



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESPLIEGUE DEL PÉPTIDO TAT EN EL FAGO M13
PARA LA TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO
A CÉLULAS DE MAMÍFERO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARIANA RUIZ SILVA



MÉXICO, D.F.

2009



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

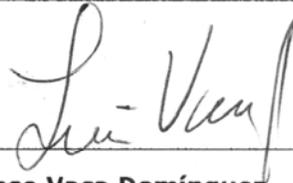
JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Rosario Adelaida Muñoz Clares
VOCAL: Raquel Ortega Muñoz
SECRETARIO: Luis Alfonso Vaca Domínguez
1er. SUPLENTE: Felipe Cruz García
2° SUPLENTE: León Patricio Martínez Castilla

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 126-NTE, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:



Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez

SUPERVISOR TÉCNICO:



Dr. Agustín Luz Madrigal

SUSTENTANTE:



Mariana Ruiz Silva

Agradecimientos

Al Dr. Luis A. Vaca Domínguez, por confiar en mí al permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por el apoyo brindado.

Al Dr. Agustín Luz Madrigal, porque con paciencia me enseñaste el camino de la investigación y me acompañaste hasta el final en este largo proyecto.

A Alicia Sampieri, experta en clonaciones, por tus consejos técnicos.

A María Elena Munguía y Gonzalo Acero, por su asesoramiento en la producción de los fagos.

A Gabriel Orozco, por su apoyo en el uso del microscopio confocal.

A mis sinodales: Dra. Rosario A. Muñoz Clares, M. en C. Raquel Ortega Muñoz y Dr. Luis A. Vaca Domínguez, por sus comentarios y sugerencias.

A la Sra. Salus y a Gloria, por consentirme y recibirme siempre con una sonrisa.

A mis compañeros de laboratorio: Julián, Laura, Mariana, Josué y Poncho por compartir su experiencia conmigo.

Agradezco y dedico esta tesis

A mis papás, por darme todo su apoyo y poner el ejemplo, además de enseñarme que el trabajo y la dedicación llevan al éxito. Gracias por brindarme la mejor educación y una familia llena de amor para crecer.

A mis hermanos, Alejandro, Edgar y Daniela porque con su ejemplo me impulsan a superarme. Estoy muy orgullosa de ustedes.

A mi abue Paty, por todo tu amor y tus oraciones.

A Alejandra, por tu cariño tan especial.

A M. Edgar, por tu amor, por tus palabras de aliento en los momentos de frustración y por recordarme quién soy cuando se me olvida.

A Bere, Hiro y Nantli, porque las admiro y han sido muy importantes en mi vida.

A mi familia y todas aquellas personas que de alguna u otra manera han colaborado en la realización de esta meta. Gracias a todos.

A Decroly, por enseñarme a aprender y pensar de forma crítica y darme una infancia feliz.

A la Facultad de Química y sus excelentes profesores, por darme las herramientas para alcanzar el éxito profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, donde recibí las bases de mi conocimiento para desarrollarme y crecer en la vida.

CONTENIDO

RESUMEN	5
I. ANTECEDENTES	6
1.1 Terapia génica.....	6
1.2 Vectores de transferencia de ADN en células de mamíferos.....	7
1.2.1 Vectores virales.....	8
1.2.2 Vectores no virales.....	9
1.3 Uso de bacteriófagos como vectores de transferencia.....	11
1.4 Bacteriófago M13.....	12
1.4.1 Replicación y ensamblaje de los viriones.....	15
1.5 Despliegue de péptidos en la superficie del fago M13 (“Phage display”).....	17
1.6 El péptido TAT como dominio de transducción de proteínas.....	23
1.6.1 Mecanismo de entrada en células de mamífero mediado por TAT.....	24
II. JUSTIFICACIÓN	26
III. HIPÓTESIS	26
IV. OBJETIVO GENERAL	26
V. OBJETIVOS PARTICULARES	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	27
Células y cultivo.....	27
Construcción del fagémido pG8TAT.....	27
Construcción de los fagémidos pG8SAET_CMVGFP y pG8TAT_CMVGFP.....	29
Producción de los fagos recombinantes.....	29
Titulación de los fagos.....	31
Marcaje de fagos con Alexa-488.....	31
Inmunofluorescencia.....	31
Ensayos de entrada a células de mamífero <i>in vivo</i>	32
Ensayos de transducción de células de mamífero <i>in vivo</i>	33
Citometría de flujo.....	33
Microscopía confocal.....	33
VI. RESULTADOS	35
7.1 Producción de los fagos M13 y M13TAT.....	35

7.2 Entrada del fago M13 a células de mamífero.....	37
7.3 Unión y entrada de los fagos recombinantes M13TAT a células de mamífero.....	39
7.4 Localización intracelular del fago M13TAT.....	41
7.5 Inmunofluorescencia.....	44
7.6 Producción de fagos para el análisis de transducción de células de mamífero.....	47
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	52
IX. CONCLUSIONES.....	57
X. PERSPECTIVAS.....	58
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	60
XII. APÉNDICE.....	67

Abreviaturas

AAV	Virus adeno-asociado
Ad	Adenovirus
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ad-Pb	Base pentón del adenovirus
ARN	Ácido ribonucleico
BGH pA	Señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina
ButNa	Butirato de sodio
CIAP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera
CMV	Promotor del Citomegalovirus
CPP	Péptidos que penetran células
CPT	Camptotecina
DIC	Contraste de fases
dsADN	ADN de cadena doble
EGF	Factor de crecimiento epidermal
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos
GFP	Proteína verde fluorescente
hGH	Hormona del crecimiento humana
HSV-1	Virus del Herpes simple tipo 1
MTI-2	Inhibidor de la tripsina de la mostaza
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTD	Dominio proteico de transducción
ssADN	ADN de cadena sencilla
TAT	Dominio proteico de transducción de la proteína Tat
Tat	Transactivador de transcripción del VIH-1
VIH-1	Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1

Índice de Figuras

Fig.1	Estructura del bacteriófago filamentosos y sus proteínas estructurales.	14
Fig. 2	Imágenes de microscopía electrónica del Bacteriófago M13.	14
Fig.3	Replicación y ensamblaje del fago M13.	16
Fig.4	Procedimiento para el despliegue de un péptido en la proteína pVIII del fago M13.	20
Fig.5	Esquema de la clonación de TAT en el fagémido pG8SAET para generar el fagémido pG8TAT.	28
Fig.6	Esquema de la clonación del casete de expresión GFPCMV en el fagémido pG8TAT para generar el fagémido pG8TAT_GFPCMV.	30
Fig.7	Traducción en proteína de la secuencia del fagémido pG8TAT.	36
Fig.8	Localización de las partículas virales M13 marcadas con Alexa-488.	38
Fig.9	Unión y entrada de los fagos M13TAT-Alexa488 a células de mamífero.	40
Fig.10	Entrada del fago recombinante M13TAT a células de mamífero <i>in vivo</i> . 2h de incubación.	42
Fig.11	Entrada del fago recombinante M13TAT a células de mamífero <i>in vivo</i> . 3h de incubación.	43
Fig.12	Ensayo con células fijadas y tinción de los núcleos con rojo radiante.	45
Fig.13	Ensayo de inmunofluorescencia.	46
Fig.14	Traducción en proteína del fagémido pG8SAET_CMVGFP.	48
Fig.15	Traducción en proteína del fagémido pG8TAT_CMVGFP.	49
Fig.16	Expresión de GFP en células HeLa transfectadas con los fagémidos pG8SAET_CMVGFP (arriba) y pG8TAT_CMVGFP (abajo).	51
Fig.17	Transducción de células de Cos-1 con los fagos M13 y M13TAT.	51

RESUMEN

La búsqueda de mejores vectores para la transferencia de material genético a células de mamífero ha llevado a la exploración de virus distintos a los de mamífero como una alternativa que supere los obstáculos de los vectores más utilizados: los vectores derivados de virus de mamíferos. Se propuso que los bacteriófagos podían constituir un buen vehículo para el transporte de material genético porque consisten, como los demás virus, de un esqueleto proteico que protege al material genético en su interior. Además, los bacteriófagos no producirían proteínas virales que provoquen una respuesta inmunológica fuerte y serían incapaces de replicarse en células de mamífero. Se hicieron diversos estudios para evaluar el potencial de los bacteriófagos como vectores y se observó que la eficiencia de transducción era muy baja, por lo que se procedió a modificarlos química y genéticamente para mejorarlos. En este estudio, nosotros utilizamos la técnica de despliegue en fagos para modificar al bacteriófago M13. La modificación del bacteriófago M13 consistió en desplegar el péptido TAT como fusión a la proteína de la cápside de mayor abundancia, la proteína pVIII. El péptido TAT es un segmento (aminoácidos 47 al 57) de la proteína Tat del VIH-1 que se caracteriza por su alta capacidad para transducir células de mamífero. Analizamos la entrada del fago recombinante M13TAT a células de mamífero mediante ensayos *in vivo* utilizando microscopía confocal. Así mismo, evaluamos su eficiencia de transducción mediante el análisis de la expresión de un gen reportero por citometría de flujo. Por último utilizamos fármacos para mejorar la eficiencia de transducción.

Los resultados de la entrada del fago M13TAT a células HeLa, HepG2 y Cos-1 sugieren que el fago M13TAT utiliza el mecanismo de entrada del péptido TAT para internalizarse en la célula. La eficiencia de transducción del fago M13TAT fue baja (4.7%) pero mayor a la del fago M13 (0.8%) y el tratamiento con camptotecina la incrementó a 9.7%.

I. ANTECEDENTES

1.1 Terapia génica

La terapia génica consiste en la introducción de material genético a una célula con fines terapéuticos (Verma y Weitzman, 2005). El material genético introducido puede ser ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN), ambos son utilizados para restaurar la función de un gen mutado con una copia normal del gen (Durai et al., 2008). Para el transporte del material genético al interior de la célula se utilizan “vectores” que pueden ser virus o lípidos catiónicos, los cuales se describirán con mayor detalle más adelante.

Uno de los mayores obstáculos de la aplicación de la terapia génica es el desarrollo de vectores seguros e inocuos y además eficientes para transportar el material genético al interior de las células (Verma y Weitzman, 2005). En este sentido, un vector ideal debe cumplir con las siguientes características: su producción debe ser fácil, reproducible y escalable (i.e. títulos altos cuando se habla de partículas virales); tener la habilidad de integrarse en un sitio específico del cromosoma del hospedero cuando se requiere una expresión a largo plazo, o mantenerse estable de forma episomal; poder ser manipulado genéticamente para poder ser dirigido específicamente a las células blanco; no debe tener componentes que provoquen una fuerte respuesta inmunológica y finalmente debe tener una gran eficiencia para liberar el ADN hacia el interior de las células (llamada eficiencia de transducción para partículas virales) (Verma y Somia, 1997).

Cuando se utilizan partículas virales como vectores de expresión, el proceso de transporte del material genético desde el exterior de la célula hacia el interior del núcleo y su expresión se conoce como “transducción”. Para que la transducción sea exitosa es necesario que el vector supere una serie de

obstáculos que se presentan en tres fases: entrada, transporte intracelular y expresión.

1.2 Vectores de transferencia de ADN en células de mamíferos

En general, hay dos formas de transferir material genético a células de mamífero. La primera consiste en transferir un gen exógeno a las células por medio de la administración sistémica, i.e. *in vivo*. En el segundo método, las células del paciente son extraídas, cultivadas y luego tratadas *in vitro* con el vector; a este tipo de tratamiento se le conoce como *ex vivo*. Finalmente las células son reintroducidas en el paciente. Como se mencionó anteriormente, los vectores de transferencia son sistemas que se encargan de transportar el material genético al interior de la célula y se clasifican en: virales y no virales (Durai et al., 2008).

1.2.1 Vectores virales

Son más eficientes que los no virales ya que por su naturaleza tienen la capacidad de infectar a células de mamífero y han desarrollado estrategias para transportar el material genético hasta el núcleo. Los virus no pueden ser utilizados en su forma silvestre, necesitan ser modificados para poder utilizarse como vectores. En este sentido, en los virus utilizados se han eliminado del genoma viral genes involucrados en la replicación y también aquellos cuyos productos proteicos sean altamente inmunogénicos. Las partículas resultantes son incapaces de replicarse (i.e. incapaces de infectar) pero mantienen la capacidad de transducir células de mamífero (Rozalén, 2003). Los virus utilizados más comúnmente como vectores son: retrovirus, lentivirus, adenovirus (Ad), virus adeno-asociados (AAV) y el virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1). Sus características se encuentran resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los vectores virales más comunes.

Vector	Material Genético	Cantidad de ADN exógeno que incorpora	Tropismo	Efecto inflamatorio	Forma genómica del vector	Limitaciones	Ventajas
Retrovirus	ARN	8 kb	Células que se dividen	Bajo	Integrada	Sólo transduce células que se dividen; la integración puede inducir oncogénesis	Transferencia persistente del gen en células que se dividen
Lentivirus	ARN	8 kb	Amplio	Bajo	Integrada	la integración puede inducir oncogénesis	Transferencia persistente del gen en la mayoría de los tejidos
VHS-1	dsADN	40 kb ^a 150 kb ^b	Fuerte hacia neuronas	Alto	Episomal	Inflamación; expresión breve del transgen (excepto en neuronas)	Alta capacidad de empaquetamiento; fuerte tropismo hacia neuronas
AAV	ssADN	<5 kb	Amplio	Bajo	Episomal (>90%) Integrada (<10%)	Baja capacidad de empaquetamiento	No provoca respuesta inflamatoria: no es patogénico.
Adenovirus	dsADN	8 kb ^a 30 kb ^c	Amplio	Alto	Episomal	La cápside causa una potente respuesta inflamatoria	Eficiencia de transducción excelente en la mayoría de los tejidos

^a De Replicación deficiente. ^bAmplicón. ^cDependiente de *auxiliar*. AAV, virus adeno-asociado; dsADN, ADN de cadena doble; VHS-1, virus herpes simple-1; ssDNA, ADN de cadena sencilla. Tomada y modificada de Thomas, et.al. (2003).

