



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“GENERACIÓN DE BACULOVIRUS MODIFICADOS PARA
LA TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO DE
FORMA SELECTIVA EN CÉLULAS DE MAMÍFERO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Q.F.B. AGUSTÍN LUZ MADRIGAL

Tutor: DR. LUIS VACA DOMÍNGUEZ

MÉXICO, D. F.

Noviembre 2008



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.

CONTENIDO

	Pág.
RECONOCIMIENTOS	1
AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIATURAS Y SUS TRADUCCIONES	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
I. ANTECEDENTES	11
1. Baculovirus	11
1.1 La familia <i>baculoviridae</i>	11
1.2 Estructura genómica	16
1.3 Fenotipos y características estructurales de los baculovirus	17
1.4 Programa temporal de transcripción	27
1.5 Ciclo de infección	29
2. Baculovirus recombinantes como vectores de liberación génica en células de mamífero	34
2.1 Transducción <i>in vitro</i> de células de mamífero	34
2.2 Transcripción de genes virales en células de mamífero	36
2.3 Importancia de la proteína Gp64 en la transducción mediada por baculovirus	38
2.4 Moléculas que permiten la internalización de los baculovirus en las células de mamífero	39
2.5 Escape del endosoma y tráfico sub-celular	42
2.6 Efectos del promotor en la eficiencia de transducción	45
2.7 Modificación de los baculovirus para aumentar la eficiencia de transducción	46
2.8 Transducción <i>in vivo</i> mediante baculovirus recombinantes	47
3. Transferencia de material genético en sistema vascular	50
4. Transferencia de material genético en sistema nervioso central	52
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	56
III. HIPÓTESIS	57
IV. OBJETIVO GENERAL	57
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	58
Células y cultivo	58
Construcción de los plásmidos	58
Producción de los baculovirus recombinantes	59

	Pág.
Experimentos de transducción	60
Citometría de flujo	60
Transfecciones transitorias	60
Actividad <i>in situ</i> de la β -galactosidasa	61
Transducción <i>in vivo</i> en el endotelio vascular de la retina	61
Inmunofluorescencia	61
Microscopia confocal y deconvolución de las imágenes	62
VII. RESULTADOS	63
Susceptibilidad de transducción en células de mamífero mediante baculovirus recombinantes	63
Expresión tejido-específica en células endoteliales mediante baculovirus recombinantes que contienen el promotor de <i>flt-1</i>	66
Expresión tejido-específica en las células C6 y CH235 mediante baculovirus recombinantes que contienen el promotor de <i>gfap</i>	69
Efecto de inhibidores de HDACS en la expresión dirigida por los promotores de <i>flt-1</i> y <i>gfap</i>	72
Transducción específica en el endotelio vascular de la retina de rata mediante baculovirus recombinantes	75
VIII. DISCUSIÓN	78
IX. CONCLUSIONES	86
X. PERSPECTIVAS	87
XI. REFERENCIAS	89
XII. ANEXOS	112
1. Diagrama de flujo de la construcción y mapas de los plásmidos generados en este estudio	112
2. Producción de baculovirus recombinantes	116
3. Ensayo en placa	117
4. Purificación de ADN genómico viral	119
5. Concentración de baculovirus recombinantes por gradientes de sacarosa	121
6. In vivo transcriptional targeting into the retinal vasculature using recombinant baculovirus carrying the human <i>flt-1</i> promoter	123

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Luis Vaca Domínguez en el laboratorio 126 Nte, del departamento de Biología Celular en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El Comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Luis Vaca Domínguez
Instituto del Fisiología Celular, UNAM

Dr. Luis Padilla Noriega
Instituto del Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Karen Manoutcharian Airapetian
Instituto del Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular en donde se realizó el análisis por microscopía confocal. Dra. Araceli Patrón y al Biol. Gabriel Orozco Hoyuela.

Se agradece la colaboración de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular en donde se llevó a cabo el análisis por citometría de flujo y de secuenciación.

Se reconoce la asesoría de la Dra. Carmen Clapp Jiménez y del Dr. Jorge Aranda en los experimentos de transducción *in vivo* en el endotelio vascular de la retina.

Se agradecen las siguientes donaciones:

Plásmido *pgfa2-nlacZ* al Dr. José Segovia del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Plásmido p(-748/+284) al Dr. Andrew Baker y Dr. Stuart Nicklin de la Universidad de Glasgow, BHF Glasgow Cardiovascular Research Centre, UK.

La línea celular endotelial de aorta de bovino BUVEC-E6E7-1, a la Dra. Carmen Clapp Jiménez y

La línea celular de glioma humano CH235 al Dr. Andrés Gutiérrez de la Unidad de Ingeniería de Tejidos y Terapia Celular del Instituto Nacional de Rehabilitación de la Secretaría de Salud.

Se reconoce el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, No. Registro 169909) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM, por las becas otorgadas a A.L.M. para realizar los estudios de doctorado. Así como al programa de fomento a la graduación de alumnos de posgrado de la UNAM. El proyecto fue apoyado parcialmente por el CONACyT (D42469) y DGAPA PAPIIT (IN204406).

EL JURADO DE EXAMEN DOCTORAL ESTUVO CONSTITUIDO POR:

- Presidente: Dr. Carlos Federico Arias Ortiz
Instituto de Biotecnología, UNAM
- Vocal: Dra. Imelda López Villaseñor
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
- Vocal: Dr. Félix Recillas Targa
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
- Vocal: Dr. José Luis Puente García
Instituto de Biotecnología, UNAM
- Secretario: Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
- Suplente: Dr. Fernando López Casillas
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
- Suplente: Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

A Mi pequeño

Pablo Luz Grajales

A mi esposa Erika Grajales Esquivel

Gracias por estar conmigo siempre, incluso en los momentos difíciles

En memoria de un gran amigo

Q. Fabián Joaquín Urbina García†

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Isaura Madrigal y Agustín Luz por el incansable apoyo incondicional que siempre me han dado.

A mis hermanos Lupita, Leonel y Erick, y ahora Rafa, por la gran confianza que siempre han tenido en mi.

A las familias Grajales-Esquivel, Martínez-Grajales y Hernández-Grajales por su gran apoyo de siempre.

Al Dr. Luis Vaca Domínguez, por permitirme formar parte de su laboratorio, por su apoyo, confianza y paciencia, y por ser además de mi tutor, un excelente amigo.

Al Dr. Félix Recillas Targa, por sus comentarios, críticas y sugerencias siempre tan acertadas.

A mi comité tutorial, Dr. Luis Padilla Noriega y al Dr. Karen Manoutcharian por sus valiosas críticas y aportaciones a este trabajo.

En general a los miembros del jurado por sus comentarios y sugerencias para la conclusión de esta tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Alicia, Mariana Ruíz, Mariana Ramos, Laura, Cecilia, Inés, Israel, Josué, Benito, Julian y Poncho.

A la Sra. Salus y Gloria Salgado por toda su ayuda en el laboratorio.

A las personas con las cuales he compartido además de la crítica constructiva de la ciencia, una gran amistad, Viviana, Selene, Julian, Poncho, Héctor, Inti, Mayra, Ernesto y Abraham,.

A los amigos y vecinos del laboratorio 122 Nte.

A la Dra. Araceli Patrón y al Biol. Gabriel Orozco Hoyuela y en general a la Unidad de Microscopía del IFC.

Y aunque no están todos los que son..., si son todos los que están.

*En este laboratorio no solo se hacen manos..
se hacen alumnos que puedan pensar por si mismos para resolver cualquier problema al que se
enfrenten en la ciencia.*

Dr. Luis Vaca Domínguez
Investigador del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

*Los alumnos buenos no llegan solos, se hacen con el trabajo diario en el laboratorio y es un trabajo
conjunto entre el investigador y el alumno.*

Dr. Félix Recillas Targa
Investigador del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

ABREVIATURAS Y SUS TRADUCCIONES

a.a.	Aminoácido
AAV	Adeno-associated virus (Virus adeno asociado)
AcMNPV	<i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>
Ad	Adenovirus
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AzaC	5'-Azacitidina
BmNPV	<i>Bombix mori nucleopolyhedrovirus</i>
ButNa	Butirato de sodio
BV	Budded virion (Viri3n libre)
CMV	Citomegalovirus
CVF	Cobra venom factor (Factor del veneno de cobra)
DAF	Decay-accelerating factor (Factor acelerador de la degradaci3n)
GCL	Ganglion cell layer (Capa de c3lulas ganglionares)
GFAP	Glial fibrillary acidic protein (Prote3na fibrilar 3cida de la glia)
GFP	Green fluorescent protein (Prote3na verde fluorescente)
GVs	<i>Granulovirus</i>
HDACs	Histone deacetylases (Desacetilasas de histonas)
hpi	Horas post-infecci3n
hpt	Horas post-transducci3n
hr	Homologous regions (Regiones hom3logas)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Comit3 Internacional en Taxonom3a de Virus)
ILM	Inner limiting membrane (Membrana limitante interna)
IMF	Intensidad media de fluorescencia
ITRs	Inverted terminal repeats (Terminales invertidas repetidas)
kb	kilo bases
kDa	kilo Daltones
Lef, <i>lef</i>	Late expression factors (factores de expresi3n tard3a)
Luc	Luciferasa
MNPV	Multiple <i>Nucleopolyhedrovirus</i>
MOI	Multiplicity of infection (Multiplicidades de infecci3n)
NC, NCs	Nucleocapsid (Nucleoc3pside)
NPVs	<i>Nucleopolyhedrovirus</i>
OBs	Occlusion bodies (Cuerpos de oclusi3n)
ODV	Occlusion-derived virions (Virus derivado de los cuerpos de oclusi3n)
ORF	Open reading frame (Marco de lectura abierta)
pb	Pares de bases
PDV	Polyhedra-derived virions (Virus derivado de la polihedra)
PEP	Polyhedral envelope protein (Prote3na de la envoltura de la polihedra)
Ph	Polyhedra (Polihedra)
rpm	Revoluciones por minuto
RSV	Rous Sarcoma Virus (Virus del sarcoma de Rous)
SNC	Sistema nervioso central
SNPV	Single <i>Nucleopolyhedrovirus</i>
SV	Sistema vascular
TSA	Tricostatina A
UFP	Unidades formadoras de placa
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Factor de crecimiento endotelial vascular)
VLPs	Virus-like particles (Part3culas similares a part3culas virales)
VS VG	Vesicular stomatitis virus G protein (Prote3na G del virus de estomatitis vesicular)
vWF	Von Willebrand factor (Factor de von Willebrand)

RESUMEN

Recientemente, se ha demostrado que los baculovirus recombinantes principalmente aquellos derivados del baculovirus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), pueden transferir genes para su expresión en células de mamífero. A la fecha, existe poca información concerniente al uso de promotores tejido-específicos en el contexto del genoma del baculovirus. En este trabajo, hemos producido los baculovirus recombinantes BacFlt-GFP y BacGfap-GFP con la finalidad de restringir la expresión génica en células endoteliales y astrocitos, respectivamente. BacFlt-GFP contiene la secuencia promotora del gen *flt-1* que codifica para el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, el cual dirige una expresión específica en células endoteliales. Por otro lado, BacGfap-GFP contiene la secuencia promotora del gen *gfap* que codifica para la proteína fibrilar ácida de la glia y que dirige una expresión específica en astrocitos. Además, generamos el baculovirus recombinante BacCMV-GFP el cual contiene la secuencia del enhancer y el promotor temprano del citomegalovirus, con la finalidad de comparar la selectividad y los niveles de expresión mediados por BacFlt-GFP y BacGfap-GFP. La especificidad y los niveles de expresión mediados por los diferentes baculovirus recombinantes, fueron evaluados mediante citometría de flujo utilizando la proteína verde fluorescente (GFP, green fluorescent protein) como reportero. Todas las líneas celulares utilizadas fueron susceptibles de ser transducidas por BacCMV-GFP, la más susceptible fue la línea celular de hepatoma humano HepG2 (89.2 %, $n=4$). Las células endoteliales BUVEC-E6E7-1 tuvieron los niveles más altos de expresión al ser transducidas por BacFlt-GFP y fueron similares a los niveles alcanzados por BacCMV-GFP (112 % relativo a BacCMV-GFP, $n=4$). Interesantemente, BacFlt-GFP dirigió altos niveles de expresión en las líneas celulares de glioma de rata C6 y de glioblastoma humano CH235 (34.78 % y 47.86 % relativo a BacCMV-GFP, respectivamente, $n=4$). Por otro lado, BacGfap-GFP dirigió los niveles más altos de expresión en las líneas celulares C6 y CH235 (30.62 % y 35.13 % relativo a BacCMV-GFP, $n=4$). Los inhibidores de desacetilasas de histonas tales como la tricostatina A (TSA) y butirato de sodio (ButNa), pero no el inhibidor de la metilación del ADN, 5-azacitidina (AzaC), promovieron un aumento de la actividad transcripcional de BacCMV-GFP, BacFlt-GFP y BacGfap-GFP en términos del número de células GFP+ y la intensidad media de fluorescencia. La especificidad de la expresión *in vivo* fue demostrada en el endotelio vascular de la retina, mediante la inyección intravítrea de BacFlt-GFP en el ojo de ratas adultas. El análisis mediante microscopia de fluorescencia demostró que la mayoría de las células GFP+, se encontraron casi exclusivamente en la membrana limitante interna (ILM, inner limiting membrane) así como en la capa que corresponde a las células ganglionares (GCL, ganglion cell layer). Más aun, mediante inmunofluorescencia contra el factor de von Willebrand (vWF, von Willebrand Factor) y microscopia confocal, se demostró que una gran número (70 %, $n=10$) de células GFP+

colocalizaron con vWF en estructuras similares a vasos sanguíneos, demostrando de esta manera el fenotipo endotelial de las células transducidas. Estos resultados indican que la desacetilación de las histonas juega un papel clave en el mecanismo de silenciamiento del transgen y que la especificidad de la expresión dirigida por los promotores de *flt-1* y *gfap*, no se afecta por el contexto del genoma viral. Finalmente, este trabajo sugiere la posibilidad de utilizar baculovirus recombinantes para dirigir la expresión de un transgen *in vivo* en el endotelio vascular de la retina.

ABSTRACT

The insect baculovirus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV)-based vectors, have recently been introduced as a new type of delivery vehicle for transgene expression in mammalian cells. However, there is little information available concerning the use of tissue-specific promoters in the context of the baculovirus genome. In the present study, we have generated recombinant baculovirus containing the human Flt-1 (BacFlt-GFP) or the human glial fibrillary acidic protein (GFAP) promoters (BacGfap-GFP) to restrict gene expression to endothelial cells and astrocytes, respectively. We also generated a recombinant baculovirus containing the cytomegalovirus immediately-early promoter/enhancer (BacCMV-GFP), to compare the selectivity and the levels of expression with BacFlt-GFP and BacGfap-GFP. All cell lines tested were susceptible to transduction mediated by BacCMV-GFP, being the most susceptible the human hepatoma cells HepG2 (89.2 %, $n=4$). BacFlt-GFP evoked the highest level of expression in the endothelial cell line BUVEC-E6E7-1, similar to those reached by BacCMV-GFP (112 % relative to BacCMV-GFP, $n=4$). Interestingly, BacFlt-GFP directed high levels of expression in rat glioma C6 and in human glioblastoma CH235 cells (34.78 and 47.86 % relative to BacCMV-GFP, respectively). BacGfap-GFP evoked the highest level of expression in C6 and CH235 cell lines (30.62 and 35.13 % relative to BacCMV-GFP, $n=4$). In all cases (BacCMV-GFP, BacFlt-GFP and BacGfap-GFP-transduction), histone deacetylase inhibitors such as butyrate or trichostatin A (TSA), but not the DNA methylation inhibitor, 5-azacytidine (AzaC), increased the level of expression in terms of the number of GFP-expressing cells and the intensity of fluorescence. Suggesting that histone deacetylation seems to influence the transgene expression in the context of the baculovirus genome. *In vivo* transcriptional targeting was demonstrated in adult rat retinal vasculature by intravitreal delivery of BacFlt-GFP and immunohistochemical staining with von Willebrand factor (vWF). Analysis by fluorescence microscopy and deconvolved three-dimensional confocal microscopy of retinal whole mounts obtained after 3 days of baculovirus injection showed that most GFP-expressing cells localized to inner limiting membrane (ILM) and ganglion cell layer (GCL) and localize with vWF (70 %, $n=10$) in blood vessels, confirming the endothelial phenotype of the transduced cells. Taken together, our results indicate that the specific gene expression mediated by Flt-1 and GFAP promoters is maintained in the context of the baculovirus genome. We also demonstrated for the first time, the potential of using recombinant baculovirus for transcriptional targeted gene expression into the eye vasculature.

I. ANTECEDENTES

1. Baculovirus

1.1 La familia *Baculoviridae*

Los baculovirus son virus envueltos en una bicapa lipídica que contienen un genoma de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 80 a 180 kilo bases (kb) (Smith y Summers, 1978; Schafer *et al.*, 1979; Blissard y Rohrmann, 1990; van Oers y Vlak, 2007). Dichos virus pertenecen a la familia *Baculoviridae* y actualmente se han descrito más de 500 especies de baculovirus obtenidas de más de 600 especies de insectos (Blissard y Rohrmann, 1990; van Oers y Vlak, 2007). Los baculovirus infectan exclusivamente artrópodos del orden *Lepidoptera* (mariposas y larvas), *Hymenoptera* (moscas) y *Diptera* (moscas y mosquitos) así como algunos crustáceos del orden *Decapoda* (camarones) (Couch, 1974; Blissard y Rohrmann, 1990; Herniou *et al.*, 2003; van Oers y Vlak, 2007). Por otro lado, existen especies de baculovirus capaces de infectar insectos del orden *Coleoptera*, *Neuroptera*, *Thysanura* y *Trichoptera*; sin embargo, aun no existe una caracterización molecular de tales baculovirus (Herniou *et al.*, 2003; van Oers y Vlak, 2007).

La familia *Baculoviridae* se encuentra clasificada en dos géneros según el sexto reporte del Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses), los *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) y los *Granulovirus* (GVs) (Jehle *et al.*, 2006). La clasificación toma como base las características estructurales de los cuerpos formados por una matriz proteica denominados cuerpos de oclusión (OBs, occlusion bodies) o polihedra (Summers y Smith, 1975). Los OBs están formados principalmente por una proteína de 29 kilo Daltones (kDa) codificada por el genoma viral llamada poliedrina, ésta se sintetiza en grandes cantidades durante la fase tardía de infección y se acumula en el núcleo de las células infectadas (Rohrmann, 1986). Los NPVs producen grandes OBs (0.15 a 3 μm de longitud) en el núcleo de la célula infectada los cuales contienen una gran cantidad de viriones (Slack y Arif, 2007). En contraste, los GVs producen partículas en forma de gránulos o pequeños cuerpos de oclusión (0.13 por 0.50 μm) los cuales contienen un solo virión (Figura 3) (Bideshi *et al.*, 2000; Slack y Arif, 2007). Durante el proceso de infección de los GVs el citoplasma y el núcleo de las células se mezclan para formar una estructura conocida como estroma núcleo-citoplásmico; mientras que los OBs se encuentran dispersos en la célula (Bideshi *et al.*, 2000). En el sexto reporte de la ICTV, los virus relacionados con baculovirus llamados previamente como no ocluidos o incapaces de formar OBs, fueron removidos de esta familia y hasta el momento no han sido reasignados a una nueva familia o género (Jehle *et al.*, 2006).

El nombre de los baculovirus proviene de la especie del insecto del cual fueron aislados. Dicho sistema es conveniente; sin embargo, éste ignora las relaciones genéticas entre distintas especies de baculovirus. Por ejemplo, el baculovirus aislado del gusano de la alfalfa es llamado virus de la

polihedra múltiple nuclear *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV) (Vail y Hall, 1969; Brown *et al.*, 1979). No obstante, existen baculovirus genéticamente similares a AcMNPV que son llamados *Trichoplusia ni* (Heimpel, 1966), *Galleria mellonella* (Smith y Summers, 1979) y *Rachiplusia ou* (Summers y Anderson, 1973).

Indudablemente, la especie de baculovirus mejor estudiada a nivel molecular ha sido AcMNPV debido a su eficiencia para replicarse en células en cultivo (Granados y Lawler, 1981). En consecuencia, la gran mayoría de los sistemas de expresión de baculovirus han sido diseñados para utilizarse con ésta especie. Por otro lado, el baculovirus que infecta el gusano de la seda *Bombix mori nucleopolihedrovirus* (BmNPV) también ha sido modificado para ser utilizado como un sistema de expresión, aunque su uso es menos frecuente que el de AcMNPV (Maeda *et al.*, 1985; Maeda, 1989b, a).

Con el avance en la tecnología de secuenciación durante la última década; 29 genomas de baculovirus han sido secuenciados en su totalidad. La información obtenida muestra una gran diversidad genética, contenido y organización de genes, así como su filogenia (Hayakawa *et al.*, 2000; Garcia-Maruniak *et al.*, 2004; Lauzon *et al.*, 2004; van Oers y Vlak, 2007). Los genomas varían de entre 82 a 180 kb y contienen entre 90 a 180 marcos de lectura abierta (ORF, open reading frame) (Tabla 1 y para revisión ver Jehle *et al.*, 2006).

A pesar de que la clasificación morfológica de los baculovirus sigue vigente, el análisis de la secuencia genómica de varias especies de baculovirus sugiere que la clasificación de éstos depende de la especie que infectan, más que de la morfología que presentan. Recientemente Jehle *et al.*, (2006) sugirieron una revisión de la clasificación actual de los baculovirus. En dicha revisión, se propone que los NPVs específicos para el orden *Hymenoptera* y *Diptera* deberían ser separados de los específicos para *Lepidoptera* y organizados en un nuevo género. En este mismo estudio, se plantea una nueva clasificación y nomenclatura para cada género dentro de la familia de los baculovirus. De acuerdo a lo anterior, la actualización propuesta deberá incluir cuatro géneros: Alfabaculovirus (NPVs específicos para *lepidoptera*), Betabaculovirus (GVs específicos para *lepidoptera*), Gammabaculovirus (NPVs específicos para *hymenoptera*) y Deltabaculovirus (NPVs específicos para *diptera*) (Figura 1). Dicha propuesta de re-clasificación aun no esta vigente; sin embargo, será sometida al próximo ICTV para su consideración.

Tabla 1. Genomas de baculovirus secuenciados

VIRUS REF	AB^a	No. DE ORFs^b	GENOMA (pb)	NA^c
<i>Autographa californica</i> MNPV (Ayres <i>et al.</i> , 1994)	AcMNPV	155	133,894	NC_001623
<i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV (Lauzon <i>et al.</i> , 2005)	CfMNPV	145	129,609	NC_004778
<i>Choristoneura fumiferana</i> (de Jong <i>et al.</i> , 2005)	CfDEFNPV	149	131,160	NC_005137
<i>DEF NPV</i>				
<i>Rachiplusia ou</i> MNPV (Harrison y Bonning, 2003)	RoMNPV	146	131,526	NC_004323
<i>Bombyx mori</i> NPV (Gomi <i>et al.</i> , 1999)	BmNPV	143	128,413	NC_001962
<i>Epiphyas postvittana</i> NPV (Hyink <i>et al.</i> , 2002)	EppoNPV	136	118,584	NC_003083
<i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV (Ahrens <i>et al.</i> , 1997)	OpMNPV	152	131,990	NC_001875
<i>Adoxophyes honmai</i> NPV (Nakai <i>et al.</i> , 2003)	AdhoNPV	125	113,220	NC_004690
<i>Agrotis segetum</i> MNPV (Jakubowska <i>et al.</i> , 2006)	AgseNPV	153	147,544	NC_007921
<i>Chrysodeixis chalcites</i> (van Oers <i>et al.</i> , 2005)	ChChNPV	151	149,622	NC_007151
<i>Helicoverpa armigera</i> NPV (G4) (Chen <i>et al.</i> , 2001)	HearNPV (G4)	135	131,403	NC_002654
<i>Helicoverpa armigera</i> NPV (C1) (Zhang <i>et al.</i> , 2005)	HearNPV (C1)	134	130,760	NC_003094
<i>Helicoverpa zea</i> SNPV (Chen <i>et al.</i> , 2002)	HzSNPV	139	130,869	NC_003349
<i>Mamestra configurata</i> NPV (A) (Li <i>et al.</i> , 2002a; Li <i>et al.</i> , 2005a)	MacoNPV (A)	169	155,060	NC_003529
<i>Mamestra configurata</i> NPV (B) (Li <i>et al.</i> , 2002b)	MacoNPV (B)	168	158,482	NC_004117
<i>Lymantria dispar</i> MNPV (Kuzio <i>et al.</i> , 1999)	LdMNPV	166	161,046	NC_001973
<i>Spodoptera exigua</i> MNPV (WF <i>et al.</i> , 1999)	SeMNPV	139	135,611	NC_002169
<i>Spodoptera litura</i> NPV (Pang <i>et al.</i> , 2001)	SpltNPV	141	139,342	NC_003102
<i>Trichoplusia ni</i> SNPV (Willis <i>et al.</i> , 2005)	TnSNPV	144	134,394	NC_007383
<i>Cryptophlebia leucotreta</i> GV (Lange y Jehle, 2003)	CrleGV	129	110,907	NC_005068
<i>Cydia pomonella</i> GV (Luque <i>et al.</i> , 2001)	CpGV	143	123,500	NC_002816
<i>Phthorimea operculella</i> GV	PhopGV	130	119,217	NC_004062
<i>Plutella xylostella</i> GV (Hashimoto <i>et al.</i> , 2000)	PlxyGV	120	100,999	NC_002593
<i>Adoxophyes orana</i> GV (Wormleaton <i>et al.</i> , 2003)	AdorGV	119	99,657	NC_005038
<i>Xestia c-nigrum</i> GV (Hayakawa <i>et al.</i> , 1999)	XecnGV	181	178,733	NC_002331
<i>Agrotis segetum</i> GV	AgseGV	132	131,680	NC_005839
<i>Neodiprion lecontei</i> NPV (Lauzon <i>et al.</i> , 2004)	NeleNPV	90	81,756	NC_005906
<i>Neodiprion sertifer</i> NPV (Garcia-Maruniak <i>et al.</i> , 2004)	NeseNPV	90	86,462	NC_005905
<i>Culex nigripalpus</i> NPV (Afonso <i>et al.</i> , 2001)	CuniNPV	109	108,252	NC_003084

^a AB, nombre abreviado del baculovirus.

^b ORFs, se refiere al número de marcos de lectura abierta.

^c NA, número de acceso del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Tomado de Jehle *et al.*, 2006.

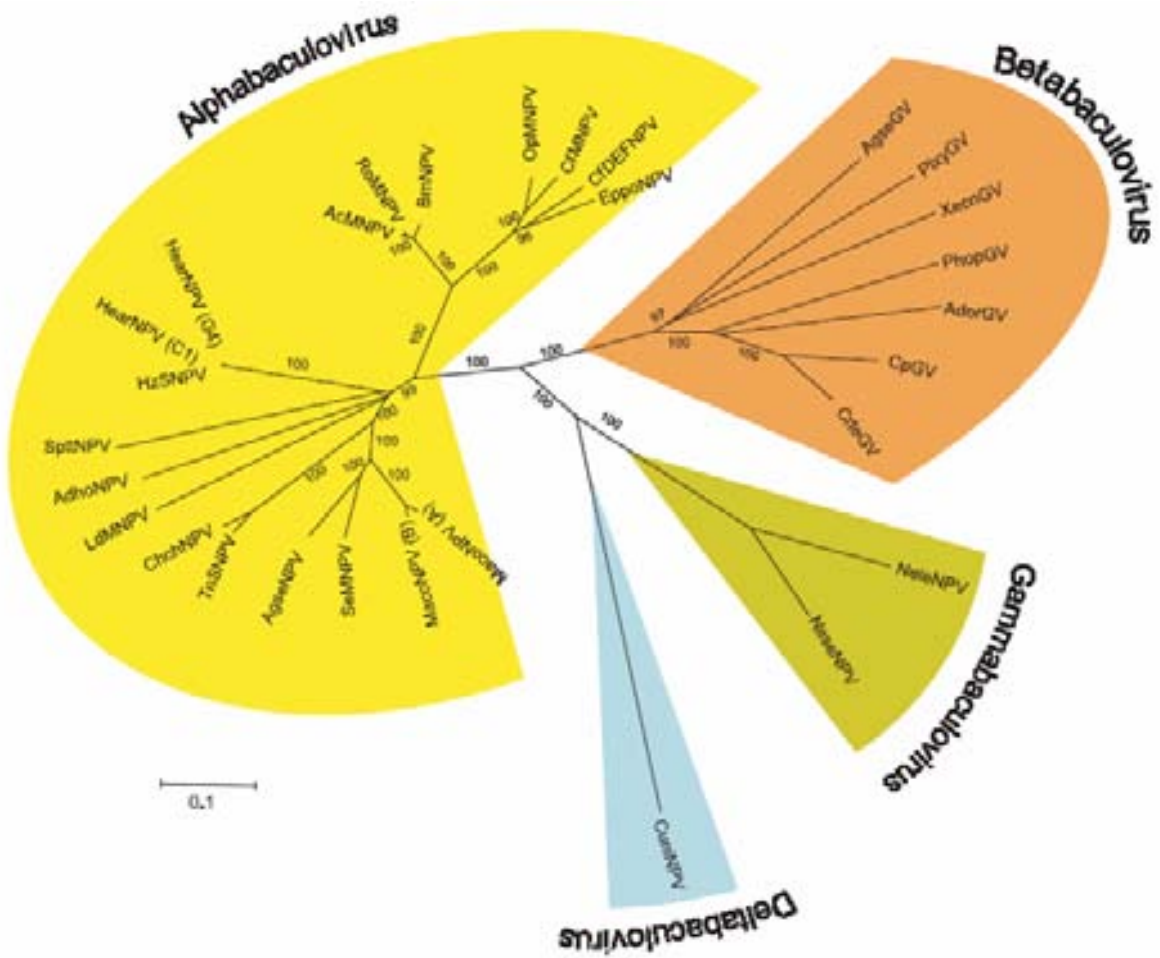


Figura 1. Árbol filogenético generado a partir del alineamiento de aminoácidos provenientes de 29 genes de los genomas secuenciados de baculovirus. Tomado de Jehle *et al.*, 2006.

1.2 Estructura genómica

La gran variabilidad en el tamaño del genoma de los baculovirus (82 a 180 kb) es causada principalmente por el contenido y número de genes repetidos, en algunos casos, existen genes que se repiten hasta 17 veces en un genoma, tales características pueden ser causadas por la incorporación de genes provenientes de las células del insecto o de otros virus y que pueden conferir ciertas ventajas a una especie (Hayakawa *et al.*, 2000). Por otro lado, el genoma de los baculovirus contiene un gran número de secuencias no-codificantes llamadas regiones homologas repetidas (*hr*, homologous regions) (Blissard y Rohrmann, 1990). En AcMNPV existen 9 secuencias *hr* denominadas *hr1*, *hr1a*, *hr2*, *hr3*, *hr4a*, *hr4b*, *hr4c* y *hr5* con una longitud que varía de entre 150 a 800 pb y organizadas en módulos de aproximadamente 70 pb de longitud con un palíndromo imperfecto de 30 pb, el cual contiene un sitio de restricción *EcoRI* en el centro de cada palíndromo (Ayres *et al.*, 1994; Rasmussen *et al.*, 1996) (Figura 2). Las regiones de las secuencias *hr* son altamente diversas; sin embargo, a pesar de que existe una relación entre ellas en un mismo genoma, éstas muestran una homología muy limitada entre genomas virales tanto a nivel de localización como en su secuencia. Por ejemplo, en el genoma de los GVs no existen secuencias repetidas en tandem a pesar de que un palíndromo imperfecto de 75 pb, se encuentra en 13 sitios diferentes del genoma (Luque *et al.*, 2001). Por otro lado, en la secuencia genómica del baculovirus *Trichoplusia ni* NPV no se encontraron secuencias *hr* (Willis *et al.*, 2005). Se ha sugerido que para muchos baculovirus las secuencias *hr* parecen ser potenciadores o enhancers transcripcionales u orígenes de replicación de ADN (Guarino y Summers, 1986a, b). Sin embargo, un estudio reciente demostró que las secuencias *hr1*, *hr1a*, *hr2*, *hr3*, *hr4a* y *hr4b* no son necesarias para la replicación viral (Carstens y Wu, 2007).

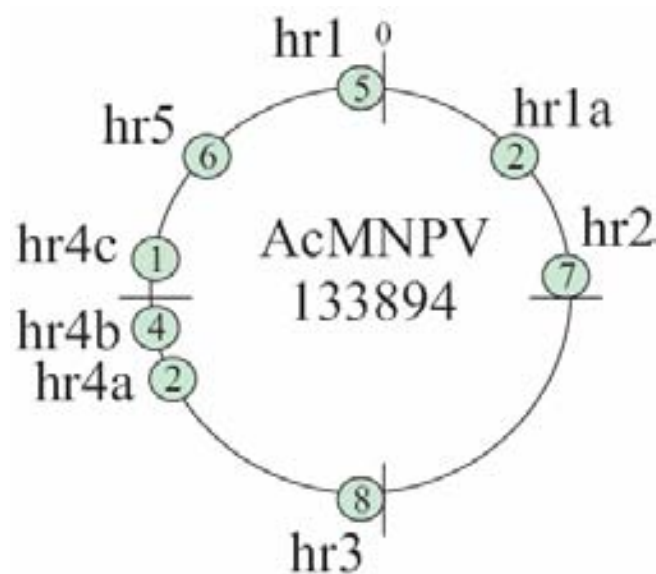


Figura 2. Secuencias *hr* encontradas en el genoma de AcMNPV. Las secuencias *hr* están representadas por los círculos con el número de repeticiones dentro de cada círculo.

1.3 Fenotipos y características estructurales de los baculovirus

Los viriones de la familia *Baculoviridae* consisten de una o más nucleocápsides (NCs) en forma de bastón o baciliforme, envueltas en una bicapa lipídica y con dimensiones de 30 a 60 nm de diámetro por 250 a 300 nm de largo (Blissard y Rohrmann, 1990). El ADN del virus se encuentra asociado con una proteína básica de 69 kDa llamada P6.9, la cual contiene un gran número de residuos de arginina (40%) y es similar a una histona (Tweeten *et al.*, 1980; Miller *et al.*, 1983a; Kelly y Lescott, 1984; Wilson y Consigli, 1985b; Wilson, 1988). La proteína P6.9 está codificada en el genoma viral y se encuentra altamente conservada entre muchas especies de baculovirus (Slack y Arif, 2007). La asociación del ADN con P6.9, forma una estructura parecida a un nucleosoma y es conocida como el centro o “core” de las NCs (Tweeten *et al.*, 1980; Wilson y Consigli, 1985b, a). Existe evidencia que sugiere que la proteína P6.9 participa en la condensación o empaquetamiento del ADN en la nucleocápside (NC). Además, se ha propuesto que durante la infección la proteína P6.9 (asociada con el ADN en la NC) puede ser fosforilada causando una des-condensación del ADN empaquetado (Tweeten *et al.*, 1980; Wilson y Consigli, 1985b, a). Experimentos *in vitro* han demostrado que la fosforilación de las NCs purificadas parece resultar en la liberación del ADN (Wilson y Consigli, 1985b).

La NC de los baculovirus está constituida principalmente por una proteína de 39 kDa denominada P39 o VP39 (Pearson *et al.*, 1988; Blissard *et al.*, 1989; Thiem y Miller, 1989). Estudios realizados mediante microscopia inmuno-electrónica demostraron que P39 se distribuye a través de toda la NC (Russell *et al.*, 1991). Un patrón similar se ha observado para la proteína P24, un componente minoritario de las NC (Wolgamot *et al.*, 1993). En contraste, P78/83, una fosfoproteína rica en prolina, se asocia con los extremos terminales de las NCs (Possee *et al.*, 1991; Vialard y Richardson, 1993). Un modelo de la morfogénesis de las NCs propone que una vez que el ADN viral es replicado, éste se asocia a P6.9 para formar el core, mientras que la NC es ensamblada de forma independiente; posteriormente, el complejo de nucleoproteína (ADN y P6.9) entra en la NC a través de un extremo para formar la NC madura (Slack y Arif, 2007). Existe una fosfoproteína codificada por el genoma viral llamada PP31, la cual se une al ADN de forma no específica y co-localiza con el estroma virogénico, además de que se asocia con la matriz nuclear. Se ha sugerido que PP31 juega un papel importante en el empaquetamiento o, alternativamente en la replicación y/o transcripción viral (Guarino y Smith, 1990; Guarino *et al.*, 1992).

Durante la infección viral en los insectos, los baculovirus producen dos fenotipos estructural y funcionalmente distintos. El primer fenotipo es producido por los viriones envueltos derivados de los OBs, (ODV, occlusion-derived virions) o también llamados viriones derivados de la polihedra (PDV, polyhedra-derived virions) (Figura 3 y 4 para revisión ver Slack y Arif, 2007). Para los NPVs el ODV consiste de una única (S, single) o múltiples (M, multiple) NCs y por tanto son

designados como *single nucleopolyhedrovirus* (SNPV) o *multiple nucleopolyhedrovirus* (MNPV), respectivamente (Herniou y Jehle, 2007). Es importante señalar que la clasificación S y M es arbitraria y no tiene un soporte filogenético. Todas las especies de baculovirus producen un segundo fenotipo durante el ciclo de infección y es denominado virión libre (BV, budded virion), el cual brota o gema de las células de insecto infectadas (Slack y Arif, 2007). Aunque ambos fenotipos presentan la misma NC, existen diferencias en la composición de lípidos y proteínas de su envoltura, además de tener distintos papeles durante el ciclo de infección. El ODV es potencialmente infeccioso únicamente en las células epiteliales del intestino y por tanto son responsables de la transmisión horizontal de insecto a insecto a través de los OBs (Figura 4). Por otro lado, el BV es altamente infeccioso para todas las células del insecto y es responsable de la transmisión del virus de célula a célula *in vivo* así como en cultivo celular (Slack y Arif, 2007).

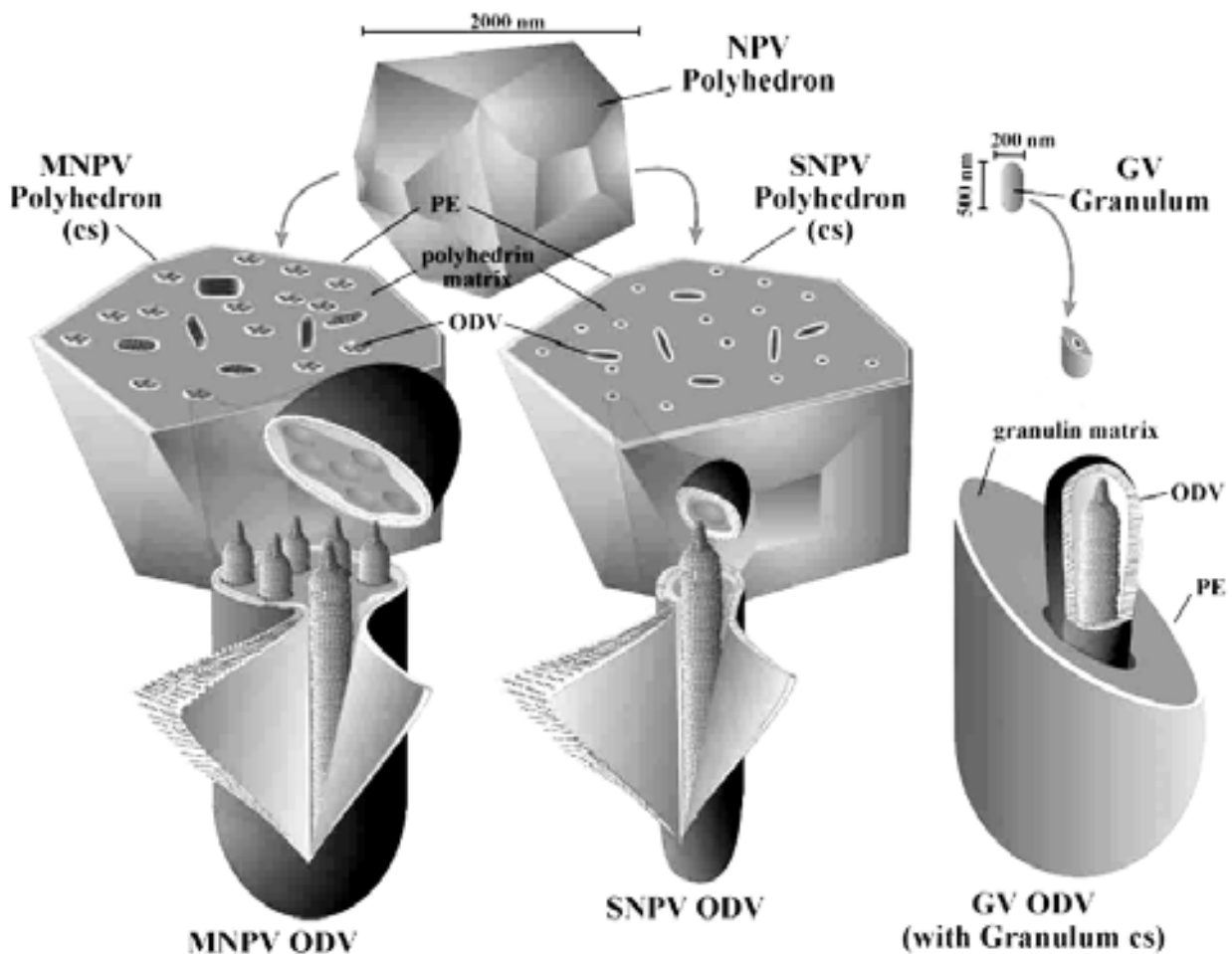


Figura 3. Virus derivados de los cuerpos de oclusión (ODV, occlusion-derived virions). En la parte superior se muestran los tres principales fenotipos de los cuerpos de oclusión (OB, occlusion body) NPV polyhedron, SNPV polyhedron y GV granulum. Los OBs de los *nucleopolyhedrovirus* (NPV) son más grandes que los OBs de los *granulovirus* (GV) debido a que contienen un gran número de virus derivados de los cuerpos de oclusión (ODV, occlusion-derived virus). Los OBs de los GV tienen forma de cápsula y contienen un solo virión. Los NPV se subdividen en MNPV y SNPV (ver texto). La clasificación (M) y (S) hacen referencia al número de nucleocápsides (NCs) que son encontradas en cada virión. En la parte inferior se muestran los ODV de MNPV, SNPV y GV. Los ODV se encuentran parcialmente disectados mientras que el ODV de GV se muestra parcialmente encapsulado. PE, proteína de la envoltura. Modelos tomados de Slack y Arif, 2007.

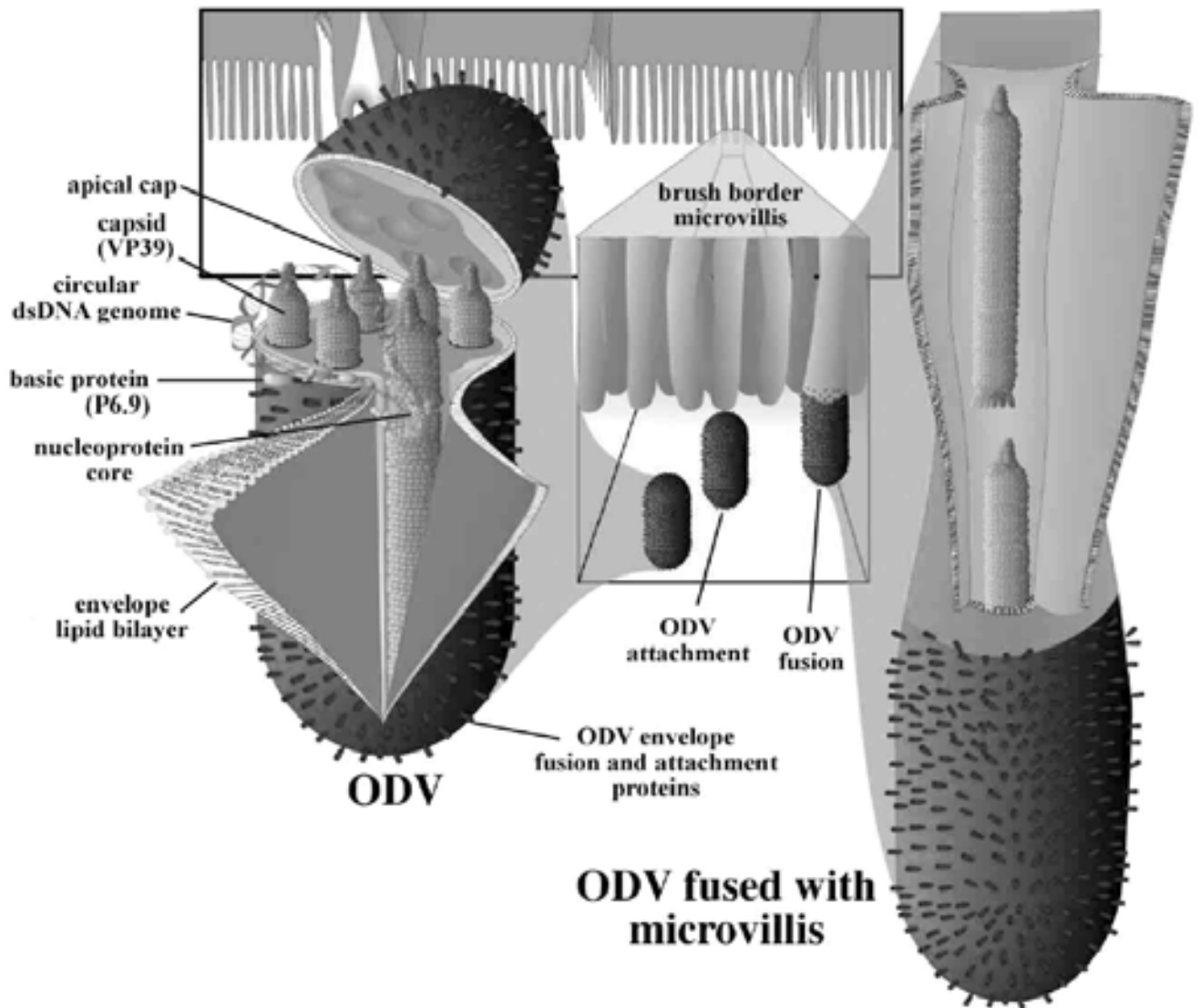


Figura 4. Virus derivados de los cuerpos de oclusión (ODV, occlusion-derived virions). La ilustración de la izquierda muestra una disección de la estructura del ODV, además se ilustra el ADN asociado a la proteína básica P6.9, así como la proteína principal de la nucleocápside, VP39. En el centro, se muestra la interacción de los ODV con el epitelio intestinal del insecto (ODV attachment) y su posterior entrada mediante un evento de fusión (ODV fusion). Del lado derecho, se muestra la liberación de las nucleocápsides dentro de las células del epitelio intestinal. Modelos tomados de Slack y Arif, 2007.

