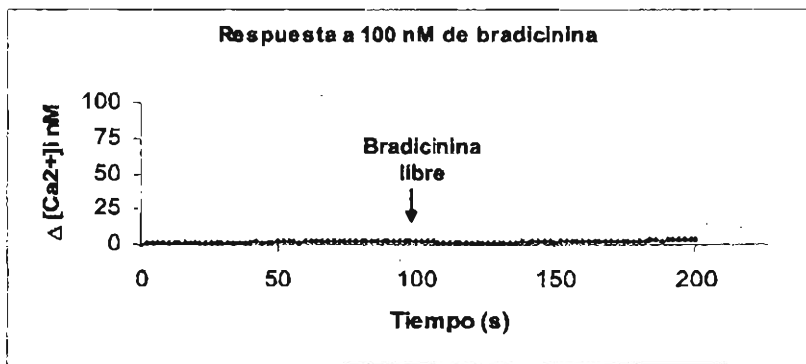


Figura 22. Respuesta a bradicinina libre en células que no expresan B2. La flecha indica el momento en que se administro la bradicinina.

Cuando se hace este mismo experimento (células Sf9 que no expresan B2) pero ahora probando los baculovirus BacGP64BRAD (figura 23) y BacGP64GFP (figura 24) generados en medio TNM-FH, se observó que tampoco se dispara un cambio en la concentración de Ca^{2+} intracelular, lo cual indica que no existe ningún tipo de interacción no específica entre estos baculovirus y células sin expresar el receptor B2 que induzcan un cambio en la concentración de Ca^{2+} intracelular.

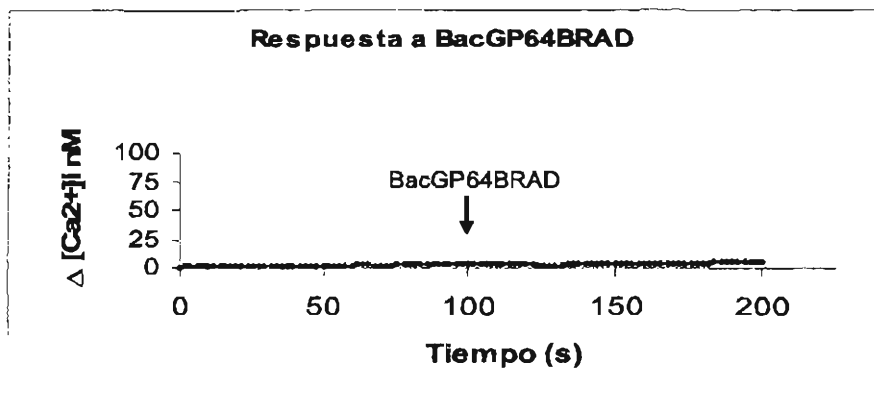


Figura 23. Respuesta a 200 MOI de BacGP64BRAD en células que no expresan B2. La flecha indica el momento de adición del baculovirus BacGP64BRAD.

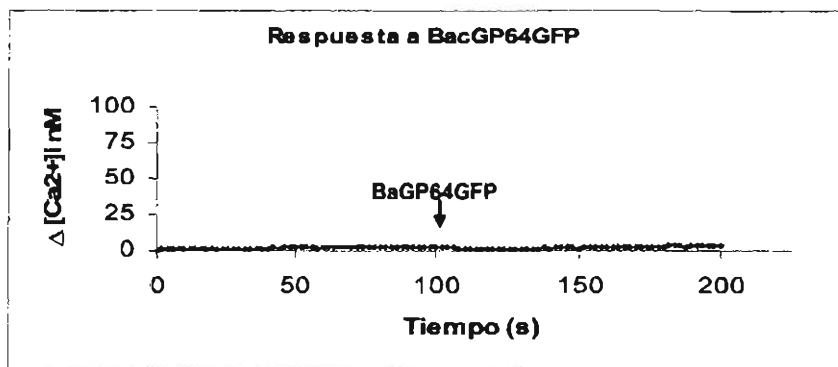


Figura 24. Respuesta a 200 MOI de BacGP64GFP en células que no expresan B2. La flecha indica el momento de adición del baculovirus.

Por lo tanto, cualquier cambio llevado a cabo en el Ca^{2+} intracelular en células que si expresen el receptor B2, necesariamente sería dependiente de la presencia de este receptor al utilizar al probar cualquiera de estos baculovirus, o el mismo péptido libre. Un resumen de los tres pasados experimentos puede observarse en la figura 25.

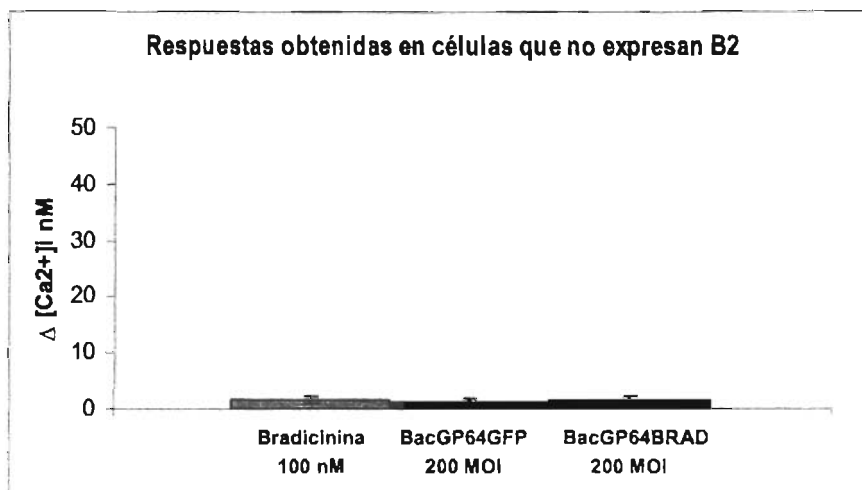


Figura 25. Resumen de las respuestas obtenidas a Bradicinina libre, BacGP64GFP y BacGP64BRAD en células Sf9 que no expresan el receptor B2. Los experimentos fueron realizados por lo menos por quintuplicado.

VI.D Ensayos de actividad del baculovirus BacGP64BRAD en células Sf9 que expresan el receptor B2.

Ya comprobado que en células que no expresan el receptor B2 no existe respuesta alguna por ninguno de los dos baculovirus, ni por la bradicinina libre, posteriormente se empezaron a hacer ensayos en células Sf9 pero que si expresan el receptor B2. Después de haber establecido las mejores condiciones de infección para poder registrar buenas respuestas, en primer lugar se realizó una curva dosis-respuesta a bradicinina libre, donde se observa que a una concentración de 100 nM se obtiene una saturación del sistema. Esta curva puede ser apreciada en la figura 26.