Es bien conocido que los vectores virales son los más eficientes para transferir material genético en células de mamífero; sin embargo, todos ellos han sido virus de mamíferos que han sido modificados y por tanto una de las principales limitaciones para su uso ha sido la respuesta inmune preexistente debida a anticuerpos neutralizantes contra las partículas virales. Estos hechos se reflejan en la necesidad de incrementar las dosis (alto número de partículas virales) para alcanzar el efecto deseado (Loser et al., 2002).

1.2.2 Vectores no virales

Los vectores no virales no son en sí una partícula que transporta el material genético en su interior —tal como los virus—, sino mas bien el ADN desnudo es introducido en la célula mediante métodos físicos o químicos. Una de las principales ventajas de los sistemas no virales es su baja inmunogenicidad, lo cual permite que puedan ser administrados repetidamente, además de que su producción resulta económica y fácil (Rozalén, 2003). Sin embargo, la principal desventaja radica en la eficiencia de liberación del ADN y la duración de la expresión tanto *in vitro* como *in vivo* (Stefanidakis y Koivunen, 2004). En la Tabla 2 se describen brevemente los métodos, así como sus ventajas y desventajas.

En la búsqueda de vectores eficientes y poco inmunogénicos se ha explorado el uso de virus distintos a los de mamífero, tales como los baculovirus —patógenos de insectos— (Boyce y Bucher, 1996; Hofmann et al., 1995) y los bacteriófagos —patógenos de bacterias (Di Giovine et al., 2001; Hart et al., 1994; Larocca et al., 1999; Poul y Marks, 1999).

Tabla 2. Características de los vectores no virales

Métodos	Descripción	Ventajas	Desventajas
Físicos			
Inyección de ADN desnudo	Inyección local de ADN plasmídico en el tejido.	Simple, seguro y económico. Baja toxicidad.	Baja eficiencia y expresión transitoria.
Biobalística	El ADN se adhiere a partículas de oro o tungsteno que son aceleradas hacia la célula diana.	Buena eficiencia y fácil manejo.	Daño tisular en la zona de impacto y expresión transitoria.
Electroporación	Se aplica una corriente eléctrica a las células que abre poros en la membrana celular. El ADN es inyectado y entra a la célula a través de los poros.	Alta eficiencia	Necesidad de intervención quirúrgica para insertar los electrodos. La efectividad se reduce a una zona limitada entre los electrodos. Algunas células mueren al no soportar la descarga eléctrica.
Químicos			
Liposomas catiónicos	Condensan el ADN, formando complejos transfectantes que se unen a los azúcares de la membrana plasmática por enlaces electrostáticos. Los lípidos se absorben a la membrana celular, liberando el ADN directamente dentro del citoplasma, lo cual evita la degradación lisosomal.	Sencillos. El tamaño de los complejos facilita su difusión. Baja inmunogenicidad. Ampliamente utilizado en ensayos <i>in vitro</i> . Alta eficiencia <i>in vitro</i> ; baja a mediana eficiencia <i>in vivo</i> .	Inducción de respuesta inmune aguda. Actividad limitada <i>in vivo</i> porque los complejos son susceptibles a degradación por proteínas séricas.
Polímeros catiónicos	Se unen al ADN y lo condensan en forma de una partícula de alrededor de 50 nm que entra a la célula vía endocitosis por interacción de cargas con la membrana plasmática.	Alta eficiencia <i>in vitro</i> ; baja a mediana eficiencia <i>in vivo</i> .	Citotoxicidad; inducción de respuesta inmune aguda.
Híbridos Lípido-Polímero	Se forman complejos ADN-polímero que son recubiertos por una capa lipídica. Siguen el mismo mecanismo de entrada que los lípidos catiónicos.	De baja a mediana eficiencia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ; baja toxicidad.	Baja eficiencia <i>in vivo</i> .
Péptidos catiónicos	Son péptidos ricos en residuos de aminoácidos básicos que se unen al ADN por cargas electrostáticas.	Pueden ser manipulados para mejorar sus propiedades, p. ej. añadiendo una señal de localización nuclear. Alta eficiencia y el tamaño del ADN puede ser muy grande.	Su producción es costosa.

Referencia de la tabla (Gao et al., 2007; Niidome y Huang, 2002; Rozalén, 2003). <http://www.gene-delivery.ox.ac.uk>

1.3 Uso de bacteriófagos como vectores de transferencia

Los bacteriófagos o fagos son virus que se replican como parásitos intracelulares obligados en bacterias. Están formados por una cápside proteica que rodea y protege al genoma viral (Baron, 1996). Los bacteriófagos ofrecen una alternativa atractiva a los vectores virales tradicionales y a los no virales porque pueden ser capaces de contrarrestar algunas de sus principales deficiencias (Ver Tabla 3). Una de las principales ventajas de los bacteriófagos sobre los vectores virales es la incapacidad de replicarse en células de mamífero, lo cual sugiere que no existe una respuesta inmune preexistente contra estas partículas. Por otro lado, es posible modificar genéticamente los fagos para que puedan ser dirigidos a tipos celulares específicos. En general, algunas de las ventajas de utilizar fagos como vectores de transferencia de ADN son: 1) su producción es más simple y más económica que la de los vectores existentes obteniéndose en consecuencia grandes títulos cuya purificación a gran escala es sencilla (Larocca y Baird, 2001); 2) son muy estables bajo una variedad de condiciones adversas incluyendo pH extremo, DNasa y enzimas proteolíticas (Larocca et al., 2002).

Estudios recientes han demostrado que la eficiencia de la transducción en células de mamífero utilizando fagos es baja comparada con la de los vectores virales, aunque es similar a la obtenida con vectores no virales (1-10%). Incluso, sometiendo a las células a estrés genotóxico se puede alcanzar una eficiencia del 45% (Burg et al., 2002; Larocca y Baird, 2001). Con el objetivo de mejorar la eficiencia de transducción de los bacteriófagos a células de mamífero se han hecho diversas modificaciones estructurales principalmente a su superficie. Estas modificaciones consisten en la conjugación covalente de péptidos o en la modificación genética utilizando la técnica de despliegue en fagos llamada también "phage display" (Clark y March, 2006).

1.4 Bacteriófago M13

El fago M13 es un fago filamentososo que infecta a bacterias *Escherichia coli* F⁺, y pertenece a la familia de los fagos filamentosos en particular a los de la clase Ff que se caracterizan por infectar a *E. coli* mediante la unión al pili F de la superficie bacteriana. A diferencia de la mayoría de los bacteriófagos, éste es un fago no lítico que sale de la bacteria sin matarla por medio de un mecanismo de extrusión. La bacteria continúa dividiéndose, aunque a una velocidad menor porque su maquinaria celular está ocupada en la producción de viriones. Las dimensiones del fago M13 son de aproximadamente 930 nm de largo y 6.5 nm de diámetro por lo que su forma es la de un cilindro muy alargado (similar a un cabello). La longitud del cilindro depende de la extensión del ADN que lleva en su interior. Está formado por una cápside proteica que envuelve a una molécula circular de ADN de cadena sencilla (ssDNA) de 6407 nucleótidos. El genoma del fago codifica para 11 proteínas y tiene una región intergenómica no codificante que contiene los sitios de origen de la replicación + y - y la señal de empaquetamiento. De las once proteínas codificadas, tres (pII, pX y pV) participan en la replicación, tres (pI, pXI y pIV) son necesarias para el ensamblaje y cinco (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX) componen la estructura del fago. La cápside está constituida por 5 proteínas estructurales, la más abundante es la proteína pVIII que recubre el largo de la partícula viral con 2700 copias. En un extremo de la partícula hay de 3 a 5 moléculas de la proteína pIX y de 3 a 5 de la proteína pVIII. En el otro extremo se encuentran de 3 a 5 moléculas de la proteína pIII y de 3 a 5 de la proteína pVI (Barbas, 2001; Russel, 2004) (Figura 1).

Tabla 3. Comparación de las características de los fagos (como vectores) con los vectores virales tradicionales y los no virales

	Vectores virales	Vectores no virales	Bacteriófagos
Toxicidad potencial	Alta	Baja	Baja
Replicativo	Si	No	No
Expresión de proteínas virales	Si	No	No
Complejidad	Alta	Baja	Baja
Costo de producción	Alto	Bajo	Bajo
Eficiencia de transducción	Alta	Baja	Baja
Reproducibilidad	Alta	Baja	Alta
Posibilidad de manipulación genética para dirigir a tejidos específicos	Limitada	Limitada	Amplia

Tomada y modificada de Larocca y Baird (2001).

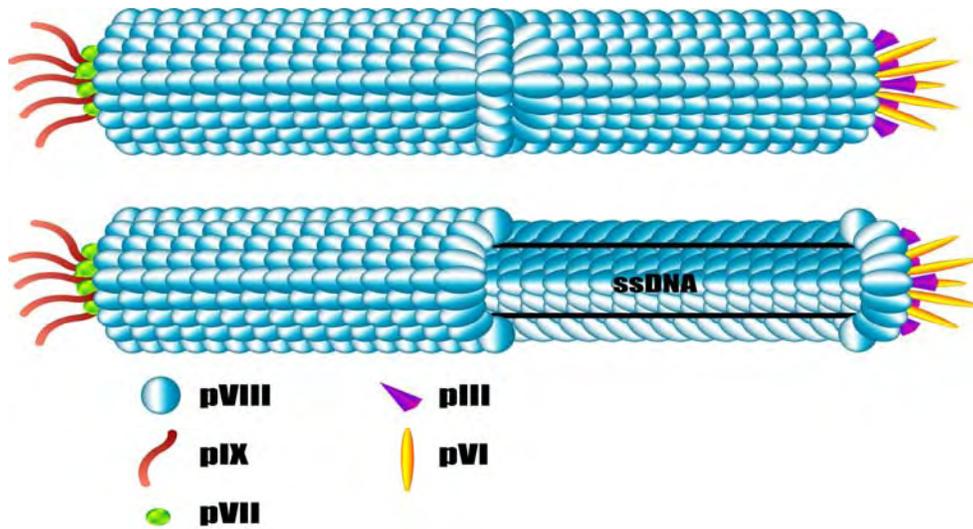


Figura 1. Estructura del bacteriófago filamentoso y sus proteínas estructurales. En el extremo izquierdo del fago están ancladas las proteínas pVII (3~5 copias) y pIX (3~5 copias). El fago está cubierto a lo largo por 2700 copias de la proteína pVIII. En el otro extremo están las proteínas pVI (3~5 copias) y pIII (3~5 copias).

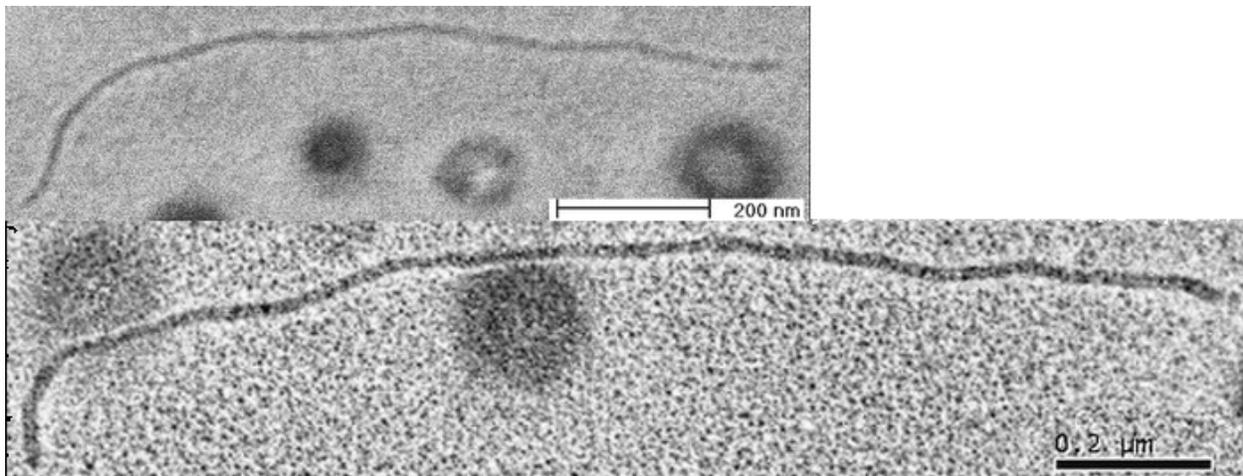


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica del Bacteriófago M13. Arriba: Imagen de microscopía electrónica de barrido del bacteriófago M13. Abajo: Imagen de microscopía electrónica de transmisión del bacteriófago M13. Tomada de: <http://www.mardre.com/homepage/mic/tem/samples/bio/virus/m13a.htm>.