Recientemente se determinó la composición de proteínas de los ODV (Braunagel *et al.*, 2003). En dicho estudio se describieron más de 30 proteínas incluyendo aquellas necesarias para la replicación del ADN; ADN polimerasa, lef1, lef3, helicasa así como el factor de transcripción temprano, IE-1; proteínas de la cápside como p39, p78/83, p43, PCNA, FP25, Vlf-1, p6.9, p24, entre otras; así como proteínas de la envoltura de los ODV, tales como p74, 6p41 y p96/vp91 (para revisión ver Slack y Arif, 2007) (Braunagel *et al.*, 2003). Aparentemente, las proteínas forman parte de un sistema de optimización de la infección primaria, ya que estas se encuentran disponibles dentro de los ODV para comenzar la fase de replicación viral, inmediatamente después de la entrada del virus en las células epiteliales del intestino (Braunagel *et al.*, 2003).

El perfil de proteínas observado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) muestra un contenido proteico más complejo para los BV que para los ODV, dicha característica es debida a las proteínas obtenidas durante el proceso de gemación y en su mayoría por proteínas codificadas por el genoma viral (Figura 5). A pesar de que la composición de proteínas en ambos fenotipos no esta completamente caracterizada, la proteína más abundante en la superficie de los BV, es una glicoproteína de 64 kDa denominada Gp64, la cual no se presenta en los ODV (Hohmann y Faulkner, 1983; Volkman, 1986; Blissard y Rohrmann, 1989). La proteína Gp64 se encuentra en el citoplasma durante las primeras horas de infección (24-26 h); posteriormente, esta se re-localiza de forma muy abundante en la membrana plasmática de las células infectadas y finalmente es adquirida por los BV durante el proceso de gemación (Volkman *et al.*, 1984; Blissard y Rohrmann, 1989). Gp64 se encuentra fosforilada y glicosilada, además de estar estabilizada por puentes disulfuro (Jarvis y Garcia, 1994). En AcMNPV, Gp64 contiene 511 aminoácidos, de los cuales las posiciones 17 al 20 en el extremo amino-terminal, son altamente hidrofóbicos y probablemente funcionen como péptido señal, para la inserción de la proteína en la membrana plasmática (Volkman y Goldsmith, 1984; Jarvis y Garcia, 1994). El dominio hidrofóbico localizado en el extremo carboxi-terminal, permite el anclaje de la proteína en la membrana plasmática de la célula infectada, y en la envoltura de los BV (Volkman, 1986; Jarvis y Garcia, 1994). Los extremos amino- y caboxilo-terminales, son muy conservados en secuencia de aminoácidos (40-59 %); sin embargo, la naturaleza hidrofóbica de estas dos regiones se mantiene conservada, mostrando con ello la importancia funcional de ambos extremos (Jarvis y Garcia, 1994). En la membrana plasmática así como en los BV, Gp64 se asocia en forma de trímeros (Jarvis y Garcia, 1994). Por otro lado, estudios de neutralización *in vitro* utilizando anticuerpos dirigidos contra Gp64, bloquean la infección de los BV en células de insecto (Hohmann y Faulkner, 1983; Volkman *et al.*, 1984; Jarvis y Garcia, 1994). Más aun, se ha demostrado que Gp64 es indispensable para el evento de fusión entre los BV y la membrana plasmática de las células de insecto, además, Gp64 permite la liberación de las NCs del compartimiento del endosoma (Volkman y Goldsmith, 1985).

La matriz cristalina de los OBs o polihedra esta formada por una proteína viral de 29 kDa denominada polihedrina (Figura 3 y 6) (Rohrmann, 1986; Slack y Arif, 2007). Sin lugar a dudas, la polihedrina es una de las proteínas del baculovirus más estudiadas debido a que se expresa en grandes cantidades (más del 18 % del total de la proteína celular) durante el ciclo de infección viral (Quant *et al.*, 1984). La polihedrina es el principal componente de la matriz de los OBs y su función es la de estabilizar a los viriones en el ambiente, ya sea protegiendo el ADN viral de la luz ultravioleta (UV) y/o protegiendo los componentes estructurales de los ODV (Figura 3 y 6) (Slack y Arif, 2007). Por otro lado, la polihedrina se encuentra muy conservada en distintas especies de baculovirus con más del 80% de similitud entre diferentes NPVs de *lepidoptera*, más del 50% de similitud entre NPVs de *lepidoptera* y GVs, y aproximadamente un 40% de similitud entre polihedrinas de *hymenoptera* y polihedrinas de NPVs y GVs de *lepidoptera* (Rohrmann, 1986).

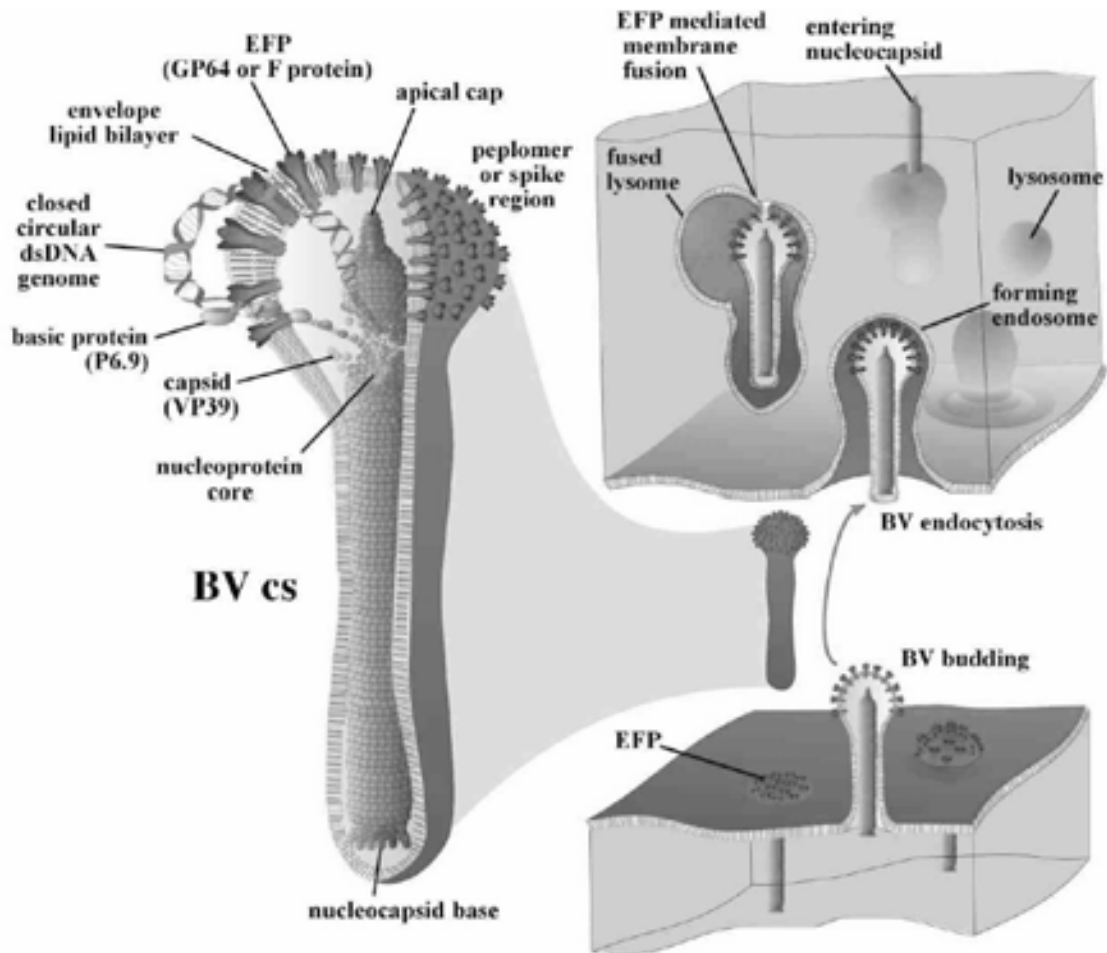


Figura 5. Fenotipo del virión libre (BV, budded virions). La figura de la izquierda muestra la disección de la estructura del BV. El ADN genómico se expande de la NC para enfatizar su asociación con la proteína P6.9. Además, se muestran las proteínas principales de la envoltura (EFPs, envelope fusion proteins) que participan en la fusión con la membrana plasmática de las células del insecto (proteínas Gp64 y F). Del lado derecho abajo se muestra el proceso de brote o gemación de los BV de una célula de insecto infectada (BV budding). Además del lado derecho arriba, se muestra el proceso de endocitosis y la fusión mediada por las EFPs así como la liberación de las nucleocápsides (entering nucleocapsid). Modelo tomado de Slack and Arif, 2007.

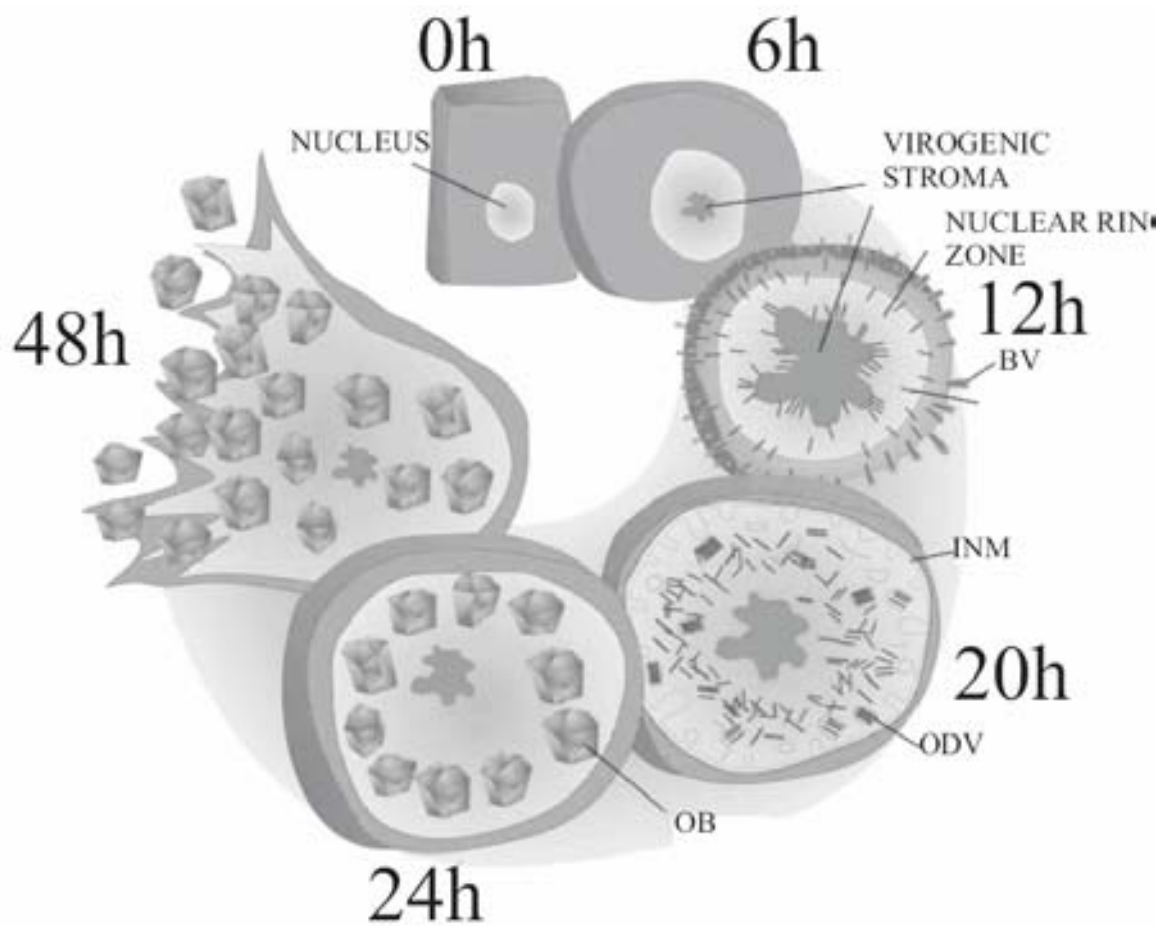


Figura 6. Curso temporal de la infección de AcMNPV y formación de los cuerpos de oclusión (OBs, occlusion bodies). En la figura se describen las distintas fases de infección incluyendo la producción de los viriones libres (BV, budded virions) a la producción de los virus derivados de los cuerpos de oclusión (ODV, Occlusion-derived virions). El estroma virogénico (sitio de replicación del ADN viral) se genera a las 6 horas post-infección (hpi). Posteriormente, a las 12 hpi, los BV comienzan a liberarse de la célula infectada. Entre las 20 y 24 hpi., comienzan a formarse los ODV y son concomitantemente ocluidos para formar los OBs. Finalmente, a las 48 hpi., los OBs son liberados de la célula infectada. Modelo tomado de Slack and Arif, 2007.

A pesar de que la polihedrina es el componente mayoritario de los OBs, existen otras proteínas que pueden estar involucradas con la formación de su estructura. La proteína vial de 10 kDa llamada P10, se sobre-expresa en la fase tardía de infección y se ha sugerido que participa en la formación de los OBs (Kuzio *et al.*, 1984; Leisy *et al.*, 1986; Quant-Russell *et al.*, 1987; Vlak *et al.*, 1988). El análisis mediante microscopia inmuno-electrónica y de inmuno-fluorescencia, han mostrado que P10 se distribuye en forma de fibras entre el núcleo (asociadas a los OBs) y el citoplasma de las células infectadas (Dong *et al.*, 2005; Carpentier *et al.*, 2008). Más aun, P10 co-localiza con los microtubulos celulares sugiriendo que dicha asociación puede ser crítica para la lisis celular (Patmanidi *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2005; Carpentier *et al.*, 2008).

El análisis por microscopia electrónica ha mostrado que existe una capa semejante a una membrana rodeando a los OBs, cuya función es la de mantener la integridad de éstos durante su liberación al medio ambiente (van Lent *et al.*, 1990). Por otro lado, se ha observado que la envoltura de los OBs permanece intacta después de la disolución de los éstos *in vitro*, mientras que los viriones permanecen atrapados dentro de la estructura colapsada (Whitt y Manning, 1988). En la superficie de los OBs existe una proteína de 36 kDa (en AcMNPV) llamada proteína de la envoltura de la polihedra (PEP, polyhedral envelope protein) (Whitt y Manning, 1988; Gombart *et al.*, 1989; Russell y Rohrmann, 1990; van Lent *et al.*, 1990). Originalmente se determinó que la envoltura de la polihedra de *Heliothis virescens* NPV esta compuesta por más del 90% de carbohidratos; sin embargo, la PEP parece ser el componente mayoritario de la envoltura en los OBs (Gombart *et al.*, 1989). Más aun, se ha observado que la disolución de los OBs de AcMNPV requiere de un ambiente reductor para la liberación de la PEP, sugiriendo que la proteína se encuentra estabilizada mediante enlaces tiol formados con los carbohidratos (Gross *et al.*, 1994). En resumen, durante la propagación de los baculovirus en los insectos, participan de forma importante los dos fenotipos ODV y BV, por un lado el ODV se disemina en el medio ambiente protegido por medio de los OBs, mientras que el BV participa en la infección y diseminación del virus dentro de un mismo organismo, los detalles de la infección serán discutidos más adelante.

1.4 Programa temporal de transcripción

La expresión génica de los baculovirus se encuentra regulada a nivel transcripcional y puede ser separada de manera general en tres fases: temprana, tardía y muy tardía (Friesen y Miller, 1986; Guarino y Summers, 1986a; Vanarsdall *et al.*, 2007). Durante la fase temprana, en las primeras 3 horas post-infección (hpi) la ARN polimerasa II del hospedero reconoce y transcribe promotores con secuencias consenso similares a las del hospedero (e.g., TATA) (Blissard y Rohrmann, 1991; Dickson y Friesen, 1991; Blissard *et al.*, 1992; Guarino y Smith, 1992; Pullen y Friesen, 1995b). Otro elemento regulador que actúa *cis*, es el motivo de inicio de la transcripción CAGT el cual se ha

encontrado en muchos de los promotores tempranos de AcMNPV (Blissard *et al.*, 1992; Pullen y Friesen, 1995a). En algunos promotores, existen motivos no convencionales tales como CGTGC, los cuales responden fuertemente a *trans*-activadores expresados por el baculovirus (Tomalski *et al.*, 1988; Lu y Carstens, 1993; Ohresser *et al.*, 1994). Una característica en común de muchos virus de ADN, es que los *trans*-activadores son sintetizados al inicio de la fase temprana para estimular la expresión de los genes tempranos. En este sentido, en AcMNPV existen cuatro *trans*-activadores virales que actúan de forma importante durante de la fase temprana de transcripción, estos incluyen IE-0, IE-1, IE-2 y PE38 (Vanarsdall *et al.*, 2007).

La siguiente fase de expresión puede ser separada en tardía y muy tardía, las cuales comprenden de 6 a 76 hpi. En la fase tardía de infección (6 a 12 hpi) se expresan genes conocidos como factores de expresión tardía (*lef*, late expression factors), los cuales están involucrados en la replicación del genoma viral y la producción de BV (Lu y Miller, 1995; Rapp *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999). Un elemento regulador *cis* es el motivo TAAG, presente en todos los promotores de genes tardíos y muy tardíos de AcMNPV (Vanarsdall *et al.*, 2007). En la fase muy tardía del programa temporal de transcripción (18 a 76 hpi) también conocida como “fase de oclusión”, se expresan proteínas asociadas con la formación de los OBs y liberación de los ODV durante la lisis celular (Vanarsdall *et al.*, 2007). En esta misma etapa, se sobre-expresan las proteínas no esenciales para la producción de los BV, incluidas la polihedrina (*polh*) y p10 (*p10*), las cuales participan en la producción de los OBs (Slack y Arif, 2007). Un estudio detallado utilizando la tecnología de microarreglos, demostró que la transcripción global de los genes de AcMNPV puede ser ordenada en cuatro grupos: grupo I (iniciales tempranos, tempranos a máximos), grupo II (iniciales tempranos, curso medio a máximo), grupo III (iniciales tempranos, tardíos a máximos) y grupo IV (iniciales tardíos) (ver Jiang *et al.*, 2006) (Jiang *et al.*, 2006). En dicho estudio, la cinética de la expresión de genes correlacionó con la infección viral, replicación y efectos citopáticos de las células infectadas. Más aun, se demostró que algunos de los genes clave en la fase temprana inmediata son el *trans*-activador temprano *pe38*, el regulador de la síntesis de ADN *me53* y el gen temprano *lef-3*, con tiempos de expresión máxima a las 2.4, 2.5 y 2.9 hpi, respectivamente. Mas tarde, durante esta misma etapa, se expresa el gen *ie-1* del factor de trascrición temprano así como los genes *gp64* y *DNApol* (2.5 a 9.6 hpi). Posteriormente, seguido de la replicación del ADN, los promotores tardíos son transcritos utilizando una ARN polimerasa codificada en el genoma del baculovirus. Esta ARN polimerasa viral resistente a α -amanitina, reconoce la secuencia consenso constituida por el pentanucleótido A/G/T TAAG, encontrada en los promotores virales y cuyo inicio de la trascrición comienza en el primero o segundo nucleótido de dicha secuencia (Rohrmann, 1986; Rankin *et al.*, 1988; Huh y Weaver, 1990). Recientemente, se purificó un complejo capaz de transcribir genes a partir de secuencias de ADN con promotores tardíos. Este complejo incluye los factores virales de expresión tardía, LEF-4,

-8, -9 y p74; además los homólogos de estos genes han sido identificados y secuenciados en genomas de otros baculovirus (Guarino *et al.*, 1998). LEF-8 contiene un dominio conservado en otras ARN polimerasas y se sugiere que forma parte del sitio catalítico (Passarelli *et al.*, 1994; Titterington *et al.*, 2003). No obstante, la proteína p74 no parece estar relacionada con proteínas asociadas a la transcripción, sino más bien participa de forma importante en la infección primaria de los ODV (Carstens *et al.*, 1993). Algunos genes claves expresados durante la fase tardía de expresión (48.7 a 52.9 hpi) incluyen la proteína de la cápside *vp39*, *vp80* y *p24*, además de los genes muy tardíos de la infección (49 a 53 hpi) incluyendo *p10*, *orf-1629* y *p74*, los cuales forman parte de la estructura final de los OBs y además participan en la lisis celular (Jiang *et al.*, 2006; van Oers y Vlak, 2007).

Un resumen detallado de la cinética y los tiempos de expresión máximos de los genes AcMNPV, en células Sf21 de *Spodoptera frugiperda* son mostrados en: http://www.nhri.org.tw/nhri_org/mm/jljuang/supplementary/AcMNPV-Sf21/Table_SII.pdf; Jiang *et al.*, 2006.

Existe una gran cantidad de información concerniente al programa temporal de transcripción de los baculovirus; sin embargo, la función exacta de muchas de las proteínas virales esta parcialmente caracterizada, por tanto, el estudio detallado de la función permitiría entender muchos aspectos de la biología molecular de este virus, incluidos los mecanismos de infección, el ensamblaje de las partículas virales así como la posible modificación de estos virus como vectores de transferencia de ADN en células de mamífero.

1.5 Ciclo de infección

De manera natural los OBs son encontrados sobre la superficie de las plantas que son ingeridas por las larvas (Figura 7). Después de su ingestión, los OBs son desintegrados durante la exposición al ambiente alcalino (pH >10) en la parte media del intestino del insecto (Granados y Lawler, 1981). De manera simultánea los ODV son liberados, pasan a través de la membrana peritrópica y se unen a las microvelocidades de las células epiteliales (Slack y Arif, 2007). Las NCs son liberadas en el citoplasma a través de un evento de fusión, en el cual la proteína p74 de la envoltura viral de los ODV tiene un papel fundamental, a dicho proceso se le conoce como la “infección primaria” (Horton y Burand, 1993). Las NCs migran hacia el núcleo mediante un mecanismo de transporte dependiente de citoesqueleto y finalmente entran al núcleo a través de los poros nucleares (Lanier y Volkman, 1998; Xu *et al.*, 2007). En contraste con otros virus con cápsides esféricas, tales como el virus del Herpes simplex y adenovirus (Ad), las NCs de los baculovirus se desensamblan dentro del núcleo y posteriormente comienza la transcripción de genes virales y la replicación de su genoma (Granados y Lawler, 1981). Cuando existe una cantidad suficiente de proteínas estructurales y el

ADN es replicado, las NCs son ensambladas y transportadas a través del poro nuclear y a lo largo del citoesqueleto hacia la membrana plasmática, es en este sitio donde toma su envoltura y junto con ella la proteína Gp64 viral, la cual previamente se ha acumulado en la superficie de las células infectadas (Blissard y Rohrmann, 1989) (Figura 7). Los BV salen de la célula infectada llevando en su envoltura parte de la membrana plasmática celular, la cual posteriormente es pérdida; sin embargo, la proteína Gp64 permanece en su superficie y se sugiere que es indispensable en el proceso de salida de los BV (Volkman, 1986; Blissard y Rohrmann, 1989; Markovic *et al.*, 1998).

El fenotipo de los BV es el responsable de la diseminación del virus dentro del insecto, dicho proceso se conoce como “infección secundaria” (Slack y Arif, 2007) (Figura 7). Durante la infección secundaria, los BV se fusionan con la membrana de las células de insecto y entran mediante un evento de endocitosis mediado por un receptor hasta ahora no bien identificado (Markovic *et al.*, 1998; Zhou y Blissard, 2008). Seguido del evento de fusión y de la formación del endosoma, la acidificación de este último induce cambios conformacionales en la proteína Gp64, en consecuencia se lleva a cabo un evento de fusión entre la membrana viral y la membrana del endosoma con la concomitante liberación de las NCs en el citoplasma (Blissard y Wenz, 1992; Westenberg *et al.*, 2007; Zhou y Blissard, 2008). Aunque, el mecanismo de entrada de los BV y ODV es distinto, una vez que las NCs son liberadas en el citoplasma las etapas finales de infección parecen ser similares (Slack y Arif, 2007).

La NCs producidas *de novo* en el núcleo de la célula infectada pueden ser transportadas hacia la superficie de la célula y con ello liberarse en forma de BV o en la fase tardía de la infección (fase de oclusión) pueden ser envueltas en el núcleo para formar partículas de ODV, las cuales posteriormente son embebidas para formar los OBs (Slack y Arif, 2007) (Figura 7). En la fase terminal de la infección, los OBs se acumulan alcanzando concentraciones muy elevadas (más de 1 g/L), contando con el 30 al 50% del total de la proteína del insecto (Russell y Rohrmann, 1990; Slack y Arif, 2007). No obstante, el mecanismo preciso de la formación de los OBs no está del todo descrito y se ha reportado que la polihedrina no es esencial para la infección y replicación *in vitro* de los BV, si no más bien, su importancia radica en la formación de los OBs, los cuales son indispensables para la protección física y bioquímica de los viriones en el medio ambiente, asegurando con ello su propagación (Gombart *et al.*, 1989; Russell y Rohrmann, 1990) (Figura 7).

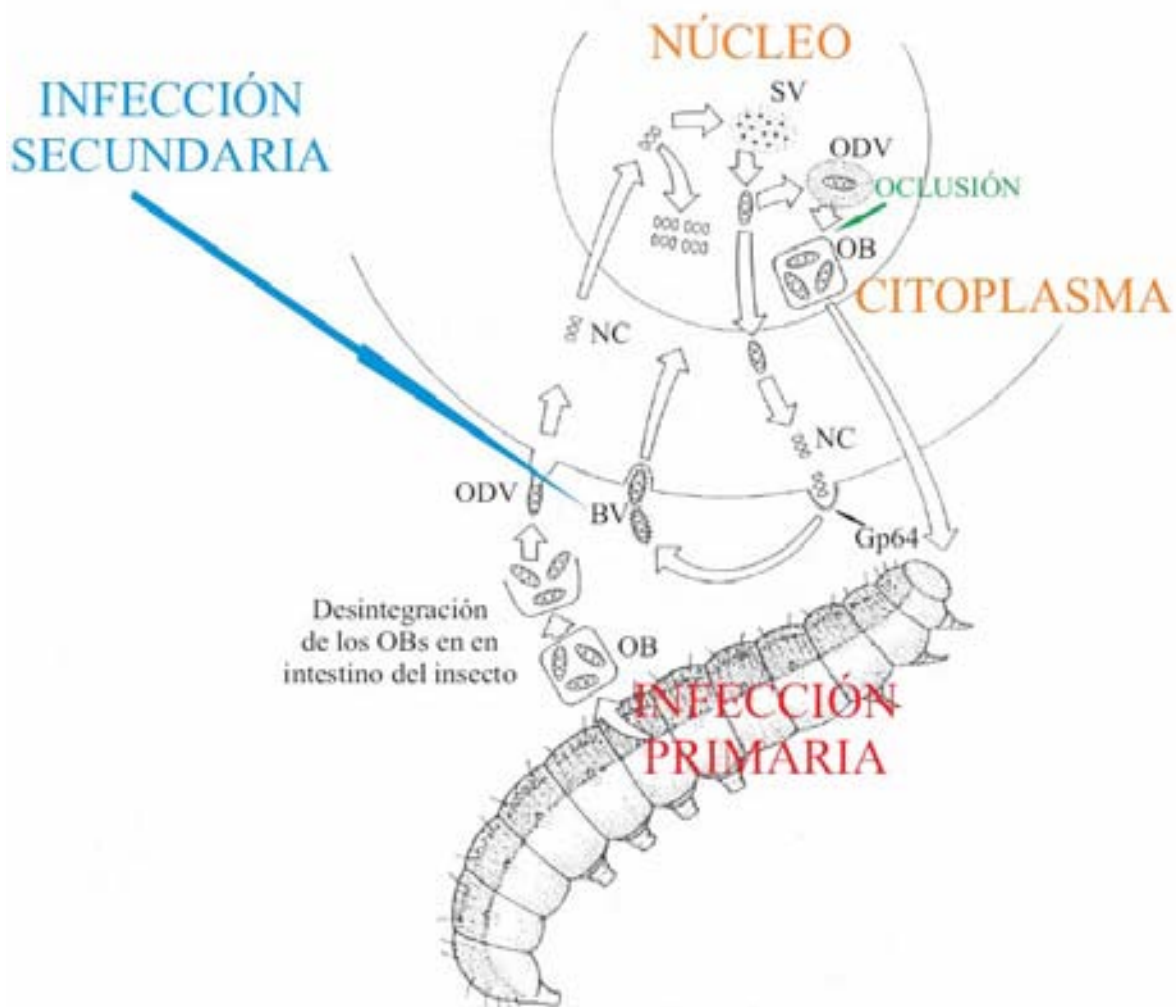


Figura 7. Ciclo de infección de los baculovirus. El insecto ingiere el follaje contaminado por los cuerpos de oclusión (OBs, occlusion bodies) y éstos posteriormente se desintegran en la parte media del intestino del insecto debido al ambiente alcalino ($\text{pH} \geq 8$). Los ODV liberados de los OBs pasan a través de la membrana peritrópica y se unen a las microvellocidades de las células epiteliales del intestino. Las nucleocápsides (NC, nucleocapsid) son liberadas en el citoplasma a través de un evento de fusión mediado por la proteína P74 de la superficie de los ODV, a dicho mecanismo se le conoce como INFECCIÓN PRIMARIA. Después de la replicación viral en el estroma virogénico (SV), los viones libres (BV, budded virion) brotan o geman de la célula infectada al mismo tiempo que incorporan la proteína Gp64 en su superficie. Los BV infectan células aledañas al sitio de infección y se distribuyen mediante la hemolinfa para infectar al organismo completo, a este mecanismo se le conoce como INFECCIÓN SECUNDARIA. Concomitantemente se forman nuevos OBs los cuales contienen los ODV mediante un mecanismo de OCLUSIÓN hasta ahora no bien descrito, éstos OBs serán liberados al medio ambiente para infectar otro insecto asegurando con ello la propagación del insecto. Esquema tomado y modificado de King, L. A., y Possee, R. D. (1992) *The Baculovirus Expression System*. Ed. Chapman and Hall. New York, pp 4-5.

La especificidad de infección de los baculovirus en los insectos depende del orden de estos últimos, por lo tanto, algunos baculovirus infectan solo una especie de insecto y no otro. Debido a lo anterior, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US Environmental Protection Agency), ha sugerido fuertemente la utilización de algunas especies de baculovirus (e.g., *Helicoverpa zea*, *Orgyia pseudotsugata* y *Lymantria dispar*) como pesticidas biológicos (Inceoglu *et al.*, 2006). Sin embargo, su uso se ha visto limitado principalmente por la lentitud con la cual infectan a los insectos, contrario a la rapidez de los pesticidas químicos convencionales (Miller *et al.*, 1983b; Carbonell *et al.*, 1988; Maeda, 1989b; Zuidema *et al.*, 1989). A pesar de ello, actualmente existe un gran interés en el desarrollo de baculovirus recombinantes más eficientes para ser utilizados como bio-insecticidas a nivel industrial (Inceoglu *et al.*, 2006; Summers, 2006; Ashour *et al.*, 2007).

La mayor parte de la investigación de baculovirus ha estado dirigida a estudiar el fenotipo de los BV, una de las razones principales es la disponibilidad de líneas celulares (e.g., células Sf9, Sf21 de *Spodoptera frugiperda*) lo cual permite la amplificación del virus *in vitro*, mientras que los estudios del fenotipo de los ODV requieren de bioensayos de alimentación de insectos, además de equipo especial para el mantenimiento de los animales. La estructura de los ODV es más compleja que la de los BV y las proteínas que interactúan con la matriz de los OBs hasta el momento no han sido descritas. La oclusión (incorporación de los ODV en los OBs, ver Figura 7) es un fenómeno único, por tanto la comprensión del mecanismo podría tener importantes aplicaciones más haya de la biología del baculovirus. En este sentido, Mori *et al.*, 2007 incorporaron el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2, fibroblast growth factor 2) en partículas de OBs generados por *Bombix mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV). Las partículas de los OBs-FGF2 fueron capaces de estimular la proliferación *in vitro* de fibroblastos. Además, la respuesta de las células a los OBs-FGF2 fueron bloqueadas por un inhibidor sintético de FGF2, sugiriendo que la acción de los OBs-FGF2 se llevo a cabo a través del receptor para FGF en los fibroblastos (Mori *et al.*, 2007). Estos datos sugieren fuertemente la posibilidad de modificar baculovirus para incorporar vacunas, enzimas o proteínas en general de uso farmacéutico. Más aún, los OBs representan una forma de conservación ideal debido a las características intrínsecas a la biología del baculovirus. Por otro lado, la liberación de las enzimas, vacunas, etc., puede llevarse a cabo con el cambio de $\text{pH} \geq 8$. Estudios preliminares han demostrado que la forma de los OBs puede ser alterada de una manera relativamente fácil sin alterar sus propiedades. En este sentido, existe evidencia que demuestra la incorporación de proteínas completas sin alterar su estructura y función lo cual tiene aplicaciones biotecnológicas (Luz-Madrigal A, Sampieri A, Orozco-Hoyuela G y Vaca L, datos no publicados) (Figura 8).

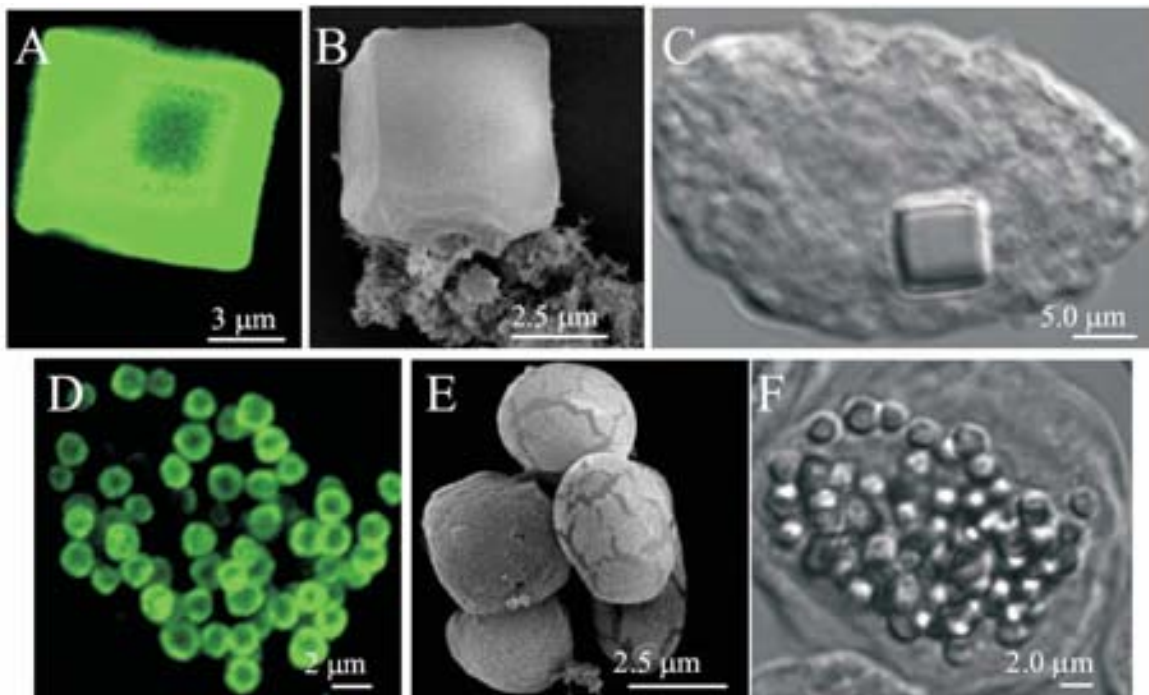


Figura 8. Partículas recombinantes de polihedra. (A) Microscopia confocal de una partícula recombinante de polihedra obtenida a partir de células Sf9 co-infectadas con dos baculovirus, el primero contiene el gen de la polihedra (*ph*) con una mutación en el aminoácido 25 lo cual genera un cambio del aminoácido glicina a aspártico, el segundo virus contiene el mismo gen *ph* con la misma mutación pero además fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP). (B) Microscopia de barrido de la partícula de polihedra mostrada en B. (C) Célula Sf9 infectada en la cual se observa el cristal cúbico. (D) Partículas de polihedra recombinante obtenidas a partir de células Sf9 co-infectadas con dos baculovirus, el primero contiene el gen *ph* tipo silvestre y el segundo contiene el gen *ph* fusionada a la GFP (Luz-Madrigal A, Sampieri A, Orozco-Hoyuela G y Vaca L, datos no publicados).

2. Baculovirus recombinantes como vectores de liberación génica en células de mamífero

2.1 Transducción *in vitro* de células de mamífero

Los baculovirus recombinantes han sido utilizados de manera tradicional como sistemas de sobre-expresión de proteínas recombinantes en células de insecto [para revisión ver (Hu, 2005)]. Los primeros estudios de la interacción de los baculovirus con células de mamífero fueron llevados a cabo por Volkman y Goldsmith en 1983, quienes demostraron que los baculovirus particularmente el fenotipo de los BV, eran capaces de internarse en células diferentes a las de insecto incluyendo células de mamífero (Volkman y Goldsmith, 1983). Estudios posteriores confirmaron la entrada de baculovirus recombinantes en células de mamífero, además de la expresión de un gen reportero en niveles muy bajos, dirigido por el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) (Carbonell *et al.*, 1985). En ambos estudios no se encontró evidencia de replicación de partículas virales en las

células de mamífero ni la expresión de genes virales (Volkman y Goldsmith, 1983; Carbonell *et al.*, 1985). No fue sino hasta 10 años más tarde, cuando dos grupos independientes demostraron por primera vez que los baculovirus no solo eran capaces de internarse, sino también de transducir células de mamífero, tal como se demostró mediante la expresión del gen de la luciferasa dirigido por el promotor temprano del citomegalovirus (IE-CMV) o la expresión del gen de la β -galactosidasa, dirigido por el promotor del RSV (Hofmann *et al.*, 1995; Boyce y Bucher, 1996). En ambos estudios, se observó que los baculovirus fueron más eficientes para transducir células de origen hepático (>90 % de células positivas), mientras que en otras líneas celulares los niveles de expresión fueron muy bajos e incluso indetectables. Tales resultados sugirieron que la falta de expresión en algunas líneas celulares, no se debía a la entrada del baculovirus sino más bien a los eventos subsecuentes a la entrada, ya que todas las líneas celulares utilizadas incorporaron cantidades muy similares de partículas virales (Hofmann *et al.*, 1995; Boyce y Bucher, 1996). Una posible explicación para los niveles bajos de expresión observados en algunas líneas celulares, era la fuerza del promotor. Posteriormente, se demostró que las células no transducidas por el baculovirus que contenía el cassette con el promotor del CMV, podían ser eficientemente transducidas por un baculovirus con un cassette de expresión del promotor fuerte CAG, un promotor compuesto por el enhancer del promotor temprano del CMV (IE-CMV), el promotor de la β -actina de pollo y la secuencia de poliadenilación de la β -globina de conejo (Shoji *et al.*, 1997). Seguido de tales hallazgos, se ha incrementado en los últimos años la cantidad de cultivos primarios así como líneas celulares de mamífero susceptibles de ser transducidas por baculovirus (Hu, 2005; Kost *et al.*, 2005). Los baculovirus recombinantes transducen eficientemente cultivos primarios de condrocitos de rata sin afectar su estado de diferenciación (Ho *et al.*, 2004). Por otro lado, cultivos primarios de riñón de ratón son también transducidos por baculovirus manteniendo la expresión del transgen por más de 20 días (Liang *et al.*, 2004). Indudablemente, las células hepáticas representan un blanco atractivo para transferir y expresar genes mediante baculovirus recombinantes con >90 % de células positivas (Gao *et al.*, 2007). Por otro lado, las líneas celulares de osteosarcoma han demostrado ser altamente susceptibles de ser transducidas, sobrepasando incluso los niveles de expresión obtenidos en células hepáticas (Song y Boyce, 2001; Clay *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003). Más aun, recientemente se ha demostrado la transducción de células troncales del mesénquima (Ho *et al.*, 2005). Además, es posible utilizar vectores de baculovirus para liberar ARNs pequeños de interferencia (RNAi) utilizando promotores como U6 (Nicholson *et al.*, 2005). Un estudio demostró que la liberación de ARNs pequeños mediante un baculovirus, abatieron con el 95% de la expresión del gen blanco *in vitro* y con el 85 % de la expresión en cerebro de rata *in vivo* (Ong *et al.*, 2005). Además de transducir células de mamífero, se ha demostrado que los baculovirus son capaces de transducir un gran número de líneas celulares así como embriones de pez cebra (Leisy *et al.*, 2003;

Wagle y Jesuthasan, 2003). En este sentido, se ha demostrado la transducción de líneas celulares de eritroblastos de pollo tales como HD3 (Luz-Madrigal A y Rincon-Arano H, datos no publicados), así como cultivos primarios de embrión de pollo (25 a 34 % células positivas) y de pato (> 70 % células positivas) de distintos tejidos (Ping *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006). Más aun, los baculovirus recombinantes son capaces de transducir células S2 de *Drosophila melanogaster* utilizando promotores tales como el de *hsp70*, actina 5C o el promotor de metalotionina (MT) (Lee *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008).

Existe una gran variabilidad en la eficiencia de transducción de las células de mamífero, en algunas ocasiones se alcanzan porcentajes tan altos como el 95 % para las células de riñón de hámster, BHK; mientras que las células de fibroblastos de embrión de ratón, NIH-3T3; son pobremente transducidas a menos del 10% (Cheng *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Se ha sugerido que la eficiencia de transducción depende de la activación de ciertos promotores exógenos (e.g., CMV y SV40) mediante una secuencia río arriba del locus de la polihedrina (*pu*, polyhedrin upstream activator sequence) y una región *hr* en AcMNPV (Viswanathan *et al.*, 2003). En este sentido, ensayos de expresión transitoria en células Sf21 han demostrado que la secuencia *hr1* y la secuencia *pu* actúan de forma sinérgica aumentando la actividad transcripcional (>18,000 veces sobre la activación del promotor basal) del promotor mínimo de CMV (CMVm) y del promotor de la proteína de choque térmico (*hsp70*) de *D. melanogaster* (Lo *et al.*, 2002; Venkaiah *et al.*, 2004).

2.2 Transcripción de genes virales en células de mamífero

A la fecha no existe evidencia que demuestre la replicación de partículas de baculovirus en células de mamífero; sin embargo, se ha documentado la transcripción de ciertos genes virales principalmente factores de transcripción tempranos, mediante la acción de la ARN polimerasa II de eucariontes (Murges *et al.*, 1997; Dai *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2006). Murges *et al.*, (1997) fueron los primeros en demostrar la activación de los promotores tempranos de *ie1* y *he65* en células riñón de hámster, BHK-21 (Murges *et al.*, 1997). En otro estudio se demostró que el factor de transcripción temprano IE-1 es activo en células de ovario de hámster, CHO, y en células de fibroblastos de embrión de ratón, NIH-3T3 (Dai *et al.*, 2004). Posteriormente, se demostró la expresión de los genes tempranos *ie1*, *ie0*, *p39*, *he65* y *polh*, en células HEK-293 transducidas con el baculovirus *Bombix mori* NPV (Kenoutis *et al.*, 2006). Más recientemente, se demostró la transcripción de varios genes de AcMNPV entre ellos *ie1*, *ie0*, *p6.9*, *p38* y *gp64* en células de HeLa14 (Fujita *et al.*, 2006). Por otro lado, la expresión transitoria del factor de transcripción temprano IE-1 en células Vero E6 activó significativamente los genes *gp64*, *pe38*, *ie2*, *he65*, *pcna*, *orf16*, *orf17* y *orf25*; mientras que la expresión transitoria de IE-2, activó únicamente los genes *pe38* y *orf17* (Liu *et al.*, 2007). Interesantemente, la expresión transitoria de ambos factores (IE-1 e

IE-2) en las mismas células produjo un efecto sinérgico promoviendo la activación de 59 de los 155 genes analizados del genoma de AcMNPV (Liu *et al.*, 2007). Un resumen de los genes de baculovirus expresados en las células de mamífero es mostrado en la tabla 2.