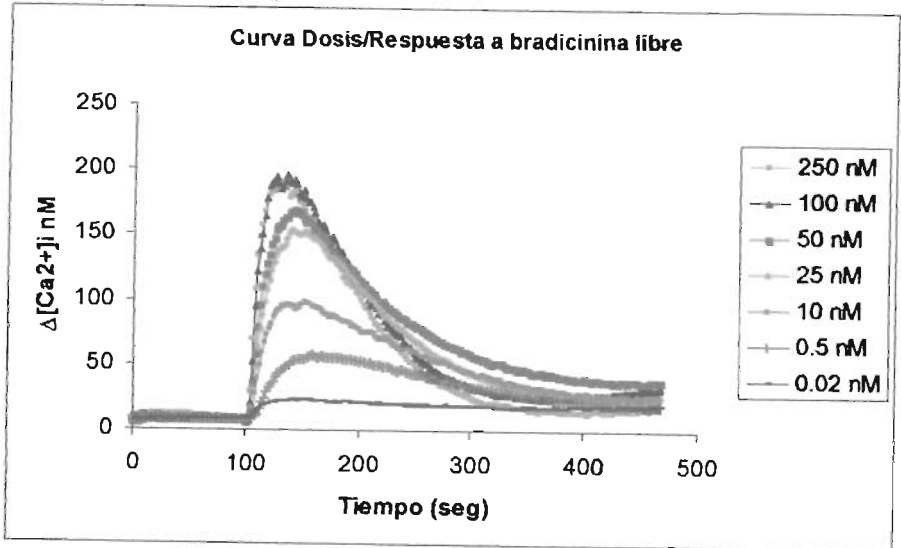


Figura 26. Curva dosis respuesta a bradicinina libre en células Sf9 que expresan el receptor B2. Las células fueron infectadas durante 36 a 40 horas a una MOI de 1 con el baculovirus BacB2R, para lograr la sobre expresión del receptor B2.

Al probar la capacidad del Baculovirus BacGP64BRAD generado en medio TNM-FH de movilizar calcio intracelular de células que expresan B2 (figura 27), se observó que efectivamente si se incrementaba la concentración al adicionar 200 partículas virales por cada célula presente (MOI de 200).

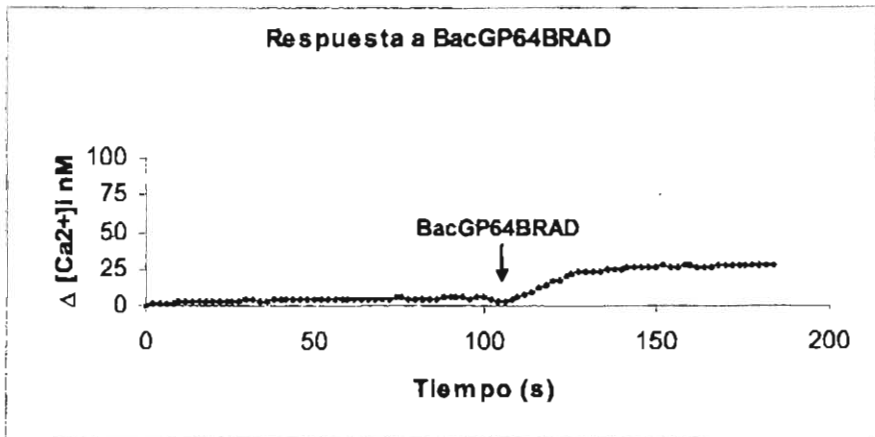


Figura 27. Respuesta observada en células que expresan el receptor B2 a las cuales se adclonaron 200 MOI de BacGP64BRAD. La flecha indica el momento de adclón del baculovirus.

Algo aun más interesante: esta respuesta podía ser abatida utilizando el antagonista selectivo de receptores B2 llamado HOE-140 como se puede ver en la figura 28. La concentración utilizada de HOE-140 es 1 μ M en este y los siguientes experimentos.

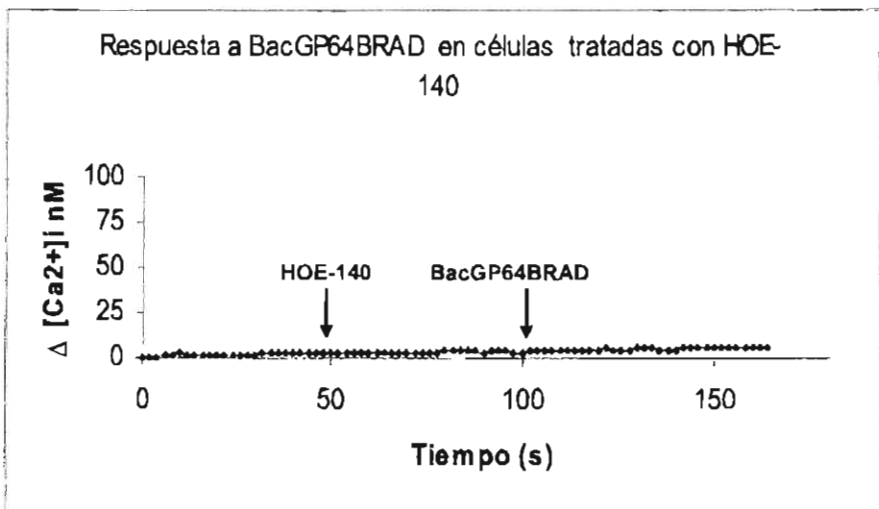


Figura 28. Respuesta observada en células que expresan B2 al baculovirus BacGP64BRAD, cuando estas han sido previamente tratadas con el antagonista específico HOE-140. Este antagonista fue incubado junto con las células 50 segundos antes de que estas fueran expuestas a 200 MOI de BacGP64BRAD.

Lo que nos indican estos dos experimentos, es que al parecer sí estaba interaccionando el péptido bradicinina del baculovirus recombinante BacGP64BRAD con el receptor B2, ya que no solo se observa un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular, sino que además esta respuesta pudo ser abatida con un antagonista específico de receptores B2 como lo es el HOE-140. Sin embargo, al realizar estos mismos experimentos, pero esta vez utilizando el baculovirus control BacGP64GFP, el cual por tener la GFP en lugar del péptido bradicinina fusionado a la proteína GP64, no debería de inducir un aumento en el Ca²⁺ intracelular; lo que se encontró fue lo siguiente:

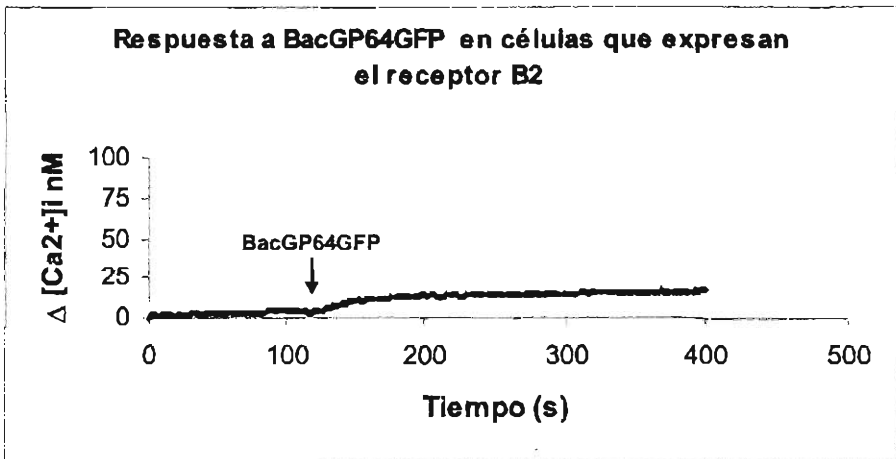


Figura 29. Respuesta encontrada en células que expresan B2 a 200 MOI del BacGP64GFP generado en medio TNM-FH. La flecha indica el momento de adición del baculovirus en prueba.