1.4.1 Replicación y ensamblaje de los viriones

La replicación del fago M13 comienza cuando la proteína pIII se une al pili F en la superficie de una célula de *E. coli* y facilita la translocación del ADN viral (+) hacia el citoplasma. La replicación del fago M13 en *E. coli* puede ser dividida en cuatro fases. Durante la primera fase, se produce la cadena complementaria (i.e. cadena negativa) generándose de esta manera una doble cadena super enrollada —semejante a la de un plásmido. A partir de la cadena doble se transcriben y se sintetizan las proteínas virales utilizando la cadena negativa como templado. En la segunda fase, la proteína pII corta la cadena positiva produciéndose un corte que funciona como cebador para la replicación de otras cadenas positivas por el mecanismo de círculo rodante. Concomitantemente, las cadenas positivas sintetizadas sirven como templados para producir más formas replicativas y la síntesis de más proteínas. En la tercera fase, las proteínas estructurales (pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX) recién sintetizadas se insertan en la membrana interna con su extremo amino terminal en el periplasma y su extremo carboxilo terminal en el citoplasma. Cuando pV alcanza una concentración crítica en el citoplasma se forman dímeros que se unen a las cadenas sencillas de ADN viral y previenen su conversión a formas replicativas. Las proteínas pI y pXI forman un poro en la membrana bacteriana, a través del cual la cadena positiva circular sencilla de ADN emerge al mismo tiempo que es recubierta por las proteínas estructurales que estaban en la membrana y que forman la cápside. En la cuarta fase (fase de ensamblaje), el ensamblaje del virión es iniciado por la incorporación de pVII y pIX en un extremo de la partícula. El proceso de elongación continúa con la adición de miles de moléculas de pVIII a lo largo de la partícula, y el proceso termina con la adición de pVI y pIII en el otro extremo de la partícula (Barbas, 2001; Sidhu, 2001; Sidhu, 2005).

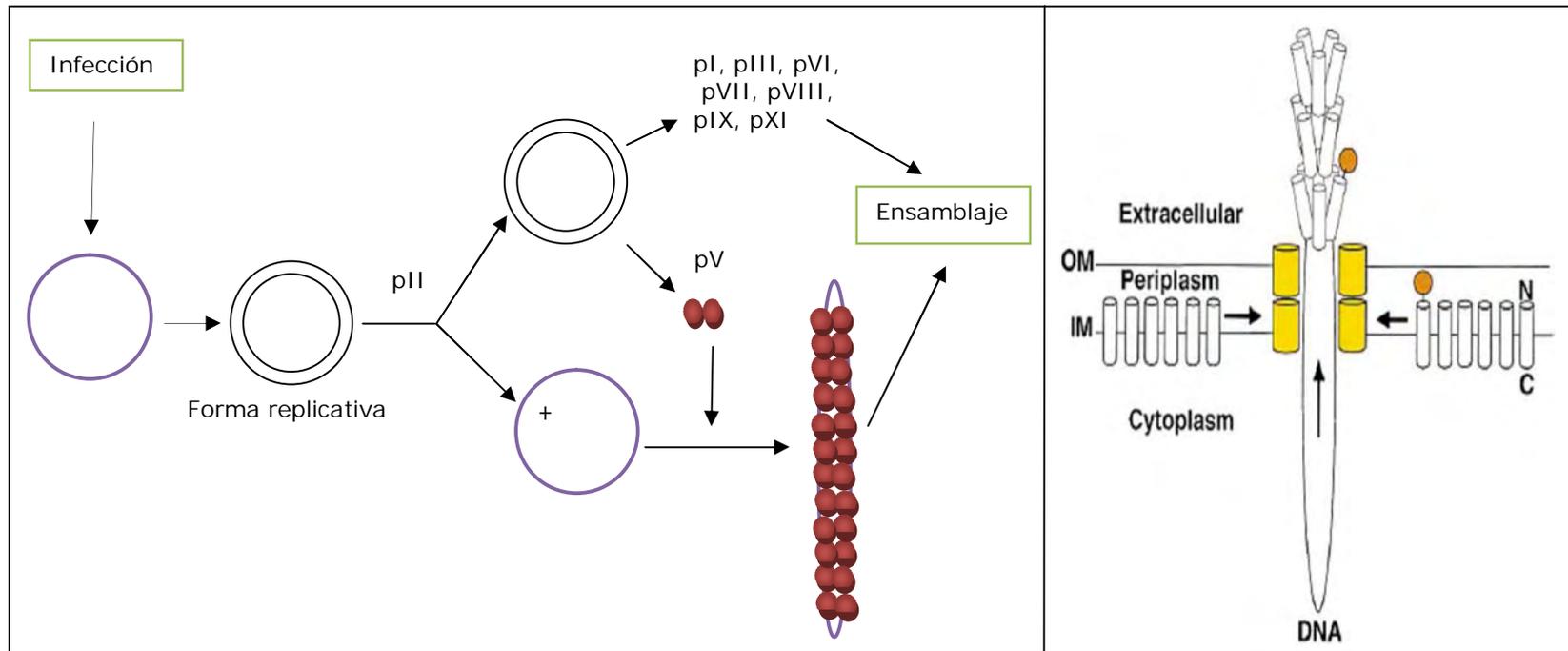


Figura 3. Replicación y ensamblaje del fago M13. Izquierda: Replicación del fago M13. Derecha: Ensamblaje del fago M13. El círculo naranja representa un péptido desplegado en la cápside. Tomada de Sidhu (2001).

Las proteínas de la superficie del fago M13 han sido ampliamente estudiadas, en particular pIII y pVIII ya que es posible fusionar péptidos o proteínas a éstas y de esta manera se logra modificar la superficie del fago. Esta técnica se discutirá en el siguiente apartado.

1.5 Despliegue de péptidos en la superficie del fago M13 (“Phage display”).

El origen de la tecnología de despliegue en fagos también denominada en inglés como “Phage display” se remonta a 1985, año en que George Smith clonó una secuencia de aminoácidos fusionada al gen de la proteína pIII. El producto era una proteína pIII modificada que era incorporada al virión en el ensamblaje y que era reconocida por un anticuerpo dirigido a la secuencia adicionada (Smith, 1985). La proteína desplegada no interfería en la integridad y capacidad infectiva del fago. El despliegue en fagos consiste en la expresión de péptidos o proteínas en la superficie del fago. Se logra clonando la secuencia del péptido de interés fusionada al gen de una de las proteínas estructurales de la cápside del fago. Al amplificarse el fago se producen proteínas recombinantes que son incorporadas en la superficie del fago; a su vez, el gen es empaquetado en el fago recombinante (Arap, 2005). Los bacteriófagos más utilizados para el despliegue de péptidos son el fago M13 y los filamentosos relacionados, sin embargo también se han utilizado otros como el fago lambda y el T7 (Clark y March, 2006).

Hay tres tipos principales de sistemas de expresión utilizados para despliegue en fagos: genoma viral, fagémido e híbrido (Fig. 4). En el primero, el genoma viral es modificado (p. ej. mediante la adición de sitios de restricción) para permitir la inserción de ADN junto al gen de alguna proteína de la cápside. Este sistema garantiza que el despliegue del péptido sea multivalente, de esta forma, todas las copias de la proteína superficial despliegan el péptido de fusión (Barbas, 2001).

El sistema híbrido (33 ó 88) consiste en introducir en el genoma viral una segunda copia del gen de la proteína estructural. En esta segunda copia se clona la secuencia que se quiere desplegar. Los fagos que se generan con este sistema presentan una cápside con una mezcla de proteína recombinante y proteína silvestre (Uppala y Koivunen, 2000).

Un fagémido es un plásmido que cuenta con: un gen de resistencia a algún antibiótico; dos orígenes de replicación: uno bacteriano que permite su replicación en *E. coli* y uno vírico del fago Ff; el gen de la proteína estructural a la cual se fusionará el péptido de interés (gVII ó gIII); y una señal de empaquetamiento viral. No obstante carece de los genes que codifican para las demás proteínas estructurales y las no estructurales que el fago necesita para la producción de viriones completos. Los fagémidos pueden ser amplificados en *E. coli* como cualquier plásmido, sin embargo para la producción de fagos recombinantes es indispensable utilizar un fago ayudador. El fago auxiliar es un fago derivado del M13 que tiene un genoma viral completo y cuya señal de empaquetamiento tiene mutaciones que reducen su eficiencia de empaquetamiento; además posee un gen de resistencia a algún antibiótico. Para producir fagos recombinantes se transforma una población de bacterias *Escherichia coli* F' con el fagémido. Luego, esta población es superinfectada con el fago auxiliar. El genoma viral del fago auxiliar inicia la síntesis de las proteínas virales silvestres. Una de estas proteínas, pII, actúa sobre el origen de replicación viral del fagémido y activa la replicación de la hebra positiva (Claros et al., 2004). Durante el ensamblaje de los viriones, las proteínas estructurales se van adhiriendo a la membrana bacteriana así como también la proteína estructural recombinante. El resultado es una población de fagos cuya cápside contiene tanto proteínas silvestres del fago auxiliar como copias de la proteína recombinante codificada por el fagémido. La mayoría de los viriones resultantes contendrán la hebra positiva del fagémido porque la eficiencia de

empaquetamiento del ADN del fago auxiliar es baja (Figura 4) (Barbas, 2001; Kehoe y Kay, 2005; Mullen et al., 2006; Sidhu, 2001; Uppala y Koivunen, 2000).

Sus principales aplicaciones son la identificación de péptidos y sus sitios de unión, así como la búsqueda de antígenos potentes para inmunización. Las cinco proteínas de la cápside han sido utilizadas para desplegar péptidos. Sin embargo las que se utilizan más son pVIII y pIII (Tabla 4) (Malik et al., 1996).

La proteína pIII permite la fusión de péptidos grandes que se despliegan generalmente en una sola copia por virión. En el caso de la proteína pVIII la posibilidad de tener un número mayor de copias de proteína recombinante por virión aumenta ya que se puede obtener hasta un 40% (1000 copias) de proteínas recombinantes por virión cuando el péptido consiste de entre 10 y 15 aminoácidos (Greenwood et al., 1991). El número de proteínas recombinantes en cada virión depende del tamaño del péptido insertado y también de la estructura que adopte al ser desplegado porque de ésta dependerá la eficiencia de ensamblaje de los viriones (Malik et al., 1996). Generalmente cuando se pretende desplegar péptidos de gran tamaño (>100 residuos) se opta por el despliegue en pIII y cuando lo importante es el número de copias desplegadas (p ej. cuando se quiere maximizar la oportunidad de interacción entre el fago y la célula) se utiliza pVIII (Russel, 2004).

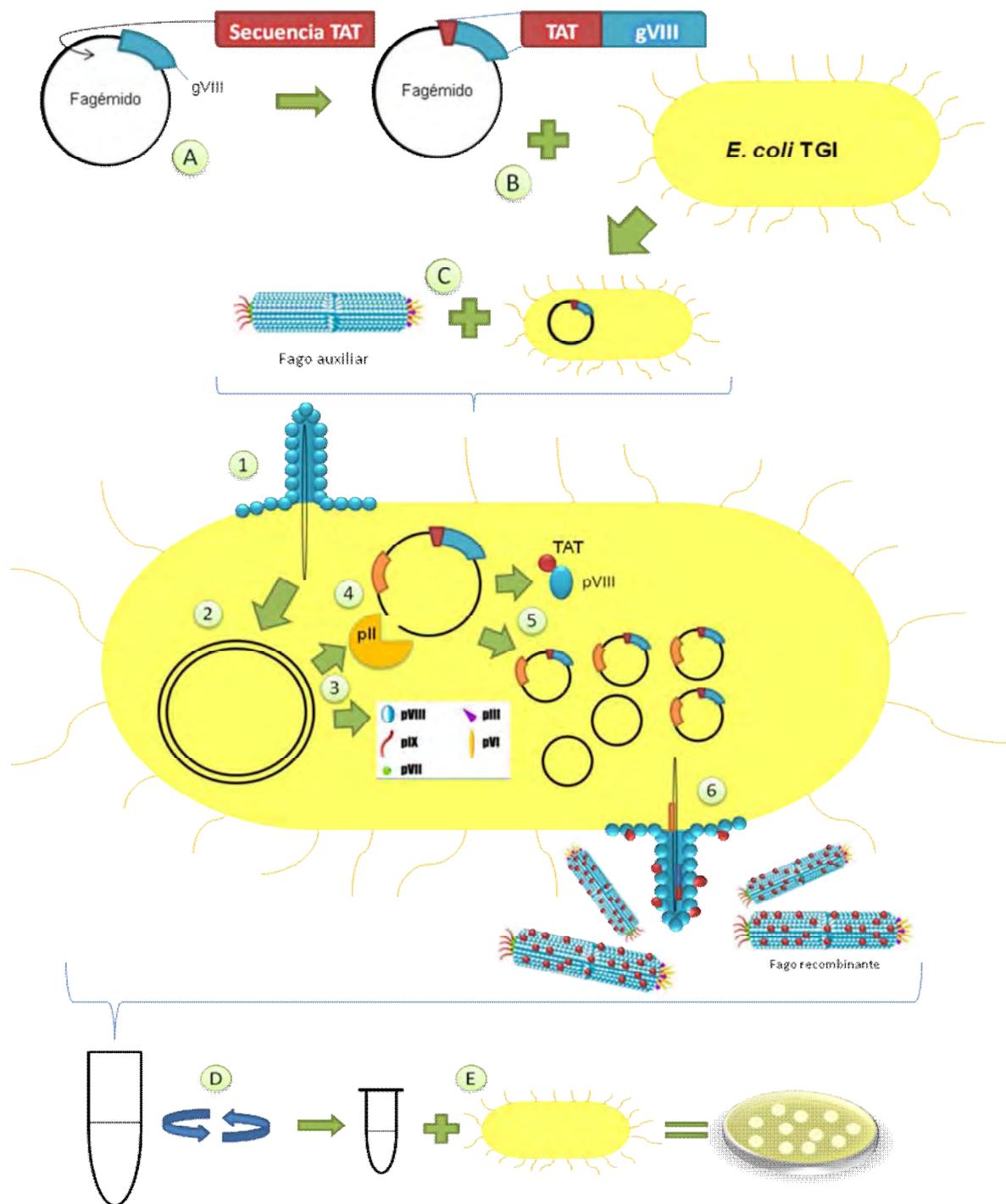


Figura 4. Procedimiento para el despliegue de un péptido en la proteína pVIII del fago M13. A) Clonación de la secuencia del péptido (p. ej. el péptido TAT) en el fagémido. B) Transformación de bacterias competentes F'. C) Rescate de fagos por superinfección con el fago auxiliar: 1) Translocación del ADN del fago auxiliar hacia el citoplasma. 2) Síntesis de la cadena complementaria. 3) Síntesis de proteínas virales. 4) Activación del origen de replicación viral del fagémido por pII. 5) Síntesis de proteína recombinante y replicación de la hebra positiva (+) del fagémido. 6) Ensamblaje de los fagos recombinantes. D) Purificación por precipitación y centrifugación. E) Titulación por conteo del número de unidades transductoras.