Tabla 2. Transcripción de genes virales en células de mamífero

GEN	ORF	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
<i>ie0</i>	ORF-141	Transactivador temprano	(Fujita <i>et al.</i> , 2006; Kenoutis <i>et al.</i> , 2006)
<i>ie1</i>	ORF-147	Transactivador temprano	(Murges <i>et al.</i> , 1997; Dai <i>et al.</i> , 2004; Fujita <i>et al.</i> , 2006; Kenoutis <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2007)
<i>ie2</i>	ORF-151	Transactivador temprano	(Liu <i>et al.</i> , 2007)
<i>p39</i>	ORF-89	Proteína de la nucleocápside	(Kenoutis <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2007)
<i>polh</i>	ORF-8	Polihedrina	(Kenoutis <i>et al.</i> , 2006)
<i>p6.9</i>	ORF-100	Proteína de unión a DNA	(Fujita <i>et al.</i> , 2006)
<i>gp64</i>	ORF-128	Glicoproteína de la superficie del BV	(Fujita <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2007)
<i>ptp</i> <i>odv-e56</i> <i>me53</i> <i>vp80</i> <i>p35</i> <i>hisP</i>	ORF-1 ORF-148 ORF-139 ORF-104 ORF-135 ORF-33	Tirosina fosfatasa Proteína de la superficie de los ODV Regulador de la síntesis de ADN Proteína asociada a la cápside Inhibidor de apoptosis Histidinol fosfatasa	(Fujita <i>et al.</i> , 2006)
<i>lef-3</i> <i>pcna</i> <i>egt</i> <i>orf1629</i> <i>tlp</i> <i>pkip</i> <i>lef-2</i> <i>p24</i> <i>lef6</i> <i>fgf</i> <i>p35</i> <i>ctx</i> <i>lef1</i> <i>lef11</i> <i>env-prot</i> <i>v-ubi</i> <i>iap2</i> <i>alk-exo</i>	ORF-17 ORF-49 ORF-15 ORF-9 ORF-82 ORF-24 ORF-6 ORF-129 ORF-28 ORF-32 ORF-135 ORF-3 ORF-14 ORF-11 ORF-23 ORF-35 ORF-71 ORF-133	Factor de expresión tardía 3 Antígeno nuclear de proliferación celular UDP-glucosil transferasa Proteína asociada a la cápside viral Ac-vp78 “Telokin like protein-20” Proteína que interactúa con la proteína cinasa Factor de expresión tardía 2 Proteína de la cápside viral Factor de expresión tardía 6 Factor de crecimiento de fibroblastos Inhibidor de apoptosis “conotoxin-like peptide” Factor de expresión tardía 1 Factor de expresión tardía 11 Proteína similar a la proteína de la superficie Ubiquitina viral Inhibidor de apoptosis Exonucleasa alcalina	(Liu <i>et al.</i> , 2007) ^a
GENES DE FUNCIÓN DESCONOCIDA			
<i>orf38, orf120, orf4, orf66, orf149, orf102, orf92, orf75, orf78, pe38, orf19, orf13, orf73, orf108, orf140, orf91, orf152, orf45, orf117, odv-e26, orf142, orf91, 94k.</i>			(Fujita <i>et al.</i> , 2006)
<i>orf17, orf16, orf25, orf13, orf21, Ac-p40, orf48, orf74, orf45, hcf-1, orf118, orf12, bro, orf120, orf47, orf78, orf117, orf152, orf4, orf20, orf603, orf11, orf38, p43, orf56, orf63, orf68, orf91, orf108, orf114, 94k, orf140.</i>			(Liu <i>et al.</i> , 2007) ^a
<i>he65</i>			(Murges <i>et al.</i> , 1997; Fujita <i>et al.</i> , 2006; Kenoutis <i>et al.</i> , 2006)

^a La expresión de los genes de baculovirus se indujo mediante la síntesis de los transactivadores tempranos IE1 e IE2 en las células de mamífero.

2.3 Importancia de la proteína Gp64 en la transducción mediada por baculovirus

Se ha demostrado que la proteína Gp64 de la superficie de los BV, es esencial para la entrada en células tanto de insecto como de mamífero (Wickham *et al.*, 1990; Tani *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2005). La proteína Gp64 permite la entrada de los BV mediante un evento de endocitosis mediado por un receptor hasta el momento no descrito, además facilita la liberación de las NCs del compartimiento del endosoma (Blissard y Wenz, 1992; Hofmann y Strauss, 1998; Markovic *et al.*, 1998). Anticuerpos monoclonales contra Gp64 bloquean la transducción de baculovirus en células de mamífero (Tani *et al.*, 2001). Además, la sobre-expresión de Gp64 mediante una copia adicional del gen, aumenta de 10 a 100 veces más su capacidad de transducción en células de distintos tejidos (Tani *et al.*, 2001). Por otro lado, mutantes de Gp64 son incapaces de transducir células (Abe *et al.*, 2005). Finalmente, la incorporación Gp64 de AcMNPV en el baculovirus *Helicoverpa armigera* (HaSNPV), un baculovirus que normalmente no transduce células de mamífero, permitió que HaSNPV transdujera células con una eficiencia semejante a la de AcMNPV (Liang *et al.*, 2005). En resumen, estos datos sugieren que la proteína GP64 es indispensable para la infección de células de insecto y es determinante en la unión y transducción de células de mamífero.

2.4 Moléculas que permiten la internalización de los baculovirus en las células de mamífero

La importancia de la proteína Gp64 para la entrada de los BV esta bien documentada; sin embargo, se desconoce aún la naturaleza del receptor tanto en la superficie de las células de insecto como de mamífero (Kukkonen *et al.*, 2003). Se ha sugerido la existencia de un receptor específico el cual permite la interacción y la entrada del virus, esta idea surge a partir de las grandes diferencias en la eficiencia de transducción en células de distintos tejidos (Hofmann *et al.*, 1995; Boyce y Bucher, 1996). Por ejemplo, la línea celular de hepatoma de rata H35 no es permisiva [$<2\%$ de células positivas a 1000 multiplicidades de infección (MOI)] mientras que las líneas celulares de hepatoma humano HepG2 y Huh7, son susceptibles a ser transducidas ($>75\%$ de células positivas a 100 MOI) (Hofmann *et al.*, 1995; Boyce y Bucher, 1996). Estos resultados pueden reflejar diferentes niveles de expresión del receptor; no obstante, esta idea no ha sido demostrada. Inicialmente, se sugirió que la glicoproteína sialica (asialoglycoprotein) era el posible receptor; no obstante, se demostró que la sobre-expresión de dicha proteína en una línea celular no permisiva, no logró un aumento en la eficiencia de transducción (van Loo *et al.*, 2001). En este sentido, Van Loo *et al.*, (2001) demostraron que la línea celular de epitelio de riñón de cerdo, Pk1, la cual no expresa la proteína sialica, es susceptible de ser transducida con alta eficiencia mediante baculovirus recombinantes, por lo tanto la proteína sialica no es el receptor determinante (van Loo *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que las interacciones electrostáticas juegan un papel importante en la unión del virus con las células de mamífero. Duisit *et al.*, (1999) demostraron que la incubación de células

293 con polibreno, un compuesto catiónico que neutraliza las cargas negativas en la membrana celular, resultó en una inhibición de la unión del virus (Duisit *et al.*, 1999). En el mismo estudio, se sugirió que el heparan sulfato puede actuar como una molécula importante, ya que la remoción del heparan sulfato mediante heparanasa I o III, disminuyó en un ~50% la eficiencia de transducción (Duisit *et al.*, 1999). De manera paralela al heparan sulfato, se ha sugerido que los fosfolípidos en la membrana celular son importantes para la unión de Gp64, facilitando la entrada del virus en las células de mamífero (Tani *et al.*, 2001).

La depleción del Ca^{2+} mediante el pre-tratamiento con EGTA, demostró que los complejos de uniones para-celulares (paracellular junctions), representan una barrera importante para la entrada del virus en cultivos primarios de hepatocitos (Bilello *et al.*, 2003). A pesar de las grandes discordancias en la identificación del receptor, existe una gran cantidad de evidencias que sugieren que los BV entran a las células mediante un evento de endocitosis (Matilainen *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2006). En este sentido, Matilainen *et al.*, (2005) demostraron mediante microscopía electrónica y confocal, que los baculovirus se internalizan en células HepG2 mediante endocitosis mediada por clatrin (clathrin-coated pits) es un fenómeno poco frecuente, y por tanto puede existir un proceso distinto (e.g., macropinositosis) de entrada. Posteriormente, Long *et al.*, (2006) demostraron que la entrada de los BV tanto en células de insecto como de mamífero, se lleva a cabo a través de la formación de pozas cubiertas de clatrin y se sugirió que la caveola de alguna manera estaba involucrada en dicho proceso, ya que la genisteína, un inhibidor de la endocitosis mediada por caveolas, produjo un aumento en la eficiencia de transducción en células BHK-21 (Long *et al.*, 2006). Recientemente, se ha demostrado que el marcaje de partículas virales, principalmente la NC o proteínas de la envoltura, utilizando proteínas fluorescentes, permite analizar *in vivo* la entrada y el tráfico sub-celular en las células (Toivola *et al.*, 2002; Riikonen *et al.*, 2005). En este sentido, baculovirus recombinantes que contienen una segunda copia de Gp64 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP), pueden ser localizados tanto en la superficie como en el citoplasma de las células susceptibles de ser transducidas (Figura 9, Camacho-Zarco AR, Luz-Madrigal A y Vaca L, datos no publicados). La eficiencia de transducción no depende exclusivamente de la unión del virus a las células blanco, ya que los baculovirus se unen eficientemente a las células NIH-3T3, las cuales son poco susceptibles a la transducción (Stanbridge *et al.*, 2003). En resumen, los BV entran en las células de mamífero a través de la fusión de la proteína Gp64 de la superficie de los BV y mediante un receptor (aún no descrito) en la membrana de las células de mamífero. Posteriormente, se lleva a cabo un evento de endocitosis y la formación de pozas cubiertas de clatrin. No obstante, existe evidencia que sugiere que la unión y entrada del virus no necesariamente representan la limitante para la transducción (i.e., expresión del transgen) de las células, ya que en algunas líneas

celulares (e.g., A549, CHO, NIH-373 y CV-1) los BV se unen y entran de forma eficiente, lo cual sugiere que la restricción se lleva a cabo en un evento subsecuente (Boyce y Bucher, 1996; Stanbridge *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2004).

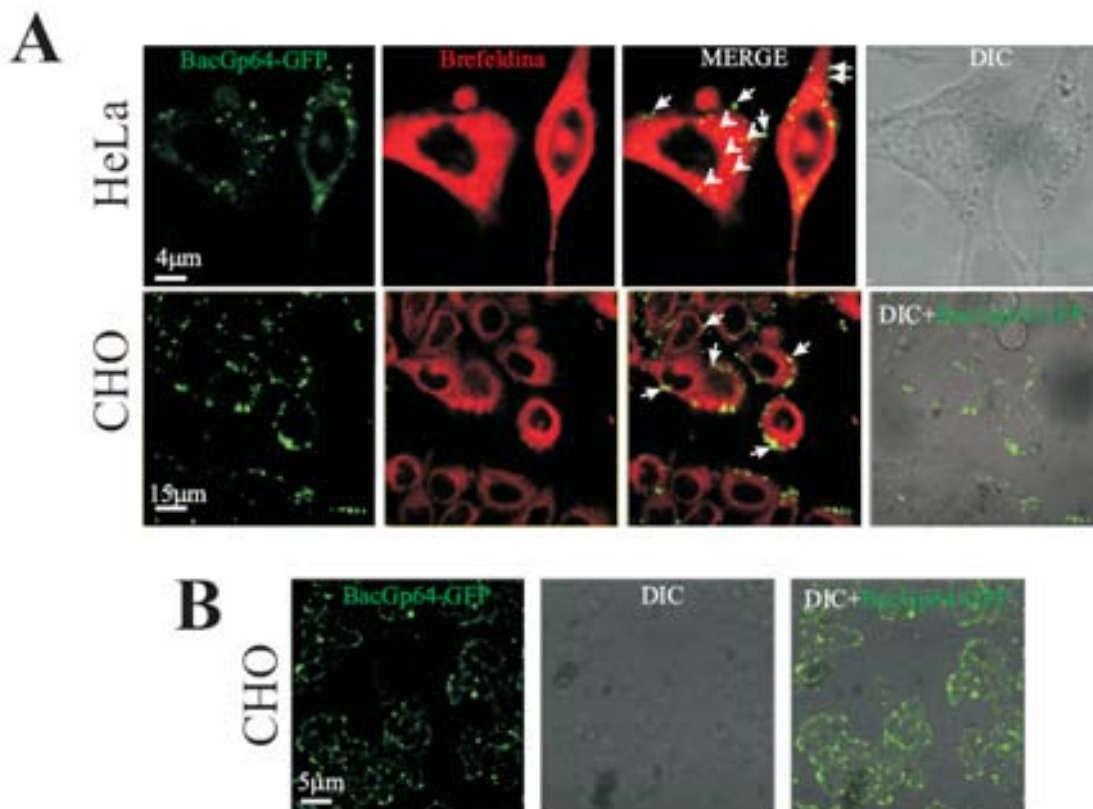


Figura 9. Microscopia confocal de partículas de BV que contienen GFP fusionada a GP64 (BacGp64-GFP). (A) Células HeLa y CHO incubadas durante 2 h con 200 multiplicidades de infección (MOI) del baculovirus BacGp64-GFP (en verde). Las flechas indican los virus en la membrana plasmática y algunos otros dentro de la célula (puntas de flecha) que co-localizan (puntos amarillos) con el marcador de retículo brefeldina (en rojo). (B) Células CHO incubadas durante 30 min con 500 MOI del baculovirus BacGp64-GFP (en verde). Camacho-Zarco A, Luz-Madriral A y Vaca L, datos no publicados.

2.5 Escape del endosoma y tráfico sub-celular

Después de la unión a la superficie de las células de mamífero, los BV son introducidos a través de un endosoma, la acidificación ($\text{pH} < 5$) induce cambios conformacionales en la proteína Gp64 lo cual induce su fusión con la membrana del endosoma, permitiendo el escape y liberación de las NCs en el citoplasma (Kukkonen *et al.*, 2003). La importancia del escape del endosoma fue descrito por primera vez, mediante el tratamiento con cloroquina, que inhibe la maduración del endosoma y subsecuentemente la transducción mediada por baculovirus (Hofmann *et al.*, 1995; Boyce y Bucher, 1996). Mas tarde, la importancia del escape del endosoma fue confirmada tratando células HepG2 con monensina, la cual bloquea la acidificación del endosoma atrapando con ello las NCs (Kukkonen *et al.*, 2003). Por tanto, se ha propuesto que el escape del endosoma es una etapa limitante en la transducción de algunas líneas celulares de mamífero (Boyce y Bucher, 1996; Barsoum *et al.*, 1997). No obstante, el tráfico sub-celular o el transporte de las NCs al núcleo, representan una barrera importante en la transducción (Kukkonen *et al.*, 2003). Por ejemplo, en algunas células no permisivas a la transducción mediada por baculovirus (e.g., EAHY, MG63 y NHO), éste es internalizado y se localiza en los endosomas a los 30 minutos post-transducción y posteriormente escapa de los endosomas a las 4 horas post-transducción (hpt); sin embargo, las NCs no llegan al núcleo de forma eficiente incluso en altas MOI (Kukkonen *et al.*, 2003). En contraste, los baculovirus son capaces de entrar en células HepG2 (las cuales son altamente permisivas a la transducción mediada por baculovirus), escapan del endosoma y llegan al núcleo después de 4 hpt (Kukkonen *et al.*, 2003). Más aun, la liberación directa de las NCs en el citoplasma, no afecta su translocación al núcleo, demostrando de esta manera que el escape del endosoma, no necesariamente representa una etapa crítica durante la transducción (Kukkonen *et al.*, 2003; Salminen *et al.*, 2005). Las NCs son transportadas en diferentes compartimentos sub-celulares en distintas células (Abe *et al.*, 2005). En células 293T, las NCs llegan al núcleo en donde el transgen es expresado de forma eficiente, una vez que las partículas virales son desensambladas correctamente en el núcleo (Abe *et al.*, 2005). Resultados similares han sido observados en la línea celular de glioma de rata, C6 (Luz-Madrigal A y Vaca L, datos no publicados). Sin embargo, en la línea celular no permisiva a la transducción RAW264.7, una línea celular murina de macrófagos, las NCs parecen estar atrapadas en la ruta fagocítica y el ADN viral es degradado, y transportado mediante compartimentos intracelulares que expresan el receptor TLR9 (toll-like receptor-9) (Abe *et al.*, 2005).

Una vez liberadas las NCs en el citoplasma, éstas inducen la formación de microfilamentos de actina lo cual facilita el transporte de las éstas al núcleo, un mecanismo utilizado por muchos otros virus (para revisión ver Campbell y Hope; 2005). La citocalasina D (Cytochalasin D), un agente que causa la des-polimerización reversible de los filamentos de actina, inhibe fuertemente la expresión

del transgen; sin embargo, dicho compuesto no previene la unión, la entrada del virus, así como el escape de las NCs de los endosomas (van Loo *et al.*, 2001). Recientemente, fue demostrado en células HepG2, que la desintegración de los microtubulos mediante agentes que causan su despolimerización (e.g., Nocodazol y vinblastina), aumentaron significativamente el transporte nuclear del virus con la subsiguiente expresión del transgen, sugiriendo que los microtubulos constituyen una barrera importante del transporte hacia el núcleo (Salminen *et al.*, 2005). Finalmente, la proteína P39 (la proteína más abundante de las NCs) así como las NCs aparentemente completas han sido observadas dentro del núcleo, sugiriendo que las NCs son transportadas a través de los poros nucleares (van Loo *et al.*, 2001). En resumen, los BV se unen a la membrana plasmática de las células de mamífero a través de la proteína Gp64 de su superficie y un receptor aun no descrito en las células. Los BV internalizan en la célula mediante endocitosis y pozas cubiertas de clatrin, consecutivamente la acidificación del endosoma induce cambios conformacionales en la proteína Gp64, la cual se fusiona con la membrana del endosoma y libera con ello las NCs en el citoplasma. Las NCs son transportadas al núcleo mediante microfilamentos de actina y finalmente éstas son translocadas al núcleo a través de los poros nucleares. Finalmente, las NCs son des-ensambladas en el núcleo mediante un mecanismo hasta ahora no descrito, liberando con ello el ADN para la expresión del transgen. Los mecanismos de entrada y tráfico sub-celular de los BV en células de mamífero se encuentran ilustrados en la figura 10.

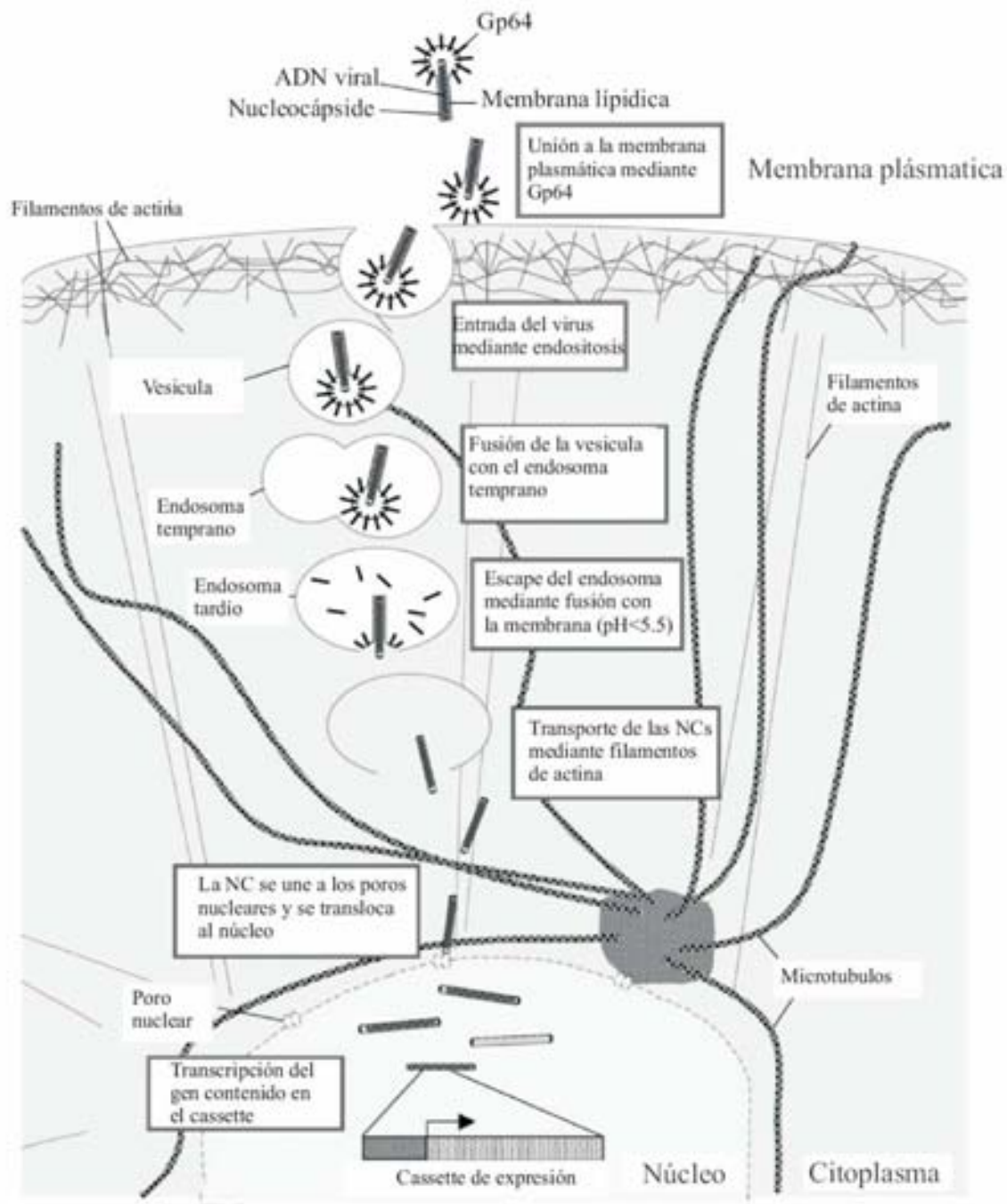


Figura 10. Mecanismos propuestos de entrada y tráfico sub-celular de los BV en células de mamífero. Modelo modificado de Hu, Y.C. 2005.

2.6 Efectos del promotor en la eficiencia de transducción

A pesar de que varios promotores han sido utilizados en el contexto del genoma de baculovirus (Tabla 3), solo Spenger *et al.*, (2004) compararon sistemáticamente los niveles de expresión dirigidos por los promotores del virus de simio (SV40), CMV, RSV y el promotor de la ubiquitina C humana (UbC), en células CHO, COS-1 y HEK293. Los promotores de CMV y RSV fueron los más activos, seguido del promotor de ubiquitina C; mientras que, el promotor de SV40 fue el más débil de los cuatro promotores (Spenger *et al.*, 2004). Más aun, en dicho estudio la adición de tricostatina A (TSA), un inhibidor específico de desacetilasas de histonas, provocó un aumento en la expresión del trasuño sugiriendo una asociación del ADN viral con proteínas susceptibles a ser acetiladas (Spenger *et al.*, 2004).

El uso de promotores tejido-específicos fue primero demostrado por Li *et al.*, 2005 quienes utilizaron la secuencia de un promotor híbrido que consiste del enhancer del promotor del citomegalovirus (CMV-IE), fusionado al promotor neuronal de la cadena β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, platelet-derived growth factor) (Li *et al.*, 2005b). Los niveles de expresión en células neuronales fueron 100 veces mayores con el virus llevando promotor híbrido, en comparación con los niveles de expresión obtenidos con el promotor de PDGF (Li *et al.*, 2005b). Posteriormente, el mismo grupo demostró mediante la misma estrategia que la secuencia del promotor híbrido CMV E/GFAP, el cual contenía el promotor de la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP, glial fibrillary acidic protein), mantuvo su especificidad de expresión en astrocitos y además los niveles de expresión fueron 10 veces mayores que los niveles alcanzados con el promotor de GFAP (Wang y Wang, 2006). Finalmente, al flanquear el cassette de expresión con secuencias terminales invertidas repetidas (ITRs, inverted terminal repeats) provenientes del virus adenoasociado (AAV, adeno-associated virus), se mantuvieron niveles altos de expresión *in vivo* por más de 90 días en cerebro de rata, en contraste los niveles de expresión *in vivo* utilizando los promotores del CMV-IE y de GFAP fueron prácticamente indetectables (Wang y Wang, 2006). Más tarde, Wang *et al.*, (2006) demostraron que la expresión de la cadena A de la toxina de difteria, dirigida por el promotor híbrido del CMV E/GFAP, suprimió el desarrollo tumoral *in vivo* en un modelo de glioma en rata (Wang *et al.*, 2006).

Tabla 3. Promotores utilizados en vectores de expresión en baculovirus.

PROMOTOR	REFERENCIA
Virus del sarcoma de Rous (RSV)	(Boyce y Bucher, 1996)
CMV-IE	(Hofmann <i>et al.</i> , 1995; Sollerbrant <i>et al.</i> , 2001)
SV40	(Spenger <i>et al.</i> , 2004)
CAG	(Shoji <i>et al.</i> , 1997; Stanbridge <i>et al.</i> , 2003)
Virus de hepatitis B (HBV)	(Delaney y Isom, 1998)
α -fetoproteína humana	(Park <i>et al.</i> , 2001)
Ubiquitina C humana (UbC)	(Spenger <i>et al.</i> , 2004)
PROMOTORES TEJIDO-ESPECÍFICOS	
Híbrido de la cadena β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF/CMV-IE)	(Li <i>et al.</i> , 2004; Wang y Wang, 2005)
CMV E/GFAP	(Wang <i>et al.</i> , 2006; Wang y Wang, 2006)
Proteína fibrilar ácida de glía	Luz-Madrigal A y Vaca L (No publicado)
Receptor de VEGF (Flt-1)	(Luz-Madrigal <i>et al.</i> , 2007)
PROMOTORES UTILIZADOS EN CÉLULAS DIFERENTES A MAMÍFERO	
Proteína de choque térmico de <i>Drosophila</i> (<i>hsp70</i>)	(Viswanathan <i>et al.</i> , 2003)
Metalotionina (MT)	(Viswanathan <i>et al.</i> , 2003; Kim <i>et al.</i> , 2008)

2.7 Modificación de los baculovirus para aumentar su eficiencia de transducción.

Se ha desarrollado un gran número de estrategias para desplegar proteínas o péptidos en la superficie de baculovirus, dicha metodología ha sido conocida como “baculovirus display” (Grabherr *et al.*, 2001; Oker-Blom *et al.*, 2003; Makela y Oker-Blom, 2008). La modificación de la proteína Gp64 de manera adecuada resulta en un cambio del tropismo y un aumento en la eficiencia de transducción de los baculovirus (Makela y Oker-Blom, 2008). La estrategia consiste en fusionar péptidos o proteínas al extremo 5' terminal de la proteína Gp64 y bajo el promotor de polihedrina o p10 (Oker-Blom *et al.*, 2003). Durante la replicación viral en las células de insecto, la proteína de fusión es expresada como una segunda copia de Gp64 y translocada a la membrana plasmática de donde es adquirida por los BV durante el proceso de gemación (ver ciclo de infección de los baculovirus). El uso de esta estrategia fue utilizada por primera vez por Boublick *et al.*, (1995), quienes incorporaron proteínas del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), lo cual resultó en baculovirus modificados con la capacidad de unirse al receptor CD4 en las células T (Boublick *et al.*, 1995). Una estrategia similar fue aplicada para generar baculovirus que despliegan avidina, causando un incremento de 5 veces en la eficiencia de transducción en células de glioma de rata BT4C y de 26 veces en células de músculo liso de aorta de conejo (RAASMC, rabbit aortic smooth muscle cells) (Raty *et al.*, 2004). Por otro lado, baculovirus que despliegan la proteína G del virus de estomatitis vesicular (VSVG), mostraron un aumento de 10 a 100 veces más eficiente para transducir células HepG2 y células neuronales de rata (Barsoum *et al.*, 1997). Más aun, se demostró que los virus desplegando la proteína VSVG, adquieren un tropismo más amplio al transducir líneas celulares que previamente no eran susceptibles de ser transducidas (Barsoum *et al.*, 1997). En dicho

estudio, se sugirió que el aumento en la eficiencia de transducción fue un resultado del mejoramiento del escape del endosoma, más que de la entrada del virus (Barsoum *et al.*, 1997). Posteriormente, se demostró la unión específica de baculovirus a células blanco mediante el despliegue de anticuerpos de cadena única (scFv) (Mottershead *et al.*, 2000). Más recientemente, Makela *et al.*, (2006) demostraron que la incorporación de los péptidos LyP-1, F3 y CGKRR en la superficie de baculovirus, aumentaron de 2 a 5 veces la eficiencia de transducción en células de cáncer de mama (MDA-MB-435) y en células de hepatoma humano (HepG2) (Makela *et al.*, 2006). Resumiendo, la inserción de péptidos y/o proteínas en la superficie de los BV utilizando la proteína Gp64, permite la modificación del tropismo celular y el aumento en la eficiencia de transducción. Por tanto, esta estrategia puede ser aplicada para dirigir la transducción mediante baculovirus recombinantes hacia células blanco.

2.8 Transducción *in vivo* mediante baculovirus recombinantes

Los baculovirus recombinantes también han sido utilizados para liberar genes para su expresión *in vivo*. En este sentido, se ha demostrado la expresión de genes reporteros en la arteria carótida de conejo; hígado, cerebro, músculo esquelético y testículos de ratón; así como en cerebro de rata (Airenne *et al.*, 2000; Sarkis *et al.*, 2000; Huser *et al.*, 2001; Pieroni *et al.*, 2001; Lehtolainen *et al.*, 2002; Tani *et al.*, 2003; Hoare *et al.*, 2005; Wang y Wang, 2005). Sin embargo, su aplicación *in vivo* se ha visto limitada debido a la acción del sistema del complemento (Sandig *et al.*, 1996; Hofmann y Strauss, 1998; Hoare *et al.*, 2005). La liberación de BV de forma sistémica, intraportal e inyección directa en el parénquima del hígado, resultó en una expresión génica indetectable (Sandig *et al.*, 1996). Éstos resultados, son debidos a la inactivación de los baculovirus en la presencia del suero, más específicamente debido a la activación de la vía clásica del complemento (Hofmann y Strauss, 1998). Hoare *et al.*, (2005) demostraron que la inactivación de los baculovirus se lleva a cabo mediante la ruta clásica y alterna del complemento, además, sugirieron la existencia de anticuerpos IgM con alta afinidad dirigidos contra baculovirus, los cuales pueden ser parcialmente responsables de dicha inactivación, aunque a la fecha no ha sido demostrado. Hoffman y Strauss (1998), demostraron que el tratamiento del suero humano con un anticuerpo bloqueador contra el componente del complemento 5(C5), aumento la estabilidad de los baculovirus (Hofmann y Strauss, 1998). Por otro lado, el inhibidor del complemento llamado receptor soluble del complemento tipo 1 (sCR1, soluble complement receptor type 1) protege a los baculovirus de la inactivación por el suero, más aún la co-administración de sCR1 junto con la liberación intraportal de baculovirus, permitió la expresión de un transgen en hígado de ratón (Hoare *et al.*, 2005). La inactivación de los baculovirus en plasma humano puede ser prevenida mediante el tratamiento con el factor del veneno de la cobra (CVF, cobra venom factor), un inhibidor del sistema del complemento

(Hofmann y Strauss, 1998). Sarkis *et al.*, (2000) corroboraron que la inactivación de los baculovirus puede ser bloqueada mediante la inyección de CVF y con ello transducir *in vivo* astrocitos de cerebro de ratones. Interesantemente, en el mismo estudio se observaron los mismos niveles de expresión en animales sin el tratamiento de CVF, sugiriendo que los virus no fueron inactivados por el sistema del complemento (Sarkis *et al.*, 2000). Los resultados contradictorios, probablemente se deben a las características inmunológicas del cerebro o a las diferencias en las coordenadas, presión o velocidad de inyección de las partículas virales (Sarkis *et al.*, 2000).

El problema de la inactivación por el complemento puede ser minimizado previniendo el contacto de los baculovirus con los componentes de la sangre. Airenne *et al.*, (2000), analizaron la transducción de células endoteliales *in vivo* administrando baculovirus recombinantes por medio de una cánula dirigida a la arteria carótida (Airenne *et al.*, 2000). En ése mismo estudio, se demostró que la eficiencia de transducción fue muy similar a la eficiencia de transducción obtenida por Ad y además fue transitoria, alcanzándose los niveles más altos en una semana y desapareciendo en el día 14 (Airenne *et al.*, 2000). Otra estrategia para prevenir la inactivación del virus por el sistema del complemento fue demostrada por Huser *et al.*, (2001), quienes generaron un baculovirus que incorpora la proteína del factor acelerador de la degradación (DAF, decay-accelerating factor) en su superficie, dicha proteína bloquea el complemento en la etapa central de las rutas clásica y alterna. El baculovirus con DAF en su superficie permitió un aumento substancial en la transducción *in vivo*, después de la inyección local en el parénquima del hígado de ratas recién nacidas (Huser *et al.*, 2001). Por otro lado, baculovirus que contienen VSVG, produjeron un aumento en la eficiencia de transducción *in vivo* en músculo esquelético (Pieroni *et al.*, 2001). Más aun, en el mismo estudio, la expresión del transgen permaneció durante 178 días en ratones DBA/2J y durante 35 días en ratones BALB/c y C57BL/6 (Pieroni *et al.*, 2001). Finalmente, se demostró que baculovirus con la proteína VSVG en su superficie, exhibieron una gran resistencia a la inactivación por el suero y demás fueron muy eficientes para transducir la corteza cerebral y testículos de ratón (Tani *et al.*, 2003). En resumen, el sistema del complemento representa una barrera importante para la aplicación de vectores de baculovirus para liberar genes *in vivo*; sin embargo, el uso de inhibidores del complemento tales como sCR1, CVF o la incorporación de las proteínas VSVG y DAF en la superficie de los BV, pueden ser alternativas para contrarrestar el efecto causado por el complemento.

3. Transferencia de material genético en sistema vascular

La transferencia de material genético en el sistema vascular (SV) puede ser una alternativa para el tratamiento de numerosas enfermedades, tales como hipertensión, inflamación, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis y cáncer (para revisión ver (Nabel, 1995; Gibbons y Dzau, 1996; Kullo *et al.*, 1999). Actualmente, existen más de 100 protocolos clínicos de transferencia de material genético en SV. Tales protocolos han sido aprobados por la Oficina de Actividades Biotecnológicas (OBA, Office of Biotechnology Activities) y por el comité de consulta de ADN recombinante (RAC, Recombinant DNA Advisory committee) de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, National Institutes of Health) de los Estados Unidos de Norteamérica. Algunos de los protocolos clínicos se encuentran en fase clínica I/II (<http://www4.od.nih.gov/oba/rac/PROTOCOL.pdf>).

El SV tiene ciertas características que lo hacen atractivo para expresar o inhibir genes (Nabel, 1995; Gibbons y Dzau, 1996; Kullo *et al.*, 1999). Entre sus propiedades destacan una gran área superficial y fácil acceso para la administración de vectores. La estructura del SV es relativamente simple y consiste de tres capas principales; el endotelio, la media y la adventicia (Nabel, 1995; Cines *et al.*, 1998). La arquitectura normal de los vasos sanguíneos está compuesta por tres tipos celulares; las células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos (Cines *et al.*, 1998; Melo *et al.*, 2004). Más aún, la transferencia génica puede ser dirigida hacia un lugar específico o al SV completo. Finalmente, el producto del transgen pueden ser secretado localmente, para llevar a cabo un efecto autocrino-paracrino o puede ser liberado en el torrente sanguíneo, para tener un efecto sistémico (Nabel, 1995).

Se han descrito varios métodos para transferir material genético para su expresión en el SV. Dichos sistemas pueden ser clasificados de manera general en sistemas virales y no virales. Los sistemas no virales incluyen el ADN desnudo o en complejos con lípidos catiónicos, así como complejos de ADN-proteína; sin embargo, tales sistemas son poco eficientes para liberar ADN *in vivo* (Verma y Weitzman, 2005).

Indudablemente, los virus han demostrado ser los vectores más eficientes para transferir ADN en el SV tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre los virus más utilizados están los retrovirus, Ad, AAV y más recientemente lentivirus. Sin embargo, una característica común en todos los virus utilizados como vectores en SV es que todos ellos son derivados de virus que normalmente infectan mamíferos, lo cual limita su uso debido a la respuesta inmune pre-existente (Thomas *et al.*, 2003; Verma y Weitzman, 2005; White *et al.*, 2007).

Existe un gran interés en el desarrollo de vectores virales con la capacidad de transferir y expresar genes de forma específica en el SV (para revisión ver (Nicklin y Baker, 2003; Baker *et al.*, 2005). Teóricamente, esto puede llevarse a cabo de dos maneras, la primera; modificando el tropismo de la

partícula viral y redirigiéndola a las células blanco (direccionamiento transduccional, transductional targeting) y segunda; incorporando secuencias de ADN, tales como secuencias de regulación transcripcional tejido-específicas, para restringir la expresión génica en ciertos tipos celulares (direccionamiento transcripcional, transcriptional gene targeting) (Nicklin *et al.*, 2003; Papadakis *et al.*, 2004; Baker *et al.*, 2005). El direccionamiento transduccional, ha sido poco exitoso debido a la incapacidad de modificar el tropismo de algunos virus; sin embargo, la técnica de despliegue en fagos (phage display), ha permitido identificar péptidos o secuencias que pueden ser incorporadas en la superficie de algunos vectores virales (Nicklin *et al.*, 2000; White *et al.*, 2001; Work *et al.*, 2002). En este sentido, Nicklin *et al.*, (2000) demostraron que la incorporación del péptido SYGYPLP en la superficie de Ad, redirigieron la transducción de forma específica hacia células endoteliales de cordón umbilical de humano (HUVEC) (Nicklin *et al.*, 2000). Resultados muy similares fueron obtenidos en un estudio posterior del mismo grupo, en donde el péptido SYGYPLP fue incorporado en la superficie de AAV serotipo 2 (Nicklin *et al.*, 2001a). El AAV modificado (AAV-sig) promovió un aumento en los niveles de expresión en células HUVEC. Más aun, la eficiencia de transducción mediada por AAV-sig, en células hepáticas y células de músculo liso, fueron menores en comparación con los niveles obtenidos con el AAV no modificado (Nicklin *et al.*, 2001a).

El uso de secuencias reguladoras de la transcripción tales como promotores tejido-específicos, ha dado los mejores resultados para restringir la expresión de un transgen en SV (Nicklin *et al.*, 2001b; Reynolds *et al.*, 2001; Papadakis *et al.*, 2004). Se han utilizado los promotores del factor de von Willebrand (vWF) (Jahroudi y Lynch, 1994), de la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1) (Neish *et al.*, 1992), de la oxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) (Marsden *et al.*, 1992), de la tirosina cinasa con inmunoglobulinas y dominios homólogos al factor de crecimiento epidermal (TIE) (Korhonen *et al.*, 1995), del receptor con dominios parecidos a cinasa (KDR) (Patterson *et al.*, 1995), de la molécula de adhesión intracelular 2 (ICAM-2) (Cowan *et al.*, 1996) y del receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular tipo 1 (Flt-1) (Nicklin *et al.*, 2001b; Reynolds *et al.*, 2001; Nicklin *et al.*, 2003). Un estudio detallado de la actividad transcripcional de los promotores específicos en SV fue llevado a cabo por Nicklin *et al.*, (2001), en dicho estudio se demostró que los promotores de Flt-1 e ICAM-2 dirigieron altos niveles de expresión en células endoteliales (HUVEC y en células endoteliales de vena safena (HSVEC), mientras que el promotor de vWF dirigió bajos niveles de expresión en las mismas células. Más aun, el análisis de la especificidad de la expresión en células no endoteliales, demostró que el promotor de Flt-1 es el más eficiente y específico en SV (Nicklin *et al.*, 2001b). En resumen, existen numerosas enfermedades relacionadas con la disfunción del endotelio vascular, por ello el SV representa un blanco atractivo para la transferencia de material genético con fines tanto terapéuticos como de investigación. Más aún, el

uso de secuencias promotoras tejido-específicas (e.g., el promotor de Flt-1) aunado al direccionamiento de los vectores virales hacia este tejido, representan dos estrategias importantes para dirigir la expresión de un transgen en el SV.

4. Transferencia de material genético en sistema nervioso central

Existe un considerable interés en el tratamiento de enfermedades asociadas con el sistema nervioso central (SNC) mediante la transferencia y expresión de genes con fines terapéuticos, [para revisión ver (Benitez y Segovia, 2003; Davidson y Breakefield, 2003; Deglon y Hantraye, 2005)]. Algunas enfermedades importantes incluyen; el Alzheimer, Parkinson, Huntington así como algunos tumores (gliomas y neuroblastomas) (Deglon y Hantraye, 2005). El uso de vectores virales para transferir material genético representa una estrategia para la investigación tanto básica como aplicada. Los virus más utilizados en el SNC han sido los lentivirus, AAV, Ad e incluso virus del herpes simplex (Davidson y Breakefield, 2003). Entre ellos destacan los Ads, éstos se unen al receptor CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor) mediante la proteína de la fibra (llamada “knob”) y su entrada es facilitada por la base del pentón y la unión a integrinas $\alpha_v\beta_3$ y β_5 , encontradas en la membrana de las células (Nemerow, 2000). Existen dos estrategias principales para dirigir la entrada de partículas de Ads en células del SNC, la primera consiste en la modificación de la proteína de la fibra y la segunda, consiste en el uso de anticuerpos bi-específicos. Douglas *et al.*, (1996) redirigieron partículas virales de Ads hacia líneas celulares tumorales derivadas de cerebro (Krasnykh *et al.*, 1996). El uso de promotores tejido-específicos también se ha demostrado en el SNC (Klein *et al.*, 1998; Glover *et al.*, 2002; Benitez y Segovia, 2003). Se han utilizado los promotores de la prolactina (PRL) (Southgate *et al.*, 2000; Smith-Arica *et al.*, 2001), de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Mellon *et al.*, 1990; Kepa *et al.*, 1996), de la enolasa neuronal (NSE) (Andersen *et al.*, 1992; Klein *et al.*, 1998), de la proteína básica de mielina (MBP) (Hashimoto *et al.*, 1996; Miyao *et al.*, 1997), de la telomerasa reversa transcriptasa (hTERT) (Koga *et al.*, 2000; Komata *et al.*, 2001), de la tirosina hidroxilasa (TH) (Cambi *et al.*, 1989; Gandelman *et al.*, 1990; Fung *et al.*, 1992), de la dopamina β -hidroxilasa (DBH) (Lamouroux *et al.*, 1993; Hwang *et al.*, 2001), de las células de Purkinje (pcp-2) (Nordquist *et al.*, 1988; Hashimoto *et al.*, 1996), de la hormona de crecimiento (GH) (Lefevre *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1999), de la preproencefalina (PPE) (Kaplitt *et al.*, 1994), de la sinapsina I (syn1) (Howland *et al.*, 1991; Hoesche *et al.*, 1993; Ralph *et al.*, 2000; Kugler *et al.*, 2001; Glover *et al.*, 2002), de la fosfoglicerato cinasa (PGK) (Corti *et al.*, 1999a; Corti *et al.*, 1999b) y de la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP) (Trejo *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2006; Wang y Wang, 2006).

La lista de promotores tejido-específicos utilizados en el SNC es bastante larga; sin embargo, el objetivo esencial de esta estrategia es promover la expresión del transgen en un tipo celular

específico. En este sentido, en la selección del promotor deberá tomarse en cuenta aquel que conserve sus propiedades de transcripción semejantes a las del gen endógeno, esto permitiría que la expresión del transgen se lleve a cabo no solamente en las células de interés, sino con los niveles necesarios para que el transgen ejerza sus efectos terapéuticos incluso por largos periodos de tiempo. Por otro lado, las secuencias promotoras deberán ser caracterizadas en el contexto del genoma viral que se vaya a utilizar (e.g., Ad, AAV o lentivirus), de tal manera que sigan manteniendo sus características de actividad transcripcional y de regulación de acuerdo al tejido o a la progresión de la enfermedad (Benitez y Segovia, 2003).

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC y juegan un papel crucial en la sobrevivencia y funciones fisiológicas de las neuronas (Bohn, 2004; Do Thi *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004). En este sentido, se ha demostrado la importancia de utilizar los astrocitos como células blanco para transferir genes para su expresión en enfermedades relacionadas con el SNC (Bohn, 2004; Do Thi *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004). Los factores neurotróficos secretados por los astrocitos pueden actuar localmente o cerca de las neuronas y actuar de manera semejante a los producidos en la periferia de la región de interés. Además, los factores tróficos pueden actuar de un modo paracrino para promover la sobrevivencia de las neuronas, disminuir o detener el proceso de degeneración de los axones y probablemente estimular la regeneración de éstos. Más aún, la transferencia génica en astrocitos con factores neurotróficos puede beneficiar las interacciones celulares entre astrocitos y neuronas.

El promotor más utilizado y mejor caracterizado para expresar genes en astrocitos, ha sido el promotor del gen *gfap* que codifica para la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP) (Su *et al.*, 2004). La proteína GFAP es encontrada en los filamentos intermedios y es expresada casi exclusivamente en astrocitos (Eng y Ghirnikar, 1994). Estos hechos han sugerido el uso del promotor de GFAP para dirigir una expresión tejido-específica en astrocitos (Su *et al.*, 2004). Existen dos grupos principales de investigación que han empleado el promotor de GFAP; el primero del Dr. Mucke, ha analizado la expresión de transgenes dirigidos por el promotor de GFAP derivado de ratón y el segundo, el grupo del Dr. Brenner, el cual ha utilizado el promotor de GFAP derivado de humano (Mucke *et al.*, 1991; Brenner *et al.*, 1994). Ambos grupos han obtenido resultados similares y a la fecha existen más de 150 artículos, en los cuales se utiliza al promotor de GFAP para dirigir la expresión de transgenes en astrocitos (Su *et al.*, 2004). Algunas aplicaciones incluyen; estudios funcionales *in vivo* de varios productos génicos, uso de astrocitos para la síntesis de bio-moléculas activas y la generación de modelos de enfermedades. Además de su especificidad en la expresión, el promotor de GFAP dirige altos niveles de expresión llegando a expresar un transgen a más del 0.1 % del total de la proteína del cerebro (Smith *et al.*, 1998).

Tomando en cuenta los antecedentes descritos anteriormente, el promotor del gen *gfap* puede ser utilizado en distintos sistemas de transferencia génica y puede ser útil para obtener una expresión tejido-específica en el SNC. Más aún, éste promotor puede ser utilizado para la síntesis y liberación de factores tróficos, tales como neurotransmisores y factores de crecimiento así como en el tratamiento de gliomas.

En resumen, los virus han sido los mejores vectores de transferencia génica en células de mamífero tanto *in vitro* como *in vivo*. Recientemente, se ha demostrado que los baculovirus recombinantes derivados del baculovirus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) pueden transferir material genético para su expresión en células de mamífero. AcMNPV infecta exclusivamente insectos y es incapaz de replicarse en células de mamífero. Existe un gran interés en el desarrollo de vectores virales con la capacidad de transferir y expresar genes en un tipo celular específico. Por otro lado, una de las principales estrategias para dirigir la expresión de un transgen en un tipo celular específico, ha sido la incorporación de secuencias de ADN (e.g., promotores tejido-específicos). Dicha estrategia puede ser relevante para la transferencia de material genético de forma tejido-específica en el SV y en el SNC.