Como se puede observar, se obtuvo una respuesta con BacGP64GFP (figura 29), lo cual no se esperaba, y aun más, este respuesta también pudo ser abatida con el antagonista HOE-140 (Figura 30). Lo que esto significa, es que algún componente que se encuentra tanto en BacGP64BRAD como en BacGP64GFP estaba interaccionando con el receptor tipo B2 específicamente, aunque no se sabía que era. Lo curioso, es que este componente, sea lo que sea, pudo ser abatida su interacción con B2 utilizando HOE-140, lo cual nos haría pensar que

es algún agonista del receptor B2, pero por que habría de estar presente también en la alicota de BacGP64GFP?

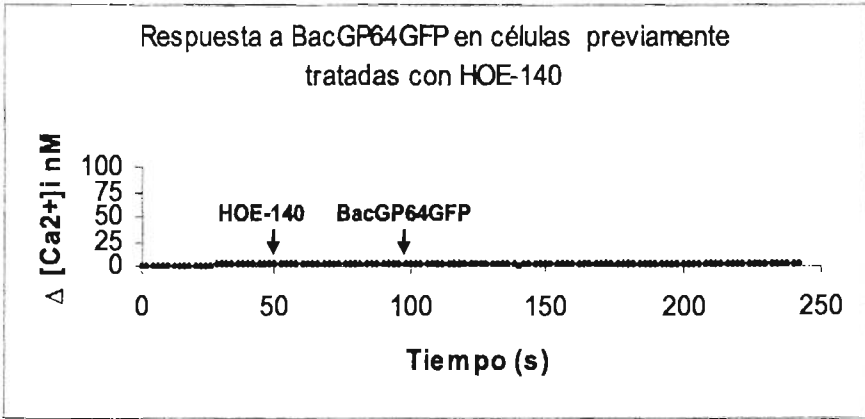


Figura 30. Resposta en células Sf9 que expresan el receptor B2 a BacGP64GFP, previamente tratadas con el antagonista selectivo HOE-140. El antagonista fue adicionado 50 segundos antes de agregarse el baculovirus para permitir su interacción con los receptores B2.

Lo que se realizó, fue hacer un control bastante sencillo utilizando las células que expresan B2 para probar aquello que tenían en común los dos baculovirus: el medio TNM-FH, que es donde habían sido generados. Al inyectar una cantidad en volumen igual a la de los baculovirus probados de medio nuevo, se encontró que las células respondían a este medio (Fig. 31).

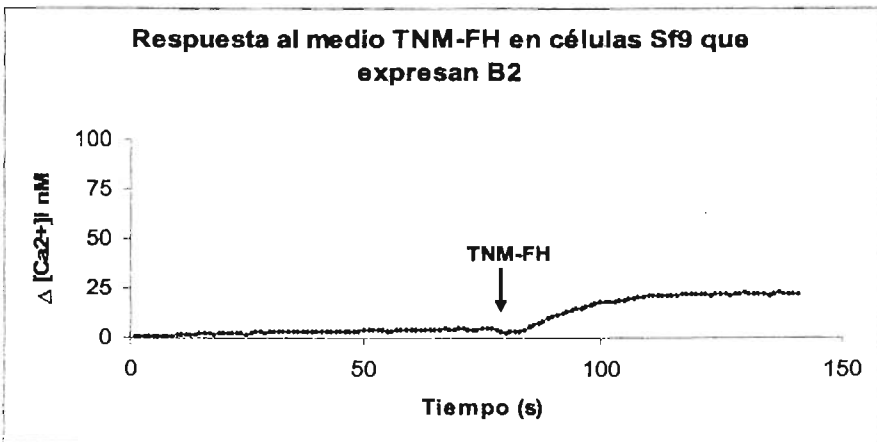


Figura 31. Adición de 50 μ L de TNM-FH a células que expresan el receptor B2. La flecha indica el momento de administración del medio. Este medio nunca había tenido contacto ya sea con células o baculovirus antes de ser adicionado.

Además, la respuesta inducida por este medio en las células de insecto, también podía ser totalmente abatida con HOE-140 (figura 24).

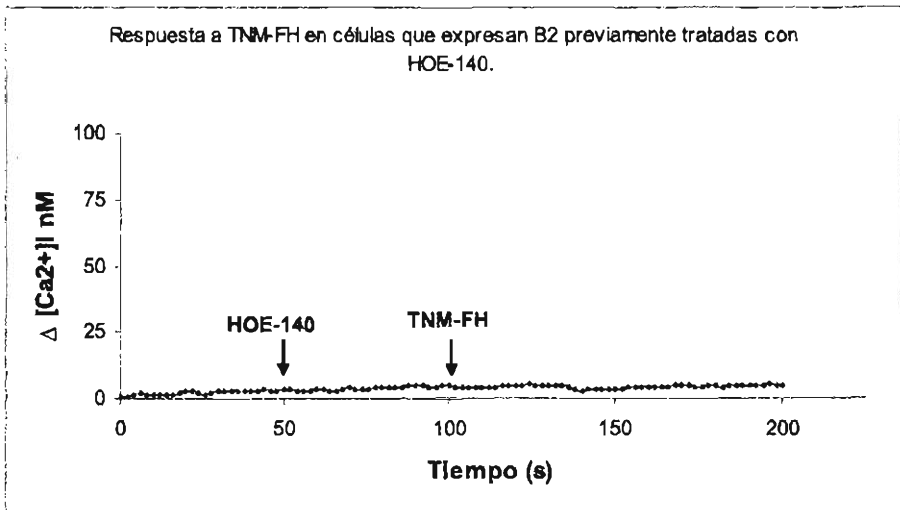


Figura 32. Respuesta a TNM-FH en células que expresan B², previamente tratadas con el antagonista HOE-140. El volumen de TNM-FH adicionado fue de 50 μ L y la concentración de HOE-140 fue 1 μ M al igual que en el resto de los experimentos.

Lo que esto significa es que muy probablemente el medio TNM-FH contenía bradicinina libre en concentraciones suficientes como para ser detectadas. El origen de esta, muy probablemente podría ser el suero fetal bovino con el cual se suplementa el medio, ya que este contiene una gran variedad de hormonas proteicas entre otros tantos componentes. Es de notar que esta bradicinina que esta presente en el suero no se haya degradado completamente al haber estado en contacto durante 8 días con las células, que es el tiempo que se dejan incubando las células infectadas para producir las alicotas virales. En la figura 33 se puede observar una grafica de barras resumiendo todos los pasados experimentos hecho en células que expresan el receptor B2. Como se puede ver, la respuesta obtenida con BacGP64BRAD es apenas la quinta parte de la respuesta obtenida con concentraciones saturantes de bradicinina libre.