El despliegue en fagos ha sido aplicado para mejorar la eficiencia de los fagos filamentosos como vectores de transferencia de ADN (Tabla 4). La unión e internalización del fago se indujo cuando se desplegó en su superficie el péptido RGD que se une a integrinas (Hart et al., 1994). Larocca y colaboradores produjeron fagos filamentosos que expresaban el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) o el factor de crecimiento epidermal (EGF) como fusión con la proteína pIII y transducían células COS-1 con mayor eficiencia que el fago silvestre (Larocca et al., 1999; Larocca et al., 1998). Posteriormente Poul et al. dirigieron fagos a células de cáncer mamario desplegando un anticuerpo contra el receptor ErbB2 presente en la membrana de éstas células (Poul y Marks, 1999). Por su parte, Di Giovine y colaboradores tomaron la base pentón del adenovirus (la cual es responsable de la entrada del virus a células de mamífero), la desplegaron en la proteína pVIII y observaron que los fagos eran capaces de transducir células que expresan integrinas (Di Giovine et al., 2001).

Tabla 4. Ejemplos de péptidos y proteínas desplegados en el fago filamentoso.

Proteína desplegada	Masa molecular (kDa)	Proteína estructural	Referencia
Inhibidor de tripsina de la mostaza (MTI-2)	7	pIII	(Volpicella et al., 2001)
Hormona del crecimiento humana (hGH)	22	pIII, pVIII	(Sidhu et al., 2000) (Weiss et al., 2000)
Tripsina	24	pIII, pVIII	(Corey et al., 1993)
Fragmentos scFv de anticuerpos	25	pIII, pVIII	(McCafferty et al., 1990)
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	2x11.5	pIII	(Muller et al., 1997)
Fragmentos Fab de anticuerpos	2x25	pIII, pVIII	(Hoogenboom et al., 1991)
Fosfatasa alcalina	2x60	pIII	(McCafferty et al., 1991)
Estreptavidina	4x15	pVIII	(Sidhu et al., 2000)
Citocromo b ₅₆₂	11	pIII	(Ku y Schultz, 1995)
Glutation S-transferasa	2x25.5	pIII	(Widersten y Mannervik, 1995)
Para el uso del fago filamentoso como vector de transferencia			
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2)	18	pIII	(Larocca et al., 1999)
Factor de crecimiento epidermal (EGF)	6	pIII	(Larocca et al., 1998)
Anticuerpo contra Erb2 (anti-ErbB2 scFv)	25	pIII	(Poul y Marks, 1999)
Base pentón del adenovirus (Ad-Pb)	77	pVIII	(Di Giovine et al., 2001)
Tripéptido RGD	1	pVIII	(Hart et al., 1994)

Tomada y modificada de Russel (2004).

1.6 El péptido TAT como dominio de transducción de proteínas

Tat (transactivador de transcripción) es una proteína de 86 aminoácidos expresada por el virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1). Su función está relacionada con la replicación viral (Wadia y Dowdy, 2005). En 1988 se descubrió que Tat podía ingresar a células en cultivo y llegar hasta el núcleo para transactivar genes virales (Frankel y Pabo, 1988; Green y Loewenstein, 1988). Posteriormente se determinó que un péptido derivado de los aminoácidos 47 a 57 (YGRKKRRQRRR) de Tat es suficiente para transducir células y que además posee una señal de localización nuclear (Ruben et al., 1989); a este péptido se le nombró TAT (en mayúsculas, para diferenciarlo de Tat que es la proteína completa de 86 aa) (Vives et al., 1997). Por su capacidad de ingresar a la célula con facilidad, TAT ha sido agrupado con los llamados péptidos que penetran células (*cell penetrating peptides, CPP*) o dominios proteicos de transducción (PTD). Estos péptidos se caracterizan por tener secuencias cortas de 11 a 34 aminoácidos, que son muy ricas en aminoácidos básicos. Los más importantes son el homeodominio de Antennapedia (Antp ó penetratina), el cual es un factor de transcripción de *Drosophila*; la proteína estructural VP22 del virus de herpes simple tipo 1 y el péptido RGD, un tripéptido común en las proteínas de unión a integrinas (Gupta et al., 2005; Hart et al., 1994). Se cree que la interacción de éstos con la membrana plasmática que está cargada negativamente es lo que facilita su ingreso a la célula. Al fusionar TAT con una gran variedad de macromoléculas, desde ADN hasta partículas de oro, se ha demostrado que TAT puede acarrear grandes moléculas al interior de la célula (Eguchi et al., 2001). Recientemente se demostró que fagos lambda que expresaban el péptido TAT en su superficie eran capaces de transducir eficientemente células de mamífero (Eguchi et al., 2001).

1.6.1 Mecanismo de entrada en células de mamífero mediado por TAT

El mecanismo de entrada de los PTDs se ha estudiado intensivamente en los últimos años y ha sido tema de controversia porque diversos equipos han llegado a distintas conclusiones. El modelo actual de la transducción de proteínas mediada por TAT es un proceso de etapas múltiples que implica la unión de TAT a la superficie celular, estimulación de macropinocitosis, captura en macropinosomas y escape del endosoma hacia el citosol (Gump y Dowdy, 2007).

Diversos experimentos refuerzan la teoría de que la unión de TAT a la superficie celular se da por la interacción de éste con proteoglicanos de heparan sulfato. Los proteoglicanos son una clase de glicoproteínas muy abundantes en la matriz intercelular y el exterior de las membrana celulares y están formados por un centro proteico con una o más cadenas de glicosaminoglicanos unidas covalentemente. Estas cadenas de glicosaminoglicanos son largos polímeros de carbohidratos lineares que están cargadas negativamente bajo condiciones fisiológicas, debido a la presencia de grupos sulfato y de grupos de ácido urónico (Alberts, 2002). Tyagi et al. encontraron que si inhibía la síntesis de proteoglicanos en ciertas células, la transducción de TAT acoplado a GFP no ocurría en estas células. Así mismo demostraron que al tratar la superficie celular con liasas, que específicamente degradan las cadenas heparan sulfato, TAT no entraba a las células y que la heparina (un glucosaminoglicano) inhibe competitivamente la entrada de TAT a las células sin tratar (Tyagi et al., 2001). Además la existencia de cadenas de heparan sulfato en la membrana de casi todos los tipos de células podría explicar porque TAT es capaz de penetrar una gran variedad de células (Wadia y Dowdy, 2005).

La macropinocitosis es una forma de endocitosis independiente de receptor que involucra la formación de proyecciones membranales (lamelipodios),

sostenidas por una red de filamentos de actina, que al fusionarse crean vesículas internas grandes o macropinosomas (Sieczkarski y Whittaker, 2002). La evidencia de que la macropinocitosis es el mecanismo de entrada de TAT a la célula es extensa. Se ha observado que TAT incrementa la entrada de dextran neutro, un marcador de macropinocitosis, a la célula. Además, se ha demostrado que en presencia de inhibidores de macropinocitosis la captura de TAT y proteínas fusionadas con TAT se reduce significativamente (Kaplan et al., 2005; Wadia et al., 2004).

En los experimentos en que TAT ha sido marcado fluorescentemente se ha observado que dentro de la célula se encuentra distribuido en vesículas y no de forma libre en el núcleo o en el citosol. Además varios grupos han demostrado que la eficiencia de transducción de proteínas fusionadas TAT se mejora con el uso de agentes endosomolíticos, como la cloroquina (Caron et al., 2004; Wadia et al., 2004). Wadia et al. fusionaron TAT con un péptido que reacciona al cambio de pH en los endosomas desestabilizando la membrana de éstos y observaron que la transducción de TAT se mejoró (Wadia et al., 2004). Lo anterior indica que, aunque una cantidad importante de TAT escapa del macropinosoma (por un mecanismo aun desconocido), posiblemente el paso limitante de la transducción de TAT sea el escape del endosoma (Wadia y Dowdy, 2005).

II. JUSTIFICACIÓN

Han sido numerosos los intentos por mejorar los vectores de transferencia. El bacteriófago M13 constituye una alternativa por su baja inmunogenicidad y porque su producción resulta económica y sencilla; sin embargo su eficiencia de transducción es muy baja. Por otro lado, el péptido TAT posee la capacidad de penetrar células. El despliegue de TAT en la superficie del fago M13 facilitará su entrada a la célula y por lo tanto mejorará su eficiencia de transducción.

III. HIPÓTESIS

El despliegue de TAT en la superficie del fago M13 facilitará su entrada a células de mamífero.

IV. OBJETIVO GENERAL

Analizar la entrada así como la eficiencia de transducción de un fago que contenga el péptido TAT desplegado en su superficie.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Construir los fagémidos que contengan la fusión de TAT con la proteína pVIII.
- 2) Generar un casete de expresión que contiene el gen reportero de la GFP.
- 3) Producir los fagos recombinantes.
- 4) Determinar entrada, internalización y eficiencia de transducción de los fagos usando diferentes líneas celulares.
- 5) Utilizar fármacos para mejorar la transducción.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Células y cultivo. Las líneas celulares de mamífero: HEK-293 (riñón de embrión humano), HeLa (epiteliales de humano) y HepG2 (hepáticas de humano) fueron obtenidas del ATCC (Manassas, Virginia, USA). Las células COS-1 (riñón de mono) fueron proporcionadas por el Dr. Fernando López Casillas (Instituto de Fisiología Celular, UNAM). Todas las células mencionadas anteriormente fueron crecidas y mantenidas en medio DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) complementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina/amfotericina B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Construcción del fagémido pG8TAT. La clonación de la secuencia correspondiente al dominio de transducción de la proteína TAT se realizó mediante PCR utilizando como templado el plásmido pET28bTATv2 (Dowdy, University of California San Diego, USA). Los oligonucleótidos utilizados fueron TATF282 (5'-CATTACGTACTTTTGTTTAACTTTAAGA-3') y TATR282 (5'-GCTCGGATCCTCGACCCATTTGCTGTC-3') (Sigma, St Louis, MD, USA), los cuales contienen los sitios de restricción *Sna*BI y *Bam*HI (subrayados). El fragmento amplificado se sometió a electroforesis y se purificó. Se usaron las enzimas *Sna*BI y *Bam*HI para digerir el fragmento así como el fagémido pG8SAET (proporcionado por el Dr. Manoutcharian, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). Este fagémido posee una copia del gen de la proteína pVIII y el gen de resistencia a ampicilina. Los fragmentos generados fueron sometidos a electroforesis, purificados y ligados utilizando la T4 DNA ligasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Ver Figura 5). El fagémido pG8TAT resultante se secuenció para confirmar la secuencia de TAT así como su marco de lectura con pVIII.