A pesar de que está bien documentado el uso de baculovirus recombinantes como vectores para transferir genes tanto *in vitro* como *in vivo* en células de mamífero, el uso de estos virus como vectores de expresión se encuentra en sus etapas iniciales de desarrollo. Por tanto, existe muy poca información concerniente al uso de promotores tejido-específicos en el contexto del genoma del baculovirus.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los virus recombinantes derivados de virus de mamíferos pueden transferir información genética para su expresión en SV y SNC. Sin embargo, su aplicación se encuentra limitada por la citotoxicidad, la respuesta inmune y la incapacidad de modificar su tropismo celular. Es por ello que actualmente existe un gran interés en el desarrollo de vectores virales con la capacidad de transferir y expresar genes en un tipo celular específico. El direccionamiento de la expresión de un transgen mediante un vector viral puede llevarse a cabo a dos niveles, el primero consiste en la modificación del tropismo de la partícula viral y el segundo, consiste en la incorporación de secuencias reguladoras de la transcripción tales como promotores tejido-específicos. Se ha demostrado que las secuencias promotoras de los genes *flt-1* y de *gfap* dirigen una expresión específica en células endoteliales y astrocitos, respectivamente.

Los baculovirus son virus de insectos y son incapaces de replicarse en células de mamífero. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que los baculovirus recombinantes derivados de AcMNPV pueden transferir información genética para su expresión en células de mamífero tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, a la fecha existe poca información concerniente al uso de promotores tejido-específicos en el contexto del genoma del baculovirus. Por tanto, este estudio pretende evaluar los niveles y selectividad de la expresión de un transgen tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante el uso de baculovirus recombinantes que contengan promotores tejido-específicos.

III. HIPÓTESIS

El uso de secuencias asociadas con la regulación de la transcripción tales como los promotores de los genes de *gfap* o de *flt-1*, permitirá dirigir una expresión tejido-específica en células de mamífero tanto *in vitro* como *in vivo* mediante baculovirus recombinantes.

IV. OBJETIVO GENERAL

Producir los baculovirus recombinantes derivados de AcMNPV que contengan las secuencias de los promotores de *gfap* o de *flt-1* y evaluar los niveles y especificidad de la expresión de un gen reportero tanto *in vitro* como *in vivo* en células de mamífero.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Producir el baculovirus recombinante BacCMV-GFP, incorporando la secuencia del promotor/potenciador temprano del citomegalovirus (CMV-IE) río arriba del gen de la proteína verde fluorescente (GFP).
- b) Evaluar la susceptibilidad de transducción y los niveles de expresión de GFP mediante BacCMV-GFP, en cultivos *in vitro* de diferentes líneas celulares de mamífero.
- c) Producir los baculovirus recombinantes incorporando la secuencia del promotor de *gfap* (BacGfap-GFP, BacGfap-*nlacZ*) o de *flt-1* (BacFlt-GFP), río arriba del gen *gfp* o *nlacZ*.
- d) Analizar la especificidad de la expresión del gen *gfp* utilizando BacFlt-GFP y BacGFAP-GFP, en cultivos *in vitro* de diferentes líneas celulares de mamífero y comparar los niveles de expresión con los obtenidos mediante BacCMV-GFP.
- e) Examinar la especificidad de la expresión de *gfp in vivo* en el SV de la retina de rata a través de la inyección intravítrea de partículas del baculovirus BacFlt-GFP.
- f) Analizar la especificidad de la expresión de *gfp in vivo* en el cerebro de rata adulta mediante la inyección de partículas virales de BacGfap-GFP

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Células y cultivo. Las células utilizadas para propagar los baculovirus recombinantes fueron Sf21 o Sf9 de *Spodoptera frugiperda* (Invitrogen, Carlsbad, CA) y fueron cultivadas en monocapa y/o suspensión en medio Grace's (Sigma, St Louis, MD, USA) suplementado con 10 % (vol/vol) de suero fetal bovino, 1.0 % de yeastolate, 1.0 % de hidrolizado de lactalbumina y 1.0 % de penicilina/streptomycin (Gibco, Grand Island, NY.) e incubadas a 27 °C. En el caso de las células crecidas en suspensión se añadió 0.1 % de ácido plurónico F68 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se incubaron a 27 °C y con una agitación de 100 revoluciones por minuto (rpm). Las líneas celulares de mamífero: C6, RIN-m5F, CHO, HEK-293 y HepG2; fueron obtenidas de una colección de cultivos (ATCC, American Type Culture Collection). Las células CH235 de glioma humano fueron donadas por el Dr. Andrés Gutiérrez (Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA México D.F.). Todas las células mencionadas anteriormente fueron cultivadas en medio DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las células RIN-m5F de insulinooma de páncreas de rata fueron crecidas y mantenidas en medio RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las células BUVEC-E6E7-1 de cordón umbilical de bovino fueron donadas por la Dra. Carmen Clapp (Cajero-Juarez *et al.*, 2002), (Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México) y fueron mantenidas en medio F12-K (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Todos los medios de cultivo celular fueron suplementados con 10 % de suero fetal bovino, 1.0 % de penicilina/streptomycin y 2mM de L-glutamina (Gibco, Grand Island, NY). Las células de mamífero fueron incubadas en una atmósfera de 5.0 % de CO₂ y una temperatura de 37 °C.

Construcción de los plásmidos. Un fragmento *HindIII/SmaI* proveniente del plásmido pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, CA) fue clonado en el plásmido pBluescript SK+ (Stratagen) en los mismos sitios, para producir pSKpoliA. Posteriormente, un fragmento *EcoRI/BamHI* proveniente de pSKpoliA fue clonado en los sitios *EcoRI/BglII* del plásmido pBlueBac 4.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) en orientación opuesta al promotor de polihedrina para generar pBB4PoliA. Finalmente, un fragmento *SalI/EcoRI* proveniente de pcDNA3.1(+), el cual contiene el promotor temprano y en enhancer del citomegalovirus (CMV-IE), fue clonado en el plásmido pBB4PoliA para generar el plásmido pBlueCMV (este plásmido contiene un sitio múltiple de clonación para incorporar cualquier gen bajo el promotor de CMV-IE). El plásmido pBlueCMV-GFP fue generado a través de la clonación de un fragmento *BamHI/NotI*, el cual contiene el gen de la proteína verde fluorescente *gfp*, proveniente del plásmido pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA), en los sitios *KpnI* y *ApaI* de pBlueCMV, tratando previamente los insertos con el fragmento klenow de la ADN polimerasa. El plásmido pBlueFlt-GFP, fue construido a través de la clonación de un fragmento *BamHI/HindIII* de 1040 pb, proveniente del plásmido p(-748/+284) donado por el Dr. Lewis (Morishita *et al.*, 1995), en los sitios *BglII/HindIII* del plásmido pBlueCMV-GFP. El

plásmido pBlueGfap-GFP, fue generado primero liberando un fragmento *Bam*HI proveniente del plásmido pgfa2-*nlacZ* (Brenner *et al.*, 1994) (donado por el Dr. Segovia, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, CINVESTAV), posteriormente este fragmento fue tratado con la enzima klenow y finalmente con la enzima *Bgl*III para ser clonado en el plásmido pBlueCMV-GFP previamente digerido con la enzima *Hind*III, tratado con la enzima klenow y finalmente digerido con *Bgl*III. El plásmido pBlueGFAP-*nlacZ*, el cual contiene la secuencia promotora del gen *gfap* río arriba del gen de la β -galactosidasa con señal de localización nuclear (*nlacZ*), fue construido clonando un fragmento *Bgl*III proveniente del plásmido pgfa2-*nlacZ* (Brenner *et al.*, 1994) en un sitio *Bgl*III del plásmido pBlueBac4.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Todos los plásmidos fueron secuenciados para confirmar la integridad de la secuencia promotora así como la secuencia del gen de *gfp*. El diagrama de flujo detallado de la construcción de los plásmidos así como sus mapas es mostrado en el Anexo 1.

Producción de los baculovirus recombinantes. Los baculovirus recombinantes BacCMV-GFP, BacFlt-GFP, BacGfap-GFP y BacGfap-*nlacZ*, fueron generados mediante recombinación homóloga de los plásmidos previamente descritos con el ADN genómico lineal de AcMNPV *Bsu*36I Bac-N-Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA). En todos los casos, los cassettes de expresión fueron incorporados en el locus de la polihedrina dentro del genoma de AcMNPV *Bsu*36I Bac-N-Blue y en orientación opuesta al promotor de la polihedra (ver Anexo 1). Tanto los plásmidos de transferencia como el ADN genómico lineal de AcMNPV, fueron co-transfectados mediante lípidos catiónicos (CELLFECTINE[®], Invitrogen Carlsbad, CA) en células Sf21. Una semana después, el medio de cultivo fue recolectado y diluido para realizar ensayos en placa utilizando agarosa de bajo punto de fusión (Sigma, St Louis, MD, USA) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosido (X-gal, Sigma, St Louis, MD, USA) para detectar la expresión del gen *lacZ*. Después de dos rondas de purificación, los baculovirus fueron amplificados durante 7 días en células Sf21 o Sf9 cultivadas en suspensión. Posteriormente, el medio se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min y el sobrenadante fue recolectado para realizar ensayos en placa y conocer el título viral. La producción de los baculovirus recombinantes esta descrita con mayor detalle en el Anexo 2.

Experimentos de transducción. Todas las líneas celulares de mamífero fueron tratadas bajo las mismas condiciones. Aproximadamente, 1×10^5 células de mamífero fueron cultivadas en placas de seis pozos con las condiciones antes descritas. Antes de la transducción, las células se lavaron dos veces con medio OPTI-MEM (Gibco, Grand Island, NY). Posteriormente, se incubaron durante 4 h a 37 °C con una suspensión de baculovirus recombinante a diferentes multiplicidades de infección (MOI) en 0.5 mL del mismo medio. Finalmente, la suspensión viral fue removida y se adicionó medio fresco solo o con los inhibidores de desacetilasas de histonas (HDAC, histone deacetylases),

tricostatina A (TSA) o butirato de sodio (ButNa) (Sigma, St Louis, MD, USA) o con el inhibidor de metilación del ADN, 5-azacitidina (AzaC, Sigma, St Louis, MD, USA). El análisis de la expresión del gen *gfp* se realizó a las 48 hpt mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo.

Citometría de flujo. El análisis del porcentaje de células positivas a la expresión del gen de *gfp* (GFP+) y la intensidad media de fluorescencia (IMF) se llevo a cabo mediante citometría de flujo (FACS, Calibur, BD Biosciencias) a las 48 hpt. Adicionalmente, se incluyo un control de células no tratadas para normalizar el número de células que expresan GFP+ y la IMF. La adquisición (10,000 eventos) y el análisis de los datos se llevo a cabo utilizando el software CellQuest (BD Biosciences, Palo Alto, CA) y el software WinMDI 2.8 (Windows Multiple Document Interface, Flow Cytometry Application, Joseph TrotterTM, <http://facs.scripps.edu/>, Scripps Research Institute, USA).

Transfecciones transitorias. Las transfecciones transitorias se llevaron a cabo sembrando 2.5×10^5 células BUVEC-E6E7-1 o C6, en placas de seis pozos tal como se describió anteriormente. Aproximadamente 24 h después, 2.5 μ g del plásmido pBlueFlt-GFP o pBlueGfap-GFP (ver construcción de los plásmidos) fueron transfectados en las células BUVEC-E6E7-1 y C6, respectivamente. Las transfecciones se llevaron a cabo utilizando Lipofectamina Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo al protocolo de manufactura. Después de la transfección, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los inhibidores de HDAC (ButNa o TSA), según se indica en el pie de figura y los niveles de expresión de GFP fueron analizados 48 h después de la transfección mediante citometría de flujo.

Actividad *in situ* de la β -galactosidasa. Aproximadamente 1×10^5 células CHO, HeLa o cultivo primario de astrocitos de rata, fueron transducidos en placas de 6 pozos con BacGfap-*nlacZ*. A las 48 hpt las células fueron lavadas 2 veces con PBS (KH₂PO₄ 1.7 mM, Na₂HPO₄ 5mM, NaCl 150 mM, pH=7.4) y fijadas con una solución de 20 % de formaldehído y 2 % de glutaraldehído en PBS durante 10 min. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se adiciono 1 mL de una solución de tinción (MgCl₂ 20 mM, K₄Fe(CN)₆·3H₂O 40 mM, K₃Fe(CN)₆ 40 mM y X-gal 1 mg/mL); posteriormente, las células se incubaron durante toda la noche a 37 °C y una atmósfera de 5 % de CO₂. Finalmente se lavaron 2 veces con PBS y se analizaron en un microscopio invertido.

Transducción *in vivo* en el endotelio vascular de la retina. Ratas hembras, adultas, de 6 a 8 semanas de edad, de la cepa Wistar y con un peso de 200-250 g, fueron manipuladas de acuerdo a la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO, Animals in Ophthalmic and Vision Research) y anestesiadas con 70 % de ketamina (Sigma, St Louis, MD, USA) y 30 % de xilasina (Sigma, St Louis, MD, USA) (1 μ L/g de peso corporal, intraperitonealmente). Para los experimentos de transducción *in vivo*, 1×10^7 unidades formadoras de placa (UFP) de BacFlt-GFP o PBS en el ojo contra-lateral (10 μ l) se inyectaron en el espacio del cuerpo vítreo, previamente

extrayendo 5 μ l del vítreo. Los animales recuperados de la anestesia se mantuvieron durante tres días después de la inyección y se sacrificaron para realizar los análisis de la expresión del gen *gfp*. Se utilizaron 30 animales en todos experimentos.

Inmunofluorescencia. A los tres días después de la administración de BacFlt-GFP, las retinas se disectaron y se trataron de la siguiente manera; 6 h en 4 % de paraformaldehído en PBS (pH= 7.4), 3 h en 10 % de sacarosa, toda la noche en 20 % de sacarosa y finalmente 3 días en 30 % de sacarosa. Las retinas se embebieron en medio de congelación (Tissue-Tek; Sakura Finetek, Torrance, CA) durante 45 min a -70 °C. Para el análisis, se obtuvieron cortes alternados 1 x 60 μ m por 10 de 10 μ m y los cortes se montaron en portaobjetos (Superfrost/Plus, A Daigger and Co., Vernon Hills, IL). Las muestras se trataron durante 2 h a 4 °C con el buffer de bloqueo (solución de Tritón X-100 0.05 %, BSA 1 % y 1 % de suero normal de cabra en PBS) y se lavaron dos veces con PBS (pH=7.4) a temperatura ambiente. Los cortes de retina se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo contra el factor de von Willebrand (vWF, von Willebran Factor) de rata hecho en conejo (1:100 en buffer de bloqueo, ZYMED Laboratorios, South San Francisco), el cual marca específicamente células endoteliales (Blann, 2006). Al día siguiente, las muestras se lavaron tres veces durante 5 min con PBS, se añadió un anticuerpo acoplado a rodamina contra conejo hecho en cabra (Sigma-Aldrich USA, 1:100) y se incubo durante 1 h a 4 °C. Adicionalmente, las muestras se trataron con 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI, Vector Labs, USA) para marcar la cromatina contenida en el núcleo. A continuación, se lavaron tres veces durante 5 min con PBS y se montaron para su análisis en una solución de PBS/40 % glicerol. Las secciones fueron analizadas utilizando un objetivo 40X en un microscopio de fluorescencia (NIKON, Melville, NY)

Microscopia confocal y deconvolución de las imágenes. El análisis por microscopia confocal se llevo a cabo en un sistema confocal FV1000 Olympus (Olympus Tokyo, Japan). La fluorescencia de la proteína GFP fue obtenida después de excitar las muestras a 488 nm y las lecturas fueron registradas a 540 nm. Para la detección de rodamina, la longitud de onda de excitación fue 554 nm y la longitud de emisión fue registrada a 576 nm. Las imágenes fueron digitalizadas y evaluadas con el software Image ProPlus V5.1 (Media Cybernetics, San Diego, CA). La reconstrucciones en tres dimensiones (3D) de vasos sanguíneos, se obtuvieron apilando aproximadamente 30 imágenes obtenidas de cortes ópticos de 0.3 μ m. La deconvolución de las imágenes se llevo a cabo utilizando el software Autodeblur-X-G-CF software (Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD). Todas las imágenes fueron obtenidas de un mínimo de 3 cortes de retina en al menos 2 animales tratados.

VII. RESULTADOS

Susceptibilidad de transducción en células de mamífero mediante baculovirus recombinantes

Con la finalidad de conocer la susceptibilidad de transducción de diferentes líneas celulares de mamífero, se utilizó el baculovirus BacCMV-GFP (Figura 11A y ver Anexo 1 para mayor detalle). Dicho virus contiene la secuencia del enhancer y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV-IE) (nucleótidos -655 a +106), el cual es ubicuo y dirige altos niveles de expresión en células de distintos tejidos. Diferentes líneas celulares de mamífero incluyendo la línea celular endotelial BUVEC-E6E7-1 y la línea celular de glioma de rata C6, fueron tratadas con 100 multiplicidades de infección (MOI) de BacCMV-GFP utilizando el sobrenadante de las células de insecto previamente infectadas con el mismo virus (ver materiales y métodos). Posteriormente, las células fueron incubadas con butirato de sodio (ButNa) 5 mM, un inhibidor de desacetilasas de histonas (HDAC, histone deacetylases) (Davie, 2003). El análisis de la expresión de *gfp* se llevó a cabo mediante microscopia de fluorescencia y los porcentajes de células positivas a la síntesis de la proteína GFP (GFP+) así como la intensidad media de fluorescencia (IMF) fueron evaluados mediante citometría de flujo. En las células HepG2 y C6 se observó la expresión de GFP a partir de las 8 hpt y los niveles más altos para todas las líneas celulares fueron máximos a las 48 hpt; por tanto, este tiempo fue seleccionado para el análisis de los niveles de expresión. Todas las líneas celulares utilizadas fueron susceptibles de ser transducidas por BacCMV-GFP con porcentajes de células GFP+ de 89.2 % para HepG2, 57.7 % para C6, 24.2 % para BUVEC-E6E7-1, 19.4 % para HEK-293 y de 14.4 % para RIN-m5F (Figura 11B, línea roja del histograma).

Es bien conocido que el acceso de la maquinaria transcripcional al promotor es uno de los mecanismos de regulación de la expresión génica (Strahl y Allis, 2000). A pesar de que varios mecanismos han sido implicados en la regulación de dicho proceso, el estado de acetilación y desacetilación de las histonas así como los estados de metilación del ADN parecen ser los de mayor importancia (Newell-Price *et al.*, 2000; Strahl y Allis, 2000). Previamente, se ha sugerido que la regulación epigenética parece jugar un papel importante en la expresión de un transgen, mediante el uso de vectores de baculovirus en células de mamífero (Sarkis *et al.*, 2000; Spenger *et al.*, 2004). Por tanto, las células fueron tratadas con ButNa, un inhibidor de las HDAC y con AzaC, un inhibidor de la metilación del ADN (Juttermann *et al.*, 1994; Spenger *et al.*, 2004).

La adición de ButNa inmediatamente después de la transducción, claramente promovió un aumento en la cantidad de células GFP+ (Fig. 11B, línea verde en el histograma). Llama la atención el incremento en el número de células GFP+ para HEK293, RIN-m5F y BUVEC-E6E7-1 cuyos porcentajes van del 19.4 al 66.2 % ($P < 0.01$, $n=5$) de 14.4 al 59.6 % ($P < 0.05$) y de 24.2 al 66.8 % respectivamente, cuando son tratadas con ButNa. Por otro lado, en las células C6 no existió un aumento significativo en número de células GFP+ (57.7 al 63.5 %, $P = 0.7244$, $n = 4$) después del

tratamiento con ButNa, mientras que en HepG2 solo se observó un ligero aumento del 89.2 al 94 % células GFP+ ($P < 0.05$, $n = 4$) (Figura 11B y C). Los niveles de síntesis de la proteína GFP evaluados por la IMF, mostraron claramente un aumento en la expresión en todas las líneas celulares tratadas con el inhibidor de HDAC (Figura 11D). El efecto más evidente fue para las células RIN-m5F con un aumento de 92.6 veces comparado con las células no tratadas, mientras que el efecto fue menor para las células HepG2 y C6 (5.9 y 3.9, respectivamente). En un intento por reactivar la expresión de *gfp* mediante un inhibidor de la metilación del ADN, las células fueron tratadas con AzaC; sin embargo, dicho tratamiento no mostró ningún efecto en los niveles de expresión de GFP obtenidos después de tratar las células con 30 y 50 μM de AzaC sola o en combinación con ButNa 5 mM o TSA 30 nM (datos no mostrados). Estos resultados demuestran claramente que en todas las líneas celulares utilizadas incluida la línea celular endotelial BUVEC-E6E7-1 y la línea celular de glioma de rata C6, existe una fuerte represión de la expresión del transgen *gfp* aparentemente debida a una desacetilación de las histonas y esta represión es revertida por inhibidores de HDAC tales como TSA y el ButNa, pero no por el inhibidor de la metilación del ADN, AzaC. Estos datos sugieren que la metilación de ADN no juega un papel importante en la represión del transgen en el contexto del genoma del baculovirus.

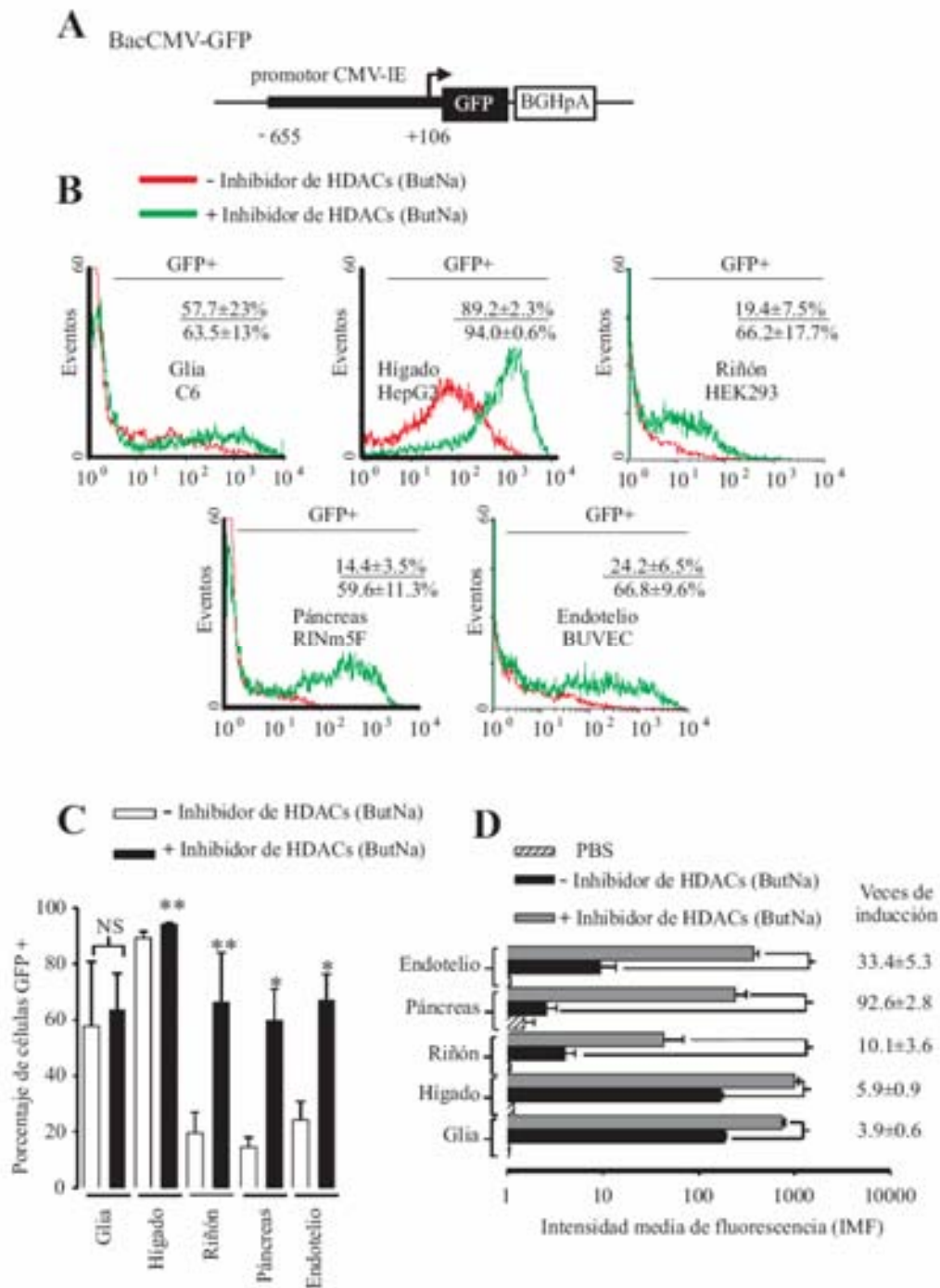


Figura 11. Susceptibilidad de transducción en células de mamífero mediante baculovirus recombinantes. 1×10^5 células fueron transducidas con 100 MOI de BacCMV-GFP. **(A)** Estructura del cassette de expresión de BacCMV-GFP. CMV-IE, promotor/potenciador temprano del citomegalovirus (nucleótidos -655 a +106); *gfp*, gen de la proteína verde fluorescente (GFP); BGHpA, secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. **(B)** Histogramas representativos obtenidos por citometría de flujo a las 48 hpt. El porcentaje de células GFP+ fue calculado substrayendo la fluorescencia basal de las células sin tratamiento con el virus (ver materiales y métodos). Los números en cada histograma se refiere al porcentaje de células GFP+ \pm la desviación estándar (DS) de las células sin tratar (arriba) o tratadas (abajo) con el inhibidor de HDACs (ButNa) ($n=4$). **(C)** Porcentaje de células GFP+ obtenidas por citometría de flujo con o sin ButNa. * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, *** $P = 0.7244$ contra las células sin tratar con ButNa. NS= no significativo. **(D)** Niveles de expresión de *gfp* y veces de inducción (indicados a la derecha) determinados por la intensidad media de fluorescencia (IMF) en presencia o ausencia de ButNa. Los valores representan la media \pm DS de cuatro experimentos independientes ($n=4$). Las líneas celulares utilizadas fueron: C6, de glioma de rata; HepG2, de hepatoma humano; HEK293, de riñón de embrión humano; RINm5F, de insulinoma de rata y BUVEC-E6E7-1, células endoteliales de cordón umbilical de bovino.

Expresión tejido-específica en células endoteliales mediante baculovirus recombinantes conteniendo el promotor de Flt-1

Los experimentos de expresión tejido-específica en el endotelio vascular se llevaron a cabo utilizando el baculovirus BacFlt-GFP, éste contiene la secuencia promotora previamente reportada del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular *flt-1* (Morishita *et al.*, 1995). Dicha secuencia va de los nucleótidos +284 a -748 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (Figura 12A) (Morishita *et al.*, 1995). El análisis de los niveles de expresión de *gfp* se llevo a cabo en las células inmortalizadas BUVEC-E6E7-1, las cuales conservan las características fenotípicas y funcionales de células endoteliales (Cajero-Juarez *et al.*, 2002). Las células BUVEC-E6E7-1 fueron transducidas con 100 MOI de BacFlt-GFP en presencia de ButNa 5mM y analizadas a las 48 hpt. El análisis por citometría de flujo demostró un porcentaje de células GFP+ del 60.34 %, un porcentaje muy semejante al obtenido con BacCMV-GFP (66.8 %) (Figuras 12B y 11B). Por otro lado, no se demostró una diferencia significativa en los niveles de expresión alcanzados con BacCMV-GFP y BacFlt-GFP ($P=0.197$, $n=4$) (Figura 12B) a la misma MOI. Resultados muy similares fueron obtenidos por Nicklin *et al.*, (2001) en donde se observó que un Ad conteniendo la misma secuencia promotora (i.e., promotor de *flt-1*), produjo niveles muy similares de expresión que un Ad que contenía la secuencia promotora del CMV-IE en células endoteliales de cordón umbilical de humano (HUVEC) (Nicklin *et al.*, 2001b).

Para conocer el mantenimiento de la especificidad de expresión en células endoteliales, se realizaron experimentos de transducción en diferentes líneas celulares de mamífero utilizando el baculovirus BacFlt-GFP. Debido a que las eficiencias de transducción varían entre las diferentes líneas celulares, el nivel de expresión (i.e., IMF) para cada línea celular fue normalizado utilizando el virus BacCMV-GFP como control positivo. Tal como se esperaba, el valor más alto de expresión fue para las células BUVEC-E6E7-1 (112 % relativo BacCMV-GFP, $P<0.0005$, $n=4$) (Figura 12C). De manera importante, los niveles de expresión fueron severamente reducidos en otras líneas celulares no endoteliales incluyendo HepG2, HEK-293 y RIN-m5F. Por ejemplo, la expresión de *gfp* en las células HepG2 fue de tan solo 5.32 % de la obtenida con BacCMV-GFP, demostrando de esta manera una ligera actividad transcripcional del promotor de *flt-1* en esta línea celular (Figura 12C). Más aun, el virus BacFlt-GFP dirigió altos niveles de expresión en la línea celular de glioma de rata C6 y en la línea celular de glioblastoma humano CH235 (34.78 y 47.86 %, respectivamente). De acuerdo a estos resultados, se ha demostrado la expresión de los genes *flt-1* y *kdr* (ambos receptores para VEGF) en tumores del SNC, mama, cáncer de próstata y en líneas celulares derivadas de estos tumores (Steiner *et al.*, 2004; Shibuya y Claesson-Welsh, 2006). Con la finalidad de confirmar la presencia del mensajero de Flt-1 en las líneas celulares C6 y CH235, se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR, dichos experimentos mostraron la presencia del mensajero de *flt-1*

(datos no mostrados). En resumen, estos resultados demuestran que el promotor de *flt-1* retiene su especificidad de expresión en células endoteliales en el contexto del genoma del baculovirus.

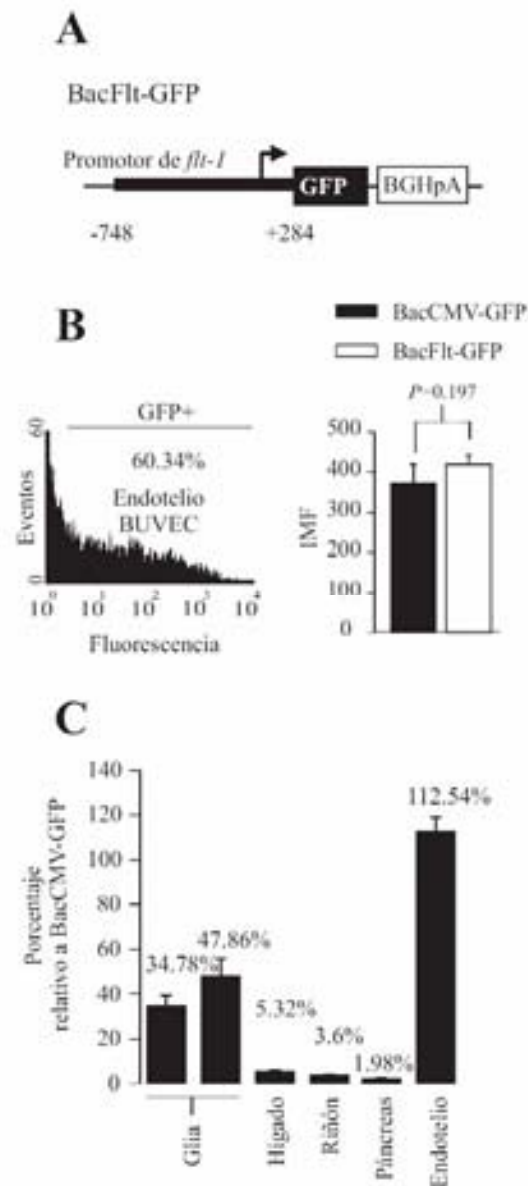


Figura 12. Especificidad y niveles de expresión obtenidos por el baculovirus BacFlt-GFP. (A) Estructura del cassette de expresión del baculovirus BacFlt-GFP. Abreviaturas: Flt-1, secuencia promotora del gen de *flt-1* de humano (nucleótidos -748 a +284, con respecto al sitio de inicio de la transcripción) (Morishita *et al.*, 1995); *gfp*, proteína verde fluorescente (GFP); BGHpA, secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. (B) Panel izquierdo, histograma representativo obtenido por citometría de flujo a las 48 hpt de células BUVEC-E6E7-1 transducidas con 100 MOI de BacFlt-GFP y 5 mM de ButNa. El porcentaje de células GFP+ fue calculado substrayendo la fluorescencia basal de las células sin tratamiento con el virus (ver materiales y métodos). Panel derecho, niveles de expresión obtenidos con BacCMV-GFP o BacFlt-GFP en las células BUVEC-E6E7-1. (C) Selectividad de la expresión mediante BacFlt-GFP en diferentes líneas celulares de mamífero. El nivel de expresión para cada línea celular se calculó como el porcentaje de expresión obtenido con BacFlt-GFP, relativo a los niveles de expresión de BacCMV-GFP. La media y la desviación estándar (DS) se muestra arriba de cada barra. Los datos fueron obtenidos de cuatro experimentos independientes \pm DS. Las líneas celulares utilizadas fueron: C6, de glioma de rata; HepG2, de hepatoma humano; HEK293, de riñón de embrión humano; RINm5F, de insulinoma de rata y BUVEC-E6E7-1, células endoteliales de cordón umbilical de bovino.

Expresión tejido-específica en las células C6 y CH235

Los experimentos de expresión tejido-específica en astrocitos se llevaron a cabo utilizando el baculovirus BacGfap-GFP, dicho virus contiene la secuencia promotora de la proteína fibrilar ácida de la glia *gfap*, nucleótidos +47 a -2163 con respecto al sitio de inicio de la transcripción de GFAP (Brenner *et al.*, 1994) (Figura 13A). Previamente, se ha reportado la actividad tejido-específica de dicho promotor en las células de glioma de rata C6, por tanto estas células fueron utilizadas para analizar los niveles de expresión mediados por BacGfap-GFP (Segovia *et al.*, 1994; Segovia *et al.*, 1998). Las células C6 fueron tratadas con 100 MOI de BacGfap-GFP y 5 mM ButNa; posteriormente, fueron analizadas por citometría de flujo a las 48 hpt. Los resultados demostraron un porcentaje de células GFP+ muy similar al obtenido con BacCMV-GFP, 66.27 % y 63.5 %, respectivamente (Figuras 13B y 11B). No obstante, los niveles de expresión obtenidos mediante BacGfap-GFP fueron mucho menores comparados con los niveles de expresión obtenidos con BacCMV-GFP a la misma MOI, 226.9 y 776.62, respectivamente ($P=0.0002$, $n=4$, Figura 13B).

El análisis de la especificidad de expresión obtenida por BacGfap-GFP, demostró claramente que los niveles de expresión más altos se observaron en las líneas celulares C6 de glioma de rata y CH235 de glioma humano (30.62 y 35.13 % respectivamente, relativo a BacCMV-GFP), además dichos niveles de expresión fueron muy similares en ambas líneas celulares ($P=0.199$). Por otro lado, se observaron niveles extremadamente bajos a prácticamente indetectables en las líneas celulares HepG2, HEK-293, RIN-m5F y BUVEC-E6E7-1; 0.55, 2.70, 0.51 y 0.62 %, respectivamente (Figura 13C). Para confirmar tales resultados, se llevo a cabo la transducción de cultivos primarios de astrocitos de rata y se utilizó el baculovirus BacGfap-*nlacZ*, dicho virus contiene la misma secuencia promotora dirigiendo la expresión del gen de la β -galactosidasa (*nlacZ*), el cual contiene una señal de localización nuclear (Figura 13D) (Brenner *et al.*, 1994). La actividad de la β -galactosidasa se demostró claramente en los cultivos primarios de astrocitos y prácticamente fue indetectable en las células de ovario de hámster, CHO (Figura 13E). En suma, todos estos datos demuestran que el promotor del gen *gfap* es activo y mantiene su especificidad de expresión tanto en líneas celulares de origen glial así como en cultivo primario de astrocitos.

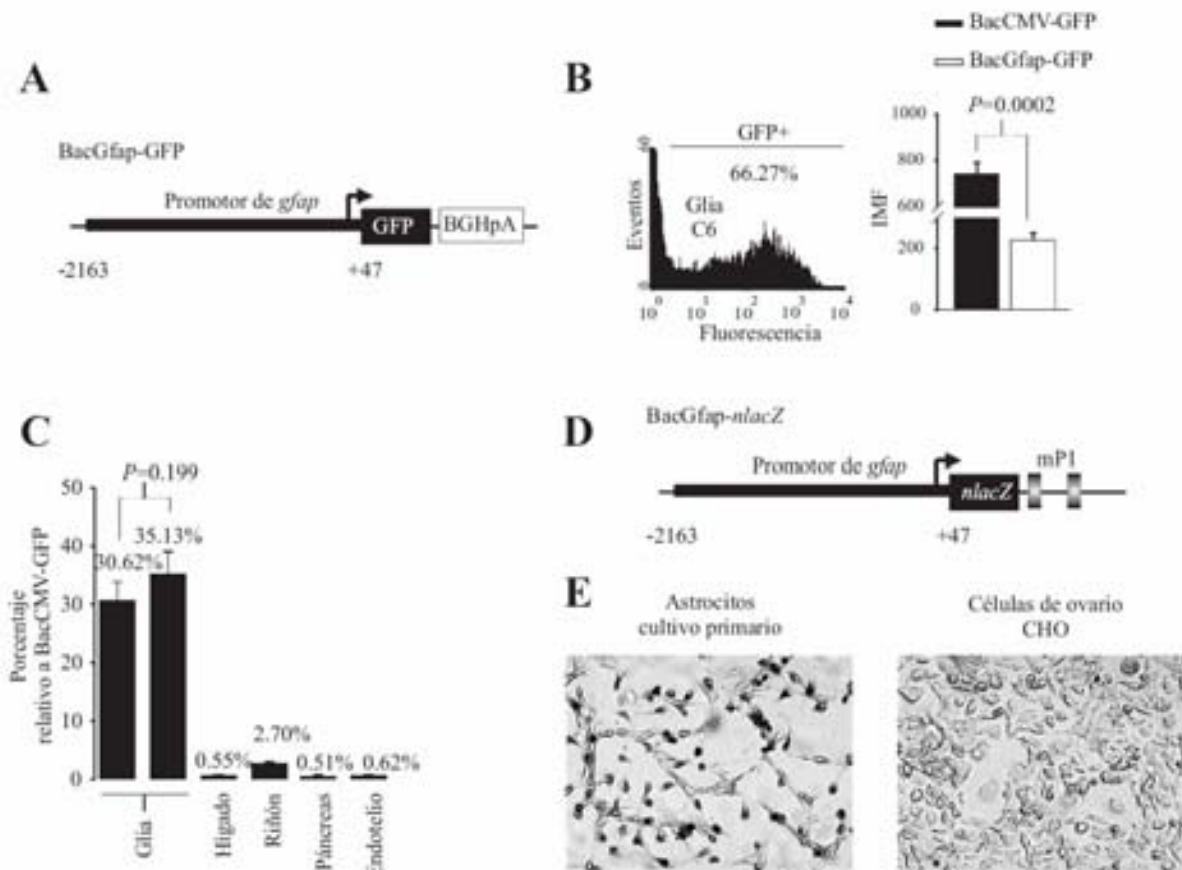


Figura 13. Especificidad y niveles de expresión producidos por BacGFAP-GFP. (A) Estructura del cassette de expresión de BacGFAP-GFP. Abreviaturas: GFAP, secuencia promotora del gen de *gfap* de mamífero (nucleótidos -2163 a +47, con respecto al sitio de inicio de la transcripción) (Brenner *et al.*, 1994); *gfp*, gen de la proteína verde fluorescente (GFP); BGHpA, secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. (B) Panel izquierdo, histograma representativo obtenido por citometría de flujo a las 48 hpt de células C6 transducidas con 100 MOI de BacFlt-GFP y 5 mM de ButNa. El porcentaje de células GFP+ fue calculado substrayendo la fluorescencia basal de las células sin tratamiento con el virus (ver materiales y métodos). Panel derecho, niveles de expresión obtenidos con BacCMV-GFP o BacGFAP-GFP en células C6. (C) Selectividad de la expresión mediante BacGFAP-GFP en diferentes líneas celulares de mamífero. El nivel de expresión para cada línea celular se calculó como el porcentaje de expresión obtenido con BacGFAP-GFP, relativo a los niveles de expresión de BacCMV-GFP. La media y la desviación estándar (DS) se muestra arriba de cada barra. Los datos fueron obtenidos de cuatro experimentos independientes \pm DS. (D) Estructura del cassette de expresión de BacGFAP-*nlacZ* (Brenner *et al.*, 1994). El cassette de expresión contiene además del promotor de *gfap*, un fragmento del gen de la protamina-1 de ratón (*mP1*) el cual provee un intrón (línea delgada) y la secuencia de poliadenilación. (E) Transducción de cultivos primarios de astrocytos o células de ovario de hámster (CHO), utilizando 100 MOI de BacGFAP-*nlacZ* y 5 mM de ButNa. Las líneas celulares utilizadas fueron: C6, de glioma de rata; HepG2, de hepatoma humano; HEK293, de riñón de embrión humano; RINm5F, de insulinoma de rata y BUVEC-E6E7-1, células endoteliales de cordón umbilical de bovino.

En resumen, todos estos datos demuestran que la especificidad transcripcional de los promotores de *flt-1* y de *gfap* es mantenida en el contexto del genoma del baculovirus. Además, los niveles de expresión de *gfp* que se obtuvieron con el baculovirus BacFlt-GFP fueron muy similares a los obtenidos con el virus que contiene un promotor fuerte como el de CMV-IE (i.e., BacCMV-GFP), en contraste los niveles de expresión obtenidos utilizando en baculovirus BacGfap-GFP fueron mucho menores en comparación con los niveles obtenidos con el virus BacCMV-GFP. La Tabla 3 resume los resultados obtenidos con los distintos virus utilizados en este estudio y las distintas líneas celulares.

Tabla 3. Transducción de células de mamífero y niveles de expresión de *gfp* utilizando el baculovirus con el promotor ubicuo de CMV-IE (BacCMV-GFP) y los baculovirus recombinantes que contienen promotores tejido-específicos (BacFlt-GFP y BacGfap-GFP) ^a.

Línea celular	BacCMV-GFP		BacFlt-GFP	BacGfap-GFP
	% de células GFP+	IMF	% relativo a BacCMV-GFP	% relativo a BacCMV-GFP
Glioma de rata	63.5 ± 23.0	740.81 ± 50	34.78 ± 4.6	30.62 ± 3.23
Glioma humano	75.0 ± 17.0	504.36 ± 167	47.86 ± 7.8	35.13 ± 3.91
Hepatoma humano	94.0 ± 0.60	1059 ± 102	5.32 ± 0.37	0.55 ± 0.12
Riñón de embrión humano	66.2 ± 17.0	43.15 ± 25	3.66 ± 0.31	2.70 ± 0.14
Insulinoma de rata	59.6 ± 11.3	238.86 ± 73	1.98 ± 0.46	0.51 ± 0.10
Endotelial de cordón umbilical de bovino	66.8 ± 9.60	372.57 ± 46	112.54 ± 6.27	0.62 ± 0.10

Las células fueron transducidas con 100 MOI de los baculovirus recombinantes y tratadas con el inhibidor de HDAC, butirato de sodio 5 mM. El porcentaje de células positivas a la proteína GFP fue obtenido mediante citometría de flujo a las 48 hpt. Los niveles de expresión del gen *gfp* fueron evaluados con la intensidad media de fluorescencia (IMF). ^a Los niveles de expresión producidos por BacFlt-GFP y BacGfap-GFP están dados como porcentajes relativos a los niveles de expresión obtenidos con BacCMV-GFP a la misma MOI. Las líneas celulares utilizadas en los experimentos de transducción fueron; C6 de glioma de rata, CH235 de glioma humano, HepG2 de hepatoma humano, HEK293 de riñón de embrión humano, RINm5F de insulinoma de rata y las células endoteliales de cordón umbilical de bovino, BUVEC-E6E7-1. Los valores representan la media ± desviación estándar (DS) de al menos cuatro experimentos independientes (n=4).

Efecto de los inhibidores (TSA y ButNa) de desacetilasas de histonas (HDACs) en la expresión dirigida por los promotores de *flt-1* y *gfap*

Para analizar el posible efecto de los inhibidores de las HDACs sobre la expresión producida por BacFlt-GFP y BacGfap-GFP. Las células BUVEC-E6E7-1 y C6, fueron transducidas con 100 MOI de los baculovirus recombinantes e incubadas con concentraciones crecientes de ButNa o TSA (Yoshida y Horinouchi, 1999); posteriormente, el porcentaje de células GFP+ así como la IMF se analizaron a las 48 hpt. El tratamiento con ambos inhibidores claramente aumentó el porcentaje de células GFP+ de manera dosis dependiente, tanto para BacFlt-GFP como para BacGfap-GFP (Figura 14A y B). Para BacFlt-GFP, el número de células GFP+ aumento de 8.64 % en las células no tratadas a 78.25 % en las células tratadas con ButNa 15 mM y 53.04 % en las células tratadas con 50 nM de TSA (Figura 14A y B). Por otro lado, en las células C6 transducidas con BacGfap-GFP, el porcentaje de células GFP+ se incremento de 36.87 % en las células no tratadas a 69.88 % en las células tratadas con ButNa 10 mM, mientras que la TSA tuvo un efecto similar, alcanzándose un porcentaje de células GFP+ de 58.71 %, a una concentración de 30 nM (Figura 14A y B).

El análisis de la IMF, mostró que ambos inhibidores de HDACs (ButNa y TSA), promovieron un aumento en los niveles de expresión para ambos virus (BacFlt-GFP y BacGfap-GFP). El efecto más evidente se observó en las células BUVEC-E6E7-1 transducidas con BacFlt-GFP, con un aumento de 81.68 veces utilizando ButNa 15 mM y de 61.69 veces utilizando TSA 50 nM, respectivamente (Figura 14C). Solo se observó un ligero aumento en los niveles de expresión entre concentraciones 5 y 10 mM de ButNa ($P=0.01$, $n=4$) o 25 y 30 nM de TSA ($P=0.01$, $n=4$). Por otro lado, en las células C6 transducidas con BacGfap-GFP, los niveles de expresión fueron muy similares a las concentraciones probadas de ButNa y TSA. Los niveles máximos de inducción fueron de 3.76 veces utilizando ButNa 5 mM y de 43.2 veces utilizando TSA 30 nM, respectivamente (Figura 14D). No se observó una diferencia significativa entre la inducción producida por el tratamiento de 1 y 5 mM de ButNa ($P=0.4150$, $n=4$) y concentraciones de entre 10 y 25 nM de TSA ($P=0.5410$, $n=4$). Concentraciones mayores de 10 mM de ButNa o 30nM de TSA, tuvieron un efecto tóxico en las células C6 (datos no mostrados). Por otro lado, tratamientos por más de 72 h a concentraciones mayores de 5 mM de ButNa o mayores de 10 nM de TSA, tuvieron un efecto tóxico en ambas líneas celulares (BUVEC-E6E7-1 y C6) en términos del número de células viables evaluadas con azul de tripano (datos no mostrados). El resumen del efecto de los inhibidores de las HDACs sobre la expresión de *gfp* utilizando los baculovirus recombinantes BacFlt-GFP y BacGfap-GFP se muestra en la Tabla 4.