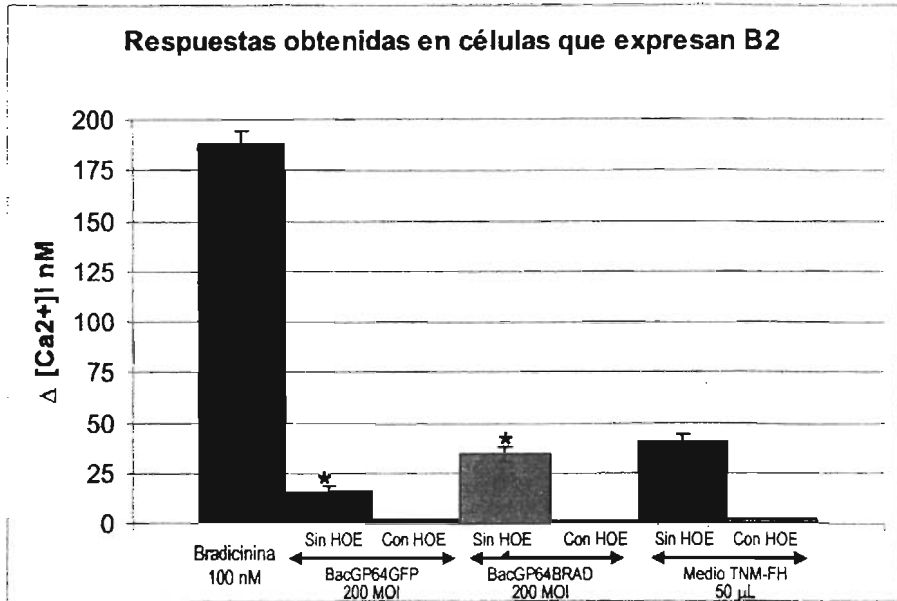


Figura 33. Resumen de las respuestas obtenidas con BacGP64GFP, BacGP64BRAD y el medio TNM-FH en células Sf9 que expresan el receptor B2. Algunos experimentos fueron realizados en la presencia del antagonista selectivo de receptores B2 llamado HOE-140. Todos los experimentos se realizaron por lo menos por quintuplicado.

Al realizar una prueba *t de student* para ver si existía una diferencia significativa entre las respuestas a BacGP64GFP y BacGP64BRAD, se observó que efectivamente sí había una diferencia, siendo mayor la obtenida debido a BacGP64BRAD. Esto resultó interesante, debido a que ambos virus fueron amplificados en el mismo medio, con las mismas condiciones de cultivo, tipo y cantidad de células infectadas, tiempo de incubación, etc. Si ambos baculovirus recombinantes habían sido generados de la misma manera, como se explicaba que la cantidad de bradicinina libre en uno de los lotes virales había sido menos consumida que en el otro, y por lo tanto se observaba esta diferencia significativa en la respuesta.

Lo que se creyó fue que tal vez, la respuesta de BacGP64BRAD era significativamente mayor debido a que era el resultado de dos componentes: la bradicinina libre, que seguramente aun existía en el medio de cultivo, y posiblemente la interacción de BacGP64BRAD. Esta era una hipótesis, y por lo

tanto se trabajó para demostrar si era cierta o no, ya que no se podía descartar que la respuesta a BacGP64BRAD pudiera estar siendo enmascarada por la bradicinina libre del medio remanente del medio TNM-FH.

Para demostrar esta hipótesis, se buscó un medio para células de insecto Sf9 que no necesitara suplementarse con suero fetal bovino, y lo que se halló fue un medio llamado SF900-II, que no solo no tenía que suplementarse con suero fetal bovino, sino que además el producto no contenía ningún tipo de proteína. Mediante este medio, podríamos generar los baculovirus en las mismas células Sf9 en que se había trabajado hasta el momento, pero con la gran ventaja de tener un medio muy probablemente libre de bradicinina libre. De esta forma, cualquier respuesta que se encontrara al utilizar BacGP64BRAD no podría deberse al medio. Al producir las nuevas alicotas virales utilizando el nuevo medio SF900-II, se obtuvieron alicotas virales con títulos virales muy parecidos (alrededor de 10^8 partículas virales por mililitro) a los previamente obtenidos en el medio TNM-FH, por lo tanto se puede decir que este nuevo medio no afecta la amplificación de los baculovirus recombinantes.

Hay que hacer notar que los siguientes experimentos realizados en células Sf9 que expresan B2, aun siguen realizándose en medio TNM-FH, ya que las respuestas obtenidas eran buenas utilizando estas condiciones, así que se decidió no cambiar esto; de tal forma que lo único que cambiara fuera el medio en el cual crecieran las células que produjeran los baculovirus recombinantes.

Lo que se realizó fue hacer experimentos con células Sf9 que expresan B2, y en estas se probó el nuevo medio para poder asegurar que éste por si mismo no inducía respuesta alguna. Lo que se encontró fue que las células no respondían a este nuevo medio como era de esperarse (figura 34).

Una vez que se comprobó que no había respuesta al medio por si mismo, ahora si se realizaron experimentos con ambos baculovirus generados en este nuevo medio

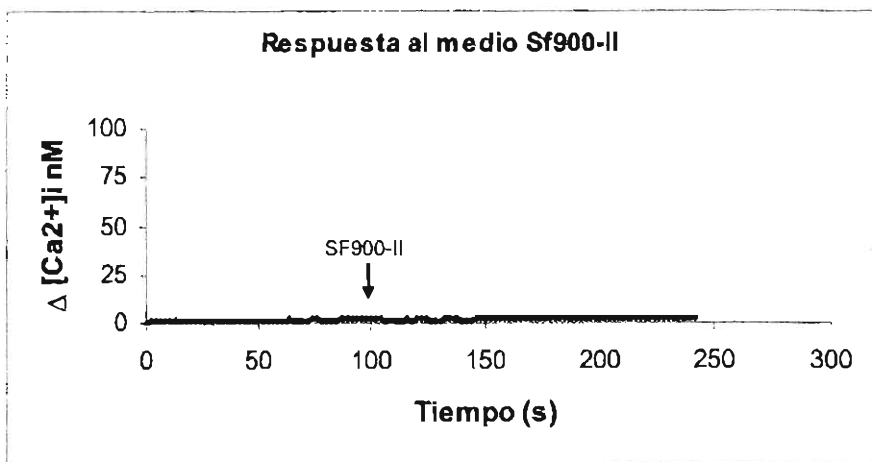


Figura 34. Respuesta al medio SF900-II. Se adicionaron 50 μ L del medio en el momento que indica la flecha negra a células Sf9 que expresan el receptor B2. .

Lo que se encontró fue que esta vez BacGP64BRAD no indujo una respuesta en las células que expresan B2. En la figura 35 se muestra un experimento donde primero se adicionaron 200 MOI de BacGP64BRAD generado en SF900-II, y viendo que no había respuesta, se agregaron en ese mismo experimento otras 200 MOI del mismo baculovirus pero generado en el medio TNM-FH, observándose la respuesta ya conocida. Puesto que la única diferencia entre ambos baculovirus era el medio en el cual habían sido generados, y por lo tanto contenidos, era evidente pensar que toda la respuesta que se había observado con BacGP64BRAD generado en TNM-FH había sido debido al medio, y no al péptido que estaba siendo desplegado en la superficie de los baculovirus.

Un resumen de las respuestas obtenidas en estos últimos experimentos puede observarse en la figura 36. Como se puede observar, al hacer varias repeticiones de este experimento se comprobó que efectivamente, BacGP64BRAD al ser generado en el medio libre de suero no indujo un cambio apreciable en la concentración intracelular de Ca^{2+} de células que expresan B2.