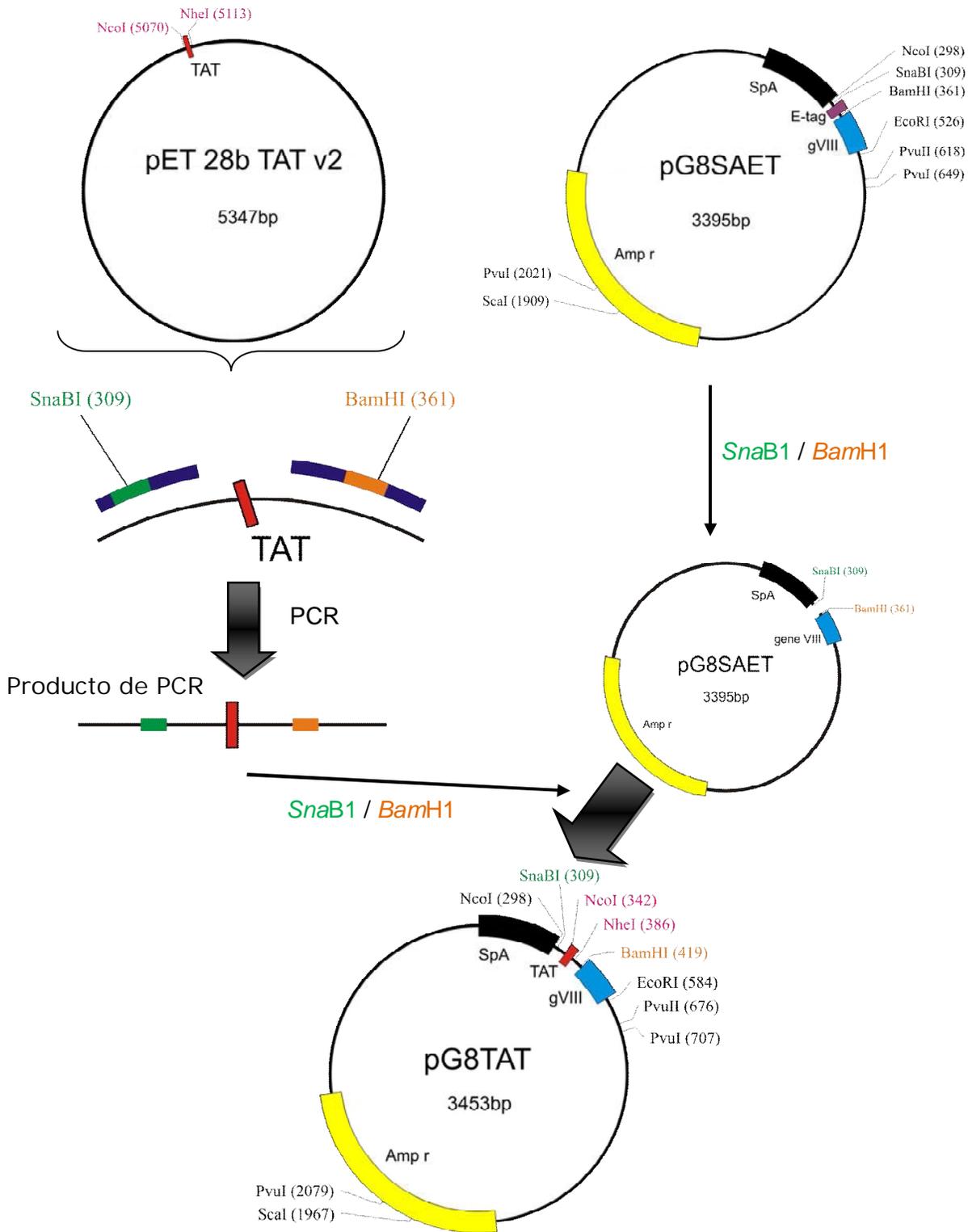


Figura 5. Esquema de la clonación de TAT en el fagémido pG8SAET para generar el fagémido pG8TAT. Se realizó un PCR del plásmido pET 28b TAT v2 con los oligonucleótidos TATF282 y TATR282 que contienen los sitios de restricción *Sna*BI y *Bam*HI respectivamente. Tanto el fragmento generado como el fagémido pG8SAET se digirieron con las enzimas *Sna*BI y *Bam*HI y posteriormente se ligaron.

Construcción de los fagémidos pG8TAT_CMVGFP y pG8SAET_CMVGFP. El plásmido pBlueCMVGFP2 (Luz-Madrigal et al., 2007) fue digerido con las enzimas de restricción *NruI* y *PvuII*, se sometió a electroforesis y se purificó el fragmento de 1727 pb utilizando un sistema de purificación de fragmentos de ADN (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Valencia, CA, USA). Los fagémidos pG8TAT y pG8SAET fueron digeridos con la enzima de restricción *PvuII*, desfosforilados con CIAP (Fosfatasa alcalina de intestino de ternera, Invitrogen), tras lo cual se sometieron a electroforesis y se purificaron los fragmentos de 3453 pb y de 3395 pb para pG8TAT y pG8SAET, respectivamente. Finalmente, los fragmentos se ligaron utilizando la T4 DNA ligasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para generar los fagémidos pG8TAT_CMVGFP y pG8SAET_CMVGFP (Ver Figura 6). Los fagémidos purificados fueron secuenciados para conocer la orientación del casete de expresión. La expresión de la proteína GFP del casete de expresión (CMVGFP) se verificó mediante la transfección de los fagémidos (pG8TAT_CMVGFP y pG8SAET_CMVGFP) en células HeLa utilizando lipofectamina plus (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El protocolo de transfección utilizado fue el proporcionado por la compañía y en placas de cultivo celular de 35 mm. El análisis de la expresión de GFP se llevó a cabo en un microscopio confocal (Olympus, FV1000).

Producción de los fagos recombinantes. Se transformaron bacterias TG1 (proporcionadas por el Dr. Manoutcharian, IIB, UNAM) con los fagémidos pG8SAET, pG8TAT, pG8SAET_CMVGFP ó pG8TAT_CMVGFP y se sembraron en una caja con medio LB y ampicilina. Con una colonia se inocularon 4 mL medio 2YT (medio líquido enriquecido) con ampicilina y se incubaron a 37 °C hasta una D.O.₆₀₀ de 0.8. Posteriormente se agregó el fago auxiliar M13K07 (10 MOIS, proporcionado por la Dra. Gevorkian, IIB, UNAM) y se incubó a 37 °C por 30 min sin agitación y otros 30 min con agitación (250 rpm). Después se utilizó este cultivo para inocular 100 mL de medio 2YT con kanamicina y

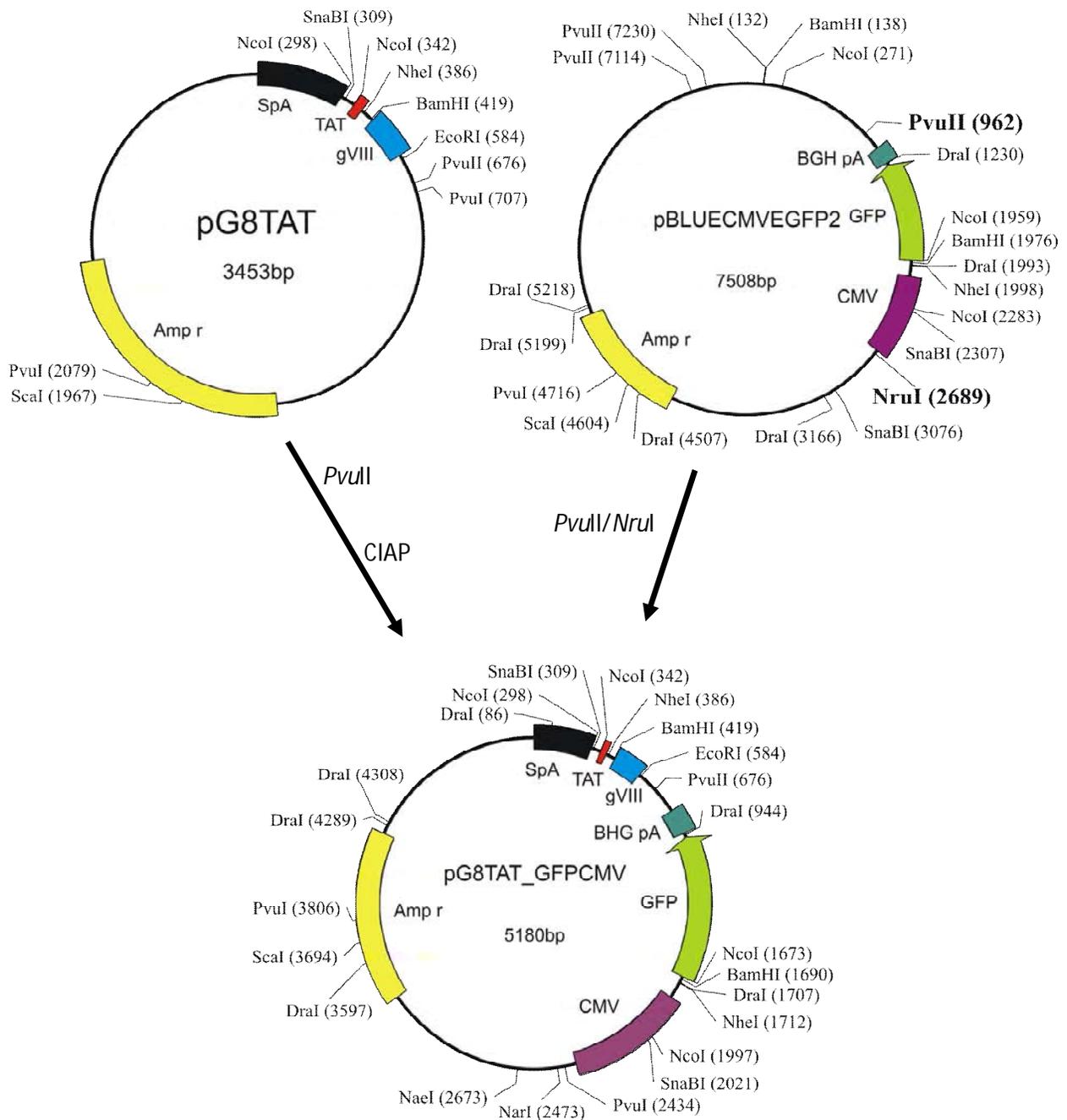


Figura 6. Esquema de la clonación del casete de expresión GFPCMV en el fagémido pG8TAT para generar el fagémido pG8TAT_GFPCMV. El casete de expresión se extrajo del plásmido pBlueCMVGFP2 con las enzimas de restricción *PvuII* y *NruI*. Posteriormente el plásmido pG8TAT se digirió con la enzima de restricción *PvuII* y se trató con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP). Finalmente se ligaron el fragmento que contenía el casete de expresión y el vector pG8TAT digerido.

ampicilina y se incubó por 20 h a 30 °C con agitación (200 rpm). Los fagos fueron purificados mediante dos rondas de precipitación con una solución 20 % de PEG/NaCl 2.5 M. Finalmente se resuspendieron en PBS y se conservaron a 4 °C.

Titulación de los fagos. Se hicieron diluciones seriales (1×10^{-3} , 1×10^{-6} , 1×10^{-9} , 1×10^{-10}) de la suspensión de fagos en medio 2YT. Con 3 μ l de la dilución 1×10^{-9} se infectaron 200 μ l del cultivo de bacterias y con 3 μ l de la dilución 1×10^{-10} otros 200 μ l. Las diluciones y alícuotas se ajustaron de acuerdo a los rendimientos esperados y se incubaron a 37 °C por 40 min sin agitación, finalmente se sembraron en cajas de medio LB con ampicilina. Se incubaron toda la noche y se contó el número de colonias. El título de los fagos se determinó de la siguiente manera: Título fágico = (N° colonias/ alícuota en mL) (1/dilución). El título de los fagos se expresó como unidades transductoras por mL (ut/mL).

Marcaje de fagos con Alexa-488. Se precipitó una cantidad equivalente a $1 \times 10^{12-13}$ partículas de fagos con una solución 20% de PEG/NaCl 2.5 M. Los fagos fueron recuperados por centrifugación y resuspendidos en un amortiguador de bicarbonatos 1 M, pH 9.0 (amortiguador de conjugación). Posteriormente se añadió una cantidad equivalente a 0.25 mg de fluorocromo Alexa-488 (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) y se dejó reaccionar por 1 hora a temperatura ambiente, en la oscuridad y con agitación constante. Luego se purificó el fago marcado mediante dos rondas de precipitación con la solución 20% de PEG/NaCl 2.5 M. Los fagos marcados fueron resuspendidos en PBS y conservados a 4 °C protegidos de la luz. Posteriormente se determinó el título de los fagos tal como se describió anteriormente.

Inmunofluorescencia. Se sembraron 1×10^4 células COS-1 por pozo en una cámara Lab-Tek II (Nalgene Nunc international, Rochester, NY, USA) y

se cultivaron por 48 h. Las células fueron lavadas una vez con PBS e incubadas con medio OPTI-MEM (Gibco, Grand Island, NY) conteniendo 1×10^{10} ut de fagos M13-Alexa488 ó M13TAT-Alexa488 por 3 h a 37 °C. Las células fueron lavadas con PBS y se incubaron por 10 min con 4% de paraformaldehído en PBS (pH= 7.4). Se lavaron dos veces con PBS y se permeabilizaron con 0.1% Triton X-100/PBS recién preparado por 10 min. Después se lavaron con PBS y fueron tratadas con amortiguador de bloqueo (Solución en PBS de BSA 3%) por 1 h. Posteriormente, se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo contra pVIII, hecho en ratón (1:500 en buffer de bloqueo), el cual va dirigido a la proteína VIII de la cápside del bacteriófago M13. Al día siguiente, las muestras se lavaron tres veces durante 5 min con PBS y se añadió un anticuerpo acoplado a Alexa-594 contra ratón producido en cabra (Invitrogen, 1:250 en amortiguador de bloqueo) y se incubó durante 2 h a 4 °C. Adicionalmente, las muestras fueron tratadas con 4, 6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Vector Labs, USA) o rojo radiante (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) para localizar los núcleos. A continuación se lavaron dos veces durante 5 min con PBS y se montaron para su análisis en 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octano (DABCO, Sigma, St Louis, MD, USA).

Ensayos de entrada a células de mamífero *in vivo*. Aproximadamente 1.5×10^5 células COS-1, HeLa ó HepG2 se sembraron en cajas de 6 pozos con cubreobjetos redondos por pozo. Después de 48 h se retiró el medio DMEM y las células fueron lavadas dos veces con OPTI-MEM (Gibco, Grand Island, NY). Se agregaron 1.0×10^{10} ut de fagos M13-Alexa488 ó M13TAT-Alexa488 a cada pozo en 400 μ l de OPTI-MEM y se incubaron a 37 °C por 3, 2 y 1 h dependiendo del ensayo. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron dos lavados con PBS y se trataron con 4, 6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Vector Labs, USA) para marcar la cromatina contenida en el núcleo. Finalmente se lavaron dos veces con PBS. Para el ensayo de 1 h de

incubación se agregó FM 4-64 (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA), el cual marca la membrana plasmática así como endosomas, a una concentración final de 1:520. En el caso de los ensayos de 2 y 3 h de incubación se utilizó Brefeldin A (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) a una concentración final de 1:2000 para teñir el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.