Para conocer si el efecto de silenciamiento de la expresión del transgen era debido al genoma viral, se llevaron a cabo experimentos de transfecciones transitorias en las mismas líneas celulares (BUVEC-E6E7-1 y C6), utilizando los plásmidos de transferencia pBlueFlt-GFP y pBlueGfap-GFP

(ver materiales y métodos), y tratadas con concentraciones crecientes de los inhibidores de HDAC (ButNa y TSA). El análisis de la IMF a las 48 h después de la transfección, no reveló ningún efecto en los niveles de expresión del transgen, tanto en las células transfectadas con pBlueFlt-GFP como para pBlueGfap-GFP (Figura 14E y F).

Por tanto, estos resultados demuestran que la expresión del transgen contenido en el genoma viral es susceptible de silenciamiento y que dicho fenómeno es revertido por la adición de inhibidores de HDACs tales como el ButNa y TSA. Más aun, el mecanismo de silenciamiento es independiente del promotor utilizado ya que se observaron resultados muy similares con ambos virus BacFlt-GFP y BacGfap-GFP.

Tabla 4. Efecto de los inhibidores de las HDACs sobre la expresión de *gfp* utilizando los baculovirus recombinantes BacFlt-GFP y BacGfap-GFP

Virus/ células	PBS		ButNa ^a		TSA ^b	
	% GFP+	IMF	% GFP+	IMF	% GFP+	IMF
BacFlt-GFP/ endoteliales	8.64 ± 2.36	1.78 ± 0.21	78.25 ± 3.5	145.25 ± 27.11	53.04 ± 3.76	220.49 ± 61.5
BacGfap-GFP/ glia	38.87 ± 12.1	53.65 ± 12.11	69.88 ± 8.4	193.05 ± 15.08	58.71 ± 7.2	570.29 ± 27.44

Las células fueron transducidas con 100 MOI del baculovirus recombinante indicado e incubadas con PBS, ButNa o TSA. El porcentaje de células positivas a la proteína GFP fue obtenido mediante citometría de flujo a las 48 hpt y los niveles de expresión del gen *gfp* fueron evaluados con la intensidad media de fluorescencia (IMF). ^a Tratamientos de ButNa 15 mM para las células endoteliales o 5 mM para las células de glia. ^b Tratamientos de TSA 50 nM para las células endoteliales o 25 nM para las células de glia. Las líneas celulares utilizadas en los experimentos fueron; C6 de glioma de rata y BUVEC-E6E7-1 de cordón umbilical de bovino. Los valores representan la media ± desviación estándar (DS) de al menos cuatro experimentos independientes ($n=4$).

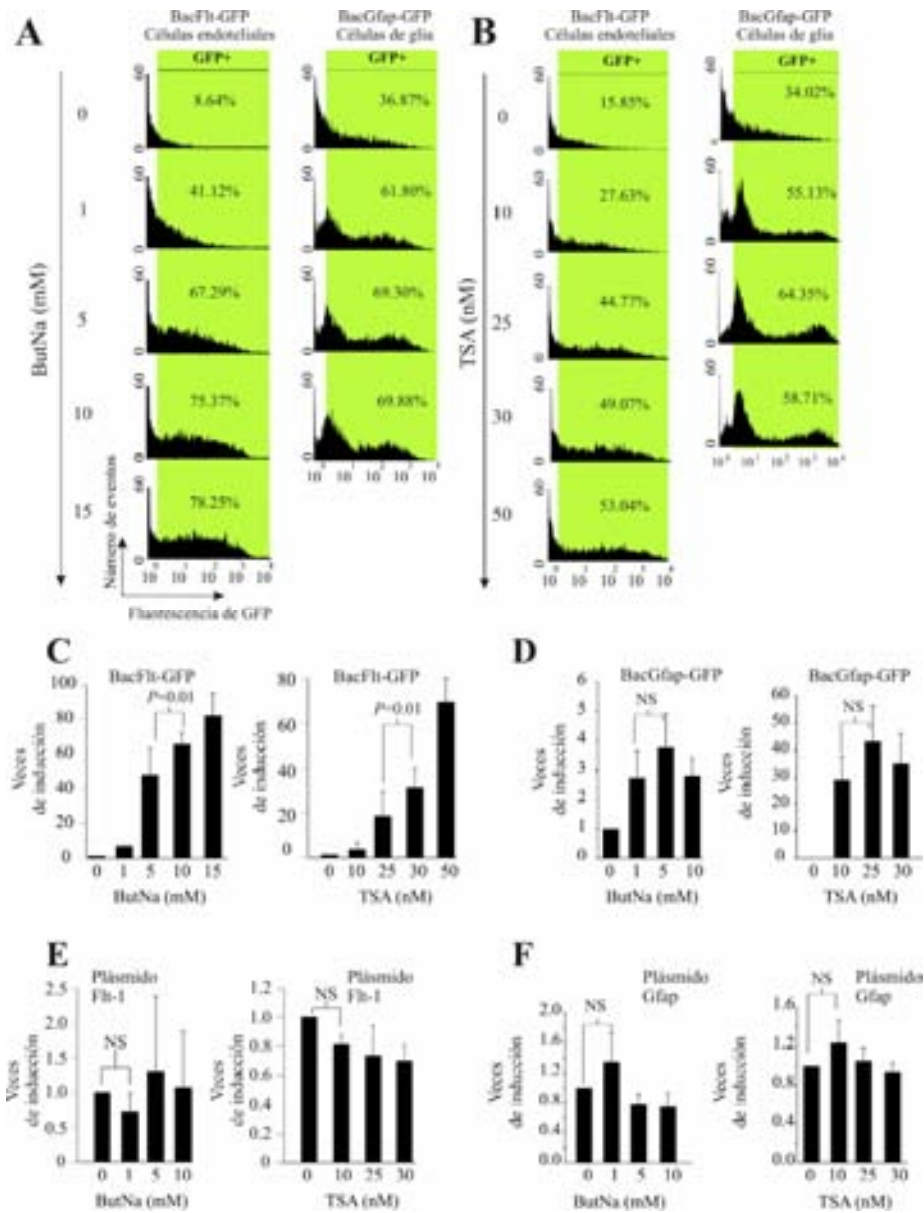


Figura 14. Efecto de los inhibidores de las HDACs en la expresión mediada por BacFlt-GFP y BacGfap-GFP. (A y B) Histogramas representativos obtenidos mediante citometría de flujo a las 48 hpt de células endoteliales (BUVEC-E6E7-1) o de glia (C6) transducidas con BacFlt-GFP o BacGfap-GFP, respectivamente. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de los inhibidores de HDACs (ButNa o TSA) según se indica. El porcentaje de células GFP+ (indicado por la barra en verde) es mostrado dentro de cada histograma y fue calculado substrayendo la fluorescencia basal de las células sin tratamiento con el virus (ver materiales y métodos). Veces de inducción de la expresión de GFP en (C) células BUVEC-E6E7-1 transducidas con 100 MOI BacFlt-GFP o (D) células C6 transducidas con 100 MOI de BacGfap-GFP y tratadas con concentraciones crecientes de ButNa o TSA. Veces de inducción de la expresión de GFP en (E) células BUVEC-E6E7-1, transfectadas con el plásmido pBlueFlt-GFP (plásmido Flt-1) o (F) células C6 transfectadas con el plásmido pBlueGfap-GFP y tratadas con diferentes concentraciones de ButNa o TSA. Los resultados en cada barra muestran la media \pm DS de al menos tres experimentos independientes. NS, no existe diferencia significativa.

Transducción específica del endotelio vascular de retina de rata mediante baculovirus recombinantes

Para analizar la especificidad de la expresión del transgen *in vivo* en el endotelio vascular, se llevaron a cabo experimentos de inyección de las partículas virales de BacFlt-GFP dentro del cuerpo vítreo del ojo de rata adulta. Debido a que el ojo es un sistema cerrado y aislado de la circulación sistémica, resulta más accesible la administración del vector (Sakamoto *et al.*, 2001). Por otro lado, la retina se encuentra separada del torrente sanguíneo el cual contiene factores inhibitorios tales como el complemento (Sakamoto *et al.*, 2001). Dichas características, son particularmente relevantes en la transferencia de genes mediante baculovirus recombinantes, ya que el sistema del complemento ha sido claramente implicado en la inactivación *in vivo* de las partículas virales (Hofmann y Strauss, 1998). Más aun, se ha demostrado la posibilidad de expresar genes reporteros en la retina de rata, mediante la inyección de partículas de baculovirus recombinantes dentro de cuerpo vítreo, así como por inyección sub-retinal, alcanzando niveles máximos de expresión a los 2-3 días después de la inyección (Haeseleer *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005b). Tomando en cuenta tales consideraciones, 10 μ l de una solución de BacFlt-GFP (aproximadamente 1×10^7 UFP) o vehículo (ver materiales y métodos), fueron inyectados en la cavidad vítrea del ojo de ratas adultas. Posteriormente, 3 días después de la inyección las ratas fueron sacrificadas, las retinas fueron rápidamente extraídas, fijadas y analizadas utilizando un microcopio de epifluorescencia equipado con un filtro para observar la fluorescencia de GFP. La inyección de las partículas virales de BacFlt-GFP, dentro del cuerpo vítreo, se tradujo en una fuerte expresión del gen reportero *gfp* y una gran cantidad de células que expresaron la proteína GFP (GFP+). La mayoría de las células GFP+ se encontraron principalmente en la membrana limitante interna (ILM, inner limiting membrane) así como en la capa de las células ganglionares (GCL, ganglion cell layer) (Figura 15A y B). Con el objeto de confirmar el fenotipo de las células transducidas (i.e., GFP+), se realizaron experimentos de inmunofluorescencia contra la glicoproteína de adhesión, factor de von Willebrand (vWF, von Willebrand factor), el cual es un marcador específico de células endoteliales (Blann, 2006). Las células GFP+ co-localizaron frecuentemente (70 %, $n=10$, Figura 15J) con el anticuerpo anti-vWF (Figura 15B,C y D), confirmando de esta manera el fenotipo endotelial de las células transducidas *in vivo* mediante BacFlt-GFP. En contraste, las retinas de las ratas inyectadas con el vehículo no mostraron señal positiva a GFP (Figura 15F y G).

Para analizar con un mayor detalle que BacFlt-GFP efectivamente dirige una expresión en el endotelio vascular, se llevo a acabo un análisis mediante microscopia confocal de cortes de 12 μ m, de las retinas tratadas con las partículas virales y con el vehículo (Figura 13H e I). Las reconstrucciones tridimensionales (3D), de cortes ópticos de 0.3 μ m (aproximadamente 30 imágenes), procesados para eliminar la fluorescencia de fondo (ver materiales y métodos),

mostraron claramente un patrón de vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-vWF (marca roja), los cuales co-localizaron con la fluorescencia de GFP en las retinas tratadas con BacFlt-GFP (color amarillo), mientras que no se observó fluorescencia de GFP en las retinas control (Figura 15H e I).

En un intento por aumentar la frecuencia de las células que expresaban la proteína GFP *in vivo* en las células transducidas con BacFlt-GFP, administramos TSA y ButNa; sin embargo, en todos los casos se observó una fuerte reacción de inflamación en los animales tratados, mostrándose la incapacidad de utilizar la TSA y el ButNa *in vivo* en la retina de las ratas.

En resumen, estos resultados demuestran que el baculovirus BacFlt-GFP tiene la capacidad de dirigir una expresión tejido-específica de *gfp in vivo* en el endotelio vascular de la retina de rata, sugiriendo además, que el promotor de *flt-1* mantiene su especificidad de expresión tanto *in vitro* como *in vivo* en el contexto del genoma del baculovirus.

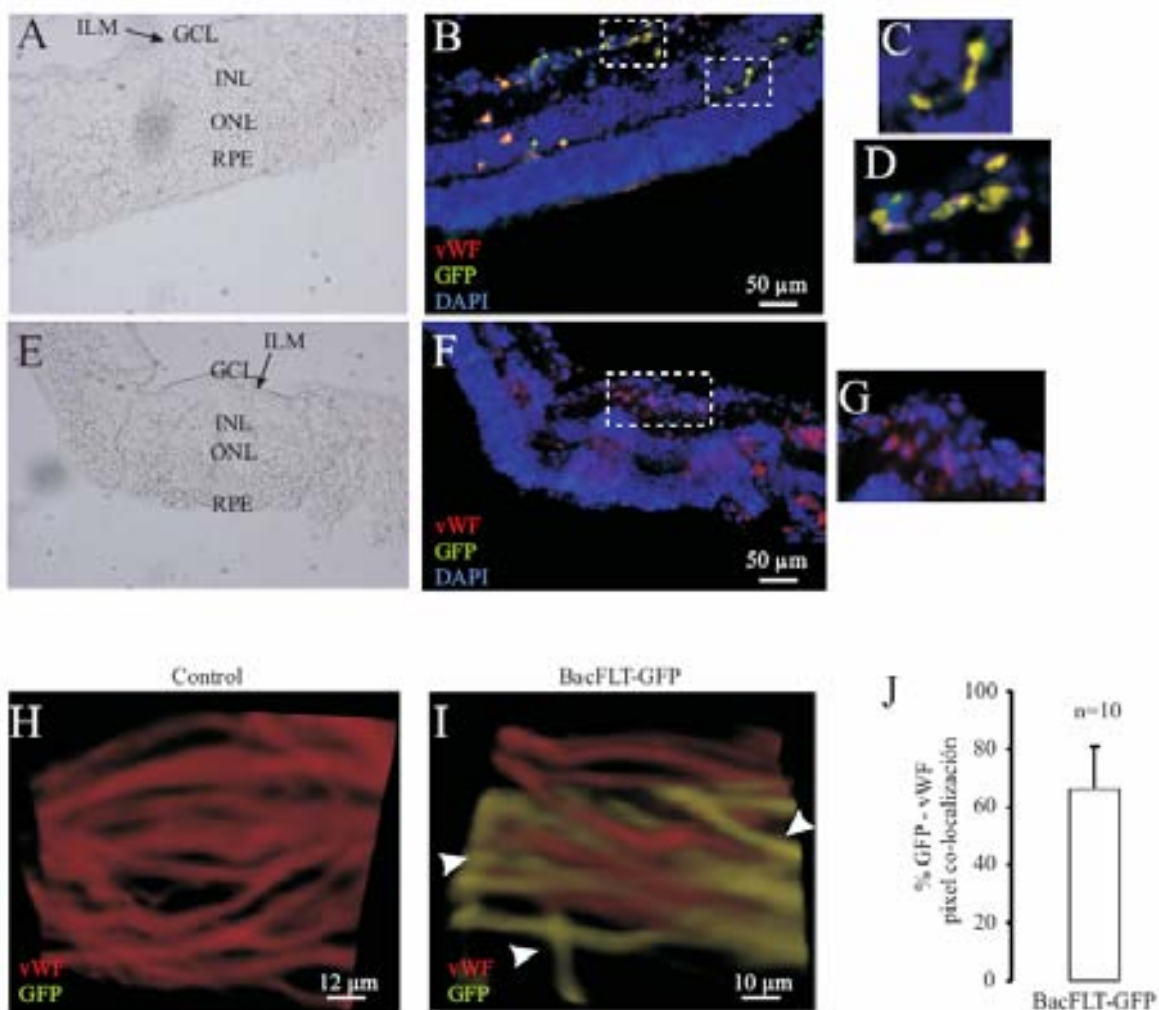


Figura 15. BacFlt-GFP dirige la expresión de *gfp* al endotelio vascular de la retina. Aproximadamente 10 μ l de una solución del baculovirus BacFlt-GFP (1×10^7 UFP de partículas virales) o vehículo (PBS), fueron inyectados en la cavidad vítrea del ojo de rata. Tres días después de la inyección del virus, las ratas fueron sacrificadas y las retinas fueron procesadas para inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo contra el Factor de von Willebrand (vWF, en rojo) y DAPI para teñir la cromatina del núcleo (en azul) (ver materiales y métodos). Cortes representativos de retinas de ojos inyectados con BacFlt-GFP (A, B, C y D) o vehículo (E, F y G). Estas mismas secciones fueron evaluadas mediante microscopia de contraste de fases (A y E) y con anticuerpos contra vWF acoplados a rodamina (en rojo) y la fluorescencia de la proteína GFP (en verde). La combinación de las imágenes muestra la co-localización de rojo y verde (en amarillo) en estructuras semejantes a capilares (rectángulos C, D y G) obtenidos de las áreas marcadas con los rectángulos pequeños (líneas punteadas) de B y F. Reconstrucciones tri-dimensionales (3D) obtenidas mediante microscopia confocal de retinas inyectadas con el vehículo (H) o con BacFlt-GFP (I). En rojo se muestra vWF marcando la localización de vasos sanguíneos. La co-localización de la fluorescencia en rojo (vWF) y verde (GFP), se muestra en amarillo (cabezas de flecha en I). (J) Porcentaje de co-localización entre vWF y GFP en retinas inyectadas con BacFlt-GFP ($n = 10$ animales). Abreviaturas: RPE, retinal pigment epithelium (epitelio pigmentado de la retina); GCL, ganglion cell layer (capa de las células ganglionares); INL, inner nuclear layer (capa nuclear interna); ONL, outer nuclear layer (capa nuclear externa) e ILM, inner limiting membrane (membrana limitante interna).

VIII. DISCUSIÓN

Los baculovirus recombinantes representan una alternativa a los vectores virales actualmente utilizados para liberar ADN para su expresión en células de mamífero (Hu, 2005). En este estudio, nosotros evaluamos la posibilidad de utilizar baculovirus para dirigir la expresión de un transgen de forma tejido-específica. En los primeros experimentos, se analizó la susceptibilidad de transducción de diferentes líneas celulares de mamífero utilizando el baculovirus recombinante BacCMV-GFP, el cual contiene el potenciador y el promotor temprano del citomegalovirus (CM-IE nucleótidos, -655 a +106), dicho promotor es ubicuo y dirige altos niveles de expresión en células de diferentes tejidos. La transducción mediante BacCMV-GFP se demostró en las células endoteliales BUVEC-E6E7-1, en las células de glioma de rata, C6; en las células de hepatoma humano, HepG2; en las células de riñón de embrión humano, HEK293; y en la línea celular de insulinoma de rata, RINm5F. De todas las líneas celulares utilizadas, la más susceptible a la transducción por BacCMV-GFP fue la línea celular HepG2, tal como se ha demostrado previamente incluyendo otras líneas celulares derivadas de hepatoma y de cultivo primario de hepatocitos (Hofmann *et al.*, 1995; Boyce y Bucher, 1996). Por otro lado, la línea celular RIN-m5F fue la menos susceptible de ser transducida (14.4 %, GFP+). En contraste a estos resultados, Ma *et al.*, (2000) demostraron que un baculovirus conteniendo la misma secuencia promotora (CM-IE) fue capaz de transducir cultivos primarios de células de islotes pancreáticos de ratón y humano, alcanzándose una eficiencia del 85 % de células transducidas (Ma *et al.*, 2000). No obstante, en dicho estudio la producción de la proteína GFP fue analizada por inmunofluorescencia y no por citometría de flujo, tal como se llevo a cabo en este trabajo, por tanto; estas diferencias en el análisis podrían explicar la diferencia en los resultados.

La línea celular de glioma de rata C6, fue muy susceptible a la transducción por BacCMV-GFP, resultados muy similares fueron observados utilizando la línea celular de glioma humano CH235 (datos no mostrados). De manera semejante, Wang *et al.*, (2006) demostraron que la línea celular C6 es susceptible a la transducción por baculovirus recombinantes (>50 % de células GFP+) a 100 MOI (Wang *et al.*, 2006).

Previamente se reportó que la línea celular endotelial de carcinoma humano ECV-304, fue prácticamente incapaz de ser transducida por baculovirus recombinantes (21 % de las células transducidas a una MOI de 1000); sin embargo, nuestros resultados demuestran que la línea celular endotelial BUVEC-E6E7-1, parece ser más susceptible a la transducción por BacCMV-GFP (>66 % de las células transducidas a una MOI de 100) (Airenne *et al.*, 2000). No obstante, en un intento de incluir una línea celular endotelial diferente a BUVEC-E6E7-1 utilizamos la línea celular endotelial de aorta de bovino BAEC; sin embargo, no logramos observar la expresión de *gfp* incluso a una MOI de 1000 y 5 mM de ButNa. En este sentido, Kukkonen *et al.*, (2003) reportaron que la línea celular de osteosarcoma MG63; la línea celular endotelial EAHY; y la línea celular de osteoblastos

de humano NHO; fueron incapaces de ser transducidas a 1000 MOI y en presencia de ButNa 10 mM, por un baculovirus recombinante llevando en gen *lacZ* bajo el promotor CMV (Kukkonen *et al.*, 2003). En ese mismo estudio, se demostró que los baculovirus recombinantes entraron en todas las líneas celulares; sin embargo, en todas ellas el virus fue incapaz de llegar al núcleo (Kukkonen *et al.*, 2003). Un fenómeno similar pudiera llevarse a cabo en las células BAEC; sin embargo, se requieren experimentos adicionales para confirmar la entrada de las partículas virales y su llegada al núcleo.

Uno de los mecanismos mejor estudiados de regulación de la expresión génica ha sido las modificaciones post-traduccionales de las histonas (Strahl y Allis, 2000; Zhang y Reinberg, 2001). En este sentido, los estados de acetilación y desacetilación de las histonas se correlacionan con los estados de activación y de represión de la expresión de genes (Strahl y Allis, 2000; Zhang y Reinberg, 2001). Previamente, se ha demostrado que el ButNa bloquea la desacetilación de las histonas induciendo con ello la acetilación de las mismas (Davie, 2003). El tratamiento con ButNa de las distintas líneas celulares transducidas con BaCMV-GFP, claramente promovió un aumento en la expresión del transgen. Más aun, el efecto provocado por el ButNa fue independiente del promotor utilizado, ya que resultados muy similares fueron observados tanto en el número de células GFP+ así como en los niveles de expresión de *gfp* en las células BUVEC-E6E7-1 y C6, transducidas con BacFlt-GFP y BacGfap-GFP, respectivamente.

Para confirmar que el bloqueo de la desacetilación de las histonas es uno de los mecanismos clave en la reactivación de la expresión del transgen, utilizamos la TSA, dicho compuesto es un inhibidor específico de HDACs (Yoshida y Horinouchi, 1999). A la fecha han sido identificados 17 genes que codifican para HDACs, 11 de estos genes (miembros de las familias de HDAC llamadas clase I y clase II), son inhibidos de forma específica por la TSA (Yoshida y Horinouchi, 1999; Johnstone, 2002; Monneret, 2005). El tratamiento con la TSA, mostró un efecto en la reactivación de la expresión de *gfp* en las células transducidas con BacFlt-GFP o BacGfap-GFP. Más aún, la reactivación utilizando la TSA fue más eficiente, ya que se observó su efecto a una concentración tan baja como 10 nM, mientras que los efectos máximos fueron observados a una concentración de 50 nM en las células BUVEC-E6E7-1 y de 25 nM en las células C6 transducidas con BacFlt-GFP y BacGfap-GFP, respectivamente. Tales concentraciones son aproximadamente 10,000 veces menores que la concentración de ButNa, utilizada para alcanzar efectos similares en la expresión. Para determinar si la metilación del ADN esta implicada en el mecanismo de silenciamiento de la expresión del transgen en el contexto del genoma viral, tratamos las células con el inhibidor de la metilación del ADN, AzaC (Juttermann *et al.*, 1994). Las células transducidas con BacCMV-GFP, BacFlt-GFP o BacGFAP-GFP, fueron tratadas con 25 μ M de AzaC solo o en combinación con ButNa o TSA; sin embargo, no se observó ningún efecto en la reactivación del transgen cuando el

AzaC fue añadido al medio de cultivo solo o en combinación con ButNa o TSA (datos no mostrados). Resultados muy similares fueron reportados recientemente por Kitajima *et al.*, (2006) en los cuales las células Huh-7, B16, Raw264.7 y YAC-1, transducidas con un baculovirus similar al reportado en este estudio (BacCMV-GFP), pudieron ser reactivadas por 10 mM de ButNa pero no por 10 μ M de AzaC (Kitajima *et al.*, 2006). Finalmente, para corroborar que el genoma viral está implicado en el mecanismo de silenciamiento del transgen, se llevaron a cabo transfecciones transitorias utilizando los plásmidos pBlueFlt-GFP y pBlueGfap-GFP (ver materiales y métodos) en las células BUVEC-E6E7-1 y C6, respectivamente, añadiendo al medio ButNa o TSA. Sin embargo, las células transfectadas e incubadas con ButNa y TSA, no mostraron un aumento en la expresión del transgen, en comparación a las células no tratadas, tal como se evaluó con la IMF.

En suma, todos estos datos sugieren que la metilación del ADN aparentemente no juega un papel preponderante en el mecanismo de silenciamiento del transgen. En contraste, la desacetilación de las histonas parece ser un mecanismo específico de represión de la expresión del transgen en el contexto del genoma del baculovirus y además es independiente del promotor y transgen utilizados en este estudio; ya que hemos observado resultados similares utilizando los baculovirus BacCMV-*nlacZ* y BacGfap-*nlacZ*, los cuales expresan el gen de la β -galactosidasa bajo el promotor de CMV y Gfap, respectivamente. Interesantemente, el fenómeno de represión transcripcional de transgenes liberados mediante partículas de baculovirus no solo se ha observado en células de mamífero, sino también en células de pollo, pato y de pez (Leisy *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2006).

Previamente, se ha demostrado que el ADN del baculovirus es incapaz de integrarse en el genoma de las células de mamífero (Tjia *et al.*, 1983). Tales hechos aunados a los resultados presentados en este trabajo, sugieren que puede existir una asociación entre el ADN viral episomal y las histonas de las células de mamífero para formar estructuras similares a nucleosomas y por lo tanto la cromatinización del genoma viral.

Por otro lado, dentro de las NCs el ADN del baculovirus se encuentra asociado a la proteína P6.9 viral, formando una estructura semejante a un nucleosoma (Tweeten *et al.*, 1980; Miller *et al.*, 1983a; Kelly y Lescott, 1984; Wilson y Consigli, 1985b; Wilson, 1988). Por tanto, existe la posibilidad de que esta proteína pueda ser sujeta a modificaciones epigenéticas por acetilación y desacetilación, dando lugar al acceso de la maquinaria transcripcional de la célula de mamífero.

Recientemente se demostró la asociación del ADN episomal de AAV y la histona H3 acetilada (Okada *et al.*, 2006). Es probable que una asociación similar pudiera estarse llevando a cabo entre el genoma del baculovirus y las histonas de mamífero, de ser posible, estudios de inmunoprecipitación de la cromatina (Chip, chromatin immunoprecipitation), permitirían explorar la probable asociación de ciertas regiones del ADN viral y las proteínas que pudieran estar modulando la estructura de la cromatina y/o las características transcripcionales de ciertas regiones de DNA (eg., el cassette de

expresión del transgen). Más aún, Bishop *et al.*, (2006) demostraron que existe una influencia de la posición espacial nuclear, en la expresión de transgenes episomales liberados mediante partículas similares a partículas virales (VLPs, virus-like particles) (Bishop *et al.*, 2006). En dicho estudio, el ADN episomal fue liberado eficientemente por las VLPs e inmediatamente silenciado y localizado en regiones de heterocromatina centromérica. Más aun, la activación de la expresión ya sea mediante factores transcripcionales o inhibidores de HDACs, tales como TSA, reactivaron eficientemente la expresión y re-localizaron el ADN episomal en zonas asociadas a eucromatina (Bishop *et al.*, 2006). Resultados preliminares de hibridación *in situ* para localizar el ADN del baculovirus en las células de mamífero, han demostrado una localización preferencial hacia la periferia nuclear (Luz-Madrigal A y Hernández-Hernández A., datos no publicados), un sitio enriquecido en heterocromatina (Sadoni *et al.*, 1999; Skalnikova *et al.*, 2000; Kozubek *et al.*, 2002). Por tanto, existe la posibilidad de que la posición espacial nuclear del ADN viral, pudiera tener consecuencias en los niveles de expresión en las células transducidas con baculovirus. Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios complementarios para demostrar: 1) la asociación del ADN viral con histonas que contengan marcas de represión y/o activación 2) la asociación entre el ADN episomal y regiones de heterocromatina (e.g., la asociación con la proteína asociada a heterocromatina, HP1) y 3) la posible re-localización del ADN viral después del tratamiento con inhibidores de HDACs. Por otro lado, los aisladores cromatínicos conocidos también como “insulators”, son secuencias de ADN que funcionan como barrera entre genes diferencialmente regulados (Valenzuela y Kamakaka, 2006). Dichas secuencias, pueden ser utilizadas para prevenir el silenciamiento, de transgenes liberados mediante partículas de baculovirus. En este sentido, Recillas-Targa *et al.*, (2002) demostraron que enmarcando un cassette de expresión con un fragmento de ADN de 250 pb proveniente de locus de la β -globina de pollo (cHS4), fue posible proteger el transgen de los efectos de silenciamiento de la cromatina circundante y de la extinción de la expresión durante largos periodos de tiempo (Recillas-Targa *et al.*, 2002). Más aun, recientemente Rincón-Arano *et al.*, (2007) demostraron que el efecto de protección por el aislador cHS4, se lleva a cabo incluso en regiones de heterocromatina telomérica, sugiriendo con ello que dicho aislador funciona en distintos contextos epigenómicos, incluyendo aquellos que corresponden a una heterocromatina constitutiva (Rincon-Arano *et al.*, 2007). A la fecha, el aislador cHS4 ha sido incorporado en distintos virus con la finalidad de proteger el transgen del silenciamiento o activación de la expresión, estos incluyen retrovirus, lentivirus e interesantemente virus episomales tales como los Ad, aunque en éste último el transgen fue protegido de efectos de activación y no de silenciamiento (Recillas-Targa *et al.*, 2004). A pesar de que el uso de los aisladores cromatínicos representa una poderosa estrategia para proteger el transgen de los efectos de posición, las principales limitaciones de su uso en contextos virales, radican en la disminución en el título de las

partículas virales así como en su estabilidad (Recillas-Targa *et al.*, 2004; Ellis y Yao, 2005; Yi *et al.*, 2005). No obstante, la utilización del aislador cHS4 podría potencialmente prevenir el silenciamiento de transgenes liberados mediante partículas de baculovirus.

Se ha demostrado que las secuencias virales, incluyendo elementos reguladores de la transcripción viral, interfieren con la expresión de los promotores exógenos utilizados para dirigir la expresión de un transgen (Imler *et al.*, 1996; Ring *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1997). Los resultados aquí mostrados, demuestran que la expresión tejido-específica dirigida por los promotores utilizados en este estudio (i.e., promotores de *flt-1* y de *gfap*) no se afecta por el contexto del genoma del baculovirus, ni por los efectos de silenciamiento, ya que BacFlt-GFP tuvo una mayor actividad transcripcional en las células BUVEC-E6E7-1 (112 % relativo a BacCMV-GFP, $n=4$) y BacGfap-GFP tuvo la mayor actividad transcripcional en las células derivadas de astrocitos C6 y CH235 (30.62 % y 35.13 % respectivamente, relativo a BacCMV-GFP, $n=4$), comparados con la actividad transcripcional manifestada en las otras líneas celulares de diferentes tejidos. Interesantemente, los niveles de expresión obtenidos en las células BUVEC-E6E7-1 transducidas con BacFlt-GFP, se lograron utilizando 100 MOI del baculovirus. En contraste, se han reportado niveles similares de expresión en células HUVEC y HSVEC, utilizando 500 MOI de un Ad recombinante (RA_dFLT-1) con la misma secuencia promotora reportada en este trabajo (Nicklin *et al.*, 2001b). Experimentos preliminares de transducción utilizando BacFlt-GFP en células HUVEC, han demostrado que se obtienen niveles similares de expresión a los obtenidos en las células BUVEC-E6E7-1, en presencia de inhibidores de HDACs (ButNa y TSA) (Luz-Madrigal A y Ventura JL, datos no publicados).

Por otro lado, los resultados obtenidos en los niveles de expresión de las células C6 y CH235 transducidas con BacGfap-GFP, fueron similares a los resultados de Wang CY *et al.*, (2006) en los cuales un baculovirus con la secuencia del promotor de *gfap* de rata (BV-GFAP-Luc), dirigió niveles de expresión de 10 a 100 veces menores comparados con los niveles de expresión obtenidos por un baculovirus con la secuencia del promotor de CMV (BV-CMV-Luc); sin embargo, en dicho estudio no se utilizaron inhibidores de HDACs (Wang *et al.*, 2006).

Con el objeto de analizar la expresión tejido-específica *in vivo* en el endotelio vascular de la retina, inyectamos partículas del baculovirus BacFlt-GFP en el cuerpo vítreo de ratas adultas. Los resultados demostraron que un gran número de células GFP+, se observaron frecuentemente en la membrana limitante interna (ILM) y en la capa que corresponde a las células ganglionares (GCL), de alguna manera estos resultados eran de esperarse debido a la cercanía con el lugar de inyección de las partículas virales (i.e., el vítreo). De acuerdo a estos resultados, se han identificado los ARNs mensajeros endógenos para los receptores VEGFR1 y VEGFR-2 (también conocidos como Flt-1 y KDR, respectivamente); además, se ha identificado a la proteína de Flt-1, en las capas nuclear interna y la que corresponde a las células ganglionares, sugiriendo con ello la actividad

transcripcional y de síntesis de la proteína Flt-1 en estas zonas de la retina (Kim *et al.*, 1999; Shih *et al.*, 2003). Por otro lado, los resultados de inmunofluorescencia contra el factor de von Willebrand (vWF) y el análisis mediante microscopia de fluorescencia y microscopia confocal, demostraron que la mayoría de las células GFP+ (70 %, $n=10$), colocalizaron con la marca del anticuerpo contra el vWF y en estructuras similares a vasos sanguíneos, sugiriendo de esta manera la especificidad de la expresión del transgen *in vivo*, es decir, en el endotelio vascular de la retina.

Es importante recalcar la detección directa de la fluorescencia derivada de la proteína GFP a partir de los cortes de retina de las ratas tratadas con BacFlt-GFP (ver materiales y métodos), incluso en ausencia de inhibidores de HDACs. Tales resultados, pueden ser debidos a que el promotor de *flt-1* dirige altos niveles de expresión en las células endoteliales y dicha expresión puede contrarrestar el posible silenciamiento del transgen *in vivo*. Sin embargo, en un intento por incrementar la expresión del transgen inyectamos partículas del baculovirus BacFlt-GFP junto con TSA; sin embargo, los ojos de las ratas tratadas, aparecieron dañadas aunado a una fuerte inflamación de las mismas, sugiriendo un efecto toxico de la TSA en el ojo de la rata.

Previamente, se ha reportado la expresión de un transgen en la retina de rata mediante baculovirus recombinantes (Haeseleer *et al.*, 2001). En dicho estudio, la inyección en el cuerpo vítreo de un baculovirus expresando el gen reportero de la GFP bajo el promotor de CMV, pudo transducir células de las capas nuclear interna y la que corresponde a las células ganglionares, además del endotelio pigmentado de la retina (RPE). En contraste, los resultados de este estudio muestran una expresión restringida de GFP, en áreas principalmente enriquecidas de vasos sanguíneos (e.g., GCL e INL) (Kim *et al.*, 1999; Shih *et al.*, 2003).

Finalmente, para analizar la expresión tejido-específica mediada por BacGfap-GFP en astrocitos *in vivo* en el cerebro de rata, se inyectaron esterotóxicamente en el hipocampo (CA3) 5 μ l de una solución de partículas del baculovirus BacGfap-GFP (1×10^{10} UFP); sin embargo, a pesar de múltiples intentos, no se logró observar la expresión del transgen, sugiriendo que los niveles de expresión dirigidos por el promotor de *gfap*, son insuficientes para contrarrestar el posible efecto del silenciamiento del transgen *in vivo*. No obstante, el uso de inhibidores de HDACs, tales como el SAHA (suberoylanilida hydroxamic acid), el cual ha demostrado atravesar la barrera hematoencefálica, pudiera reactivar la expresión del transgen liberado mediante BacGfap-GFP en el cerebro (Hockly *et al.*, 2003; Gui *et al.*, 2004; Mitsiades *et al.*, 2004).

En resumen, los resultados presentados en este trabajo indican que: 1) los baculovirus son capaces transducir células de mamífero de diferentes tejidos; 2) existe un aumento en la expresión del transgen mediante inhibidores de HDACs (ButNa y TSA), lo cual sugiere que el ADN del baculovirus forma estructuras semejantes a nucleosomas al internalizarse a las células de mamífero; 3) la especificidad de la expresión del transgen mediante promotores tejido-específicos (i.e.,

promotores de *flt-1* y *gfap*) es mantenida en el contexto del genoma viral y 4) los resultados de transducción *in vivo* mediante BacFlt-GFP demuestran que es posible dirigir la expresión de un transgen en el endotelio vascular de la retina, mediante el uso de baculovirus recombinantes.

IX. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos con este trabajo permitieron llegar a las siguientes conclusiones generales:

1. Los baculovirus son capaces transducir células de mamífero de diferentes tejidos.
2. Existe un silenciamiento de la expresión del transgen en el contexto del genoma viral el cual puede ser evitado mediante el uso de inhibidores de desacetilasas de histonas, sugiriendo de esta manera que el ADN viral puede formar una estructura semejante a un nucleosoma al internalizarse en las células de mamífero.
3. Los resultados sugieren que la metilación del ADN aparentemente no juega un papel preponderante en el mecanismo de silenciamiento del transgen, ya que no se observó ningún efecto en la actividad transcripcional con el tratamiento de las células con el inhibidor de la metilación del ADN.
4. La expresión tejido-específica dirigida por los promotores utilizados en este estudio (i.e., promotores de *gfap* y *flt-1*), no se afecta por el contexto del genoma del baculovirus ni por los efectos de silenciamiento.
5. Es posible utilizar baculovirus recombinantes para dirigir la expresión de un transgen *in vivo* en el endotelio vascular de la retina.

X. PERSPECTIVAS

Los baculovirus recombinantes han demostrado ser eficientes para transducir células de mamífero de diferentes tejidos. Debido a su naturaleza no replicativa, su capacidad para incorporar una gran cantidad de ADN en el cassette de expresión y su fácil producción, hacen de estos virus una herramienta para expresar genes en células de mamífero tanto *in vitro* como *in vivo* (Hu, 2005). No obstante, a pesar de tales ventajas, el desarrollo de los vectores de baculovirus se encuentra en una etapa inicial de desarrollo. La modificación de la superficie del baculovirus, en particular la proteína GP64, representa una alternativa para incorporar péptidos, anticuerpos completos o anticuerpos de cadena única (scFv), así como ligandos, para dirigir su entrada de manera selectiva a células blanco (direccionamiento transduccional). La naturaleza episomal del ADN del baculovirus restringe el tiempo de expresión del transgen, lo cual es particularmente relevante si se requiere una expresión sostenida a largo plazo (meses e incluso años). Una alternativa, puede ser el desarrollo de vectores híbridos tales como baculovirus/AAV, con la finalidad de integrar el cassette de expresión en el genoma de la célula transducida. Por otro lado, el estudio de los mecanismos del silenciamiento del transgen, incluyendo la localización del ADN viral dentro del núcleo, su asociación a zonas de represión transcripcional, además de su probable interacción con la cromatina de mamífero, permitiría entender mejor el proceso de transducción para diseñar vectores de baculovirus más eficientes. La incorporación en el cassette de expresión viral de las secuencias de ADN, conocidas como aisladores cromatínicos, tales como el aislador del locus de la β -globina de pollo (cHS4), podría potencialmente prevenir el silenciamiento de la expresión en el contexto del genoma del baculovirus.

La propiedad del baculovirus para desplegar proteínas completas en su superficie, además de su uso como vector de transferencia de material genético, puede permitir el desarrollo de baculovirus recombinantes como presentadores de antígenos en su superficie, aunado a la expresión de un transgen con fines de vacunación.

Finalmente, los estudios llevados a cabo en este trabajo demuestran por primera vez la transferencia de material genético *in vivo* en células endoteliales mediante baculovirus recombinantes. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para demostrar el uso de los baculovirus como vectores de transferencia génica en el endotelio vascular de la retina con fines terapéuticos.

XI. REFERENCIAS

- ABE, T., HEMMI, H., MIYAMOTO, H., MORIISHI, K., TAMURA, S., TAKAKU, H., AKIRA, S., and MATSUURA, Y. (2005). Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *Journal of virology* **79**, 2847-2858.
- AFONSO, C.L., TULMAN, E.R., LU, Z., BALINSKY, C.A., MOSER, B.A., BECNEL, J.J., ROCK, D.L., and KUTISH, G.F. (2001). Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. *Journal of virology* **75**, 11157-11165.
- AHRENS, C.H., RUSSELL, R.L., FUNK, C.J., EVANS, J.T., HARWOOD, S.H., and ROHRMANN, G.F. (1997). The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* **229**, 381-399.
- AIRENNE, K.J., HILTUNEN, M.O., TURUNEN, M.P., TURUNEN, A.M., LAITINEN, O.H., KULOMAA, M.S., and YLA-HERTTUALA, S. (2000). Baculovirus-mediated periadventitial gene transfer to rabbit carotid artery. *Gene therapy* **7**, 1499-1504.
- ANDERSEN, J.K., GARBER, D.A., MEANEY, C.A., and BREAKFIELD, X.O. (1992). Gene transfer into mammalian central nervous system using herpes virus vectors: extended expression of bacterial lacZ in neurons using the neuron-specific enolase promoter. *Human gene therapy* **3**, 487-499.
- ASHOUR, M.B., RAGHEB, D.A., EL-SHEIKH EL, S.A., GOMAA EL, A.A., KAMITA, S.G., and HAMMOCK, B.D. (2007). Biosafety of recombinant and wild type nucleopolyhedroviruses as bioinsecticides. *International journal of environmental research and public health* **4**, 111-125.
- AYRES, M.D., HOWARD, S.C., KUZIO, J., LOPEZ-FERBER, M., and POSSEE, R.D. (1994). The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **202**, 586-605.
- BAKER, A.H., KRITZ, A., WORK, L.M., and NICKLIN, S.A. (2005). Cell-selective viral gene delivery vectors for the vasculature. *Experimental physiology* **90**, 27-31.
- BARSOUM, J., BROWN, R., MCKEE, M., and BOYCE, F.M. (1997). Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Human gene therapy* **8**, 2011-2018.
- BENITEZ, J.A., and SEGOVIA, J. (2003). Gene therapy targeting in the central nervous system. *Current gene therapy* **3**, 127-145.
- BIDESHI, D.K., BIGOT, Y., and FEDERICI, B.A. (2000). Molecular characterization and phylogenetic analysis of the *Harrisina brillians* granulovirus granulins gene. *Archives of virology* **145**, 1933-1945.
- BILELLO, J.P., CABLE, E.E., MYERS, R.L., and ISOM, H.C. (2003). Role of paracellular junction complexes in baculovirus-mediated gene transfer to nondividing rat hepatocytes. *Gene therapy* **10**, 733-749.
- BISHOP, C.L., RAMALHO, M., NADKARNI, N., MAY KONG, W., HIGGINS, C.F., and KRAUZEWICZ, N. (2006). Role for centromeric heterochromatin and PML nuclear bodies in the cellular response to foreign DNA. *Molecular and cellular biology* **26**, 2583-2594.
- BLANN, A.D. (2006). Plasma von Willebrand factor, thrombosis, and the endothelium: the first 30 years. *Thromb Haemost* **95**, 49-55.
- BLISSARD, G.W., KOGAN, P.H., WEI, R., and ROHRMANN, G.F. (1992). A synthetic early promoter from a baculovirus: roles of the TATA box and conserved start site CAGT sequence in basal levels of transcription. *Virology* **190**, 783-793.
- BLISSARD, G.W., QUANT-RUSSELL, R.L., ROHRMANN, G.F., and BEAUDREAU, G.S. (1989). Nucleotide sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gene encoding p39, a major structural protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata*. *Virology* **168**, 354-362.

- BLISSARD, G.W., and ROHRMANN, G.F. (1989). Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **170**, 537-555.
- BLISSARD, G.W., and ROHRMANN, G.F. (1990). Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual review of entomology* **35**, 127-155.
- BLISSARD, G.W., and ROHRMANN, G.F. (1991). Baculovirus gp64 gene expression: analysis of sequences modulating early transcription and transactivation by IE1. *Journal of virology* **65**, 5820-5827.
- BLISSARD, G.W., and WENZ, J.R. (1992). Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *Journal of virology* **66**, 6829-6835.
- BOHN, M.C. (2004). Motoneurons crave glial cell line-derived neurotrophic factor. *Experimental neurology* **190**, 263-275.
- BOUBLIK, Y., DI BONITO, P., and JONES, I.M. (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. *Bio/technology* (Nature Publishing Company) **13**, 1079-1084.
- BOYCE, F.M., and BUCHER, N.L. (1996). Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 2348-2352.
- BRAUNAGEL, S.C., RUSSELL, W.K., ROSAS-ACOSTA, G., RUSSELL, D.H., and SUMMERS, M.D. (2003). Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 9797-9802.
- BRENNER, M., KISSEBERTH, W.C., SU, Y., BESNARD, F., and MESSING, A. (1994). GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci* **14**, 1030-1037.
- BROWN, M., CRAWFORD, A.M., and FAULKNER, P. (1979). Genetic Analysis of a Baculovirus, *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus I. Isolation of Temperature-Sensitive Mutants and Assortment into Complementation Groups. *Journal of virology* **31**, 190-198.
- CAJERO-JUAREZ, M., AVILA, B., OCHOA, A., GARRIDO-GUERRERO, E., VARELA-ECHAVARRIA, A., MARTINEZ DE LA ESCALERA, G., and CLAPP, C. (2002). immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *European journal of cell biology* **81**, 1-8.
- CAMBI, F., FUNG, B., and CHIKARAISHI, D. (1989). 5' flanking DNA sequences direct cell-specific expression of rat tyrosine hydroxylase. *Journal of neurochemistry* **53**, 1656-1659.
- CARBONELL, L.F., HODGE, M.R., TOMALSKI, M.D., and MILLER, L.K. (1988). Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors. *Gene* **73**, 409-418.
- CARBONELL, L.F., KLOWDEN, M.J., and MILLER, L.K. (1985). Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *Journal of virology* **56**, 153-160.
- CARPENTIER, D.C., GRIFFITHS, C.M., and KING, L.A. (2008). The baculovirus P10 protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus forms two distinct cytoskeletal-like structures and associates with polyhedral occlusion bodies during infection. *Virology* **371**, 278-291.
- CARSTENS, E.B., LU, A.L., and CHAN, H.L. (1993). Sequence, transcriptional mapping, and overexpression of p47, a baculovirus gene regulating late gene expression. *Journal of virology* **67**, 2513-2520.