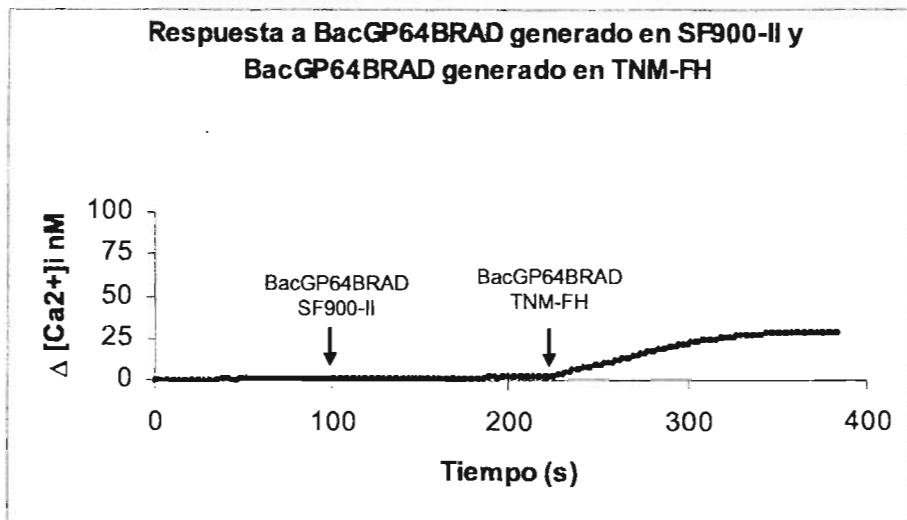


Figura 35. Respuesta a BacGP64BRAD generado en TNM-FH y a BacGP64BRAD generado en SF900-II. Con alrededor de 100 segundos de diferencia, fueron adicionados estos baculovirus; primero 200 MOI del generado en SF900-II y luego 200 MOI del generado en TNM-FH.

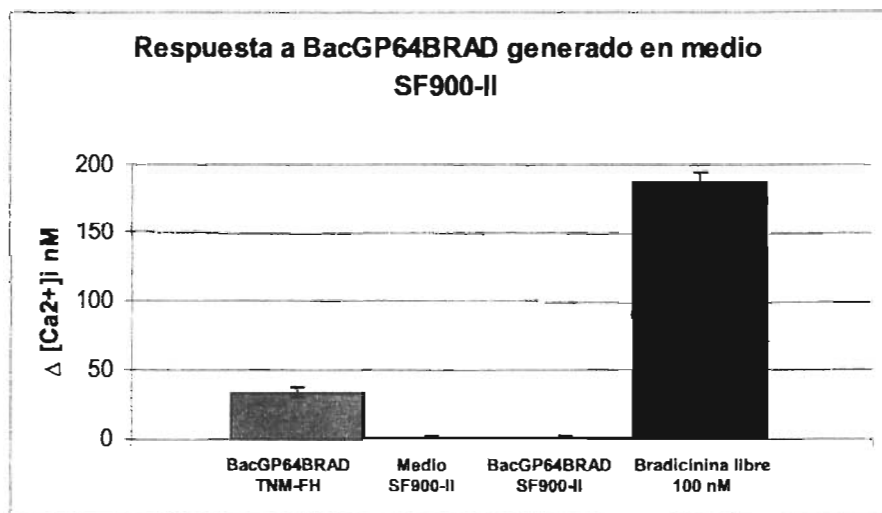


Figura 36. Respuesta al baculovirus BacGP64BRAD generado en el medio SF900-II. En la primera columna se muestra el efecto de 200 MOI de BacGP64BRAD generado en el medio TNM-FH. En la columna de en medio se muestra el efecto de 50 μ L del medio SF900-II y finalmente en la tercera columna se observa el efecto de 200 MOI de BacGP64BRAD generado en SF900-II. Todos los experimentos se realizaron por lo menos por quintuplicado en células que expresan el receptor B2.

Las razones por las cuales el péptido desplegado no interaccionó con su receptor pueden ser varias. Tal vez la más obvia es el impedimento estérico ejercido tanto por la proteína GP64, como por el mismo baculovirus debido a su gran voluminosidad con respecto a la bradiginina, que está constituida por solo nueve aminoácidos. Bien pudo haber sido determinante este factor ya que el sitio de unión del receptor B2 lo conforman tanto residuos extracelulares como residuos transmembranales (Blaukat A., 2003). Estos residuos transmembranales muy probablemente se volvieron menos accesibles al péptido fusionado debido a este impedimento estérico del cual se habla. De hecho, existe en la literatura solo un artículo (Schmidt K *et al.*, 1999) en el cual se trata de conjugar a la bradiginina. En este único artículo la bradiginina fue conjugada a una partícula de oro de 1.4 nm y con esto se realizan estudios de microscopia electrónica para poder determinar la localización de los sitios de unión de este péptido; sin embargo, en ningún momento se hacen ensayos farmacológicos serios como para poder demostrar que efectivamente la bradiginina todavía exhibe sus propiedades farmacológicas, y solo se remiten a las fotos de microscopia electrónica para señalar que el péptido conjugado aun se unía a su receptor.

La existencia de un solo artículo que muestra una conjugación del péptido bradiginina, ya nos hablaba de lo difícil que podría ser desplegar un péptido tan pequeño en la superficie de baculovirus reteniendo sus propiedades.

Otra posible razón de que no se haya detectado la unión ligando-receptor, es que al fusionar bradiginina a la GP64 se pudo haber alterado la estructura tridimensional que necesita para interaccionar específicamente con el receptor. Esto pudo haber ocurrido debido a que simplemente el ambiente químico que rodea al péptido fusionado no es el mismo que cuando se encontraba libre. Por ejemplo, se sabe que la bradiginina libre presenta una vuelta β entre sus residuos 6 y 9, sin este motivo, el receptor B2, y más específicamente su sitio de unión no podría interaccionar específicamente con la bradiginina, es decir, hubiera dejado de existir esa complementariedad electrónica y geométrica que debe de existir para que la unión sea de gran afinidad y específica. Además, hay que recordar que el grupo carboxilo terminal que está presente en la bradiginina libre ya no

esta presente, pues en la bradicinina fusionada se le encuentra formando enlace peptídico con el último aminoácido del extremo amino de la GP64.

Otra posibilidad es que el péptido fusionado si se esté uniendo al receptor, pero debido a los cambios que ha sufrido en su estructura tridimensional, esta unión no dispere el cambio conformacional que requiere el receptor para activar a la proteína G a la cual esta acoplado, y por lo tanto no se dé a lugar la cascada de transducción de señales que termina por inducir el cambio en la concentración de Ca²⁺ intracelular que estuvimos buscando.

También hay que mencionar que los resultados obtenidos en esta tesis, de una u otra manera siguen la tendencia que se ha hallado en trabajos de despliegue de péptidos en adenovirus. Como se ha mencionado, en la superficie de adenovirus se han desplegado distintos péptidos para poder dirigir su entrada de manera específica en las células blanco y en algunos casos se ha logrado con mucho éxito, sin embargo la mayoría de los péptidos probados no tienen actividad al ser desplegados. Lo que ocurre, es que la mayoría de estos péptidos son identificados mediante despliegue de péptidos en la superficie de fagos, sin embargo cuando estos péptidos son fusionados y desplegados en la superficie de adenovirus, estos pierden su actividad: ya no pueden seguir uniéndose con alta afinidad a las células blanco.