Ensayos de transducción de células de mamífero *in vivo*. Se sembraron en cajas de 12 pozos 2.5×10^4 células por pozo. Después de 24 h de incubación se retiró el medio DMEM y se lavaron una vez con OPTI-MEM. Se adicionaron 2.5×10^{10} ut de fagos M13-CMVGFP ó M13TAT-CMVGFP a cada pozo en 250 μ L de OPTI-MEM y se incubaron a 37 °C por 6 h. Luego se agregaron 250 μ L de DMEM y se incubaron a 37 °C por 42 h. Posteriormente se removió el medio y las células fueron incubadas a 37 °C con Campotecina 5 μ M (proporcionada por la Dra. Gevorkian, IIB, UNAM) ó Butirato de Sodio 5 mM por 6 h, ó Cloroquina 50 μ M (Sigma, St Louis, MD, USA) por 4 h, en DMEM. Se reemplazó el medio por 500 μ L de DMEM y se incubó por 48 h. La expresión de GFP se analizó por citometría de flujo.

Citometría de flujo. El análisis del porcentaje de células positivas a GFP (GFP+) y la intensidad media de fluorescencia (IMF), se llevo a cabo mediante citometría de flujo (FACS, Calibur, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) a las 72 h después de la adición del fago. Además, se incluyó un control de células no tratadas, para normalizar el número de células que expresan GFP y la IMF. La adquisición (5, 000 eventos) y el análisis de los datos se llevo a cabo utilizando el software Flowjo 7.2.5 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

Microscopía confocal. El análisis por microscopía confocal se llevo a cabo en un sistema confocal FV1000 Olympus (Olympus Tokyo, Japan). La fluorescencia de Alexa-488 y de GFP fue obtenida después de excitar las

muestras a 488 nm y las lecturas fueron registradas a 540 nm. Para la detección de rojo radiante, Brefeldin A y FM 4-64 la longitud de onda de excitación fue de 596 nm y la longitud de emisión fue registrada a 620 nm. La longitud de onda de excitación para la detección de Alexa-594 fue de 554 nm y la de emisión fue registrada a 576 nm. La fluorescencia de DAPI fue detectada después de excitar las muestras a 353 nm y las lecturas fueron registradas a 461 nm. El análisis de las imágenes y las reconstrucciones en tres dimensiones (3D) se llevaron a cabo utilizando el software Imaris 5.0.3 (Bitplane, Imaris™, Saint Paul, MN, USA). Al menos se tomaron imágenes de 4 campos diferentes para cada tratamiento.

VII. RESULTADOS

7.1. Producción de los fagos M13 y M13TAT

Los fagos M13 y M13TAT fueron generados en *E. coli* TG1 (ver Materiales y Métodos). Previamente se ha demostrado que el dominio de transducción (PTD, del inglés protein transduction domain) de Tat (aminoácidos 47 al 57, YGRKKRRQRRR) es capaz de transportar proteínas o péptidos hacia dentro de células de mamífero (Vives et al., 1997). Por tal motivo, nosotros generamos un fago recombinante que despliega en su superficie el péptido TAT (PTD de Tat) en marco de lectura con la proteína más abundante del fago M13 (pVIII). El péptido TAT fue amplificado mediante PCR y clonado en el fagémido pG8SAET (Figura 5). El fagémido pG8TAT fue enviado para su secuenciación a la Unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Mor.) utilizando el oligonucleótido SAET1 (CAATTCGTAAACTAGGTGTAGG). El análisis de la traducción en proteína de la secuencia obtenida utilizando el servidor Expasy (<http://ca.expasy.org>) muestra claramente que TAT se encontró en marco de lectura con la proteína pVIII (Figura 7). Por tanto, los resultados de secuenciación y análisis de la secuencia sugieren que TAT se encuentra desplegado en la superficie del fago M13TAT. Al mismo tiempo se generó el fago M13 (fago no modificado en la superficie) que será utilizado en los siguientes experimentos.

pG8TAT

cttctgtctttgggtacttacttataatctggtggcgtaaacacctgctgcaaagtctgcgcaa
F C L W Y L L I S G G V T P A A N A A Q
cacgatgaccatggcagtacgtacttttgtttaactttaagaaggagatataccatgggc
H D D H G S T Y F C L T L R R R Y T M **G**
aggaagaagcggagacagcgacgaagaggccatatggctagcatgactgggtggacagcaa
TAT
R K K R R Q R R R G H M A S M T G G Q Q
atgggtcgaggatccgaggggtgacgatcccgcaaaagcggcctttgactccctgcaagcc
M G R G S E **G D D P A K A A F D S L Q A**
tcagcgaccgaatataatcggttatgctggtggcgatgggttgttcattgtcggcgcaact
pVIII
S A T E Y I G Y A W A M V V V I V G A T
atcggatatcaagctgtttaagaaattcacctcgaaagcaagctgataaaccgatgaattc
I G I K L F K K F T S K A S - - T D E F

Figura 7. Traducción en proteína de la secuencia del fagémido pG8TAT. Los sitios de restricción con los que se clonó TAT se encuentran subrayados, el primero es *Sna*B1 (TAC'GTA) y el segundo *Bam*H1 (G'GATCC). En la caja se observa la secuencia de aminoácidos del péptido TAT. La secuencia de la proteína VIII está encerrada dentro de la caja punteada.

7.2. Entrada del fago M13 a células de mamífero

Con la finalidad de conocer si el fago que no tiene el péptido TAT desplegado en su superficie puede entrar a células de mamífero, los fagos M13 se incubaron por tres horas con tres líneas celulares diferentes: Cos-1, HeLa y HepG2. En la Figura 5 se observan fagos en el interior de las células HeLa y también dentro de la célula Cos-1, pero no en las células HepG2 (Figura 8c). En la célula Cos-1 (Figura 8a) los fagos están agrupados en una zona anexa al núcleo, mientras que en las células HeLa (Figura 8b) se encuentran dispersos.

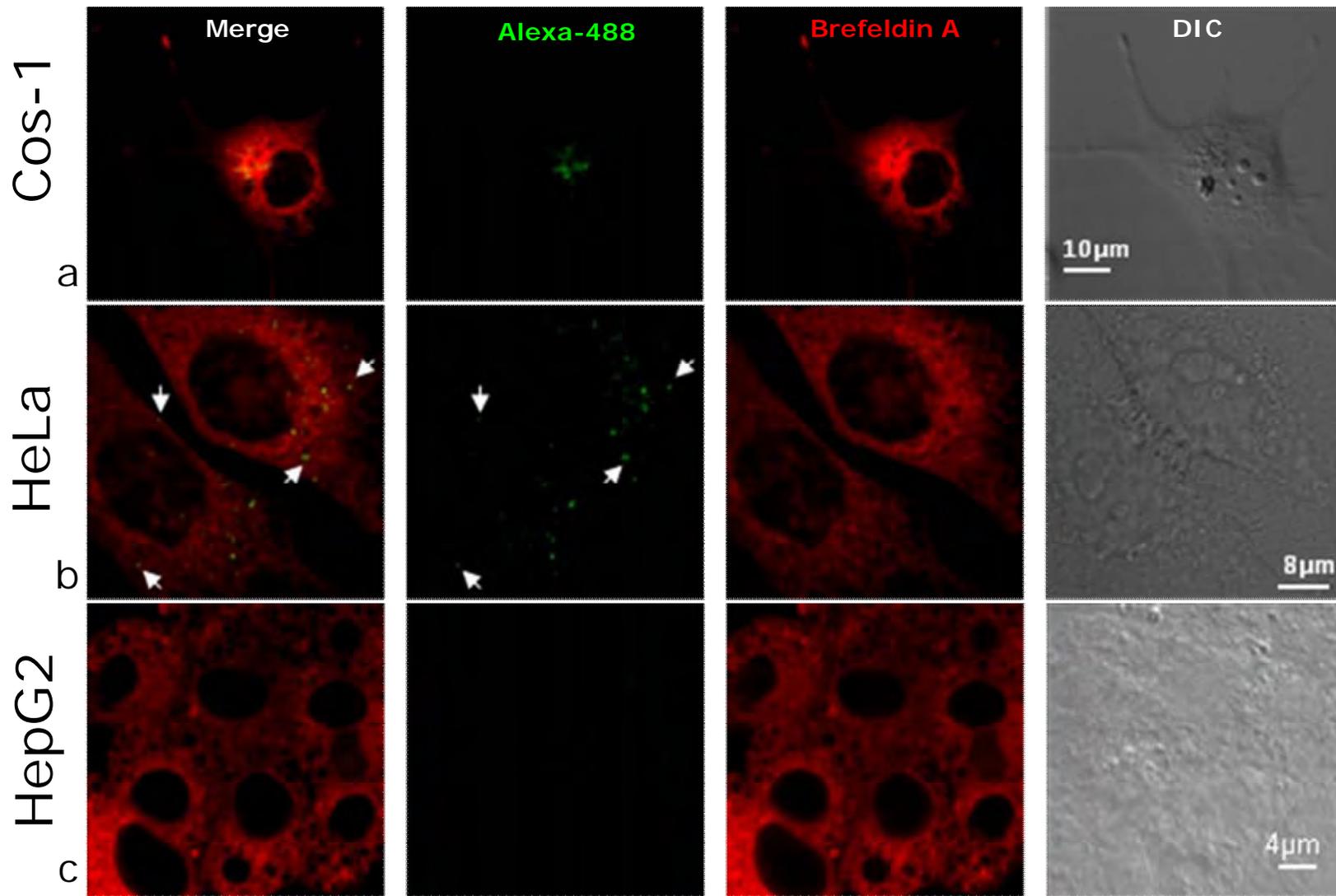


Figura 8. Localización de las partículas virales M13 marcadas con Alexa-488. Las células Cos-1, HepG2 y HeLa fueron incubadas durante 3h con 1×10^{10} partículas fágicas marcadas con el fluorocromo Alexa-488 (en verde). Las flechas indican los virus que se encuentran dentro de la célula (flecha) que co-localizan (puntos amarillos) con el marcador de retículo Brefeldin A (en rojo).

7.3 Unión y entrada de los fagos recombinantes M13TAT a células de mamífero

Con la finalidad de conocer si los fagos se unían a la membrana plasmática de células de mamífero, se utilizó el fago recombinante M13TAT-Alexa488. Dicho fago tiene fusionado el péptido TAT a la proteína pVIII de la cápside y está marcado con el fluorocromo verde Alexa-488. Las líneas celulares de mamífero HeLa y Cos-1 se trataron con 1.0×10^{10} ut del fago durante 30 min y 1 h, respectivamente. Posteriormente, las células se trataron con FM 4-64 (Invitrogen, Molecular Probes) a una concentración final de 1:520 para teñir la membrana plasmática. Finalmente, se analizaron utilizando un microscopio confocal.

En la Figura 9 se distingue la membrana plasmática teñida de rojo con FM 4-64 y en verde se puede ver la señal de los fagos marcados con Alexa 488. FM 4-64 es un colorante que se intercala en la membrana plasmática y después de un tiempo es internalizado en la célula por endocitosis (Vida y Emr, 1995). El fluorocromo Alexa-488 forma conjugados proteicos y se utiliza para marcar proteínas y así poder localizarlas. En la Figura 9a se observan fagos unidos a lo largo de la membrana plasmática de las células HeLa a los 30 min de incubación. También se señalan tres puntos (flechas) donde la densidad de fagos es mayor. En estos puntos los fagos se encuentran englobados en vesículas. Las Figuras 9b, 9c y 9d son acercamientos de la membrana plasmática donde se observan con mayor detalle las vesículas con fagos en su interior. La Figura 9e muestra que después de 1 h de incubación de los fagos con células Cos-1 se encontraron fagos en el interior de la célula. Los fagos se encuentran rodeados por una membrana (rojo) en lo que parecen ser endosomas de gran tamaño (1 μm de diámetro) o macropinosomas (flecha).