- CARSTENS, E.B., and WU, Y. (2007). No single homologous repeat region is essential for DNA replication of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *The Journal of general virology* **88**, 114-122.
- CHEN, X., WF, I.J., TARCHINI, R., SUN, X., SANDBRINK, H., WANG, H., PETERS, S., ZUIDEMA, D., LANKHORST, R.K., VLAK, J.M., and HU, Z. (2001). The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. *The Journal of general virology* **82**, 241-257.
- CHEN, X., ZHANG, W.J., WONG, J., CHUN, G., LU, A., MCCUTCHEN, B.F., PRESNAIL, J.K., HERRMANN, R., DOLAN, M., TINGEY, S., HU, Z.H., and VLAK, J.M. (2002). Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. *The Journal of general virology* **83**, 673-684.
- CHENG, T., XU, C.Y., WANG, Y.B., CHEN, M., WU, T., ZHANG, J., and XIA, N.S. (2004). A rapid and efficient method to express target genes in mammalian cells by baculovirus. *World J Gastroenterol* **10**, 1612-1618.
- CHO, H.S., KIM, K.R., KIM, Y.K., and CHA, H.J. (2007). Statistical determination of optimal baculovirus infection condition for recombinant protein production in *Drosophila* S2 cells. *Applied biochemistry and biotechnology* **142**, 243-252.
- CINES, D.B., POLLAK, E.S., BUCK, C.A., LOSCALZO, J., ZIMMERMAN, G.A., MCEVER, R.P., POBER, J.S., WICK, T.M., KONKLE, B.A., SCHWARTZ, B.S., BARNATHAN, E.S., MCCRAE, K.R., HUG, B.A., SCHMIDT, A.M., and STERN, D.M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**, 3527-3561.
- CLAY, W.C., CONDREAY, J.P., MOORE, L.B., WEAVER, S.L., WATSON, M.A., KOST, T.A., and LORENZ, J.J. (2003). Recombinant baculoviruses used to study estrogen receptor function in human osteosarcoma cells. *Assay and drug development technologies* **1**, 801-810.
- CORTI, O., SABATE, O., HORELLOU, P., COLIN, P., DUMAS, S., BUCHET, D., BUC-CARON, M.H., and MALLET, J. (1999a). A single adenovirus vector mediates doxycycline-controlled expression of tyrosine hydroxylase in brain grafts of human neural progenitors. *Nature biotechnology* **17**, 349-354.
- CORTI, O., SANCHEZ-CAPELO, A., COLIN, P., HANOUN, N., HAMON, M., and MALLET, J. (1999b). Long-term doxycycline-controlled expression of human tyrosine hydroxylase after direct adenovirus-mediated gene transfer to a rat model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 12120-12125.
- COUCH, J.A. (1974). An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement. *Journal of invertebrate pathology* **24**, 311-331.
- COWAN, P.J., SHINKEL, T.A., WITORT, E.J., BARLOW, H., PEARSE, M.J., and D'APICE, A.J. (1996). Targeting gene expression to endothelial cells in transgenic mice using the human intercellular adhesion molecule 2 promoter. *Transplantation* **62**, 155-160.
- DAI, X., WILLIS, L.G., HUIJSKENS, I., PALLI, S.R., and THEILMANN, D.A. (2004). The acidic activation domains of the baculovirus transactivators IE1 and IE0 are functional for transcriptional activation in both insect and mammalian cells. *The Journal of general virology* **85**, 573-582.
- DAVIDSON, B.L., and BREAKEFIELD, X.O. (2003). Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **4**, 353-364.
- DAVIE, J.R. (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* **133**, 2485S-2493S.

- DE JONG, J.G., LAUZON, H.A., DOMINY, C., POLOUMIENKO, A., CARSTENS, E.B., ARIF, B.M., and KRELL, P.J. (2005). Analysis of the *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus genome. *The Journal of general virology* **86**, 929-943.
- DEGLON, N., and HANTRAYE, P. (2005). Viral vectors as tools to model and treat neurodegenerative disorders. *The journal of gene medicine* **7**, 530-539.
- DELANEY, W.E.T., and ISOM, H.C. (1998). Hepatitis B virus replication in human HepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant baculovirus. *Hepatology (Baltimore, Md)* **28**, 1134-1146.
- DICKSON, J.A., and FRIESEN, P.D. (1991). Identification of upstream promoter elements mediating early transcription from the 35,000-molecular-weight protein gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of virology* **65**, 4006-4016.
- DO THI, N.A., SAILLOUR, P., FERRERO, L., DEDIEU, J.F., MALLETT, J., and PAUNIO, T. (2004). Delivery of GDNF by an E1,E3/E4 deleted adenoviral vector and driven by a GFAP promoter prevents dopaminergic neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Gene therapy* **11**, 746-756.
- DONG, C., LI, D., LONG, G., DENG, F., WANG, H., and HU, Z. (2005). Identification of functional domains required for *HearNPV* P10 filament formation. *Virology* **338**, 112-120.
- DUISIT, G., SALEUN, S., DOUTHE, S., BARSOUM, J., CHADEUF, G., and MOULLIER, P. (1999). Baculovirus vector requires electrostatic interactions including heparan sulfate for efficient gene transfer in mammalian cells. *The journal of gene medicine* **1**, 93-102.
- ELLIS, J., and YAO, S. (2005). Retrovirus silencing and vector design: relevance to normal and cancer stem cells? *Current gene therapy* **5**, 367-373.
- ENG, L.F., and GHIRNIKAR, R.S. (1994). GFAP and astrogliosis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* **4**, 229-237.
- FRIESEN, P.D., and MILLER, L.K. (1986). The regulation of baculovirus gene expression. *Current topics in microbiology and immunology* **131**, 31-49.
- FUJITA, R., MATSUYAMA, T., YAMAGISHI, J., SAHARA, K., ASANO, S., and BANDO, H. (2006). Expression of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus genes in mammalian cells and upregulation of the host beta-actin gene. *Journal of virology* **80**, 2390-2395.
- FUNG, B.P., YOON, S.O., and CHIKARAISHI, D.M. (1992). Sequences that direct rat tyrosine hydroxylase gene expression. *Journal of neurochemistry* **58**, 2044-2052.
- GANDELMAN, K.Y., COKER, G.T., 3RD, MOFFAT, M., and O'MALLEY, K.L. (1990). Species and regional differences in the expression of cell-type specific elements at the human and rat tyrosine hydroxylase gene loci. *Journal of neurochemistry* **55**, 2149-2152.
- GAO, H., WANG, Y., LI, N., PENG, W.P., SUN, Y., TONG, G.Z., and QIU, H.J. (2007). Efficient gene delivery into mammalian cells mediated by a recombinant baculovirus containing a *whispovirus* *iel* promoter, a novel shuttle promoter between insect cells and mammalian cells. *Journal of biotechnology* **131**, 138-143.
- GARCIA-MARUNIAK, A., MARUNIAK, J.E., ZANOTTO, P.M., DOUMBOUYA, A.E., LIU, J.C., MERRITT, T.M., and LANOIE, J.S. (2004). Sequence analysis of the genome of the *Neodiprion sertifer* nucleopolyhedrovirus. *Journal of virology* **78**, 7036-7051.
- GIBBONS, G.H., and DZAU, V.J. (1996). Molecular therapies for vascular diseases. *Science (New York, N.Y)* **272**, 689-693.
- GLOVER, C.P., BIENEMANN, A.S., HEYWOOD, D.J., COSGRAVE, A.S., and UNEY, J.B. (2002). Adenoviral-mediated, high-level, cell-specific transgene expression: a SYN1-WPRE cassette mediates increased transgene expression with no loss of neuron specificity. *Mol Ther* **5**, 509-516.
- GOMBART, A.F., PEARSON, M.N., ROHRMANN, G.F., and BEAUDREAU, G.S. (1989). A baculovirus polyhedral envelope-associated protein: genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization. *Virology* **169**, 182-193.

- GOMI, S., MAJIMA, K., and MAEDA, S. (1999). Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *The Journal of general virology* **80** (Pt 5), 1323-1337.
- GRABHERR, R., ERNST, W., OKER-BLOM, C., and JONES, I. (2001). Developments in the use of baculoviruses for the surface display of complex eukaryotic proteins. *Trends in biotechnology* **19**, 231-236.
- GRANADOS, R.R., and LAWLER, K.A. (1981). In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* **108**, 297-308.
- GROSS, C.H., RUSSELL, R.L., and ROHRMANN, G.F. (1994). *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure. *The Journal of general virology* **75** (Pt 5), 1115-1123.
- GUARINO, L.A., DONG, W., XU, B., BROUSSARD, D.R., DAVIS, R.W., and JARVIS, D.L. (1992). Baculovirus phosphoprotein pp31 is associated with virogenic stroma. *Journal of virology* **66**, 7113-7120.
- GUARINO, L.A., and SMITH, M. (1992). Regulation of delayed-early gene transcription by dual TATA boxes. *Journal of virology* **66**, 3733-3739.
- GUARINO, L.A., and SMITH, M.W. (1990). Nucleotide sequence and characterization of the 39K gene region of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **179**, 1-8.
- GUARINO, L.A., and SUMMERS, M.D. (1986a). Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *Journal of virology* **57**, 563-571.
- GUARINO, L.A., and SUMMERS, M.D. (1986b). Interspersed Homologous DNA of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Enhances Delayed-Early Gene Expression. *Journal of virology* **60**, 215-223.
- GUARINO, L.A., XU, B., JIN, J., and DONG, W. (1998). A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. *Journal of virology* **72**, 7985-7991.
- GUI, C.Y., NGO, L., XU, W.S., RICHON, V.M., and MARKS, P.A. (2004). Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1241-1246.
- HAESELEER, F., IMANISHI, Y., SAPERSTEIN, D.A., and PALCZEWSKI, K. (2001). Gene transfer mediated by recombinant baculovirus into mouse eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 3294-3300.
- HARRISON, R.L., and BONNING, B.C. (2003). Comparative analysis of the genomes of *Rachiplusia ou* and *Autographa californica* multiple nucleopolyhedroviruses. *The Journal of general virology* **84**, 1827-1842.
- HASHIMOTO, M., ARUGA, J., HOSOYA, Y., KANEGAE, Y., SAITO, I., and MIKOSHIBA, K. (1996). A neural cell-type-specific expression system using recombinant adenovirus vectors. *Human gene therapy* **7**, 149-158.
- HASHIMOTO, Y., HAYAKAWA, T., UENO, Y., FUJITA, T., SANO, Y., and MATSUMOTO, T. (2000). Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. *Virology* **275**, 358-372.
- HAYAKAWA, T., KO, R., OKANO, K., SEONG, S.I., GOTO, C., and MAEDA, S. (1999). Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology* **262**, 277-297.
- HAYAKAWA, T., ROHRMANN, G.F., and HASHIMOTO, Y. (2000). Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculoviruses. *Virology* **278**, 1-12.
- HEIMPEL, A.M. (1966). Exposure of white mice and guinea pigs to the nuclear-polyhedrosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Journal of invertebrate pathology* **8**, 98-102.
- HERNIOU, E.A., and JEHLE, J.A. (2007). Baculovirus phylogeny and evolution. *Current drug targets* **8**, 1043-1050.
- HERNIOU, E.A., OLSZEWSKI, J.A., CORY, J.S., and O'REILLY, D.R. (2003). The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annual review of entomology* **48**, 211-234.

- HO, Y.C., CHEN, H.C., WANG, K.C., and HU, Y.C. (2004). Highly efficient baculovirus-mediated gene transfer into rat chondrocytes. *Biotechnology and bioengineering* **88**, 643-651.
- HO, Y.C., CHUNG, Y.C., HWANG, S.M., WANG, K.C., and HU, Y.C. (2005). Transgene expression and differentiation of baculovirus-transduced human mesenchymal stem cells. *The journal of gene medicine* **7**, 860-868.
- HOARE, J., WADDINGTON, S., THOMAS, H.C., COUTELLE, C., and MCGARVEY, M.J. (2005). Complement inhibition rescued mice allowing observation of transgene expression following intraportal delivery of baculovirus in mice. *The journal of gene medicine* **7**, 325-333.
- HOCKLY, E., RICHON, V.M., WOODMAN, B., SMITH, D.L., ZHOU, X., ROSA, E., SATHASIVAM, K., GHAZI-NOORI, S., MAHAL, A., LOWDEN, P.A., STEFFAN, J.S., MARSH, J.L., THOMPSON, L.M., LEWIS, C.M., MARKS, P.A., and BATES, G.P. (2003). Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2041-2046.
- HOESCHE, C., SAUERWALD, A., VEH, R.W., KRIPPL, B., and KILIMANN, M.W. (1993). The 5'-flanking region of the rat synapsin I gene directs neuron-specific and developmentally regulated reporter gene expression in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* **268**, 26494-26502.
- HOFMANN, C., SANDIG, V., JENNINGS, G., RUDOLPH, M., SCHLAG, P., and STRAUSS, M. (1995). Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 10099-10103.
- HOFMANN, C., and STRAUSS, M. (1998). Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene therapy* **5**, 531-536.
- HOHMANN, A.W., and FAULKNER, P. (1983). Monoclonal antibodies to baculovirus structural proteins: determination of specificities by Western blot analysis. *Virology* **125**, 432-444.
- HORTON, H.M., and BURAND, J.P. (1993). Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *Journal of virology* **67**, 1860-1868.
- HOWLAND, D.S., HEMMENDINGER, L.M., CARROLL, P.D., ESTES, P.S., MELLONI, R.H., JR., and DEGENNARO, L.J. (1991). Positive- and negative-acting promoter sequences regulate cell type-specific expression of the rat synapsin I gene. *Brain research* **11**, 345-353.
- HU, Y.C. (2005). Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta pharmacologica Sinica* **26**, 405-416.
- HUH, N.E., and WEAVER, R.F. (1990). Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *The Journal of general virology* **71** (Pt 1), 195-201.
- HUSER, A., RUDOLPH, M., and HOFMANN, C. (2001). Incorporation of decay-accelerating factor into the baculovirus envelope generates complement-resistant gene transfer vectors. *Nature biotechnology* **19**, 451-455.
- HWANG, D.Y., CARLEZON, W.A., JR., ISACSON, O., and KIM, K.S. (2001). A high-efficiency synthetic promoter that drives transgene expression selectively in noradrenergic neurons. *Human gene therapy* **12**, 1731-1740.
- HYINK, O., DELLOW, R.A., OLSEN, M.J., CARADOC-DAVIES, K.M., DRAKE, K., HERNIOU, E.A., CORY, J.S., O'REILLY, D.R., and WARD, V.K. (2002). Whole genome analysis of the *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus. *The Journal of general virology* **83**, 957-971.
- IMLER, J.L., DUPUIT, F., CHARTIER, C., ACCART, N., DIETERLE, A., SCHULTZ, H., PUCHELLE, E., and PAVIRANI, A. (1996). Targeting cell-specific gene expression with

- an adenovirus vector containing the lacZ gene under the control of the CFTR promoter. *Gene therapy* **3**, 49-58.
- INCEOGLU, A.B., KAMITA, S.G., and HAMMOCK, B.D. (2006). Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Advances in virus research* **68**, 323-360.
- JAHROUDI, N., and LYNCH, D.C. (1994). Endothelial-cell-specific regulation of von Willebrand factor gene expression. *Molecular and cellular biology* **14**, 999-1008.
- JAKUBOWSKA, A.K., PETERS, S.A., ZIEMNICKA, J., VLAK, J.M., and VAN OERS, M.M. (2006). Genome sequence of an enhancin gene-rich nucleopolyhedrovirus (NPV) from *Agrotis segetum*: collinearity with *Spodoptera exigua* multiple NPV. *The Journal of general virology* **87**, 537-551.
- JARVIS, D.L., and GARCIA, A., JR. (1994). Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp64 protein. *Virology* **205**, 300-313.
- JEHLE, J.A., BLISSARD, G.W., BONNING, B.C., CORY, J.S., HERNIOU, E.A., ROHRMANN, G.F., THEILMANN, D.A., THIEM, S.M., and VLAK, J.M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of virology* **151**, 1257-1266.
- JIANG, S.S., CHANG, I.S., HUANG, L.W., CHEN, P.C., WEN, C.C., LIU, S.C., CHIEN, L.C., LIN, C.Y., HSIUNG, C.A., and JUANG, J.L. (2006). Temporal transcription program of recombinant *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrosis virus. *Journal of virology* **80**, 8989-8999.
- JOHNSTONE, R.W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 287-299.
- JUTTERMANN, R., LI, E., and JAENISCH, R. (1994). Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 11797-11801.
- KAPLITT, M.G., KWONG, A.D., KLEOPOULOS, S.P., MOBBS, C.V., RABKIN, S.D., and PFAFF, D.W. (1994). Preproenkephalin promoter yields region-specific and long-term expression in adult brain after direct in vivo gene transfer via a defective herpes simplex viral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 8979-8983.
- KELLY, D.C., and LESCOTT, T. (1984). Baculovirus replication: phosphorylation of polypeptides synthesized in *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus-infected cells. *The Journal of general virology* **65** (Pt 7), 1183-1191.
- KENOUTIS, C., EFROSE, R.C., SWEVERS, L., LAVDAS, A.A., GAITANOU, M., MATSAS, R., and IATROU, K. (2006). Baculovirus-mediated gene delivery into Mammalian cells does not alter their transcriptional and differentiating potential but is accompanied by early viral gene expression. *Journal of virology* **80**, 4135-4146.
- KEPA, J.K., SPAULDING, A.J., JACOBSEN, B.M., FANG, Z., XIONG, X., RADOVICK, S., and WIERMAN, M.E. (1996). Structure of the distal human gonadotropin releasing hormone (hGnrh) gene promoter and functional analysis in Gt1-7 neuronal cells. *Nucleic acids research* **24**, 3614-3620.
- KIM, I., RYAN, A.M., ROHAN, R., AMANO, S., AGULAR, S., MILLER, J.W., and ADAMIS, A.P. (1999). Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 2115-2121.
- KIM, K.R., KIM, Y.K., and CHA, H.J. (2008). Recombinant baculovirus-based multiple protein expression platform for *Drosophila* S2 cell culture. *Journal of biotechnology* **133**, 116-122.
- KITAJIMA, M., HAMAZAKI, H., MIYANO-KUROSAKI, N., and TAKAKU, H. (2006). Characterization of baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* **343**, 378-384.

- KLEIN, R.L., MEYER, E.M., PEEL, A.L., ZOLOTUKHIN, S., MEYERS, C., MUZYCZKA, N., and KING, M.A. (1998). Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors. *Experimental neurology* **150**, 183-194.
- KOGA, S., HIROHATA, S., KONDO, Y., KOMATA, T., TAKAKURA, M., INOUE, M., KYO, S., and KONDO, S. (2000). A novel telomerase-specific gene therapy: gene transfer of caspase-8 utilizing the human telomerase catalytic subunit gene promoter. *Human gene therapy* **11**, 1397-1406.
- KOMATA, T., KONDO, Y., KANZAWA, T., HIROHATA, S., KOGA, S., SUMIYOSHI, H., SRINIVASULA, S.M., BARNA, B.P., GERMANO, I.M., TAKAKURA, M., INOUE, M., ALNEMRI, E.S., SHAY, J.W., KYO, S., and KONDO, S. (2001). Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit (human telomerase reverse transcriptase) gene promoter. *Cancer research* **61**, 5796-5802.
- KORHONEN, J., LAHTINEN, I., HALMEKYTO, M., ALHONEN, L., JANNE, J., DUMONT, D., and ALITALO, K. (1995). Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo. *Blood* **86**, 1828-1835.
- KOST, T.A., CONDREAY, J.P., and JARVIS, D.L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology* **23**, 567-575.
- KOZUBEK, S., LUKASOVA, E., JIRSOVA, P., KOUTNA, I., KOZUBEK, M., GANOVA, A., BARTOVA, E., FALK, M., and PASEKOVA, R. (2002). 3D Structure of the human genome: order in randomness. *Chromosoma* **111**, 321-331.
- KRASNYKH, V.N., MIKHEEVA, G.V., DOUGLAS, J.T., and CURIEL, D.T. (1996). Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *Journal of virology* **70**, 6839-6846.
- KUGLER, S., MEYN, L., HOLZMULLER, H., GERHARDT, E., ISENMANN, S., SCHULZ, J.B., and BAHR, M. (2001). Neuron-specific expression of therapeutic proteins: evaluation of different cellular promoters in recombinant adenoviral vectors. *Molecular and cellular neurosciences* **17**, 78-96.
- KUKKONEN, S.P., AIRENNE, K.J., MARJOMAKI, V., LAITINEN, O.H., LEHTOLAINEN, P., KANKAANPAA, P., MAHONEN, A.J., RATY, J.K., NORDLUND, H.R., OKER-BLOM, C., KULOMAA, M.S., and YLA-HERTTUALA, S. (2003). Baculovirus capsid display: a novel tool for transduction imaging. *Mol Ther* **8**, 853-862.
- KULLO, I.J., SIMARI, R.D., and SCHWARTZ, R.S. (1999). Vascular gene transfer : from bench to bedside. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **19**, 196-207.
- KUZIO, J., PEARSON, M.N., HARWOOD, S.H., FUNK, C.J., EVANS, J.T., SLAVICEK, J.M., and ROHRMANN, G.F. (1999). Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology* **253**, 17-34.
- KUZIO, J., ROHEL, D.Z., CURRY, C.J., KREBS, A., CARSTENS, E.B., and FAULKNER, P. (1984). Nucleotide sequence of the p10 polypeptide gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **139**, 414-418.
- LAMOUREUX, A., HOUHOU, L., BIGUET, N.F., SERCK-HANSEN, G., GUIBERT, B., ICARD-LIEPKALNS, C., and MALLET, J. (1993). Analysis of the human dopamine beta-hydroxylase promoter: transcriptional induction by cyclic AMP. *Journal of neurochemistry* **60**, 364-367.
- LANGE, M., and JEHL, J.A. (2003). The genome of the *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus. *Virology* **317**, 220-236.
- LANIER, L.M., and VOLKMAN, L.E. (1998). Actin binding and nucleation by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. *Virology* **243**, 167-177.
- LAUZON, H.A., JAMIESON, P.B., KRELL, P.J., and ARIF, B.M. (2005). Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus genome. *The Journal of general virology* **86**, 945-961.

- LAUZON, H.A., LUCAROTTI, C.J., KRELL, P.J., FENG, Q., RETNAKARAN, A., and ARIF, B.M. (2004). Sequence and organization of the Neodiprion lecontei nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of virology* **78**, 7023-7035.
- LEE, D.F., CHEN, C.C., HSU, T.A., and JUANG, J.L. (2000). A baculovirus superinfection system: efficient vehicle for gene transfer into Drosophila S2 cells. *Journal of virology* **74**, 11873-11880.
- LEE, E.J., ANDERSON, L.M., THIMMAPAYA, B., and JAMESON, J.L. (1999). Targeted expression of toxic genes directed by pituitary hormone promoters: a potential strategy for adenovirus-mediated gene therapy of pituitary tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **84**, 786-794.
- LEFEVRE, C., IMAGAWA, M., DANA, S., GRINDLAY, J., BODNER, M., and KARIN, M. (1987). Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. *The EMBO journal* **6**, 971-981.
- LEHTOLAINEN, P., TYYNELA, K., KANNASTO, J., AIRENNE, K.J., and YLA-HERTTUALA, S. (2002). Baculoviruses exhibit restricted cell type specificity in rat brain: a comparison of baculovirus- and adenovirus-mediated intracerebral gene transfer in vivo. *Gene therapy* **9**, 1693-1699.
- LEISY, D.J., LEWIS, T.D., LEONG, J.A., and ROHRMANN, G.F. (2003). Transduction of cultured fish cells with recombinant baculoviruses. *The Journal of general virology* **84**, 1173-1178.
- LEISY, D.J., ROHRMANN, G.F., NESSON, M., and BEAUDREAU, G.S. (1986). Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the Orgyia pseudotsugata multicapsid nuclear polyhedrosis virus p10 gene. *Virology* **153**, 157-167.
- LI, L., DONLY, C., LI, Q., WILLIS, L.G., KEDDIE, B.A., ERLANDSON, M.A., and THEILMANN, D.A. (2002a). Identification and genomic analysis of a second species of nucleopolyhedrovirus isolated from Mamestra configurata. *Virology* **297**, 226-244.
- LI, L., HARWOOD, S.H., and ROHRMANN, G.F. (1999). Identification of additional genes that influence baculovirus late gene expression. *Virology* **255**, 9-19.
- LI, L., LI, Q., WILLIS, L.G., ERLANDSON, M., THEILMANN, D.A., and DONLY, C. (2005a). Complete comparative genomic analysis of two field isolates of Mamestra configurata nucleopolyhedrovirus-A. *The Journal of general virology* **86**, 91-105.
- LI, Q., DONLY, C., LI, L., WILLIS, L.G., THEILMANN, D.A., and ERLANDSON, M. (2002b). Sequence and organization of the Mamestra configurata nucleopolyhedrovirus genome. *Virology* **294**, 106-121.
- LI, Y., WANG, X., GUO, H., and WANG, S. (2004). Axonal transport of recombinant baculovirus vectors. *Mol Ther* **10**, 1121-1129.
- LI, Y., YANG, Y., and WANG, S. (2005b). Neuronal gene transfer by baculovirus-derived vectors accommodating a neurone-specific promoter. *Experimental physiology* **90**, 39-44.
- LIANG, C., SONG, J., and CHEN, X. (2005). The GP64 protein of Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus rescues Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus transduction in mammalian cells. *The Journal of general virology* **86**, 1629-1635.
- LIANG, C.Y., WANG, H.Z., LI, T.X., HU, Z.H., and CHEN, X.W. (2004). High efficiency gene transfer into mammalian kidney cells using baculovirus vectors. *Archives of virology* **149**, 51-60.
- LIU, C.Y., WANG, C.H., WANG, J.C., and CHAO, Y.C. (2007). Stimulation of baculovirus transcriptome expression in mammalian cells by baculoviral transcriptional activators. *The Journal of general virology* **88**, 2176-2184.
- LO, H.R., CHOU, C.C., WU, T.Y., YUEN, J.P., and CHAO, Y.C. (2002). Novel baculovirus DNA elements strongly stimulate activities of exogenous and endogenous promoters. *The Journal of biological chemistry* **277**, 5256-5264.

- LONG, G., PAN, X., KORMELINK, R., and VLAK, J.M. (2006). Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology* **80**, 8830-8833.
- LU, A., and CARSTENS, E.B. (1993). Immediate-early baculovirus genes transactivate the p143 gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **195**, 710-718.
- LU, A., and MILLER, L.K. (1995). The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication. *Journal of virology* **69**, 975-982.
- LUQUE, T., FINCH, R., CROOK, N., O'REILLY, D.R., and WINSTANLEY, D. (2001). The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. *The Journal of general virology* **82**, 2531-2547.
- LUZ-MADRIGAL, A., CLAPP, C., ARANDA, J., and VACA, L. (2007). In vivo transcriptional targeting into the retinal vasculature using recombinant baculovirus carrying the human flt-1 promoter. *Virology journal* **4**, 88.
- MA, L., TAMARINA, N., WANG, Y., KUZNETSOV, A., PATEL, N., KENDING, C., HERING, B.J., and PHILIPSON, L.H. (2000). Baculovirus-mediated gene transfer into pancreatic islet cells. *Diabetes* **49**, 1986-1991.
- MAEDA, S. (1989a). Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Annual review of entomology* **34**, 351-372.
- MAEDA, S. (1989b). Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. *Biochemical and biophysical research communications* **165**, 1177-1183.
- MAEDA, S., KAWAI, T., OBINATA, M., FUJIWARA, H., HORIUCHI, T., SAEKI, Y., SATO, Y., and FURUSAWA, M. (1985). Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* **315**, 592-594.
- MAKELA, A.R., MATILAINEN, H., WHITE, D.J., RUOSLAHTI, E., and OKER-BLOM, C. (2006). Enhanced baculovirus-mediated transduction of human cancer cells by tumor-homing peptides. *Journal of virology* **80**, 6603-6611.
- MAKELA, A.R., and OKER-BLOM, C. (2008). The baculovirus display technology--an evolving instrument for molecular screening and drug delivery. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **11**, 86-98.
- MARKOVIC, I., PULYAEVA, H., SOKOLOFF, A., and CHERNOMORDIK, L.V. (1998). Membrane fusion mediated by baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein aggregates. *The Journal of cell biology* **143**, 1155-1166.
- MARSDEN, P.A., SCHAPPERT, K.T., CHEN, H.S., FLOWERS, M., SUNDELL, C.L., WILCOX, J.N., LAMAS, S., and MICHEL, T. (1992). Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS letters* **307**, 287-293.
- MATILAINEN, H., RINNE, J., GILBERT, L., MARJOMAKI, V., REUNANEN, H., and OKER-BLOM, C. (2005). Baculovirus entry into human hepatoma cells. *Journal of virology* **79**, 15452-15459.
- MELLON, P.L., WINDLE, J.J., GOLDSMITH, P.C., PADULA, C.A., ROBERTS, J.L., and WEINER, R.I. (1990). Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* **5**, 1-10.
- MELO, L.G., GNECCHI, M., PACHORI, A.S., KONG, D., WANG, K., LIU, X., PRATT, R.E., and DZAU, V.J. (2004). Endothelium-targeted gene and cell-based therapies for cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**, 1761-1774.
- MILLER, L.K., ADANG, M.J., and BROWNE, D. (1983a). Protein Kinase Activity Associated with the Extracellular and Occluded Forms of the Baculovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *Journal of virology* **46**, 275-278.
- MILLER, L.K., LINGG, A.J., and BULLA, L.A., JR. (1983b). Bacterial, Viral, and Fungal Insecticides. *Science (New York, N.Y)* **219**, 715-721.
- MITSIADES, C.S., MITSIADES, N.S., MCMULLAN, C.J., POULAKI, V., SHRINGARPURE, R., HIDESHIMA, T., AKIYAMA, M., CHAUHAN, D., MUNSHI, N., GU, X., BAILEY,

- C., JOSEPH, M., LIBERMANN, T.A., RICHON, V.M., MARKS, P.A., and ANDERSON, K.C. (2004). Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 540-545.
- MIYAO, Y., SHIMIZU, K., TAMURA, M., AKITA, H., IKEDA, K., MABUCHI, E., KISHIMA, H., HAYAKAWA, T., and IKENAKA, K. (1997). Usefulness of a mouse myelin basic protein promoter for gene therapy of malignant glioma: myelin basic protein promoter is strongly active in human malignant glioma cells. *Jpn J Cancer Res* **88**, 678-686.
- MONNERET, C. (2005). Histone deacetylase inhibitors. *Eur J Med Chem* **40**, 1-13.
- MORI, H., SHUKUNAMI, C., FURUYAMA, A., NOTSU, H., NISHIZAKI, Y., and HIRAKI, Y. (2007). Immobilization of bioactive fibroblast growth factor-2 into cubic proteinous microcrystals (*Bombyx mori* cypovirus polyhedra) that are insoluble in a physiological cellular environment. *The Journal of biological chemistry* **282**, 17289-17296.
- MORISHITA, K., JOHNSON, D.E., and WILLIAMS, L.T. (1995). A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial-specific gene expression. *The Journal of biological chemistry* **270**, 27948-27953.
- MOTTERSHEAD, D.G., ALFTHAN, K., OJALA, K., TAKKINEN, K., and OKER-BLOM, C. (2000). Baculoviral display of functional scFv and synthetic IgG-binding domains. *Biochemical and biophysical research communications* **275**, 84-90.
- MUCKE, L., OLDSTONE, M.B., MORRIS, J.C., and NERENBERG, M.I. (1991). Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *The New biologist* **3**, 465-474.
- MURGES, D., KREMER, A., and KNEBEL-MORSODORF, D. (1997). Baculovirus transactivator IE1 is functional in mammalian cells. *The Journal of general virology* **78 (Pt 6)**, 1507-1510.
- NABEL, E.G. (1995). Gene therapy for cardiovascular disease. *Circulation* **91**, 541-548.
- NAKAI, M., GOTO, C., KANG, W., SHIKATA, M., LUQUE, T., and KUNIMI, Y. (2003). Genome sequence and organization of a nucleopolyhedrovirus isolated from the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai*. *Virology* **316**, 171-183.
- NEISH, A.S., WILLIAMS, A.J., PALMER, H.J., WHITLEY, M.Z., and COLLINS, T. (1992). Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *The Journal of experimental medicine* **176**, 1583-1593.
- NEMEROW, G.R. (2000). Adenoviral vectors--new insights. *Trends in microbiology* **8**, 391-394.
- NEWELL-PRICE, J., CLARK, A.J., and KING, P. (2000). DNA methylation and silencing of gene expression. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 142-148.
- NICHOLSON, L.J., PHILIPPE, M., PAINE, A.J., MANN, D.A., and DOLPHIN, C.T. (2005). RNA interference mediated in human primary cells via recombinant baculoviral vectors. *Mol Ther* **11**, 638-644.
- NICKLIN, S.A., and BAKER, A.H. (2003). Development of targeted viral vectors for cardiovascular gene therapy. *Genetic engineering* **25**, 15-49.
- NICKLIN, S.A., BUENING, H., DISHART, K.L., DE ALWIS, M., GIROD, A., HACKER, U., THRASHER, A.J., ALI, R.R., HALLEK, M., and BAKER, A.H. (2001a). Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. *Mol Ther* **4**, 174-181.
- NICKLIN, S.A., DISHART, K.L., BUENING, H., REYNOLDS, P.N., HALLEK, M., NEMEROW, G.R., VON SEGGERN, D.J., and BAKER, A.H. (2003). Transductional and transcriptional targeting of cancer cells using genetically engineered viral vectors. *Cancer letters* **201**, 165-173.
- NICKLIN, S.A., REYNOLDS, P.N., BROSNAN, M.J., WHITE, S.J., CURIEL, D.T., DOMINICZAK, A.F., and BAKER, A.H. (2001b). Analysis of cell-specific promoters for viral gene therapy targeted at the vascular endothelium. *Hypertension* **38**, 65-70.

- NICKLIN, S.A., WHITE, S.J., WATKINS, S.J., HAWKINS, R.E., and BAKER, A.H. (2000). Selective targeting of gene transfer to vascular endothelial cells by use of peptides isolated by phage display. *Circulation* **102**, 231-237.
- NORDQUIST, D.T., KOZAK, C.A., and ORR, H.T. (1988). cDNA cloning and characterization of three genes uniquely expressed in cerebellum by Purkinje neurons. *J Neurosci* **8**, 4780-4789.
- OHRESSER, M., MORIN, N., CERUTTI, M., and DELSERT, C. (1994). Temporal regulation of a complex and unconventional promoter by viral products. *Journal of virology* **68**, 2589-2597.
- OKADA, T., UCHIBORI, R., IWATA-OKADA, M., TAKAHASHI, M., NOMOTO, T., NONAKA-SARUKAWA, M., ITO, T., LIU, Y., MIZUKAMI, H., KUME, A., KOBAYASHI, E., and OZAWA, K. (2006). A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol Ther* **13**, 738-746.
- OKER-BLOM, C., AIRENNE, K.J., and GRABHERR, R. (2003). Baculovirus display strategies: Emerging tools for eukaryotic libraries and gene delivery. *Briefings in functional genomics & proteomics* **2**, 244-253.
- ONG, S.T., LI, F., DU, J., TAN, Y.W., and WANG, S. (2005). Hybrid cytomegalovirus enhancer-h1 promoter-based plasmid and baculovirus vectors mediate effective RNA interference. *Human gene therapy* **16**, 1404-1412.
- PANG, Y., YU, J., WANG, L., HU, X., BAO, W., LI, G., CHEN, C., HAN, H., HU, S., and YANG, H. (2001). Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Virology* **287**, 391-404.
- PAPADAKIS, E.D., NICKLIN, S.A., BAKER, A.H., and WHITE, S.J. (2004). Promoters and control elements: designing expression cassettes for gene therapy. *Current gene therapy* **4**, 89-113.
- PARK, S.W., LEE, H.K., KIM, T.G., YOON, S.K., and PAIK, S.Y. (2001). Hepatocyte-specific gene expression by baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochemical and biophysical research communications* **289**, 444-450.
- PASSARELLI, A.L., TODD, J.W., and MILLER, L.K. (1994). A baculovirus gene involved in late gene expression predicts a large polypeptide with a conserved motif of RNA polymerases. *Journal of virology* **68**, 4673-4678.
- PATMANIDI, A.L., POSSEE, R.D., and KING, L.A. (2003). Formation of P10 tubular structures during AcMNPV infection depends on the integrity of host-cell microtubules. *Virology* **317**, 308-320.
- PATTERSON, C., PERRELLA, M.A., HSIEH, C.M., YOSHIZUMI, M., LEE, M.E., and HABER, E. (1995). Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry* **270**, 23111-23118.
- PEARSON, M.N., RUSSELL, R.L., ROHRMANN, G.F., and BEAUDREAU, G.S. (1988). p39, a major baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location. *Virology* **167**, 407-413.
- PIERONI, L., MAIONE, D., and LA MONICA, N. (2001). In vivo gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors. *Human gene therapy* **12**, 871-881.
- PING, W., GE, J., LI, S., ZHOU, H., WANG, K., FENG, Y., and LOU, Z. (2006). Baculovirus-mediated gene expression in chicken primary cells. *Avian diseases* **50**, 59-63.
- POSSEE, R.D., SUN, T.P., HOWARD, S.C., AYRES, M.D., HILL-PERKINS, M., and GEARING, K.L. (1991). Nucleotide sequence of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis 9.4 kbp EcoRI-I and -R (polyhedrin gene) region. *Virology* **185**, 229-241.
- PULLEN, S.S., and FRIESEN, P.D. (1995a). The CAGT motif functions as an initiator element during early transcription of the baculovirus transregulator ie-1. *Journal of virology* **69**, 3575-3583.
- PULLEN, S.S., and FRIESEN, P.D. (1995b). Early transcription of the ie-1 transregulator gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is regulated by DNA sequences within its 5' noncoding leader region. *Journal of virology* **69**, 156-165.

- QUANT-RUSSELL, R.L., PEARSON, M.N., ROHRMANN, G.F., and BEAUDREAU, G.S. (1987). Characterization of baculovirus p10 synthesis using monoclonal antibodies. *Virology* **160**, 9-19.
- QUANT, R.L., PEARSON, M.N., ROHRMANN, G.F., and BEAUDREAU, G.S. (1984). Production of polyhedrin monoclonal antibodies for distinguishing two *Orgyia pseudotsugata* baculoviruses. *Applied and environmental microbiology* **48**, 732-736.
- RALPH, G.S., BIENEMANN, A., HARDING, T.C., HOPTON, M., HENLEY, J., and UNEY, J.B. (2000). Targeting of tetracycline-regulatable transgene expression specifically to neuronal and glial cell populations using adenoviral vectors. *Neuroreport* **11**, 2051-2055.
- RANKIN, C., OOI, B.G., and MILLER, L.K. (1988). Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression. *Gene* **70**, 39-49.
- RAPP, J.C., WILSON, J.A., and MILLER, L.K. (1998). Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression. *Journal of virology* **72**, 10197-10206.
- RASMUSSEN, C., LEISY, D.J., HO, P.S., and ROHRMANN, G.F. (1996). Structure-function analysis of the *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus homologous region palindromes. *Virology* **224**, 235-245.
- RATY, J.K., AIRENNE, K.J., MARTTILA, A.T., MARJOMAKI, V., HYTONEN, V.P., LEHTOLAINEN, P., LAITINEN, O.H., MAHONEN, A.J., KULOMAA, M.S., and YLAHERTTUALA, S. (2004). Enhanced gene delivery by avidin-displaying baculovirus. *Mol Ther* **9**, 282-291.
- RECILLAS-TARGA, F., PIKAART, M.J., BURGESS-BEUSSE, B., BELL, A.C., LITT, M.D., WEST, A.G., GASZNER, M., and FELSENFELD, G. (2002). Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 6883-6888.
- RECILLAS-TARGA, F., VALADEZ-GRAHAM, V., and FARRELL, C.M. (2004). Prospects and implications of using chromatin insulators in gene therapy and transgenesis. *Bioessays* **26**, 796-807.
- REYNOLDS, P.N., NICKLIN, S.A., KALIBEROVA, L., BOATMAN, B.G., GRIZZLE, W.E., BALLYASNIKOVA, I.V., BAKER, A.H., DANILOV, S.M., and CURIEL, D.T. (2001). Combined transductional and transcriptional targeting improves the specificity of transgene expression in vivo. *Nature biotechnology* **19**, 838-842.
- RIIKONEN, R., MATILAINEN, H., RAJALA, N., PENTIKAINEN, O., JOHNSON, M., HEINO, J., and OKER-BLOM, C. (2005). Functional display of an alpha2 integrin-specific motif (RKK) on the surface of baculovirus particles. *Technology in cancer research & treatment* **4**, 437-445.
- RINCON-ARANO, H., FURLAN-MAGARIL, M., and RECILLAS-TARGA, F. (2007). Protection against telomeric position effects by the chicken cHS4 beta-globin insulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 14044-14049.
- RING, C.J., HARRIS, J.D., HURST, H.C., and LEMOINE, N.R. (1996). Suicide gene expression induced in tumour cells transduced with recombinant adenoviral, retroviral and plasmid vectors containing the ERBB2 promoter. *Gene therapy* **3**, 1094-1103.
- ROHRMANN, G.F. (1986). Polyhedrin structure. *The Journal of general virology* **67 (Pt 8)**, 1499-1513.
- RUSSELL, R.L., PEARSON, M.N., and ROHRMANN, G.F. (1991). Immunoelectron microscopic examination of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* cells: time course and localization of major polyhedron-associated proteins. *The Journal of general virology* **72 (Pt 2)**, 275-283.
- RUSSELL, R.L., and ROHRMANN, G.F. (1990). A baculovirus polyhedron envelope protein: immunogold localization in infected cells and mature polyhedra. *Virology* **174**, 177-184.
- SADONI, N., LANGER, S., FAUTH, C., BERNARDI, G., CREMER, T., TURNER, B.M., and ZINK, D. (1999). Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome

- territories build up functionally distinct higher order compartments. *The Journal of cell biology* **146**, 1211-1226.
- SAKAMOTO, T., IKEDA, Y., and YONEMITSU, Y. (2001). Gene targeting to the retina. *Adv Drug Deliv Rev* **52**, 93-102.
- SALMINEN, M., AIRENNE, K.J., RINNANKOSKI, R., REIMARI, J., VALILEHTO, O., RINNE, J., SUIKKANEN, S., KUKKONEN, S., YLA-HERTTUALA, S., KULOMAA, M.S., and VIHINEN-RANTA, M. (2005). Improvement in nuclear entry and transgene expression of baculoviruses by disintegration of microtubules in human hepatocytes. *Journal of virology* **79**, 2720-2728.
- SANDIG, V., HOFMANN, C., STEINERT, S., JENNINGS, G., SCHLAG, P., and STRAUSS, M. (1996). Gene transfer into hepatocytes and human liver tissue by baculovirus vectors. *Human gene therapy* **7**, 1937-1945.
- SARKIS, C., SERGUERA, C., PETRES, S., BUCHET, D., RIDET, J.L., EDELMAN, L., and MALLET, J. (2000). Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 14638-14643.
- SCHAFER, M.P., ROHRMANN, G., HEINE, U., and BEAUDREAU, G.S. (1979). DNA from two *Orgyia pseudotsugata* baculoviruses: molecular weight determination by means of electron microscopy and restriction endonuclease analysis. *Virology* **95**, 176-184.
- SEGOVIA, J., LAWLESS, G.M., TILLAKARATNE, N.J., BRENNER, M., and TOBIN, A.J. (1994). Cyclic AMP decreases the expression of a neuronal marker (GAD67) and increases the expression of an astroglial marker (GFAP) in C6 cells. *Journal of neurochemistry* **63**, 1218-1225.
- SEGOVIA, J., VERGARA, P., and BRENNER, M. (1998). Differentiation-dependent expression of transgenes in engineered astrocyte cell lines. *Neuroscience letters* **242**, 172-176.
- SHI, Q., WANG, Y., and WORTON, R. (1997). Modulation of the specificity and activity of a cellular promoter in an adenoviral vector. *Human gene therapy* **8**, 403-410.
- SHIBUYA, M., and CLAESSEON-WELSH, L. (2006). Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* **312**, 549-560.
- SHIH, S.C., JU, M., LIU, N., and SMITH, L.E. (2003). Selective stimulation of VEGFR-1 prevents oxygen-induced retinal vascular degeneration in retinopathy of prematurity. *J Clin Invest* **112**, 50-57.
- SHOJI, I., AIZAKI, H., TANI, H., ISHII, K., CHIBA, T., SAITO, I., MIYAMURA, T., and MATSUURA, Y. (1997). Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *The Journal of general virology* **78** (Pt 10), 2657-2664.
- SKALNIKOVA, M., KOZUBEK, S., LUKASOVA, E., BARTOVA, E., JIRSOVA, P., CAFOURKOVA, A., KOUTNA, I., and KOZUBEK, M. (2000). Spatial arrangement of genes, centromeres and chromosomes in human blood cell nuclei and its changes during the cell cycle, differentiation and after irradiation. *Chromosome Res* **8**, 487-499.
- SLACK, J., and ARIF, B.M. (2007). The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Advances in virus research* **69**, 99-165.
- SMITH-ARICA, J.R., WILLIAMS, J.C., STONE, D., SMITH, J., LOWENSTEIN, P.R., and CASTRO, M.G. (2001). Switching on and off transgene expression within lactotrophic cells in the anterior pituitary gland in vivo. *Endocrinology* **142**, 2521-2532.
- SMITH, G.E., and SUMMERS, M.D. (1978). Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology* **89**, 517-527.
- SMITH, G.E., and SUMMERS, M.D. (1979). Restriction Maps of Five *Autographa californica* MNPV Variants, *Trichoplusia ni* MNPV, and *Galleria mellonella* MNPV DNAs with Endonucleases SmaI, KpnI, BamHI, SacI, XhoI, and EcoRI. *Journal of virology* **30**, 828-838.