Sin embargo, en esta tesis si se pudo desplegar, conservado su actividad biológica, la proteína verde fluorescente. La GFP es una proteína ampliamente utilizada, y precisamente una de las virtudes por las cuales es utilizada es su gran estabilidad. Esta estabilidad se debe en gran parte a la estructura en forma de barril β que envuelve al cromóforo. Es por esta razón que la GFP puede ser manipulada sin que pierda tan fácilmente sus propiedades bio-luminiscentes.

VII Conclusiones

- Se construyó el plásmido *pgp64display*, en el cual puede ser clonado cualquier péptido o proteína para construir rápidamente una proteína de fusión a GP64, y así llevar a cabo su despliegue en superficie de baculovirus.
- Se logro fusionar en marco el péptido bradicinina y la proteína GFP con la proteína viral GP64, para después ser transferidas al plásmido de transferencia *pBlueBac 4.0*
- Se lograron generar los baculovirus recombinantes *BacCMVGFP*, *BacGP64GFP* y *BacGP64BRAD*.
- Los baculovirus con proteínas fusionadas a una segunda copia de la proteína GP64 pudieron ser generados sin comprometer los títulos virales.
- Se demostró mediante microscopía confocal que la proteína de fusión GP64GFP si se encuentra localizada en la membrana de células Sf9 infectadas por el baculovirus *BacGP64GFP*.
- Se logró detectar mediante Western Blot la presencia de la proteína GP64GFP en una muestra compuesta por partículas virales purificadas de *BacGP64GFP*; no así en el caso del baculovirus *BacCMVGFP* como era de esperarse.
- Se observo por primera vez mediante microscopía electrónica que las células de la línea C6 son susceptibles a ser transducidas por baculovirus, como pudo observarse al utilizar *BacCMVGFP*.

- También se demostró que el baculovirus recombinante BacGP64GFP despliega en su envoltura viral la proteína de fusión GP64GFP, y se observó que la GFP conserva sus propiedades bioluminiscentes.
- Se demostró de manera indirecta que la proteína de fusión GP64BRAD es presentada en la superficie del baculovirus recombinante BacGP64BRAD
- Por primera vez fueron tomadas fotografías de un baculovirus que despliegue la GFP al ser incubado en células de mamífero.
- Se comprobó que el baculovirus BacGP64BRAD a 200 MOI no interacciona con el receptor B2 de tal forma que se induzca una liberación de Ca^{2+} de retículo endoplásmico en células de insecto Sf9.

VIII Perspectivas

Es un hecho que el despliegue en la superficie de baculovirus cada día toma más fuerza en el mundo de la ciencia debido al gran número de aplicaciones que puede tener, tales como la producción de vacunas o en el campo de la terapia génica. También es un hecho que debe de seguirse estudiando este sistema viral para poder obtener mayor éxito en el despliegue de las proteínas deseadas, y creo que en el presente trabajo se ha logrado aportar información valiosa para futuros trabajos.

En primer lugar, se debe de comentar que el despliegue funcional de péptidos pequeños como lo es bradicinina siempre va a ser más complicado, debido a que regularmente es afectada su estructura tridimensional al ser fusionado con una proteína grande como lo es la proteína GP64, lo cual puede comprometer las funciones biológicas que originalmente poseía el péptido. Esto no significa que absolutamente todos los péptidos que vayan a ser desplegados perderán sus propiedades, sin embargo si una gran parte. Muy probablemente los mejores resultados del despliegue en superficie de baculovirus serán observados en el despliegue de proteínas complejas de origen eucariótico. Esto es debido a que no se han logrado desplegar con tanto éxito proteínas eucarióticas como se ha logrado con los baculovirus: en bacteriófagos se ha fracasado simplemente por las limitaciones en cuanto a procesamiento se trata de las proteínas a desplegar, mientras que en virus eucarióticos como los adenovirus, el fracaso ha sido debido a que al desplegarse proteínas grandes, las partículas virales pierden la capacidad de ensamblarse y por lo tanto los títulos virales se ven afectados drásticamente.

Otro punto muy importante en el despliegue en superficie de baculovirus, es la elección del promotor que es utilizado para controlar la expresión de la proteína de fusión. En la mayoría de los trabajos reportados hasta el momento incluyendo el presente, se utiliza el promotor viral tardío llamado polihedrina (P_{PH}), sin embargo se ha demostrado que a pesar de que se asegura una expresión muy fuerte al utilizar este promotor, este tiene algunos inconvenientes, como es el hecho de que se generan poblaciones heterogéneas de virus recombinantes; es decir, algunas

partículas virales si adquieren la proteína de fusión mientras que otras no la adquieren o la adquieren en menor cantidad. Esto se debe a que el promotor de polihedrina es un promotor tardío, y como tal se activa alrededor de 36 hrs. después de iniciado el ciclo de infección, sin embargo se sabe que las partículas virales empiezan a brotar de las células de insecto desde la 12 hrs. Lo que provoca este hecho, es que se generen las poblaciones heterogenias de que se ha hablado. La solución en este caso sería utilizar un promotor que fuera activo durante todo el ciclo de infección, desde la etapa muy temprana hasta a tiempos muy tardíos de infección. Entre los promotores de que se han utilizado que cumplen con esta propiedad se encuentra el promotor IE-1, el cual es un promotor que desde tiempos muy tempranos del ciclo de infección se encuentra activo, y se mantiene así durante todo el ciclo de infección; lo cual lo hace un muy buen candidato para dirigir la expresión de nuestras proteínas de fusión.

En suma creo que estos dos son los puntos más importantes que podrían traer mejoras al despliegue de proteínas en la superficie de baculovirus, y que en un futuro podrían ser trascendentales para un exitoso despliegue en la superficie viral de baculovirus.

IX Bibliografía

Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee RD (1994). The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Virology*; 202(2):586-605.

Baca M, Scanlan TS, Stephenson RC, Wells JA (1997) Phage display of a catalytic antibody to optimize affinity for transition-state analog binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16;94(19):10063-8.

Benhar Itai. (2001) Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnological Advances*. 19: 1-33.

Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*; 44(1):1-80.

Blaukat A, Alla SA, Lohse MJ, Muller-Esterl W (1996). Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor from human fibroblasts. *J Biol Chem*. 13;271(50):32366-74.

Blaukat A, Dikic I (2001). Activation of sphingosine kinase by the bradykinin B2 receptor and its implication in regulation of the ERK/MAP kinase pathway. *Biol Chem*; 382(1):135-9.

Blissard GW, Rohrmann GF (1990). Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu Rev Entomol*; 35:127-55.

Blissard GW, Wenz JR (1992). Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J Virol*;66(11):6829-35.

Boublik Y, Di Bonito P, Jones IM (1995). Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the Autographa californica nuclear polyhedrosis

virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Biotechnology (N Y)*;13(10):1079-84.