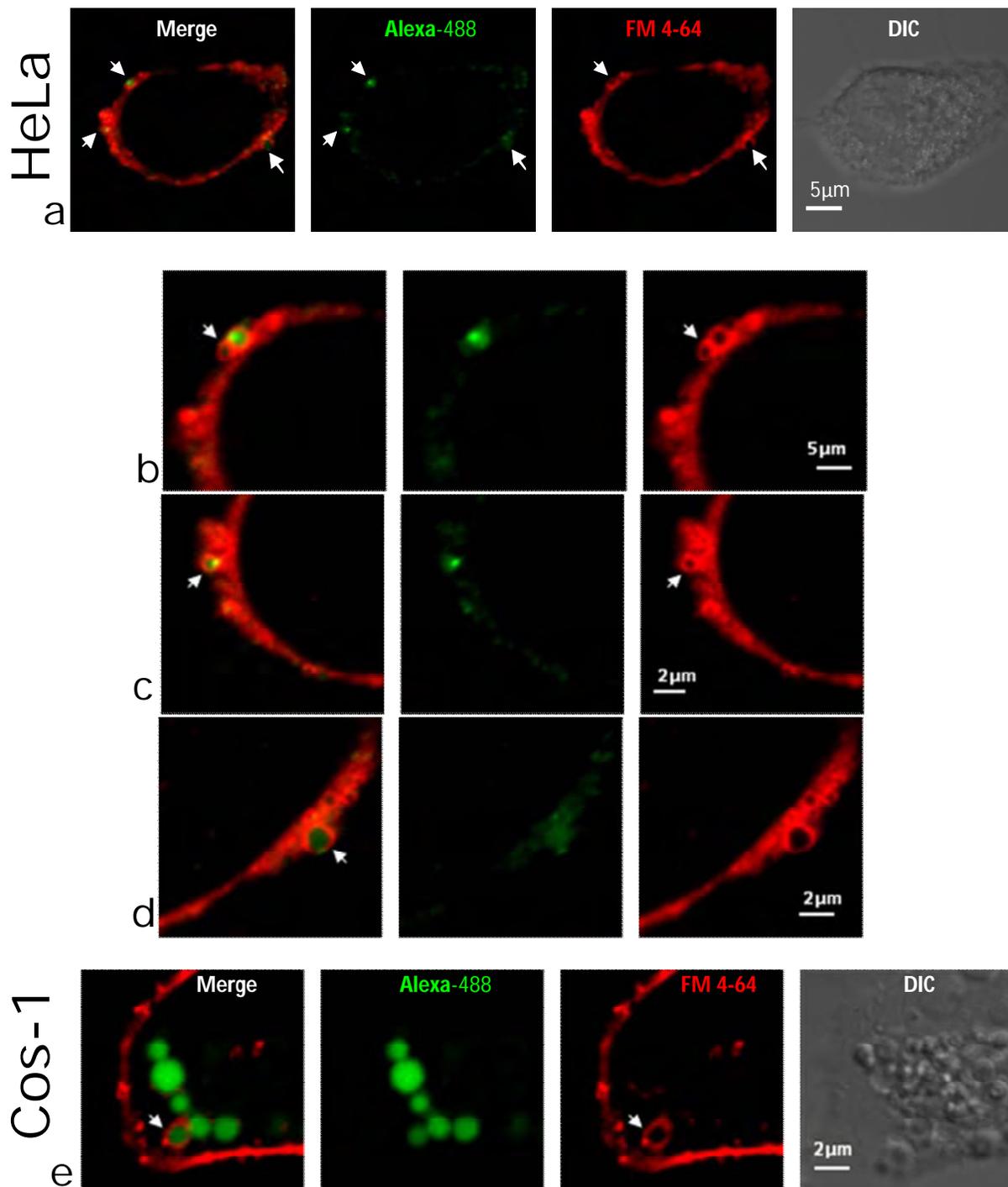


Figura 9. Unión y entrada de los fagos M13TAT-Alexa488 a células de mamífero. Las células HeLa y Cos-1 se trataron con 1.0×10^{10} ut del fago M13TAT-Alexa488 durante 30 min y 1 h, respectivamente. a) Se observan fagos (verde) unidos a lo largo de la membrana plasmática (rojo). Las flechas señalan tres puntos en donde la densidad de fagos es mayor. b), c) y d) Son acercamientos a la membrana plasmática de la célula en a) donde se observan con mayor detalle las vesículas que contienen fagos.

7.4 Localización intracelular del fago M13TAT

Para analizar la distribución del fago recombinante M13TAT en células de mamífero, células Cos-1 y HepG2 se incubaron con 1.0×10^{10} ut del fago M13TAT-Alexa488 por 2 y 3 h. Después se adicionó Brefeldin A para teñir el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi y se observaron bajo el microscopio confocal.

En las Figuras 10 y 11 se observa en rojo el citoplasma teñido por la Brefeldin A y en verde la señal de los fagos marcados con Alexa-488. La Brefeldin A es un metabolito fúngico que se une al aparato de Golgi y al retículo endoplásmico y se utiliza para el estudio del tráfico de proteínas (Klausner et al., 1992). Después de dos horas de incubación se pueden encontrar fagos (señal verde) en el interior de las células Cos-1 (Fig. 10a). Estos fagos se encuentran en vesículas redondas, muy cercanas al núcleo y de aproximadamente $1 \mu\text{m}$ de diámetro (flechas). En las células HepG2 hay mayor número de fagos en el interior de la célula (Fig. 10b). Los fagos están concentrados en vesículas cuya distribución es homogénea. La Figura 10c es el acercamiento a una célula HepG2. En esta figura se pueden ver fagos tanto dentro como fuera de la célula. Llama la atención una vesícula de aproximadamente $2 \mu\text{m}$ de diámetro que contiene una alta densidad de fagos e incluso se distingue en la imagen de contraste de fases (DIC).

Después de tres horas de tratamiento se observan fagos tanto dentro como fuera de la células en ambas líneas celulares (Figuras 11a y 11c). En la Figura 11b se observan tres conjuntos de gran densidad de fagos (flechas) muy cerca del núcleo e incluso uno de los conjuntos de fagos parece deformar la membrana nuclear (flecha derecha en BFA). También, en este caso, las vesículas se pueden apreciar en la señal transmitida (flechas). En la Figura 11d, que es un acercamiento de una célula HepG2, se observa una gran vesícula ($3 \mu\text{m}$ de diámetro) (flecha) que engloba fagos y está cerca de la membrana plasmática.

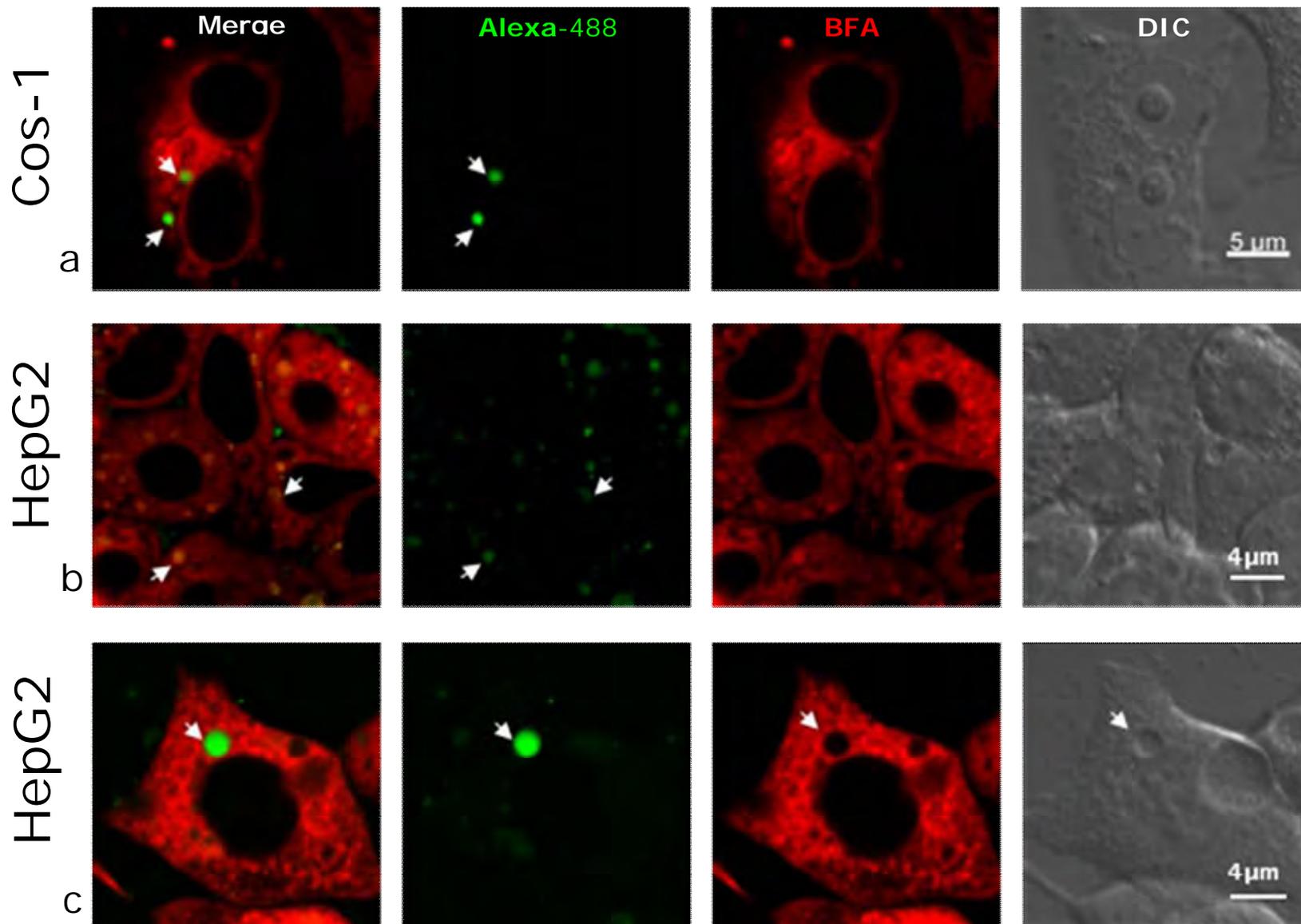


Figura 10. Entrada del fago recombinante M13TAT a células de mamífero *in vivo*. 2h de incubación. Imágenes tomadas después de 2 h de incubación con el fago. Se observa en rojo el citoplasma teñido por la Brefeldin A y en verde la señal de los fagos marcados con Alexa-488. Las flechas señalan vesículas cercanas al núcleo que contienen fagos.

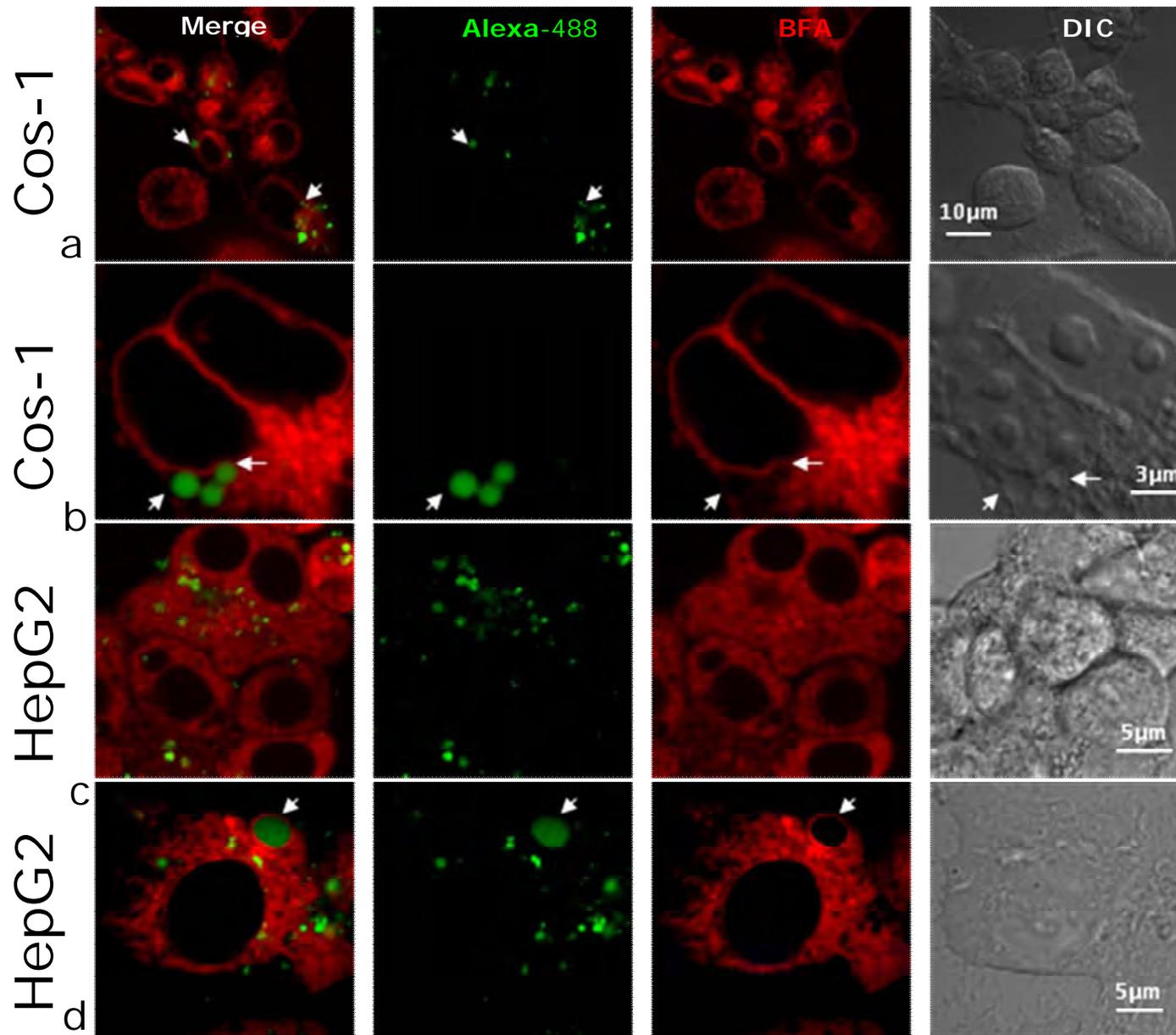


Figura 11. Entrada del fago recombinante M13TAT a células de mamífero *in vivo*. 3h de incubación. Imágenes tomadas después de 3 h de incubación con el fago. Se observa en rojo el citoplasma teñido por la Brefeldin A y en verde la señal de los fagos marcados con Alexa-488. Las flechas señalan vesículas que contienen fagos.

Para poder determinar si los fagos entraban al núcleo celular, se llevó a cabo un ensayo donde se trataron células HepG2 y HeLa por tres horas con 1×10^{10} ut del fago M13TAT- Alexa488. Posteriormente se fijaron las células y los núcleos se tiñeron con Rojo radiante.

En la Figura 12 se observan en rojo los núcleos teñidos por Rojo radiante. El colorante fluorescente Rojo radiante se utiliza para teñir ácidos nucleicos, en especial ARN. En verde se puede ver una gran cantidad de fagos distribuidos homogéneamente en el citoplasma tanto de células HeLa como de HepG2. No se observa co-localización entre los fagos y el núcleo.

7.5 Inmunofluorescencia

Para verificar que la señal verde observada en los experimentos correspondía a los fagos marcados con Alexa- 488 se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con células Cos-1. En el ensayo se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo producido en ratón dirigido a la proteína pVIII de la cápside del bacteriófago M13 y como anticuerpo secundario se añadió un anticuerpo acoplado a Alexa-594 contra ratón producido en cabra. Los núcleos se tiñeron con Rojo radiante.