- SMITH, J.D., SIKES, J., and LEVIN, J.A. (1998). Human apolipoprotein E allele-specific brain expressing transgenic mice. *Neurobiology of aging* **19**, 407-413.
- SOLLERBRANT, K., ELMEN, J., WAHLESTEDT, C., ACKER, J., LEBLOIS-PREHAUD, H., LATTA-MAHIEU, M., YEH, P., and PERRICAUDET, M. (2001). A novel method using baculovirus-mediated gene transfer for production of recombinant adeno-associated virus vectors. *The Journal of general virology* **82**, 2051-2060.
- SONG, J., LIANG, C., and CHEN, X. (2006). Transduction of avian cells with recombinant baculovirus. *Journal of virological methods* **135**, 157-162.
- SONG, S.U., and BOYCE, F.M. (2001). Combination treatment for osteosarcoma with baculoviral vector mediated gene therapy (p53) and chemotherapy (adriamycin). *Experimental & molecular medicine* **33**, 46-53.
- SONG, S.U., SHIN, S.H., KIM, S.K., CHOI, G.S., KIM, W.C., LEE, M.H., KIM, S.J., KIM, I.H., CHOI, M.S., HONG, Y.J., and LEE, K.H. (2003). Effective transduction of osteogenic sarcoma cells by a baculovirus vector. *The Journal of general virology* **84**, 697-703.
- SOUTHGATE, T.D., WINDEATT, S., SMITH-ARICA, J., GERDES, C.A., PERONE, M.J., MORRIS, I., DAVIS, J.R., KLATZMANN, D., LOWENSTEIN, P.R., and CASTRO, M.G. (2000). Transcriptional targeting to anterior pituitary lactotrophic cells using recombinant adenovirus vectors in vitro and in vivo in normal and estrogen/sulpiride-induced hyperplastic anterior pituitaries. *Endocrinology* **141**, 3493-3505.
- SPENGER, A., ERNST, W., CONDREAY, J.P., KOST, T.A., and GRABHERR, R. (2004). Influence of promoter choice and trichostatin A treatment on expression of baculovirus delivered genes in mammalian cells. *Protein expression and purification* **38**, 17-23.
- STANBRIDGE, L.J., DUSSUPT, V., and MAITLAND, N.J. (2003). Baculoviruses as Vectors for Gene Therapy against Human Prostate Cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2003**, 79-91.
- STEINER, H.H., KARCHER, S., MUELLER, M.M., NALBANTIS, E., KUNZE, S., and HEROLD-MENDE, C. (2004). Autocrine pathways of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in glioblastoma multiforme: clinical relevance of radiation-induced increase of VEGF levels. *J Neurooncol* **66**, 129-138.
- STRAHL, B.D., and ALLIS, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- SU, M., HU, H., LEE, Y., D'AZZO, A., MESSING, A., and BRENNER, M. (2004). Expression specificity of GFAP transgenes. *Neurochemical research* **29**, 2075-2093.
- SUMMERS, M.D. (2006). Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides. *Advances in virus research* **68**, 3-73.
- SUMMERS, M.D., and ANDERSON, D.L. (1973). Characterization of nuclear polyhedrosis virus DNAs. *Journal of virology* **12**, 1336-1346.
- SUMMERS, M.D., and SMITH, G.E. (1975). Comparative studies of baculovirus granulins and polyhedrins. *Intervirology* **6**, 168-180.
- TANI, H., ABE, T., LIMN, C.K., MOCHIZUKI, R., YAMAGISHI, J., KITAGAWA, Y., WATANABE, R., MORIISHI, K., and MATSUURA, Y. (2003). [Baculovirus vector--gene transfer into mammalian cells]. *Uirusu* **53**, 185-193.
- TANI, H., NISHIJIMA, M., USHIJIMA, H., MIYAMURA, T., and MATSUURA, Y. (2001). Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. *Virology* **279**, 343-353.
- THIEM, S.M., and MILLER, L.K. (1989). Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of virology* **63**, 2008-2018.
- THOMAS, C.E., EHRHARDT, A., and KAY, M.A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature reviews* **4**, 346-358.

- TITTERINGTON, J.S., NUN, T.K., and PASSARELLI, A.L. (2003). Functional dissection of the baculovirus late expression factor-8 gene: sequence requirements for late gene promoter activation. *The Journal of general virology* **84**, 1817-1826.
- TJIA, S.T., ZU ALTENSCHILDESCHE, G.M., and DOERFLER, W. (1983). *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells. *Virology* **125**, 107-117.
- TOIVOLA, J., OJALA, K., MICHEL, P.O., VUENTO, M., and OKER-BLOM, C. (2002). Properties of baculovirus particles displaying GFP analyzed by fluorescence correlation spectroscopy. *Biological chemistry* **383**, 1941-1946.
- TOMALSKI, M.D., WU, J.G., and MILLER, L.K. (1988). The location, sequence, transcription, and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene. *Virology* **167**, 591-600.
- TREJO, F., VERGARA, P., BRENNER, M., and SEGOVIA, J. (1999). Gene therapy in a rodent model of Parkinson's disease using differentiated C6 cells expressing a GFAP-tyrosine hydroxylase transgene. *Life sciences* **65**, 483-491.
- TWEETEN, K.A., BULLA, L.A., and CONSIGLI, R.A. (1980). Characterization of an Extremely Basic Protein Derived from Granulosis Virus Nucleocapsids. *Journal of virology* **33**, 866-876.
- VAIL, P.V., and HALL, I.M. (1969). The histopathology of a nuclear polyhedrosis in larvae of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, related to symptoms and mortality. *Journal of invertebrate pathology* **13**, 188-198.
- VALENZUELA, L., and KAMAKAKA, R.T. (2006). Chromatin insulators. *Annual review of genetics* **40**, 107-138.
- VAN LENT, J.W., GROENEN, J.T., KLINGE-ROODE, E.C., ROHRMANN, G.F., ZUIDEMA, D., and VLAK, J.M. (1990). Localization of the 34 kDa polyhedron envelope protein in *Spodoptera frugiperda* cells infected with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Archives of virology* **111**, 103-114.
- VAN LOO, N.D., FORTUNATI, E., EHLERT, E., RABELINK, M., GROSVELD, F., and SCHOLTE, B.J. (2001). Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *Journal of virology* **75**, 961-970.
- VAN OERS, M.M., ABMA-HENKENS, M.H., HERNIOU, E.A., DE GROOT, J.C., PETERS, S., and VLAK, J.M. (2005). Genome sequence of *Chrysodeixis chalcites* nucleopolyhedrovirus, a baculovirus with two DNA photolyase genes. *The Journal of general virology* **86**, 2069-2080.
- VAN OERS, M.M., and VLAK, J.M. (2007). Baculovirus genomics. *Current drug targets* **8**, 1051-1068.
- VANARS DALL, A.L., MIKHAILOV, V.S., and ROHRMANN, G.F. (2007). Baculovirus DNA replication and processing. *Current drug targets* **8**, 1096-1102.
- VENKAIAH, B., VISWANATHAN, P., HABIB, S., and HASNAIN, S.E. (2004). An additional copy of the homologous region (hr1) sequence in the *Autographa californica* multinucleocapsid polyhedrosis virus genome promotes hyperexpression of foreign genes. *Biochemistry* **43**, 8143-8151.
- VERMA, I.M., and WEITZMAN, M.D. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annual review of biochemistry* **74**, 711-738.
- VIALARD, J.E., and RICHARDSON, C.D. (1993). The 1,629-nucleotide open reading frame located downstream of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene encodes a nucleocapsid-associated phosphoprotein. *Journal of virology* **67**, 5859-5866.
- VISWANATHAN, P., VENKAIAH, B., KUMAR, M.S., RASHEEDI, S., VRATI, S., BASHYAM, M.D., and HASNAIN, S.E. (2003). The homologous region sequence (hr1) of *Autographa californica* multinucleocapsid polyhedrosis virus can enhance transcription from non-baculoviral promoters in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **278**, 52564-52571.

- VLAK, J.M., KLINKENBERG, F.A., ZAAL, K.J., USMANY, M., KLINGE-ROODE, E.C., GEERVLiet, J.B., ROOSIEN, J., and VAN LENT, J.W. (1988). Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-beta-galactosidase fusion gene. *The Journal of general virology* **69** (Pt 4), 765-776.
- VOLKMAN, L.E. (1986). The 64K envelope protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Current topics in microbiology and immunology* **131**, 103-118.
- VOLKMAN, L.E., and GOLDSMITH, P.A. (1983). In Vitro Survey of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Interaction with Nontarget Vertebrate Host Cells. *Applied and environmental microbiology* **45**, 1085-1093.
- VOLKMAN, L.E., and GOLDSMITH, P.A. (1984). Budded *Autographa californica* NPV 64K protein: Further biochemical analysis and effects of postimmunoprecipitation sample preparation conditions. *Virology* **139**, 295-302.
- VOLKMAN, L.E., and GOLDSMITH, P.A. (1985). Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology* **143**, 185-195.
- VOLKMAN, L.E., GOLDSMITH, P.A., HESS, R.T., and FAULKNER, P. (1984). Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody: identification of the target antigen. *Virology* **133**, 354-362.
- WAGLE, M., and JESUTHASAN, S. (2003). Baculovirus-mediated gene expression in zebrafish. *Marine biotechnology* (New York, N.Y **5**, 58-63.
- WANG, C.Y., LI, F., YANG, Y., GUO, H.Y., WU, C.X., and WANG, S. (2006). Recombinant baculovirus containing the diphtheria toxin A gene for malignant glioma therapy. *Cancer research* **66**, 5798-5806.
- WANG, C.Y., and WANG, S. (2005). Adeno-associated virus inverted terminal repeats improve neuronal transgene expression mediated by baculoviral vectors in rat brain. *Human gene therapy* **16**, 1219-1226.
- WANG, C.Y., and WANG, S. (2006). Astrocytic expression of transgene in the rat brain mediated by baculovirus vectors containing an astrocyte-specific promoter. *Gene therapy* **13**, 1447-1456.
- WANG, K.C., WU, J.C., CHUNG, Y.C., HO, Y.C., CHANG, M.D., and HU, Y.C. (2005). Baculovirus as a highly efficient gene delivery vector for the expression of hepatitis delta virus antigens in mammalian cells. *Biotechnology and bioengineering* **89**, 464-473.
- WESTENBERG, M., UIJTDEWILLIGEN, P., and VLAK, J.M. (2007). Baculovirus envelope fusion proteins F and GP64 exploit distinct receptors to gain entry into cultured insect cells. *The Journal of general virology* **88**, 3302-3306.
- WF, I.J., VAN STRIEN, E.A., HELDENS, J.G., BROER, R., ZUIDEMA, D., GOLDBACH, R.W., and VLAK, J.M. (1999). Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *The Journal of general virology* **80** (Pt 12), 3289-3304.
- WHITE, K., NICKLIN, S.A., and BAKER, A.H. (2007). Novel vectors for in vivo gene delivery to vascular tissue. *Expert opinion on biological therapy* **7**, 809-821.
- WHITE, S.J., NICKLIN, S.A., SAWAMURA, T., and BAKER, A.H. (2001). Identification of peptides that target the endothelial cell-specific LOX-1 receptor. *Hypertension* **37**, 449-455.
- WHITT, M.A., and MANNING, J.S. (1988). A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body. *Virology* **163**, 33-42.
- WICKHAM, T.J., GRANADOS, R.R., WOOD, H.A., HAMMER, D.A., and SHULER, M.L. (1990). General analysis of receptor-mediated viral attachment to cell surfaces. *Biophysical journal* **58**, 1501-1516.
- WILLIS, L.G., SEIPP, R., STEWART, T.M., ERLANDSON, M.A., and THEILMANN, D.A. (2005). Sequence analysis of the complete genome of *Trichoplusia ni* single

- nucleopolyhedrovirus and the identification of a baculoviral photolyase gene. *Virology* **338**, 209-226.
- WILSON, M.E. (1988). A synthetic peptide to the predicted 6.9K translation product of the HindIII-H/EcoRI-D region of the AcNPV genome induces antibodies to the basic DNA-binding protein. *Virus research* **9**, 21-31.
- WILSON, M.E., and CONSIGLI, R.A. (1985a). Characterization of a protein kinase activity associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella*. *Virology* **143**, 516-525.
- WILSON, M.E., and CONSIGLI, R.A. (1985b). Functions of a protein kinase activity associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella*. *Virology* **143**, 526-535.
- WOLGAMOT, G.M., GROSS, C.H., RUSSELL, R.L., and ROHRMANN, G.F. (1993). Immunocytochemical characterization of p24, a baculovirus capsid-associated protein. *The Journal of general virology* **74 (Pt 1)**, 103-107.
- WORK, L.M., NICKLIN, S.A., WHITE, S.J., and BAKER, A.H. (2002). Use of phage display to identify novel peptides for targeted gene therapy. *Methods in enzymology* **346**, 157-176.
- WORMLEATON, S., KUZIO, J., and WINSTANLEY, D. (2003). The complete sequence of the *Adoxophyes orana* granulovirus genome. *Virology* **311**, 350-365.
- XU, H., YAO, L., LU, S., and QI, Y. (2007). Host filamentous actin is associated with *Heliothis armigera* single nucleopolyhedrosis virus (HaSNPV) nucleocapsid transport to the host nucleus. *Current microbiology* **54**, 199-206.
- YI, Y., HAHM, S.H., and LEE, K.H. (2005). Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions. *Current gene therapy* **5**, 25-35.
- YOSHIDA, M., and HORINOUCI, S. (1999). Trichostatin and leptomycin. Inhibition of histone deacetylation and signal-dependent nuclear export. *Ann N Y Acad Sci* **886**, 23-36.
- ZHANG, C.X., MA, X.C., and GUO, Z.J. (2005). Comparison of the complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology* **333**, 190-199.
- ZHANG, Y., and REINBERG, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**, 2343-2360.
- ZHAO, Z., ALAM, S., OPPENHEIM, R.W., PREVETTE, D.M., EVENSON, A., and PARSADANIAN, A. (2004). Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the CNS rescues motoneurons from programmed cell death and promotes their long-term survival following axotomy. *Experimental neurology* **190**, 356-372.
- ZHOU, J., and BLISSARD, G.W. (2008). Identification of a GP64 subdomain involved in receptor binding by budded virions of the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Journal of virology* **82**, 4449-4460.
- ZUIDEMA, D., KLINGE-ROODE, E.C., VAN LENT, J.W., and VLAK, J.M. (1989). Construction and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutant lacking the polyhedral envelope. *Virology* **173**, 98-108.

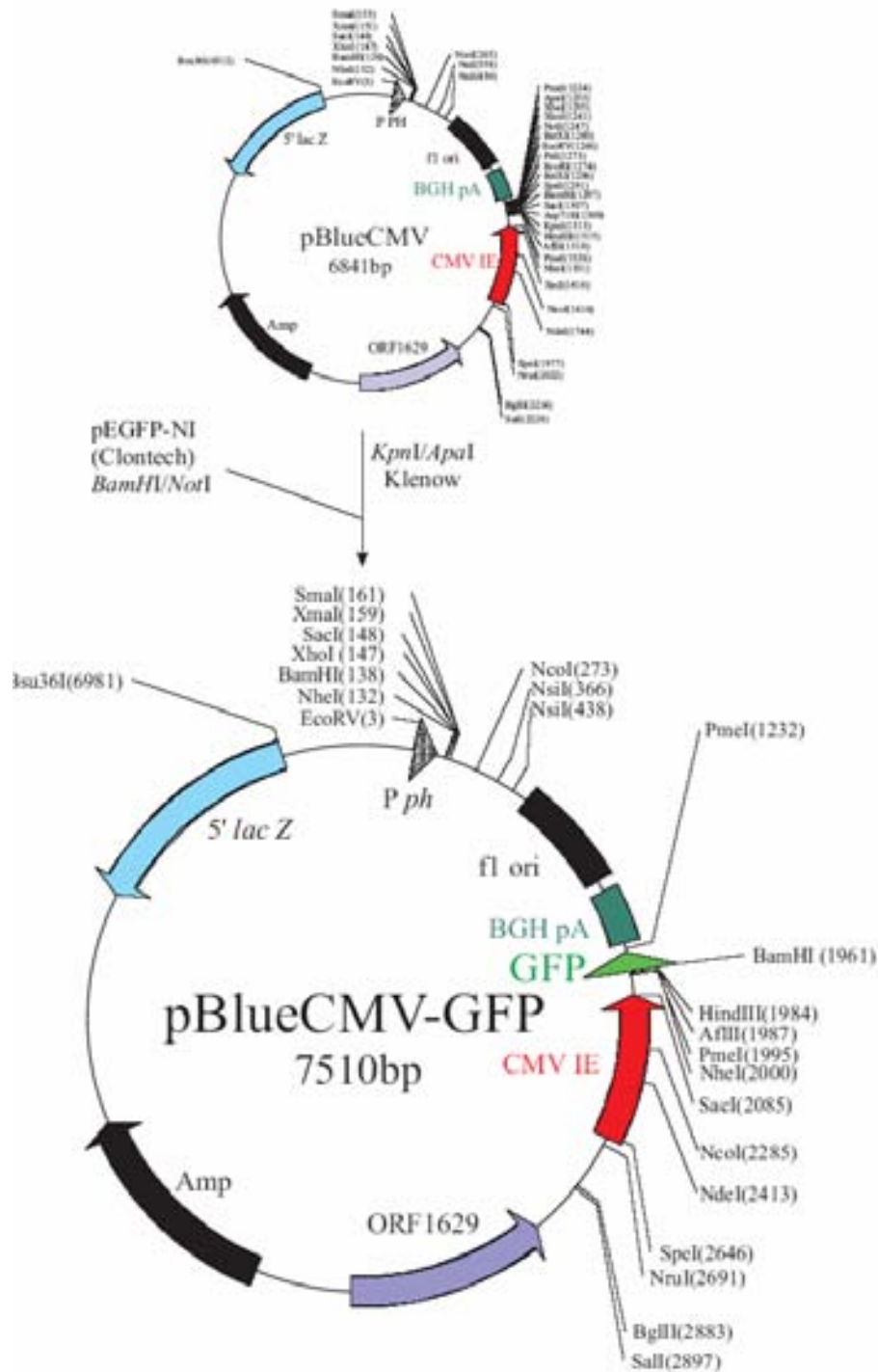


Figura 15. Construcción del plásmido pBlueCMV-GFP. El plásmido pBlueCMV-GFP fue generado a través de la clonación de un fragmento *BamHI/NotI*, el cual contiene el gen de la proteína verde fluorescente *gfp*, proveniente del plásmido pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA), en los sitios *KpnI* y *ApaI* de pBlueCMV, tratando previamente los insertos con el fragmento klenow de la ADN polimerasa.

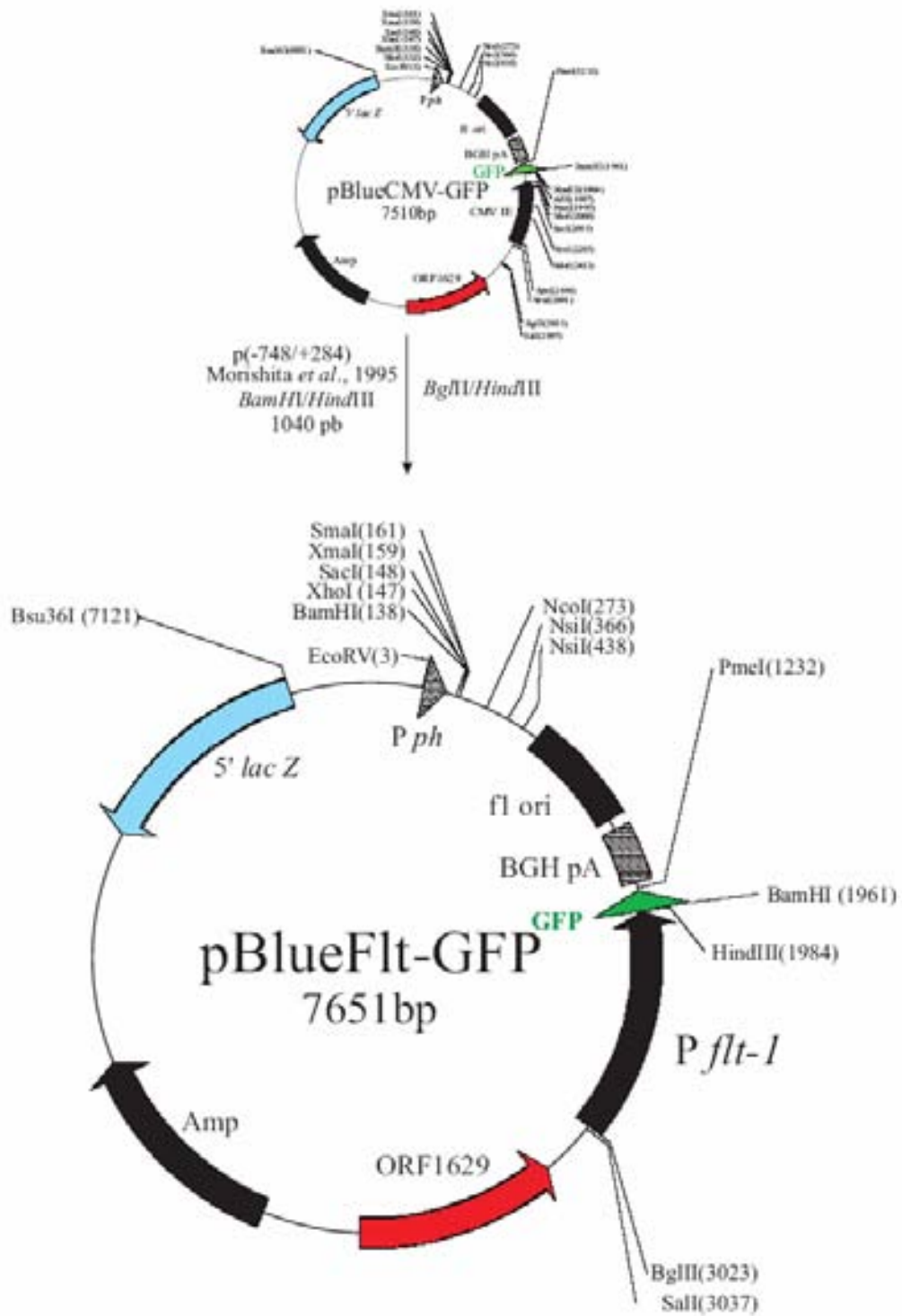


Figura 16. Construcción del plásmido pBlueFlt-GFP. El plásmido pBlueFlt-GFP, fue construido a través de la clonación de un fragmento *Bam*HI/*Hind*III de 1040 pb, proveniente del plásmido p(-748/+284) donado por el Dr. Lewis (Morishita *et al.*, 1995), en los sitios *Bgl*II/*Hind*III del plásmido pBlueCMV-GFP.

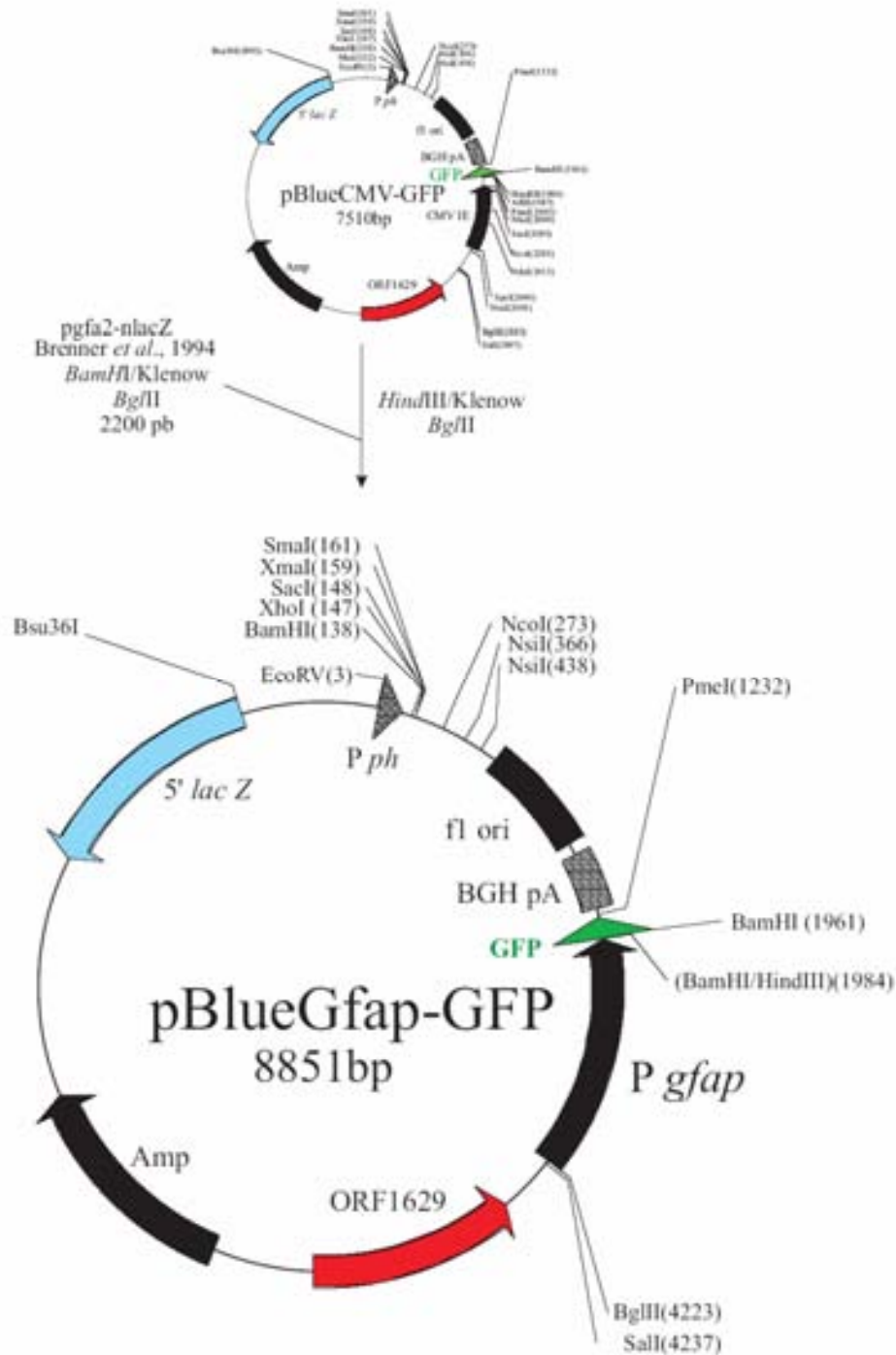


Figura 17. Construcción del plásmido pBlueGfap-GFP. El plásmido pBlueGfap-GFP, fue generado primero liberando un fragmento *Bam*HI proveniente del plásmido pgfa2-nlacZ (Brenner *et al.*, 1994) (donado por el Dr. Segovia, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, CINVESTAV), posteriormente este fragmento fue tratado con la enzima klenow y finalmente con la enzima *Bgl*II para ser clonado en el plásmido pBlueCMV-GFP previamente digerido con la enzima *Hind*III, tratado con la enzima klenow y finalmente digerido con *Bgl*II.

2. Producción de baculovirus recombinantes

La producción de baculovirus recombinantes se lleva a cabo de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en “Bac-N-Blue Transfection and Expresión Guide™” (Invitrogen Carlsbad CA, USA), con algunas modificaciones.

Todos los procedimientos se llevan a cabo en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

1.- Sembrar 1×10^6 células Sf9 o Sf21 de *Spodoptera frugiperda* (Invitrogen, San Diego, CA) en un placa de cultivo celular de 35 mm utilizando medio Grace's previamente suplementado con 10 % (vol/vol) de suero fetal bovino, 1.0 % de yeastolate, 1.0 % de hidrolizado de lactalbumina y 1.0 % de penicilina/streptomina (Gibco, Grand Island, NY.) e incubarlas durante 15 min a 27 °C. Es importante que las células sean tomadas de un cultivo de crecimiento en fase logarítmica (densidad celular de entre 1.5×10^6 a 2×10^6 células/mL)

2.- Para cada transfección preparar el ADN del plásmido de transferencia/ ADN Bac-N-Blue como sigue:

Tubo A:

100 µl de medio Grace's sin suplementar

1 µg de ADN del plásmido de transferencia

100 ng del ADN Bac-N-Blue (2 µl del contenido del vial proporcionado en el “kit”)

Mezclar con vortex durante 5 segundos.

Tubo B:

100 µl de medio Grace's sin suplementar

*6 µl del reactivo de transfección “Cellfectin” (Invitrogen, Carlsbad CA, USA, Cat. No. 10362-010

*Es muy importante mezclar muy bien el reactivo “Cellfectin” antes de utilizarlo.

3.- Combinar el contenido del tubo B en el tubo A (volumen total aprox. 200 µl) y dejar incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 30-40 min (tiempos de incubación mayores de 40 min provoca una disminución de la eficiencia de transfección.

4.- Lavar las células con 2 mL de medio Grace's sin suplementar.

5.- Añadir la mezcla anterior a las células y agregar 300 µl más de medio Grace's sin suplementar. Regresar las células a la incubadora a 27 °C durante 4-5 h.

6.- Agregar 1.5 mL de medio Grace's suplementado, sellar la caja con parafilm y regresar a la incubadora.

7.- Aproximadamente 96 h después de la transfección, agregar el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-galactosido (X-gal) a una concentración final de 150 µg/mL. Seguir incubando por un día más. La aparición de una coloración azul será la confirmación de la producción de baculovirus recombinantes (“Stock” S1). En caso de ser positiva, seguir con el protocolo de purificación mediante el ensayo en placa.

3. Ensayo en placa

El siguiente protocolo puede ser utilizado ya sea para purificar las partículas virales o para titular el “stock” viral de trabajo.

Material necesario:

Tubos estériles de 1.5 mL

Puntas estériles de 20 y 200 µl con filtro

Medio Grace's suplementado

Solución estéril de agarosa de bajo punto de fusión al 3.0 % en agua des-ionizada

X-gal (5mg/mL en dimetilformamida)

Placas de cultivo celular de 6 pozos

Pipetas estériles de 5 y 10 mL

Todos los procedimientos se llevan a cabo en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

1.- Recuperar el sobrenadante del “Stock” S1 obtenido en la “producción de baculovirus recombinantes” y colocarlo en un tubo de 1.5 mL estéril, centrifugar el tubo a 5000 rpm en una microcentrifuga durante 3 min a temperatura ambiente.

2.- En una placa de 6 pozos colocar $1.5-2 \times 10^6$ células Sf21 o Sf9 e incubarlas durante 15 min a 27 °C.

3.- En tubos de 1.5 mL llevar a cabo las siguientes diluciones:

Tubo 1 (Dilución 10^{-1}): 450 µl de medio Grace's completo + 50 µl del sobrenadante (“Stock” S1 o del “Stock” de trabajo)

Tubo 2 (Dilución 10^{-2}): 450 µl de medio Grace's completo + 50 µl de la solución del tubo 1

Tubo 3 (Dilución 10^{-3}): 450 µl de medio Grace's completo + 50 µl de la solución del tubo 2

Tubo 4 (Dilución 10^{-4}): 450 µl de medio Grace's completo + 50 µl de la solución del tubo 3

Tubo 5 (Dilución 10^{-5}): 450 µl de medio Grace's completo + 50 µl de la solución del tubo 4

Tubo 6 (Dilución 10^{-6}): 450 µl de medio Grace's completo + 50 µl de la solución del tubo 5

Tubo 7 (Dilución 10^{-7}): 450 µl de medio Grace's completo + 50 µl de la solución del tubo 6

Tubo 8 (Dilución 10^{-8}): 450 µl de medio Grace's completo + 50 µl de la solución del tubo 7

Mezclar bien y desechar 50 µl del contenido de este tubo.

Notas:

- a) Cada tubo deberá ser mezclado muy bien con ayuda de un vortex y se deberá utilizar puntas con filtro.
- b) Para la purificación de los baculovirus recombinantes así como para la titulación del “stock” de trabajo se recomienda utilizar las diluciones de 10^{-3} a 10^{-8} .
- c) Para los “stocks” de baculovirus purificados mediante gradientes de sacarosa (ver “purificación de baculovirus recombinantes por gradientes de sacarosa”) se recomienda utilizar 5 µl del “stock” y se utilizan las diluciones de 10^{-3} a 10^{-8} .

4.- Retirar el medio de las células y agregar a cada pozo una de las soluciones anteriores comenzando por la de mayor dilución.

5.- Incubar la placa durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave.

6.- Preparar la agarosa de bajo punto de fusión como sigue:

Fundir la solución de agarosa en microondas y dejarla enfriar a temperatura ambiente. Mezclar la agarosa 1:1 (vol/vol) con medio Grace's suplementado (se recomienda preparar 14 mL para una placa de 6 pozos).

8.- Retirar la solución viral de cada uno de los pozos y añadir 2 mL/pozo de la solución de agarosa/medio Grace's (la solución de agarosa deberá tener una temperatura aproximada de 40-45°C).

9.- Dejar solidificar la agarosa a temperatura ambiente o alternativamente a 4 °C.

10.- Una vez que la agarosa se ha solidificado, se añade a cada pozo 1 mL de medio Grace's suplementado y se sella la caja con parafilm.

11.- Aproximadamente 72 h después, se añade el reactivo X-gal a una concentración final de 150 µg/mL a cada pozo. La placa se sella una vez más con parafilm y se sigue incubando hasta la aparición de placas aisladas en las diluciones de 10^{-5} a 10^{-7} .

a) Para titular el "stock" viral se lleva a cabo el siguiente calculo:
$$\text{UFP/mL} = (1/\text{dilución}) \times \#\text{placas} \times (1/\text{vol. tomado del "stock" en mL})$$

b) Para purificar los baculovirus recombinantes se extraen al menos 3 placas por separado con ayuda de una punta de 1 mL con filtro y se re infectan 3 mL de células de insecto previamente diluidas a 2×10^6 células/mL en medio Grace's y en frascos de cultivo celular T25. Posteriormente, las células se incuban con agitación constante de 100 rpm a 27 °C durante 4-5 días ("Stock" S2). Al termino de este tiempo las células deberán estar lisadas y se procede con el análisis por PCR de las clonas recombinantes.

4. Purificación del ADN genómico viral

Soluciones requeridas:

Proteinasas K (5-10 mg/mL)

Phenol:Cloroformo (1:1)

Acetato de sodio (AcNa) 3 M

Glicógeno (2 mg/mL)

20% de polietilenglicol (PEG) 8000 en 1 M de NaCl, para preparar 100 mL se mezclan 20 g de PEG 8000 y 5.44 g de NaCl en 100 mL de agua desionizada y se esteriliza en el autoclave. La solución deberá mezclarse por agitación antes de utilizarse y se deberá almacenar a 4 °C.

1.- En la campana de flujo laminar se toman 0.75 mL del “Stock” S2 de cada clona de baculovirus recombinantes (ver “ensayo en placa”, punto 11 inciso b) y se colocan en un tubo de 1.5 mL, posteriormente se centrifuga a 5000 rpm durante 3 min en una microcentrifuga y se coloca el sobrenadante en un tubo limpio de 1.5 mL.

2.- Al tubo anterior se le agrega 0.75 mL de la solución fría de PEG/NaCl, se mezcla por inversión de 5 a 6 veces y se deja incubar en hielo durante 30 min.

3.- Los tubos se centrifugan en una microcentrifuga durante 10 min a la velocidad máxima.

4.- Se elimina el sobrenadante colocándolo en un recipiente con cloro. Se recomienda llevar a cabo una centrifugación más de 2-3 min a fin de eliminar el exceso del sobrenadante.

5.- Se resuspende el sedimento agregando 100 µl de agua estéril. Es importante resuspender muy bien el sedimento con ayuda de una pipeta.

6.- Adicionar 10 µl de proteinasa K (5-10 mg/ mL) e incubar durante 1 h a 37 °C.

7.- Extraer con 100 µl de la solución de fenol:cloroformo (1:1), mezclar en vortex y centrifugar durante de 2 min a velocidad máxima en una microcentrifuga. Se transfiere la fase acuosa (fase superior) a un tubo limpio de 1.5 mL.

8.- Se precipita el ADN adicionando 10 µl de AcNa 3M, 5 µl de glucogeno y 250 µl de etanol al 100 %, se mezcla muy bien en vortex y se incuba a -20 °C al menos 1 h o 30 min a -70 °C. Alternativamente, el ADN se puede almacenar de esta manera por largos periodos de tiempo.

9.- El ADN se recupera mediante centrifugación a la velocidad máxima durante 15 min en una microcentrifuga. Posteriormente, se agregan 0.5 mL de etanol al 70 % (no agitar) y se centrifuga a la máxima velocidad durante 5 min.

10.- Se eliminan las trazas de alcohol con ayuda de una pipeta y con cuidado para no perder el ADN. Los tubos se dejan secar a temperatura ambiente o alternativamente a 37 °C o en una campana de flujo laminar.

11.- Finalmente, el ADN se resuspende en 30 µl de agua previamente esterilizada y se procede con el análisis por PCR para confirmar la presencia del ADN insertado en el genoma viral. El ADN se almacena a 4 °C o por largos periodos de tiempo a -20 °C.

5. Concentración de baculovirus recombinantes por gradientes de sacarosa

El siguiente protocolo es utilizado para la concentración baculovirus recombinantes. El título aproximado que se obtiene es de 1×10^{10} - 1×10^{11} UFP/mL.

1.- En un matraz estéril de 1 L con tapa de rosca colocar de 400 a 500 mL de células Sf9 o Sf21 a una densidad de 2×10^6 células/mL. Infectar las células a 0.1-2 MOI del stock de baculovirus recombinante e incubar con agitación a 100 rpm durante 5-7 días o hasta que las células estén completamente lisadas.

Nota: Es importante que las células provengan de un cultivo en fase logarítmica ya que el título del virus disminuye considerablemente con células poco viables.

2.- Transferir el cultivo celular a un frasco de centrifuga de polipropileno previamente enfriado en hielo y centrifugar el cultivo a 4000 rpm por 10 min a 4 °C en una centrifuga Sorvall o equivalente.

3.- Transferir el sobrenadante a tubos de ultracentrifuga Beckman y colectar los virus mediante ultracentrifugación a 24 000 rpm (Beckman, swing-out rotor SW28) durante 1.5 h a 4 °C. (Es recomendable revisar el manual de usuario de la ultracentrifuga Beckman y del rotor SW28).

4.- Decantar el sobrenadante en un contenedor con cloro y agregar 2 mL de PBS a los tubos. Dejar resuspender los virus a 4 °C durante toda la noche.

5.- Resuspender cuidadosamente los virus subiendo y bajando la solución con ayuda de una pipeta de 1 mL con filtro.

6.- Gradiente de sacarosa. Las soluciones de sacarosa deberán ser almacenadas y mantenidas a 4 °C. En un tubo para ultracentrifuga (semejante al del paso 3) se colocan 9 mL de una solución de sacarosa al 50 % y con mucho cuidado, lentamente y por las paredes 9 mL de una solución de sacarosa al 10 %. El gradiente se utiliza dentro de los próximos 10 min.

7.- Sobre el gradiente se colocan las soluciones de virus/PBS obtenidas del paso 5 y se centrifuga como en el paso 3.

8.- Al término del tiempo de centrifugación, se recupera rápidamente el tubo evitando su agitación y se deberá observarse una banda color blanco entre las interfases la cual puede observarse más claramente sobre un fondo oscuro.

9.- Se recupera el virus con ayuda de una pipeta pasteur y se coloca en un tubo de ultracentrifuga previamente pre-enfriado a 4 °C. Se agregan 28 mL de PBS y recupera el virus mediante centrifugación como en el paso 3.

10.- Se decanta el PBS en un contenedor con desinfectante y se resuspenden las partículas virales en los restos de PBS durante toda la noche a 4 °C. (Nota: no trate de resuspender las partículas virales de forma mecánica).

11.- El stock concentrado se almacena a 4 °C (No almacenar el virus a -20 °C).

12.- Proceda con la titulación del virus como se indica en ensayo en placa.

**In vivo transcriptional targeting into the retinal vasculature using
recombinant baculovirus carrying the human flt-1 promoter**

Luz-Madrigal Agustín, Carmen Clapp, Jorge Aranda, and Luis Vaca^{*1}

Research

Open Access

In vivo transcriptional targeting into the retinal vasculature using recombinant baculovirus carrying the human *flt-1* promoter

Agustín Luz-Madrigal¹, Carmen Clapp², Jorge Aranda² and Luis Vaca^{*1}

Address: ¹Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México and ²Instituto de Neurobiología, UNAM-Juriquilla, Querétaro, Qro México, 76001, México

Email: Agustín Luz-Madrigal - aluz@ifc.unam.mx; Carmen Clapp - clapp@servidor.unam.mx; Jorge Aranda - jrm327@hotmail.com; Luis Vaca* - lrvaca@ifc.unam.mx

* Corresponding author

Published: 18 September 2007

Received: 21 June 2007

Virology Journal 2007, 4:88 doi:10.1186/1743-422X-4-88

Accepted: 18 September 2007

This article is available from: <http://www.virologyjournal.com/content/4/1/88>

© 2007 Agustín et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Endothelial cells are a target for gene therapy because they are implicated in a number of vascular diseases. Recombinant baculovirus have emerged as novel gene delivery vectors. However, there is no information available concerning the use of endothelial-specific promoters in the context of the baculovirus genome. In the present study, we have generated a recombinant baculovirus containing the human *flt-1* promoter (BacFLT-GFP) driving the expression of the green fluorescent protein. Transcriptional gene targeting was analyzed *in vitro* in different mammalian cell lines and *in vivo* in adult rat retinal vasculature.

Results: BacFLT-GFP evoked the highest levels of expression in the endothelial cell line BUVEC-E6E7-1, similar to those reached by recombinant baculovirus carrying the CMV promoter (112% relative to BacCMV-GFP, $n = 4$). Interestingly, BacFLT-GFP directed high levels of expression in rat glioma C6 and in human glioblastoma CH235 cells (34.78% and 47.86% relative to BacCMV-GFP, respectively). Histone deacetylase inhibitors such as butyrate or trichostatin A enhanced the transcriptional activity of both BacCMV-GFP and BacFLT-GFP. Thus, in this study histone deacetylation appears to be a central mechanism for the silencing of baculovirus, independently of the promoter utilized. *In vivo* transcriptional targeting was demonstrated in adult rat retinal vasculature by intravitreal delivery of BacFLT-GFP and immunohistochemical staining with von Willebrand factor (vWF). Analysis by fluorescence microscopy and deconvolved three-dimensional confocal microscopy of retinal whole mounts obtained after 3 days of baculovirus injection showed that most GFP-expressing cells localized to the inner limiting membrane (ILM) and ganglion cell layer (GCL) and colocalize with vWF (70%, $n = 10$) in blood vessels, confirming the endothelial phenotype of the transduced cells.

Conclusion: Taken together, our results indicate that the restricted expression in endothelial cells mediated by the *flt-1* promoter is not affected by the context of the baculovirus genome and demonstrates the potential of using recombinant baculovirus for transcriptional targeted gene expression into the eye vasculature.

Background

Local delivery of genes to vascular wall is a promising approach for the treatment of a number of vascular disorders [1]. As a target organ for gene transfer, the vasculature has several unique features such as a large surface area and easy accessibility. The architecture of the normal vessel wall is relatively simple consisting of three main cell types (endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts) and the transgene products may be secreted locally to achieve an autocrine-paracrine effect or into the bloodstream for a systemic effect. Within the vasculature, endothelial cells are the main target for gene therapy because they are closely related with disease process such as inflammation, atherosclerosis, systemic and pulmonary hypertension, cerebrovascular disease, and in angiogenesis-related disorders [1]. Moreover, tumor angiogenesis is crucial for the progression and metastasis of cancer [2]. Therefore, tumor vascular targeting therapy could represent an effective therapeutic strategy to suppress both primary tumor growth and tumor metastasis [2].

Viral vectors have been used extensively in vascular gene transfer; adenoviral vectors being the most commonly used system [3]. Other vector systems include adeno-associated virus (AAV) and lentiviral vectors [4]. Although these vectors have demonstrated the transfer of genetic material for its expression in endothelial cells, the main limitations are associated with inflammatory reactions due to the pre-existing immunity to human virus [4,5]. To address this problem, the use of recombinant viruses of non-human origin as gene therapy vectors has been suggested [6].

Recently, recombinant baculovirus derived mainly from *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) have emerged as a novel and safer system to transfer genes for its expression into a wide variety of mammalian cells [7]. Since the first studies made by two different groups, showing the ability of baculovirus to transfer genes in mammalian cells derived from hepatic origin [8,9], the list of mammalian cells susceptible to transduction by recombinant baculovirus has increased in the last few years [7].

Transcriptional targeting using cellular tissue-specific regulatory sequences has been demonstrated as a powerful strategy to restrict gene expression to a particular cell type in various tissues, including liver, smooth muscle and heart [10,11]. Moreover, utilization of tumor/tissue-specific promoters can reduce toxicity, increase safety, and improve the therapeutic index [12,13].