Boyce FM, Bucher NL (1996). Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*;19;93(6):2348-52.

Buchli PJ, Wu Z, Ciardelli TL. (1997) The functional display of interleukin-2 on filamentous phage. *Arch Biochem Biophys.* 339(1):79-84.

Charlton CA, Volkman LE (1993). Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology*; 197(1):245-54.

Cirielli C, Serino F, Straino S, Toietta G, Abeni D, Ventoruzzo G, Orlando G, Mazzanti P, Melillo G, Whickham TJ, Kovesdi I, Biglioli P, Gaetano C, Capogrossi MC (2004). Adenovirus vectors targeting alphaV integrin or heparan sulfate receptors display different distribution of transgene activity after intramuscular injection. *J Gene Med*;6(3):309-16.

Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*;173(1 Spec No):33-8.

Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol.* 19;429(1-3):161-76.

Dmitriev IP, Kashentseva EA, Curiel DT (2002). Engineering of adenovirus vectors containing heterologous peptide sequences in the C terminus of capsid protein IX. *J Virol.*;76(14):6893-9.

Ernst WJ, Spenger A, Toellner L, Katinger H, Grabherr RM (2000). Expanding baculovirus surface display. Modification of the native coat protein gp64 of *Autographa californica* NPV. *Eur J Biochem*;267(13):4033-9.

de Weerd WF, Leeb-Lundberg LM (1997). Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 11;272(28):17858-66.

Dray A, Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain (1993). *Trends Neurosci.* 16(3):99-104.

Duisit G, Saleun S, Douthe S, Barsoum J, Chadeuf G, Moullier P (1999). Baculovirus vector requires electrostatic interactions including heparan sulfate for efficient gene transfer in mammalian cells. *J Gene Med*;1(2):93-102.

Facciabene A, Aurisicchio L, La Monica N. (2004) Baculovirus vectors elicit antigen-specific immune responses in mice. *Journal of Virology.* 78(16):8663-8672.

Farmer SG, Burch RM (1992). Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*;32:511-36.

Fathy DB, Mathis SA, Leeb T, Leeb-Lundberg LM (1998). A single position in the third transmembrane domains of the human B1 and B2 bradykinin receptors is adjacent to and discriminates between the C-terminal residues of subtype-selective ligands. *J Biol Chem*; 273(20):12210-8.

Federici BA, Hice RH (1997). Organization and molecular characterization of genes in the polyhedrin region of the *Anagrapha falcifera* multinucleocapsid NPV. *Arch Virol*;142(2):333-48.

Fujii I, Fukuyama S, Iwabuchi Y, Tanimura R. (1998) Evolving catalytic antibodies in a phage-displayed combinatorial library. *Nat Biotechnol.* 16(5):463-7.

Grabherr R, Emst W, Oker-Blom C, Jones I (2001). Developments in the use of baculoviruses for the surface display of complex eukaryotic proteins. *Trends Biotechnol*;19(6):231-6.

Gram H, Strittmatter U, Lorenz M, Gluk D, Zenke G. (1993) Phage display as a rapid gene expression system: production of bioactive cytokine-phage and generation of neutralizing monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*. 161(2):169-76.

Griffiths AD y Duncan AR, (1998) Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr Opin Biotechnol*. 9(1):102-8.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*; 260(6):3440-50.

Guarino LA, Xu B, Jin J, Dong W (1998). A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. *J Virol*;72(10):7985-91.

Hall JM (1997). Bradykinin receptors. *Gen Pharmacol*, 28(1):1-6.

Hefferon KL, Oomens AG, Monsma SA, Finnerty CM, Blissard GW (1999). Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology*. 5;258(2):455-68.

Herzig MC, Leeb-Lundberg LM (1995). The agonist binding site on the bovine bradykinin B2 receptor is adjacent to a sulfhydryl and is differentiated from the antagonist binding site by chemical cross-linking. *J Biol Chem*. 1;270(35):20591-8.

Herzig MC, Nash NR, Connolly M, Kyle DJ, Leeb-Lundberg LM (1996). The N terminus of bradykinin when bound to the human bradykinin B2 receptor is adjacent to extracellular Cys20 and Cys277 in the receptor. *J Biol Chem*; 271(47):29746-51.

Hofmann C, Sandig V, Jennings G, Rudolph M, Schlag P, Strauss M (1995). Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*;92(22):10099-103.

Horton HM, Burand JP (1993). Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *J Virol*;67(4):1860-8.

Huang W, Petrosino J, Palzkill T. (1998) Display of functional beta-lactamase inhibitory protein on the surface of M13 bacteriophage. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(11):2893-7.

Isalan M, Klug A, Choo Y. (1998) Comprehensive DNA recognition through concerted interactions from adjacent zinc fingers. *Biochemistry.* 37(35):12026-33.

Jarnagin K, Bhakta S, Zuppan P, Yee C, Ho T, Phan T, Tahilramani R, Pease JH, Miller A, Freedman R (1996). Mutations in the B2 bradykinin receptor reveal a different pattern of contacts for peptidic agonists and peptidic antagonists. *J Biol Chem*; 271(45):28277-86.

Jarvis DL (2003). Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. *Virology*; 25;310(1):1-7.

Kalatskaya I, Schussler S, Blaukat A, Muller-Esterl W, Jochum M, Proud D, Faussner A (2004). Mutation of tyrosine in the conserved NPXXY sequence leads to constitutive phosphorylation and internalization, but not signaling, of the human B2 bradykinin receptor. *J Biol Chem.* 23;279(30):31268-76.

Keddie BA, Aponte GW, Volkman LE (1989). The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science* 31;243(4899):1728-30.

Kingsley DH, Behbahani A, Rashtian A, Blissard GW, Zimmerberg J (1999). A discrete stage of baculovirus GP64-mediated membrane fusion. *Mol Biol Cell.*10(12):4191-200.

Kost TA, Condreay JP (2002). Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol*;20(4):173-80.

Kuzio J, Jaques R, Faulkner P (1989). Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology*; 173(2):759-63.

Lanier LM, Volkman LE (1998). Actin binding and nucleation by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. *Virology*;243(1):167-77.

Leeb T, Mathis SA, Leeb-Lundberg LM (1997). The sixth transmembrane domains of the human B1 and B2 bradykinin receptors are structurally compatible and involved in discriminating between subtype-selective agonists. *J Biol Chem*; 272(1):311-7.

Lindley KM, Su JL, Hodges PK, Wisely GB, Bledsoe RK, Condreay JP, Winegar DA, Hutchins JT, Kost TA (2000). Production of monoclonal antibodies using recombinant baculovirus displaying gp64-fusion proteins. *J Immunol Methods*;3;234(1-2):123-35.

Lowman HB, Bass SH, Simpson N, Wells JA. (1991) Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry*. 30(45):10832-8.

McClintock JT, Guzo D, Guthrie KP, Dougherty EM (1991). DNA-Binding proteins of baculovirus-infected cells during permissive and semipermissive replication. *Virus Res*;20(2):133-45.

Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess JF (1994). Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem* 26;269(34):21583-6.