The human transmembrane *flt*-like tyrosine kinase (Flt-1) is one of the receptors for vascular endothelial growth

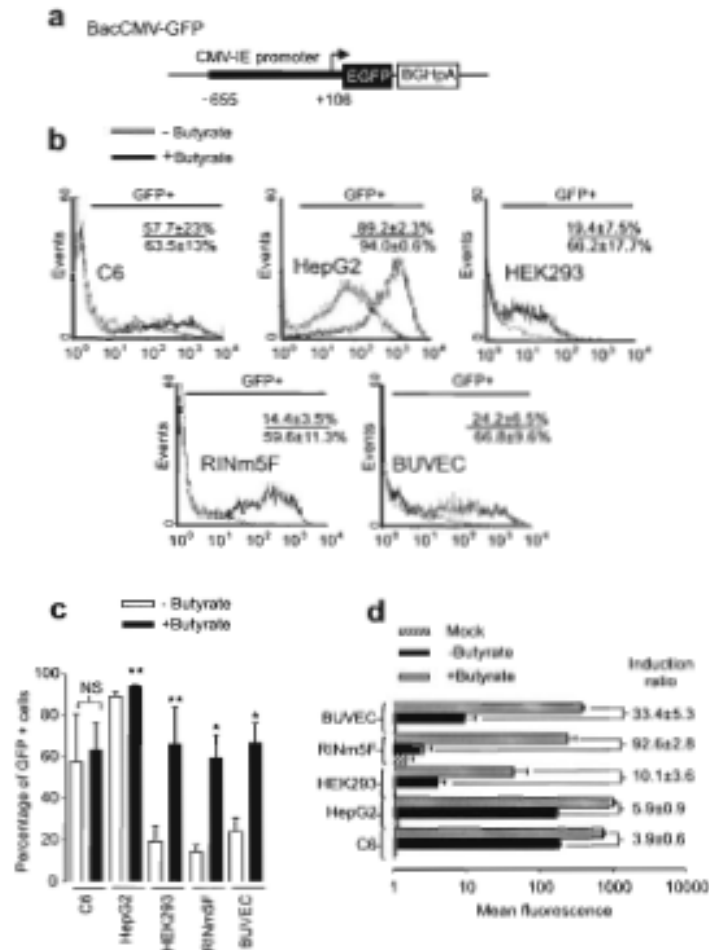
factor (VEGF) [14]. Flt-1 is expressed specifically in endothelium and is likely to play a role in tumor angiogenesis and embryonic vascularization [15]. Morishita *et al.* demonstrated that a 1-kb DNA fragment of the 5'-flanking region of human *flt-1* gene (region from -748 to -284 bp) is involved in endothelial-specific gene expression [16]. So far, there is no information available concerning the use of endothelial-specific promoters in the context of the baculovirus genome. Furthermore, only two reports show to this date *in vivo* transcriptional gene targeting by recombinant baculovirus.

In this study, we produced a recombinant baculovirus (BacFLT-GFP) containing the human flt-1 promoter driving the expression of the green fluorescent protein (GFP) and evaluated the maintenance of endothelial-specific gene expression after *in vitro* transduction of different mammalian cell lines. We also demonstrated *in vivo* transcriptional targeting into the rat retinal vasculature by immunofluorescence staining after intravitreal delivery of BacFLT-GFP. Three-dimensional (3-D) confocal reconstruction studies of retinas from animals injected with BacFLT-GFP showed for the first time the selective targeting to blood vessels of a baculovirus vector.

Results

Transduction susceptibility mediated by recombinant baculovirus in mammalian cells

To compare the selectivity and the levels of expression mediated by the endothelial specific baculovirus (BacFLT-GFP), we generated a recombinant baculovirus containing a 761-bp DNA fragment of the cytomegalovirus (CMV) promoter driving the expression of GFP (Figure 1a). This promoter was selected because it drives high levels of expression into mammalian cells from different tissues. We included the immortalized bovine umbilical vein endothelial cell line BUEVEE-E6E7-1, which retains endothelial cell characteristics and has been utilized to investigate the action of regulatory factors of vascular endothelium [17]. The cells were transduced at a multiplicity of infection (MOI) of 100 in the presence or absence of 5 mM butyrate, a histone deacetylase inhibitor. The percentage of GFP positive (GFP+) cells and the levels of expression, represented by the mean fluorescence intensity (MFI), were analyzed 48 h after transduction by flow cytometry. In all cases mock-transduced cells (cells treated with medium alone and butyrate) were used as control for background fluorescence. In the experiments performed without the addition of butyrate (Figure 1b,c) the hepatocarcinoma cell line HepG2 was the most susceptible to transduction, with 89.2 ± 2.3% GFP positive cells, followed by the rat glioma cell line C6, 57.7 ± 23%; the bovine umbilical vein endothelial cell line BUEVEE-E6E7-1, 24.2% ± 6.5%; the human embryonic kidney cell

**Figure 1**

Transduction susceptibility mediated by BacCMV-GFP in mammalian cells. 10^6 cells were transduced at a multiplicity of infection (MOI) of 100 with BacCMV-GFP. (a) Drawing showing the cassette structure of BacCMV-GFP. Abbreviations: CMV, cytomegalovirus immediately-early promoter/enhancer (nucleotides -655 to +106); EGFP, enhanced green-fluorescent protein; BGHpA, bovine growth hormone poly adenylation sequence. (b) Representative histograms obtained by flow cytometry after 48 h post-transduction. The percentage of GFP+ cells is reported in the insets, and was calculated by subtracting the background obtained with mock transduced cells (see Methods). Numbers in the inset refer to the percentage of GFP+ cells \pm SD without (above) or with (below) treatment with butyrate. (c) Percentage of GFP+ cells determined by FACS analysis in either the presence or absence of butyrate. * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, *** $P = 0.7244$ versus cells non-treated with butyrate. NS = non significant. (d) Levels of expression of GFP and induction ratio (indicated on the right) as determined by the mean fluorescence intensity in the presence or absence of butyrate. Values are means \pm SD of four independent experiments.

line HEK-293, $19.4 \pm 7.5\%$ and the rat insulinoma cell line RIN-m5F, $14.4 \pm 3.5\%$.

Modification of the accessibility of the transcription machinery to gene promoters is one of the underlying mechanisms regulating gene expression in mammalian cells [18]. Although several mechanisms are involved in the regulation of this process, the status of the histone acetylation/deacetylation and DNA methylation/demethylation seems to be of major importance [18,19]. Previous reports have suggested that epigenetic regulation seems to influence the transduction efficiency mediated by recombinant baculovirus in mammalian cells [20,21]. Therefore, we treated the cells with 5 mM butyrate, which has been used to reactivate transgene expression by inhibiting the chromatin-remodeling of histone deacetylases (HDAC), which results in an increase of transcriptional activity of the promoter [22]. Treatment with butyrate (Figure 1b,c) dramatically reactivated the expression in almost all cell lines, except in C6 in which there was no significant difference from control ($63.5 \pm 1.3\%$ and $57.7 \pm 2.3\%$ of GFP+ cells for control and butyrate, respectively; $P = 0.7244$, $n = 4$). In agreement to previous reports [20,21], levels of expression evaluated by the MFI were increased by addition of butyrate (Figure 1d). Particularly, the cell line RIN-m5F was the most susceptible to reactivation by butyrate (92.6 ± 2.8 -fold), followed by BUVEC-E6E7-1, and HEK-293 cells (33.4 ± 5.3 and 10.1 ± 3.6 -fold, respectively). In an attempt to reactivate gene expression by DNA methylation inhibitors, we treated the cells with 5'aza-2'-deoxycytidine (5'aza-C) [23], however there was not a significant difference between the levels of expression reached by control untreated cells and treated with $30 \mu\text{M}$ of 5'aza-C (data not shown). These results suggest that in these cell lines including BUVEC-E6E7-1 cells, there is a strong repression of the transgene expression most likely due to histone deacetylation. In contrast, HepG2 and C6 were less susceptible to reactivation (5.9 ± 0.9 and 3.9 ± 0.6 -fold, respectively) indicating that in these cell lines histone deacetylation does not play a critical role in gene silencing the baculovirus genome.

Baculovirus containing the human *Fli-1* promoter drives endothelial-specific gene expression in vitro

We generated a novel recombinant baculovirus with the human *Fli-1* promoter driving the expression of GFP (BacFLT-GFP, Figure 2a) to test its selectivity and efficiency as a vascular vector for gene therapy.

We first assessed the efficiency of transduction and levels of expression mediated by BacFLT-GFP in the immortalized bovine umbilical vein endothelial cell line BUVEC-E6E7-1 in the presence of 5 mM butyrate. Analysis by flow cytometry 48 h after transduction with BacFLT-GFP (MOI of 100) showed a large number of GFP+ cells (60.34% , n

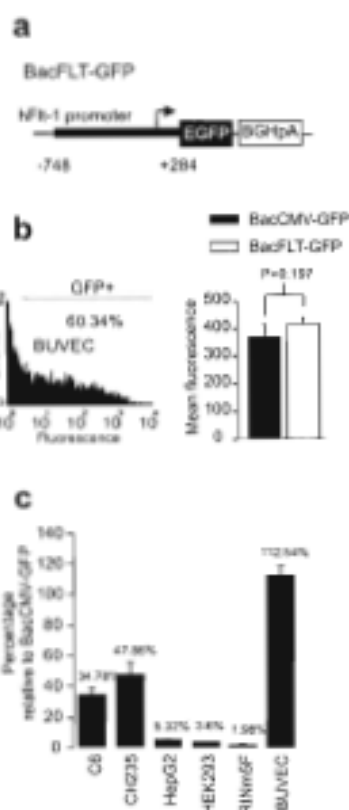


Figure 2
Specificity and levels of gene expression mediated by BacFLT-GFP. (a) Drawing showing the cassette structure of BacFLT-GFP. Abbreviations: hFli-1, promoter sequence of the human *Fli-1* gene (nucleotides -748 to +284 bp); EGFP, enhanced green-fluorescent protein; BGHpA, bovine growth hormone poly adenylation sequence. (b) (Left panel). Representative histogram obtained by flow cytometry 48 h after transduction of BUVEC-E6E7-1 cells with 100 MOI of BacFLT-GFP and 5 mM of butyrate. The percentage of GFP+ cells is reported in the inset, and was calculated by subtracting the background from mock transduced cells (see Methods). (Right panel) Levels of expression obtained with BacCMV-GFP and BacFLT-GFP in BUVEC-E6E7-1 cells, representative of four independent experiments, mean \pm SD. (c) Mean fluorescence intensity (MFI) measured 48 h after transduction with BacFLT-GFP relative to BacCMV-GFP. The percentage of GFP+ cells are indicate above of each bar. Cells were transduced with 100 MOI of BacFLT-GFP or BacCMV-GFP. Data are from four independent experiments \pm SD.

= 4), similar to that obtained with BacCMV-GFP (Figure 2b). Moreover, there is not significant difference between the levels of expression reached by BacFLT-GFP and BacCMV-GFP at the same MOI (Figure 2b right panel, $P = 0.197$, $n = 4$). Similar results were obtained by Nicklin *et al.*, in which recombinant adenoviral vector containing the same promoter sequence produced levels of expression comparable to those evoked by an adenovirus containing the CMV promoter in human umbilical vein (HUVEC) and human saphenous vein endothelial cells (HSVEC) [24].

We next analyzed levels of expression in non-endothelial cells to evaluate *in vitro* cell specificity (Figure 2c). Since the efficiency of gene transfer differs among cell types, the levels of expression (i.e. MFI) for each cell line were normalized using BacCMV-GFP as positive control.

The highest level of expression with BacFLT-GFP was observed in BUVEC-E6E7-1 cells ($112 \pm 6.2\%$ relative to BacCMV-GFP, $n = 4$). Importantly, the levels of expression were severely reduced in other non-endothelial cell types including HepG2, HEK293 and RINm5F. For example, GFP expression in HepG2 cells was only $5.32 \pm 0.37\%$, of that obtained with BacCMV-GFP, demonstrating the low activity of *flt-1* promoter in non-endothelial cells (Figure 2c). Furthermore, BacFLT-GFP produced high levels of expression in the rat glioma C6 and in the human glioblastoma CH235 cells (34.78 ± 4.6 , 47.86 ± 7.84 , respectively). In agreement with our results, *Flt-1* and *KDR* (both receptors for VEGF) have been identified on malignant cells from human CNS, breast, prostate cancer and in cell lines derived from these tumors [15,25]. Furthermore, RT-PCR studies of C6 and CH235 cells showed high levels of expression of the *Flt-1* receptor mRNA (data not shown).

In summary, these results indicate that the *flt-1* promoter retains its transcriptional selectivity in the context of baculovirus genome *in vitro*.

Histone deacetylase inhibitors reactivate the expression mediated by recombinant baculovirus containing the human *Flt-1* promoter

To analyze whether HDAC inhibitors can also improve recombinant baculovirus-mediated gene expression under the control of *flt-1* promoter, BUVEC-E6E7-1 cells were transduced with BacFLT-GFP at an MOI of 100 in the presence of different concentrations of butyrate or TSA (Figure 3a). The GFP+ cells and MFI were examined by flow cytometry 48 h post-transduction. Treatment with both HDAC inhibitors clearly improved gene expression in terms of GFP+ cells in a dose-dependent manner (Figure 3a). The number of GFP+ cells was increased from 8.64% in untreated control cells to 78.25% in cells treated

with 15 mM butyrate. Butyrate inhibits HDAC but also has a number of unrelated effects [22]. To determine whether the inhibition of histone deacetylation was the major contributor to enhanced GFP expression, cells were treated with TSA, which is a more potent and selective inhibitor of deacetylases [26]. TSA significantly enhanced transgene expression in a dose-dependent manner, ranging from 15.85% in untreated control cells to 53.04% GFP+ in cells treated with 50 nM TSA (Figure 3a, right panel). In both cases (butyrate or TSA) the range of fluorescence intensities in the population is spread over approximately three orders of magnitude, suggesting different levels of expression within the cells. Improvement of gene expression after treatment with butyrate or TSA was also evidenced by MFI (Figure 3b). The average level of induction was 81.68-fold and 61.69-fold for 15 mM butyrate and 50 nM TSA, respectively. There were no significant differences in expression at concentrations between 5 and 10 mM of butyrate or 25 and 30 nM of TSA (Figure 3a,b). Higher concentrations of butyrate or TSA administered for 48 h resulted in toxic effects in terms of viable cell number evaluated by trypan blue exclusion.

We performed transient transfections in BUVEC-E6E7-1 cells using the transfer plasmid pBlueFLT-GFP (see Methods), to determine whether the baculovirus genome is involved in the silencing of gene expression (Figure 3c). Transfected cells treated with butyrate or TSA did not show any significant reactivation of gene expression compared with untreated control cells using this construct, even at the highest butyrate or TSA concentrations tested in this study.

Therefore, all these results demonstrate that transgene expression mediated by recombinant baculovirus containing the human *flt-1* promoter is enhanced by the addition of HDAC inhibitors, and the viral genome or proteins coupled to the DNA from the virus are implicated in the silencing of gene expression, since no effect of HDAC inhibitors was observed when the original plasmid used to generate the recombinant baculovirus was directly transfected to drive GFP expression. Moreover, in this study the effect of HDAC inhibitors was independent of the two promoters used.

In vivo endothelial-specific gene expression by baculovirus vectors containing the human *Flt-1* promoter

In order to determine whether the endothelial-specific gene expression mediated by BacFLT-GFP is retained *in vivo*, we selected the eye as a target organ for gene delivery because it is a closed system clearly separated from the systemic circulation, facilitating the delivery of the vector. Furthermore, the blood retinal barrier (BRB) separates the retina from blood, which contains inhibitory factors (e.g. complement) [27]. These characteristic is particularly rel-

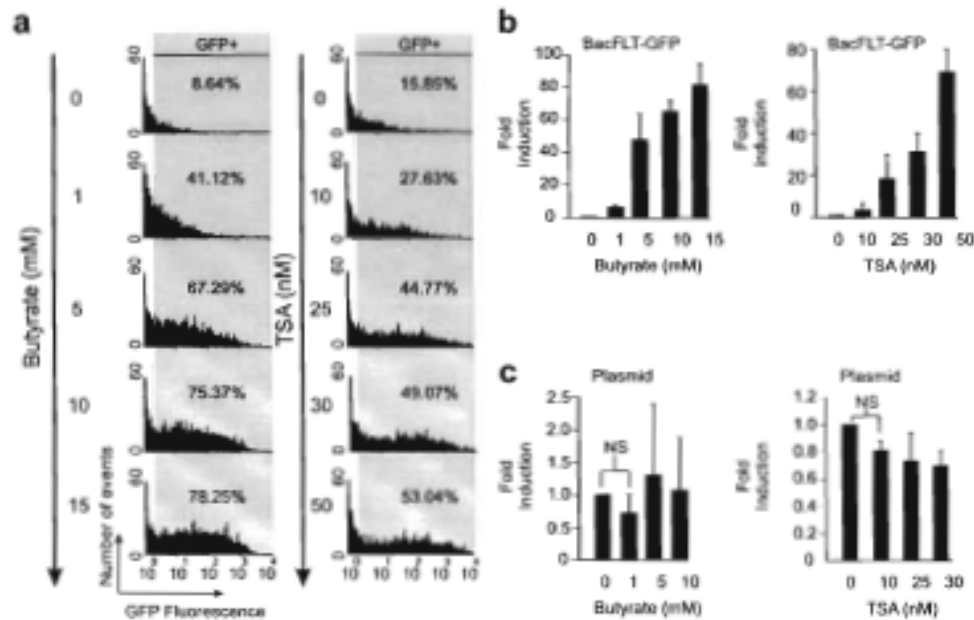


Figure 3
Effect of histone deacetylase inhibitors in the expression mediated by BacFLT-GFP. (a) Representative histograms obtained by flow cytometry 48 h after transduction of BUVEC-E6E7-1 cells with 100 MOI of BacFLT-GFP and treated with increasing concentrations (shown in the figure) of butyrate or trichostatin A (TSA). The percentage of GFP+ cells (shown inside green rectangles) is reported in the insets, and was calculated by subtracting the background from mock transduced cells. (b) Fold induction in GFP expression mediated by BacFLT-GFP with increasing concentrations of butyrate or TSA. (c) Fold induction of the expression of GFP in transfected cells with the transfer plasmid pBlueFL-T-GFP (see Methods) and treated with increasing concentrations of butyrate or TSA. Results from four independent experiments \pm SD. NS = non significant.

evant to baculovirus gene transfer, since complement has been clearly implicated in the inactivation of *in vivo* applied recombinant baculovirus [28]. Moreover, transgene expression in rat retina after intravitreal delivery of recombinant baculovirus has been previously demonstrated, showing that viral particles are able to diffuse through the vitreous body reaching the retina, with maximal GFP expression 2–3 days after injection [29,30]. Based on these considerations, ten microliters of virus (BacFLT-GFP) solution concentrated by ultracentrifugation [approximately 1×10^7 plaque forming units (PFU) of viral particles] or vehicle as a control were injected into the vitreous cavity of rat eyes. Three days after virus injection, the rats were sacrificed and the retinas were quickly dissected, fixed, and analyzed by fluorescence microscopy using a GFP filter set. Intravitreal delivery of viral particles

resulted in strong reporter gene expression, with most GFP-expressing cells almost exclusively localized in the inner limiting membrane (ILM) and ganglion cell layer (GCL). In order to successfully identify the phenotype of the GFP+ cells, we performed immunohistochemical staining showing that most GFP-expressing cells (70%, $n = 10$) react with antibodies to the endothelial specific marker vWF [31], (Figure 4b,c,d,f) confirming the endothelial phenotype of the *in vivo* transduced cells. In contrast, control eyes injected with vehicle alone did not show positive signal for GFP (Figure 4(g)).

To further confirm that our baculovirus vector was driving GFP expression in endothelial cells, we performed three-dimensional confocal reconstructions of retinal sections from control and BacFLT-GFP treated animals. Figure 4i

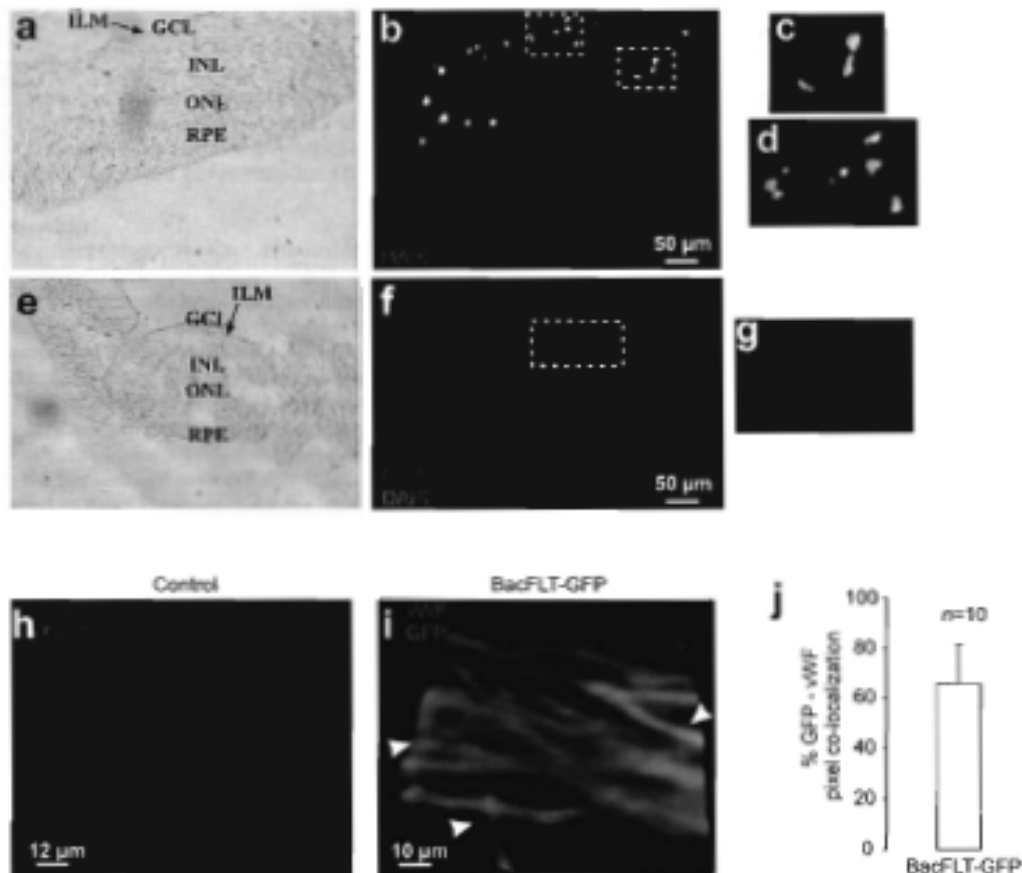


Figure 4

BacFLT-GFP directs endothelial-specific gene expression into the retina vasculature. 10 μl of BacFLT-GFP virus solution (approximately 1×10^7 PFU of viral particles) or vehicle (PBS) were injected into the rat eye vitreous chamber. Three days after the virus injection, the rats were sacrificed and the retinas processed for immunohistochemistry using an antibody against von Willebrand factor (red) and DAPI (blue) to highlight nuclei (see Methods). Representative retinas from eyes injected with 1×10^7 pfu of BacFLT-GFP (a, b, c, d) or vehicle (PBS) (e, f, g, h). The same sections were evaluated by phase-contrast microscopy (a, e) and by anti-von Willebrand factor antibodies coupled to TRITC (red) and GFP green fluorescence. Merge images illustrate the colocalization of red and green fluorescence (in yellow) in capillary-like structures (big white rectangles in c, d, g) obtained from the areas in small white rectangle insets from b, f. Confocal three-dimensional reconstruction images of retinas injected with vehicle (h) or with BacFLT-GFP (i). In red is shown the localization of von Willebrand factor (red) within characteristic blood vessel structures. The colocalization of red (vWF) and green (GFP) fluorescence is shown in yellow (white arrowheads in i). (j) Percentage of vWF and GFP pixel co-localization in retinas injected with BacFLT-GFP. (n = 10 animals). Abbreviations: RPE, retinal pigment epithelium GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; and ONL, outer nuclear layer; ILM inner limiting membrane.

illustrates tridimensional projections of the confocal reconstructions clearly showing the blood vessel pattern of GFP expression. Blood vessels were not only recognized for their morphology, but also by immunoassaying with a TRITC-coupled anti-vWF antibody (shown in red). Additional file 1 illustrates the three-dimensional reconstructions (rotating vessels) obtained with retinas from mock-injected animals and animals injected with BacFLT-GFP. These data shows the selective labeling of blood vessels, or portions of them with our recombinant baculovirus.

Discussion

In the present study, we have demonstrated that recombinant baculovirus containing the 1-kb region from the human *flt-1* promoter is able to drive transcriptional gene targeting *in vitro* and *in vivo* in the retinal vasculature. The immortalized bovine umbilical vein endothelial cell line BUVEC-E6E7-1 and other non-endothelial cell types (i.e. C6, HepG2, HEK293, RINm5F) were susceptible to BacCMV-GFP vector-mediated gene transfer. Of all cell lines explored, the highest levels of expression were observed with the hepatocarcinoma cell line HepG2, as previously reported [8,9]. In agreement with the results recently published by Wang *et al.*, we also demonstrate that rat glioma cell line C6 is highly susceptible to transduction (> 50% GFP+) by this recombinant baculovirus [32].

In addition, our results show that the endothelial cell line BUVEC-E6E7-1 appeared to be more susceptible to transduction than the human carcinoma/endothelial cell-like ECV-304, in which 21% of the cells were transduced at a MOI of 1000. Such differences could be due to different conditions in which the vectors were titrated [33].

The susceptibility of transduction demonstrated in RINm5F cells, corroborates the results observed by Ma *et al.*, in which pancreatic islet cells were efficiently transduced by recombinant baculovirus carrying a construct similar to the one reported here [34].

Reversible acetylation of the histone tails by histone acetylases (HATs)/histone deacetylases (HDACs) is one of the best studied posttranslational modifications of histones, correlating with transcriptional activation/repression. We have shown here that the treatment of cells with butyrate, an histone deacetylase inhibitor enhanced the transcriptional activity mediated by both BacCMV-GFP or BacFLT-GFP. However, histone hyperacetylation is one of many cellular changes induced by butyrate. Therefore, to confirm whether histone acetylation is involved in reactivation of transgene expression, we also tested the potent and selective HDAC inhibitor, TSA. To date 17 human genes have been identified encoding HDACs, 11 of these genes, members of so-called class I and II, are inhibited by TSA [35]. Treatment with TSA reactivates GFP expression

mediated by BacFLT-GFP at concentrations as low as 10 nM, and maximal effects were observed at 50 nM, corresponding to a concentration 10,000 fold smaller than the concentration of butyrate utilized to reach similar effects (81.68-fold and 61.69-fold for 15 mM butyrate and 50 nM TSA, respectively). To determine whether DNA methylation is also implicated in baculovirus silencing, 5-aza-C, which is known to interfere with the process of DNA methylation, was added to a concentration of 25 μ M alone or in combination with butyrate or TSA. We did not observe a significant increase of transgene expression with 5-aza-C (data not shown). Therefore, DNA methylation does not appear to play an important role in baculovirus-mediated gene transfer silencing. In contrast, histone deacetylation appears to be a general mechanism for silencing baculovirus independently of the promoter or the gene utilized (we have observed reactivation of beta-galactosidase with butyrate or trichostatin A as well, data not shown).

Therefore our results suggest an association between the episomal baculovirus DNA and mammalian histones to resemble nucleosomes. A recently published work demonstrates the association between the episomal adeno-associated virus (AAV) vector genome and the acetylated histone H3 [36]. Thus, a similar mechanism may direct the promoter and transgene-independent silencing of recombinant baculovirus observed here.

Although we do not know the exact mechanism(s) by which TSA or butyrate reactivates transgene expression, it is possible that nuclear spatial positioning can influence the levels of expression observed in the mammalian cells transduced by BacCMV-GFP or BacFLT-GFP. Repositioning of baculovirus genome after HDACs inhibition is something we are currently exploring.

A number of reports have shown that viral sequences including viral regulatory elements can interfere with heterologous promoters used to drive transgene expression and may impair tissue-specific or inducible transgene expression [37-39]. Our data demonstrate that the restricted expression in endothelial cells mediated by the *flt-1* promoter is not affected by the context of the baculovirus genome or by the mechanisms of silencing, since BacFLT-GFP evoked the highest levels of expression in BUVEC-E6E7-1 ($112 \pm 6.2\%$ relative to BacCMV-GFP, $n = 4$), compared to the other cell lines. Interestingly, we have obtained efficient GFP expression in BUVEC-E6E7-1 using 100 MOI of BacFLT-GFP, and previous studies have shown that endothelial cells transduced with recombinant adenovirus required MOI of 500 to achieve similar levels of expression in HUVEC and HSVEC [24].

We took advantage of intravitreal injection, in order to analyze *in vivo* endothelial-specific gene expression mediated by BacFLT-GFP into the retinal vasculature. Our results show that the majority of GFP+ cells were found at the inner limiting membrane (ILM) and ganglion cell layer (GCL), a somewhat expected result since these two structures are in closer apposition to the area of injection (the vitreous). Consistent with this finding, VEGFR1 and VEGFR2 mRNA and Flt-1 protein have been localized to the inner nuclear and in the ganglion cell layer of the rat retina [40,41].

By immunohistochemical staining with the von Willebrand factor (vWF), we demonstrated by fluorescence microscopy and three-dimensional confocal analyses that most of the GFP positive cells are labeled with this endothelial cell specific marker, and localize in blood vessels, showing the specificity of gene expression *in vivo*.

We have observed direct GFP fluorescence in retina slices transduced with BacFLT-GFP even in the absence of histone deacetylase inhibitors; this is probably due to the strong expression driven by the human Flt-1 promoter, which can overcome the silencing effect of histone deacetylases.

Transgene expression in retina after intravitreal body injection of recombinant baculovirus has been previously documented [29]. In this study, a recombinant baculovirus carrying GFP under the control of CMV promoter was subretinally injected, resulting in widespread transgene expression in the corneal endothelium, lens, the retinal inner nuclear layer, GCL, and retinal pigment epithelial (RPE). Unlike the previously mentioned study, the endothelium-selective expression observed in our results originates from the use of the human flt-1 promoter.

Conclusion

In summary, our study indicates that specific gene expression in the vascular endothelium mediated by the human flt-1 promoter is retained in the context of the baculovirus genome. However, the reactivation of transgene expression by histone deacetylase inhibitors such as TSA or butyrate, suggest that baculovirus genome forms a chromatin-like structure assembled into nucleosomes after the viral genome is delivered into mammalian cells. Future experiments will address the nature of the proteins that affect the silencing of baculovirus vectors in mammalian cells. Finally, this study provides the proof of principle of baculovirus mediated gene transfer to endothelial cells *in vivo* and suggest the possibility of using this recombinant baculovirus for targeted gene expression into the retinal vasculature.

Methods

Construction of transfer plasmids

pBlueCMV was generated as follows, briefly a HindIII-SmaI 1.1 kb fragment from pcDNA 3.1(+) (Invitrogen, San Diego, CA) containing the polyadenylation sequence of the Bovine Growth Hormone was inserted into HindIII-SmaI digested pBlueScript (-) (Stratagene, La Jolla, CA) to produce pBSpolyA. A fragment EcoRI-BamHI from pBSpolyA was cloned in EcoRI-BglII sites of pBlueBac 4.0 (Invitrogen, San Diego, CA) in the opposite orientation to the polyhedrin promoter to produce pBB4polyA. Finally, a SalI-EcoRI 953 bp fragment which contains the CMV was ligated into SalI-EcoRI sites of pBB4polyA to generate pBlueCMV. This plasmid was designed to contain a multiple cloning site to insert any cDNA under the control CMV promoter. The transfer plasmid pBlueCMV-GFP was constructed by ligation of a fragment BamHI-NheI 730 pb containing the coding region GFP from pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA) into the KpnI-ApaI sites of the pBlueCMV by blunt end ligation. The transfer plasmid pBlueFLT-GFP was constructed by cloning a BamHI-HindIII 1.0 kb fragment containing the human *fos*-like tyrosine kinase-1 promoter (hFLT-1 promoter, segment extending from -748 to +284) from the plasmid p(-748/+284) [16] kindly provided by Dr. Andrew Baker (University of Glasgow, Glasgow, UK) into BglII-HindIII sites of pBlueCMV-GFP. The correct sequence of each transfer plasmids were confirmed by DNA sequencing.

Production of recombinant baculovirus

The recombinant baculovirus BacCMV-GFP and BacFLT-GFP, were generated by using the Bac-N-Blue Transfection Kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA) and were plate-purified twice before to large-scale production. To propagate the baculovirus Sf9 insect cells were infected (2×10^6 /ml) at a multiplicity of infection of 0.1 and the viruses were purified as follows: culture supernatants were harvested at 6 days after infection and cells debris was removed by centrifugation at 6,000 g for 15 min at 4°C. The supernatants obtained were titered by plaque assay on Sf9 insect cells, stored at 4°C and used for *in vitro* experiments. In the experiments for gene transfer *in vivo*, recombinant baculovirus were concentrated by ultracentrifugation in a SW28 rotor (Beckman) at 27,000 rpm for 60 min, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and loaded on 10–30% (wt/vol) sucrose gradients, and was ultracentrifuged at 27,000 rpm for 60 min. The virus band was collected and diluted in PBS and was ultracentrifuged at 27,000 rpm for 150 min in SW28 rotor. The virus pellet was resuspended in PBS and titers were determined as above described.

Cell culture and transduction with recombinant baculoviruses

Insect Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) cells were obtained from Invitrogen (San Diego, CA) and were grown in Grace's media (Sigma, St. Louis, MO) containing 10% (vol/vol) of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Grand Island, NY), 1.0% of lactalbumin hydrolysate, 1.0% yeastolate, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 U/ml) and 0.1% (vol/vol) pluronic F-68 (Invitrogen, Grand Island, NY). Mammalian cell lines including human (HepG2, HEK-293) and the rat cell lines (C6, RIN-m5F) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). The immortalized bovine umbilical vein endothelial cell line BUVEC-E6E7-1, was grown as previously reported [17]. The human glioblastoma cell line CH235, was provided by A. Gutierrez-Lopez (Instituto Nacional de Rehabilitación, México, D.F.). All cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, St. Louis, MO), while RIN-m5F were maintained in RPMI 1640 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA). All cultures were supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA), glutamine 2 mM, 1% of antibiotics and incubated at 37°C with 5% CO₂ in a humidity controlled incubator (NLAIRE, Plymouth, MN). Different cell lines were treated with recombinant baculovirus under similar conditions. The day before transduction, cells were seeded at 1×10^5 per well in six-well plates under conditions above described. The next day the medium was removed, replaced with virus inoculum diluted in Opti-MEM medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) to yield multiplicities of infection indicated in the figure legends and incubated during 4 h at 37°C. The inoculum was then replaced by 2 ml of fresh medium with or without sodium butyrate or trichostatin A (TSA) (Sigma, St. Louis, MO) at different concentrations above indicated. Cells were analyzed for GFP expression by fluorescence microscopy and Fluorescence activated cell sorting (FACS) was performed 48 h post-transduction.

Transient transfection experiments

BUVEC-E6E7-1 cells (2.5×10^5) were transfected with 2.5 µg of the transfer plasmid pBlueFL1-GFP (see construction of transfer plasmids), using Lipofectamine plus (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. After transfection cells were treated with different concentrations of sodium butyrate or TSA and the levels of GFP expression were analyzed 48 h after transfection by FACS.

Fluorescence-activated Cell Sorting

The percentage of transfected (GFP⁺) and mean fluorescence intensity (MFI) was assessed by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences). Untreated cells were used to adjust the number of GFP⁺ cells and mean fluorescence

intensity (10,000 events/sample). Acquisition and analysis of FACS data were performed using CellQuest software (BD Biosciences, Palo Alto, CA).

Animals

Animal care and treatment were according to the ARVO "Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research." Male Wistar rats (200–250 g) were anesthetized with 70% ketamine/30% xylazine (1 µl/g body weight i.p.) for intravitreal injection of recombinant baculovirus.

In vivo Gene Transfer

For *in vivo* viral delivery, rats were anesthetized, and their eyes were perforated with a 29-gauge needle to insert a microsyringe (Hamilton, Reno, NV). 10 µl of the vitreous body were extracted, immediately after this 10 µl (approximately 1×10^7 PFU of viral particles) of recombinant baculovirus or vehicle (PBS) were injected into the vitreous cavity.

Immunohistochemistry

Three days after the virus injection, the rats were sacrificed and the retinas were quickly dissected and fixed in 4% paraformaldehyde-PBS (pH = 7.4) for 6 hours and then placed in 10% sucrose for 3 hours, 20% sucrose for overnight, and 30% sucrose for 3 days. The tissue was then embedded in optimal cutting temperature (OCT) compound (Tissue-Tek; Sakura Finetek, Torrance, CA), and sectioned at 12 µm. Retinal sections were blocked (0.05% Triton X-100, 1% BSA and 1% NGS) and washed with PBS (pH 7.4). Next, the sections were incubated overnight with an antibody against von Willebrand factor (ZYMED Laboratories, South San Francisco, CA) which specifically stains endothelial cells. Retinal sections were washed and incubated with a rabbit anti-goat TRITC conjugated antibody (Sigma-Aldrich USA, 1:100) and 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI; Vector Labs) was added to label nuclei. Immunofluorescence labeling was observed under a microscope equipped with fluorescence illumination (model BX60; Olympus, Lake Success, NY.)

Confocal microscopy and image deconvolution

Confocal experiments were performed in a FV1000 (Olympus, Japan). GFP fluorescence was obtained after exciting the samples with 488 nm and reading the fluorescence at 540 nm. For the detection of TRITC the excitation wavelength was 554 and emission was collected at 576 nm. Images were digitized and evaluated with Image Pro-Plus 5.1 software (Media Cybernetics, San Diego, CA). Blood vessel reconstruction was achieved by performing optical slices of retina mounts taken 0.3 µm apart in stacks of about 30 images. All images were obtained from a minimum of 2 slices from at least 2 different animals.

Image stacks of 30 images obtained at 0.3 μm intervals were deconvolved using Autodeblur-X-G-CP software (Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD). All images were background subtracted prior to deconvolution. Three-dimensional projections were performed with ImagePro Plus v6 (Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD). Movies showing rotating images were produced with Adobe Premier Pro CS3 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA).

Statistical analysis

All data were analyzed using the MedCalc Software (Frank Schoonjans, Belgium) by unpaired Student's *t*-test and are shown as mean \pm standard deviation (SD). Data were considered significant when $P < 0.05$. All experiments were performed in triplicate and repeated on at least three independent occasions.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LMA carried out the production of recombinant baculovirus, the experiments *in vitro*, immunohistochemistry and drafted the manuscript. CC designed and supervised the *in vivo* studies and data analyses. JA carried out the virus injection and data analyses. LV conceived the study and designed several of the experiments and complete the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional material

Additional file 1

Three-dimensional reconstructions (rotating views) from reimas obtained from mock-injected animals and animals injected with BacFL1-GFP. A movie showing the rotating vessels obtained from mock-injected reimas and transfected with recombinant baculovirus. Images collected with a confocal microscope and deconvolved to reduce optical aberrations and out of focus fluorescence (see Methods). Green shows GFP expression, red was Willebrand factor and its yellow is illustrated the co-localization of both fluorescent markers.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1743-422X-4-88-S1.wmv>]

Acknowledgements

We thank Drs. L.T. Williams, A.H. Baker and S.A. Nicklin for providing the plasmid p(-74B+284) and Alicia Sampieri for excellent technical assistance and Alfonso Salgado for reviewing the manuscript. This research was supported by fellowships from CONACYT (169909) and Dirección General de Estudios de Posgrado (DGER) to A. Laz-Madrigril and grant No. 4246/R A from CONACYT to L.Vaca. The services from the Molecular Biology and

Microscopy units and from the Library at the Institute of Cellular Physiology are greatly appreciated.

References

- Gruchals M, Roy H, Bhardwaj S, Yu-Hernandez S: Gene therapy for cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 2004, **10**(4):407-423.
- Dattour A, Rigaud M: Tumor endothelial cells are targets for selective therapies: *in vitro* and *in vivo* models to evaluate antiangiogenic strategies. *Anticancer Res* 2005, **25**(4B):3799-3807.
- Baker AH, Kritz A, Work LM, Nicklin SA: Cell-selective viral gene delivery vectors for the vasculature. *Exp Physiol* 2005, **90**(1):27-31.
- Liu Y, Deisseroth A: Tumor vascular targeting therapy with viral vectors. *Blood* 2006, **107**(8):3027-3033.
- Thomas CE, Birkford A, Kay MA: Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003, **4**(5):346-358.
- Lozer P, Huter A, Hülberberg M, Kuris D, Both GW, Hofmann C: Advances in the development of non-human viral DNA-vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther* 2002, **3**(2):161-171.
- Kost TA, Condroy JP, Jarvis DL: Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2005, **23**(5):567-575.
- Boyer PM, Bucher NL: Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(4):2348-2352.
- Hofmann C, Sandig V, Jennings G, Rudolph M, Schleg P, Strauss PE: Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(22):10099-10103.
- Kim S, Liu H, Barr E, Chu L, Leiden JM, Parmacek MS: Transcriptional targeting of replication-defective adenovirus transgene expression to smooth muscle cells *in vivo*. *J Clin Invest* 1997, **100**(5):1008-1014.
- Griscelli F, Gérard-Habekovic P, Hyanon N, Franz WM, Opdon P, Ferricaudet M, Kaput T: Heart-specific targeting of beta-galactosidase by the ventricle-specific cardiac myosin light chain 2 promoter using adenovirus vectors. *Nat Gene Ther* 1998, **9**(13):1919-1928.
- Fong KW: Strategies for targeting therapeutic gene delivery. *Nat Med Today* 1999, **5**(18):448-453.
- Saukkonen K, Hämäläinen A: Tissue-specific promoters for cancer gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2004, **4**(3):483-496.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrovich S, Polonsky Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999, **13**(1):7-22.
- Shihay M, Cheson-Wish L: Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006, **312**(5):549-560.
- Florintha K, Johnson DE, Williams LT: A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1) that confers endothelial-specific gene expression. *J Biol Chem* 1995, **270**(44):27946-27953.
- Cajero-Juarez M, Avila B, Ochoa A, Garrido-Guerrero E, Varela-Echavarría A, Martínez de la Escalera G, Chap C: Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *Eur J Cell Biol* 2002, **81**(1):1-8.
- Sorrell SD, Aliko CD: The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000, **403**(6745):41-45.
- Nowell-Prosz J, Clark AJ, King P: DNA methylation and silencing of gene expression. *Trends Endocrinol/Metab* 2000, **11**(4):142-148.
- Sarica C, Serrano C, Pavesi S, Bucher D, Rides J, Estévez L, Müller J: Efficient transduction of neural cells *in vitro* and *in vivo* by a baculovirus-derived vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(28):14638-14643.
- Sponger A, Ernst W, Condroy JP, Kost TA, Grabherr R: Influence of promoter choice and trichostatin A treatment on expression of baculovirus delivered genes in mammalian cells. *Process Egr Regul* 2004, **18**(1):17-23.
- Davis JR: Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Neurosci* 2003, **23**(7 Suppl):24855-24915.
- Jumarsan R, Li E, Janisch R: Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(25):11797-11801.

24. Nicklin SA, Reynolds PN, Brozman MJ, White SJ, Curial DT, Domiszak AF, Baker AH: **Analysis of cell-specific promoters for viral gene therapy targeted at the vascular endothelium.** *Hypertension* 2001, **38**(1):65-70.
25. Steiner HH, Karcher S, Mueller MP, Nalbantis E, Kurze S, Herold-Mende C: **Autocrine pathways of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in glioblastoma multiforme: clinical relevance of radiation-induced increase of VEGF levels.** *J Neuroscol* 2004, **66**(1-2):129-138.
26. Yoshida H, Horinouchi S: **Trichostatin and leptomycin. Inhibition of histone deacetylation and signal-dependent nuclear export.** *Ann N Y Acad Sci* 1999, **886**:23-36.
27. Sakamoto T, Ikeda Y, Yonemitsu Y: **Gene targeting to the retina.** *Adv Drug Deliv Rev* 2001, **52**(1):93-102.
28. Hofmann C, Strauss M: **Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system.** *Gene Ther* 1998, **5**(4):531-536.
29. Haeseler F, Iwanishi Y, Saperstein DA, Palczewski K: **Gene transfer mediated by recombinant baculovirus into mouse eye.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, **42**(13):3294-3300.
30. Li Y, Yang Y, Wang S: **Neuronal gene transfer by baculovirus-derived vectors accommodating a neuron-specific promoter.** *Exp Physiol* 2005, **90**(1):39-44.
31. Blom AD: **Plasma von Willebrand factor, thrombosis, and the endothelium: the first 30 years.** *Thromb Haemost* 2006, **95**(1):49-55.
32. Wang CY, Li F, Yang Y, Guo HY, Wu CX, Wang S: **Recombinant baculovirus containing the diphtheria toxin a gene for malignant glioma therapy.** *Cancer Res* 2006, **66**(11):5798-5806.
33. Airame KJ, Hilunan MO, Turunen MP, Turunen AM, Laitinen OH, Kulomaa MS, Yla-Herttuala S: **Baculovirus-mediated periaxonal gene transfer to rabbit carotid artery.** *Gene Ther* 2000, **7**(17):1499-1504.
34. Ma L, Tamarina N, Wang Y, Kuznetsov A, Patel N, Kending C, Hering BJ, Philipson LH: **Baculovirus-mediated gene transfer into pancreatic islet cells.** *Diabetes* 2000, **49**(12):1986-1991.
35. Johnson RW: **Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer.** *Nat Rev Drug Discov* 2002, **1**(4):287-299.
36. Okada T, Uchiyori R, Iwata-Okada M, Takahashi M, Nomoto T, Nonaka-Suzukawa M, Ito T, Uta Y, Mizukami H, Kame A, Kobayashi E, Ozawa K: **A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells.** *Mol Ther* 2006, **13**(4):738-746.
37. Heier JL, Duput F, Charter C, Accart N, Diemerle A, Schultz H, Puchelle E, Poirani A: **Targeting cell-specific gene expression with an adenoviral vector containing the lacZ gene under the control of the CFTR promoter.** *Gene Ther* 1996, **3**(1):49-58.
38. Ring CJ, Harris JD, Hurst HC, Lemoine NR: **Suicide gene expression induced in tumour cells transduced with recombinant adenoviral, retroviral and plasmid vectors containing the ERBB2 promoter.** *Gene Ther* 1996, **3**(12):1094-1103.
39. Shi Q, Wang Y, Wilson R: **Modulation of the specificity and activity of a cellular promoter in an adenoviral vector.** *Nucl Acids Res* 1997, **25**(4):403-410.
40. Kim I, Ryan AM, Rohan R, Amaro S, Aguirre S, Miller JW, Adams AP: **Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, **40**(9):2115-2121.
41. Shi SC, Ji M, Liu N, Smith LE: **Selective stimulation of VEGFR-1 prevents oxygen-induced retinal vascular degeneration in retinopathy of prematurity.** *J Clin Invest* 2003, **113**(1):50-57.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