Mercier GT, Campbell JA, Chappell JD, Stehle T, Dermody TS, Barry MA (2004). A chimeric adenovirus vector encoding reovirus attachment protein sigma1 targets

cells expressing junctional adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA*;101(16):6188-93

Meulenbroek RA, Sargent KL, Lunde J, Jasmin BJ, Parks RJ (2004). Use of adenovirus protein IX (pIX) to display large polypeptides on the virion--generation of fluorescent virus through the incorporation of pIX-GFP. *Mol Ther*; 9(4):617-24.

Moscardi F (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu Rev Entomol*; 44:257-89.

Mottershead D, van der Linden I, von Bonsdorff CH, Keinanen K, Oker-Blom C (1997). Baculoviral display of the green fluorescent protein and rubella virus envelope proteins. *Biochem Biophys Res Commun*;238(3):717-22.

Munoz CM, Leeb-Lundberg LM (1992). Receptor-mediated internalization of bradykinin. DDT1 MF-2 smooth muscle cells process internalized bradykinin via multiple degradative pathways. *J Biol Chem*. 5;267(1):303-9.

Munoz CM, Cotecchia S, Leeb-Lundberg LM (1993). B2 kinin receptor-mediated internalization of bradykinin in DDT1 MF-2 smooth muscle cells is paralleled by sequestration of the occupied receptors. *Arch Biochem Biophys*; 301(2):336-44.

Nardone J, Hogan PG (1994). Delineation of a region in the B2 bradykinin receptor that is essential for high-affinity agonist binding. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91(10):4417-21.

Nicklin SA, White SJ, Nicol CG, Von Seggern DJ, Baker AH. (2004) In vitro and in vivo characterisation of endothelial cell selective adenoviral vectors. *J Gene Med*. 6(3):300-8

Nicklin SA, Dishart KL, Buening H, Reynolds PN, Hallek M, Nemerow GR, Von Seggern DJ, Baker AH. (2003) Transductional and transcriptional targeting of

cancer cells using genetically engineered viral vectors. *Cancer Lett.* 201(2):165-73.

Nishimura T, Favre D, Durrenberger M, Michel MR, Ichihara I, Koblet H (1994). Nuclear export of recombinant baculovirus nucleocapsids through small pore or nuclear-pore-like structure in Sf9 cells. *Okajimas Folia Anat Jpn*;71(2-3):83-97.

Nishizuka Y (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*;258(5082):607-14.

Ojala K, Mottershead DG, Suokko A, Oker-Blom C (2001). Specific binding of baculoviruses displaying gp64 fusion proteins to mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*;284(3):777-84.

Oker-Blom C, Airene KJ, Grabherr R (2003). Baculovirus display strategies: Emerging tools for eukaryotic libraries and gene delivery. *Brief Funct Genomic Proteomic*;2(3):244-53.

Oomens AG, Blissard GW (1999). Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology* 15;254(2): 297-314.

Oomens AG, Monsma SA, Blissard GW (1995). The baculovirus GP64 envelope fusion protein: synthesis, oligomerization, and processing. *Virology* 1;209(2):592-603.

Pedersen H, Holder S, Sutherlin PD, Schwitter U, King DS, Schultz PG. (1998) A method for directed evolution and functional cloning of enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(18):10523-8.

Perabo L, Buning H, Kofler DM, Ried MU, Girod A, Wendtner CM, Enssle J, Hallek M. (2003) In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display. *Mol Ther.* 8(1):151-7.

Pierce HH, Adey N, Kay BK. (1996) Identification of cyclized calmodulin antagonists from a phage display random peptide library. *Mol Divers*;1(4):259-65.

Pizard A, Blaukat A, Muller-Esterl W, Alhenc-Gelas F, Rajerison RM (1999). Bradykinin-induced internalization of the human B2 receptor requires phosphorylation of three serine and two threonine residues at its carboxyl tail. *J Biol Chem.* 30;274(18):12738-47.

Plonsky I, Cho MS, Oomens AG, Blissard G, Zimmerberg J (1999). An analysis of the role of the target membrane on the Gp64-induced fusion pore. *Virology.* 5;253(1):65-76.

Rahman MM, Shaila MS, Gopinathan KP (2003). Baculovirus display of fusion protein of Peste des petits ruminants virus and hemagglutination protein of Rinderpest virus and immunogenicity of the displayed proteins in mouse model. *Virology*;5;317(1):36-49.

Regoli D, Barabe J (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev*;32(1):1-46.

Reyes-Cruz G, Vazquez-Prado J, Muller-Esterl W, Vaca L (2000). Regulation of the human bradykinin B2 receptor expressed in sf21 insect cells: a possible role for tyrosine kinases. *J Cell Biochem*; 76(4):658-73.

Reynolds PN, Nicklin SA, Kaliberova L, Boatman BG, Grizzle WE, Balyasnikova IV, Baker AH, Danilov SM, Curiel DT. (2001) Combined transductional and transcriptional targeting improves the specificity of transgene expression in vivo. *Nat Biotechnol.* 19(9):838-42.

Rodems SM, Pullen SS, Friesen PD (1997). DNA-dependent transregulation by IE1 of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus: IE1 domains required for transactivation and DNA binding. *Rodems. J Virol*;71(12):9270-7.

Sahu A, Kay BK, Lambris JD. (1996) Inhibition of human complement by a C3-binding peptide isolated from a phage-displayed random peptide library. *J Immunol.* 15;157(2):884-91. J

Schmidt K, Segond von Banchet G, Heppelmann B (1999). Labelling of peptides with 1.4-nm gold particles to demonstrate their binding sites in the rat spinal cord. *Neurosci Methods*; 87(2):195-200

Spenger A, Grabherr R, Tollner L, Katinger H, Ernst W (2002). Altering the surface properties of baculovirus *Autographa californica* NPV by insertional mutagenesis of the envelope protein gp64. *Eur J Biochem*; 269(18):4458-67.

Steranka LR, Manning DC, DeHaas CJ, Ferkany JW, Borosky SA, Connor JR, Vavrek RJ, Stewart JM, Snyder SH (1988). Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc Natl Acad Sci USA*;85(9):3245-9.

Stewart JM (2004). Bradykinin antagonists: discovery and development. *Peptides*; 25(3):527-32.

Tani H, Nishijima M, Ushijima H, Miyamura T, Matsuura Y (2001). Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. *Virology*; 5;279(1):343-53.

Valdes VJ, Sampieri A, Sepulveda J, Vaca L (2003). Using double-stranded RNA to prevent in vitro and in vivo viral infections by recombinant baculovirus. *J Biol Chem*; 278(21):19317-24.

van Loo ND, Fortunati E, Ehler E, Rabelink M, Grosveld F, Scholte BJ (2001). Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *J Virol*; 75(2):961-70.

Vialard JE, Arif BM, Richardson CD (1995). Introduction to the molecular biology of baculoviruses. *Methods Mol Biol*; 39:1-24.

Wang Y, Rubtsov A, Heiser R, White J, Crawford F, Marrack P, Kappler JW (2005). Using a baculovirus display library to identify MHC class I mimotopes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(7):2476-81.

Yoshida S, Kondoh D, Arai E, Matsuoka H, Seki C, Tanaka T, Okada M, Ishii A (2003). Baculovirus virions displaying *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein protect mice against malaria sporozoite infection. *Virology* 10;316(1):161-70.

Zimmer M (2002). Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev*; 102(3):759-81.