En la Figura 13 se señalan con flechas algunos de los puntos donde hubo co-localización (azul claro) de la marca verde de los fagos y la marca del anticuerpo secundario (azul). Como se puede notar la señal con el anticuerpo secundario es mayor que la obtenida con el colorante fluorescente Alexa-488.

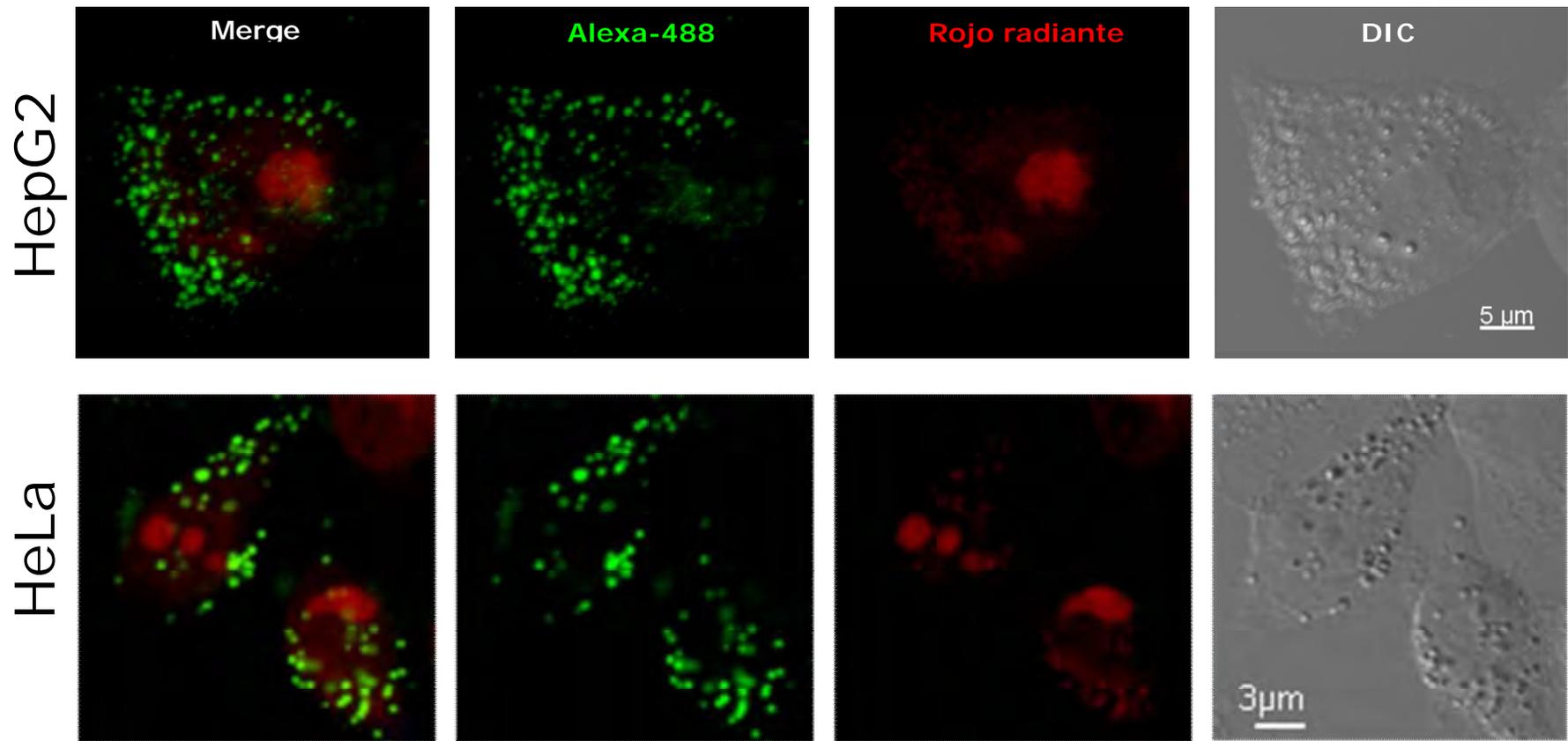


Figura 12. Ensayo con células fijadas y tinción de los núcleos con rojo radiante. Se trataron células HepG2 y HeLa por 3 h con 1×10^{10} ut del fago M13TAT- Alexa488 (en verde). Posteriormente se fijaron las células y los núcleos se tiñeron con Rojo radiante (en rojo). En verde se observan los fagos distribuidos homogéneamente en el citoplasma de ambos tipos celulares.

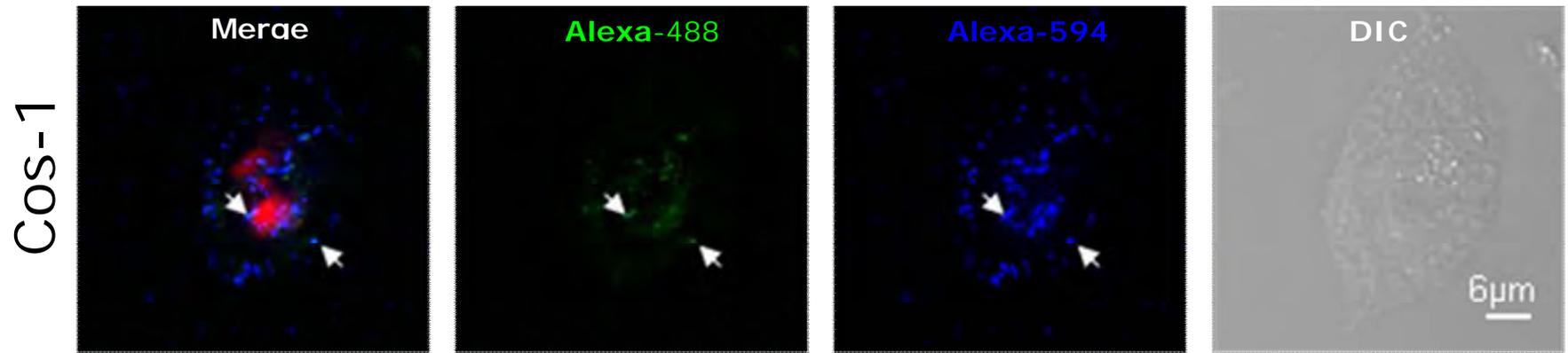


Figura 13. Ensayo de inmunofluorescencia. Las flechas señalan algunos puntos donde se observa la co-localización de la marca verde de los fagos y la marca del anticuerpo secundario (azul).

7.6 Producción de fagos para el análisis de transducción de células de mamífero

Con la finalidad de conocer si los fagos recombinantes M13TAT eran capaces de transducir células de mamífero se utilizó un casete de expresión que se clonó en el fagémido. El casete de expresión consistió de: el promotor de Citomegalovirus (CMV), el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH pA). El promotor de CMV es el promotor temprano del citomegalovirus (CMV-IE), el cual dirige altos niveles de expresión de proteínas en una amplia variedad de células de mamífero (Foecking y Hofstetter, 1986). Como gen reportero se utilizó el gen de la proteína verde fluorescente ("green fluorescent protein" ó GFP) porque su expresión puede ser observada fácilmente con un microscopio de fluorescencia o analizada mediante citometría de flujo. La señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH pA) le da estabilidad al ARN mensajero (Makrides, 1999). La construcción de los fagémidos con el casete de expresión de GFP se realizó como lo indica la Figura 6 en Materiales y Métodos. El procedimiento fue el mismo para los dos fagémidos: pG8SAET_CMVGFP y pG8TAT_CMVGFP.

Para conocer la orientación del casete de expresión en los fagémidos los enviamos a secuenciar a la Unidad de secuenciación antes mencionada. La secuenciación se hizo con el oligonucleótido SAET1. El análisis de las secuencias obtenidas muestra la secuencia de TAT en el fagémido pG8TAT_CMVGFP, y el gen de la proteína pVIII en ambos fagémidos (Figuras 14 y 15). También en ambos fagémidos se observa que el extremo del casete que tiene la señal de poliadenilación se encuentra adyacente al gen de la proteína pVIII. Por tanto, los resultados de secuenciación y análisis de la secuencia muestran que el casete de expresión se clonó en sentido contrario (-) al origen de replicación viral en ambos fagémidos.

pG8SAET_CMVGFP

AGAGCCTTGAATAATACTTGGGTGGCGTAACACCTGCTGCAAATGCTGCGCAACACGATGACCAT
GGCAGTAC**CGAGGGTGACGATCCCGCAAAGCGGCCTTTGACTCCCTGCAAGCCTCAGCG**
ACCGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTCGGCGCAACTATCGGT
ATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGCGATAAACCGATGAATTCACTGGCCG
TCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACAT
CCCCCTTTCGCCAGCTGGTTCTTTCCGCCTCAGAAGCCATAGAGCCCACCGCATCCCCAGCATGC
CTGCTATTGTCTTCCCAATCCTCCCCCTTGCTGTCCTGCCCCACCCACCCCCAGAATAGAATGA
CACCTACTCAGACAATGCG**ATGCAATTTCTCATT**TTATTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGG
CACCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCACGGGGGAGGGGCAAACAACAGATGGCTGGCAACTA
GAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGGGTTTAAACGGGCCGCTT**ACTTGTACAGCTCGTC**
CATGCCGAGAGTGATCCCGGCGGCGGT**CACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTT**
CTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCGGGCAGCA
GCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGAGCTGCACGCTG
CCGTCCTCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTCCG
CCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCC
GTCCTCCTGAAGTCGATGCCCTCAGCTCGATGCGGTTACCAGGGGTGTGCCCTCGAA
CTTACCTCGGCGCGGGTCTTGTAGTTTGCCGTCGTCCTTGAAGAAGATGGGTGCGCTCCTGG

Figura 14. Traducción en proteína del fagémido pG8SAET_CMVGFP. Los sitios de restricción relevantes están subrayados. En color azul se muestra el gen de la proteína VIII. En anaranjado está marcada la secuencia de la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina y en seguida se observa un fragmento del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) marcado en color verde. El extremo del casete que tiene la señal de poliadenilación se encuentra adyacente al gen de la proteína VIII, por lo tanto el casete de expresión se clonó en sentido contrario (-) al origen de replicación viral.

pG8TAT_CMVGFP

GCTCTGCAACTTTGGGTA CTTACTTATATCTGGTGGCGTAACACCTGCTGCAAATGCTGCGCAAC
ACGATGACCATGGCAGTACgtacttttgtttaactttaagaaggagatatacc **ATGGGCAGGAAGAAGCGG**
AGACAGCGACGAAGAggccatatggctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgaggaTC**CGAGGGTGA**
CGATCCCGCAAAGCGGCCTTTGACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTA
TGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTCGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAA
ATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGATGAAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGA
CTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGT
TCTTTCCGCCTCAGAAGCCATAGAGCCCACCGCATCCCAGCATGCCTGCTATTGTCTTCCAAT
CCTCCCCCTTGCTGTCCTGCCCCACCCACCCCCAGAATAGAATGACACCTACTCAGACAATGC
GATGCAATTTCTCATT
TTATTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGGCACCTTCCAGGGTCAAG
GAAGGCACGGGGGAGGGGCAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGG
CTGATCAGCGGGTTTAAACGGGCCGCTT**ACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATC**
CCGGCGGGCGTACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTG
CTCAGGGCGGACTGGGTGCTCACGTAGTGGTTGTCGGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGAT
GGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGAGCTGCACGCTGCCGTCTCGATGTTGTGGCGGATC

Figura 15. Traducción en proteína del fagémido pG8TAT_CMVGFP. Los sitios de restricción relevantes están subrayados. En rojo se observa la secuencia de TAT y enseguida la del gen de la proteína VIII en azul. En anaranjado está marcada la secuencia de la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina y en verde un fragmento del gen de la proteína verde fluorescente. Al igual que en el fagémido anterior, el casete de expresión se clonó en sentido contrario al origen de replicación viral (-).

Para comprobar la funcionalidad del casete de expresión de los fagémidos pG8SAET_CMVGFP y pG8TAT_CMVGFP, éstos fueron transfectados en células HeLa. Luego de 24 h de incubación las células se observaron en el microscopio confocal. Como se observa en la Figura 16, ambos fagémidos poseían un casete de expresión funcional puesto que hay células verdes.

La eficiencia de transducción de células de mamífero se determinó por citometría de flujo. El porcentaje de células GFP positivas que se obtuvo fue bajo, tanto para el tratamiento con el fago control M13 como con el fago recombinante M13TAT. Por lo anterior decidimos utilizar distintos compuestos químicos que actuando en etapas diferentes del proceso de transducción permitieran ubicar el paso limitante de la transducción.

El butirato de sodio (ButNa) es un inhibidor de desacetilasas de histonas que se ha utilizado para estimular la transcripción viral en células de mamífero (Balakrishnan y Milavetz, 2008). El tratamiento con este inhibidor no tuvo un efecto considerable en el número de células GFP positivas y resultó tóxico para las células bajo las condiciones experimentales.

La cloroquina es un compuesto que desestabiliza los endosomas, evitando su acidificación, y libera su contenido (Seglen et al., 1979). El tratamiento con cloroquina no elevó los niveles de expresión de GFP y también tuvo un efecto citotóxico bajo las condiciones experimentales (Figura 17).

La camptotecina es inhibidor de la topoisomerasa I. Se ha demostrado que facilita la conversión de ADN de cadena sencilla a cadena doble y mediante este mecanismo mejora la transducción con virus de cadena sencilla, como el virus adenoasociado (Alexander et al., 1994) y el fago filamentoso M13 (Burg et al., 2002). El tratamiento con camptotecina incrementó el número de células GFP positivas tanto para M13 como para M13TAT (Figura 17).

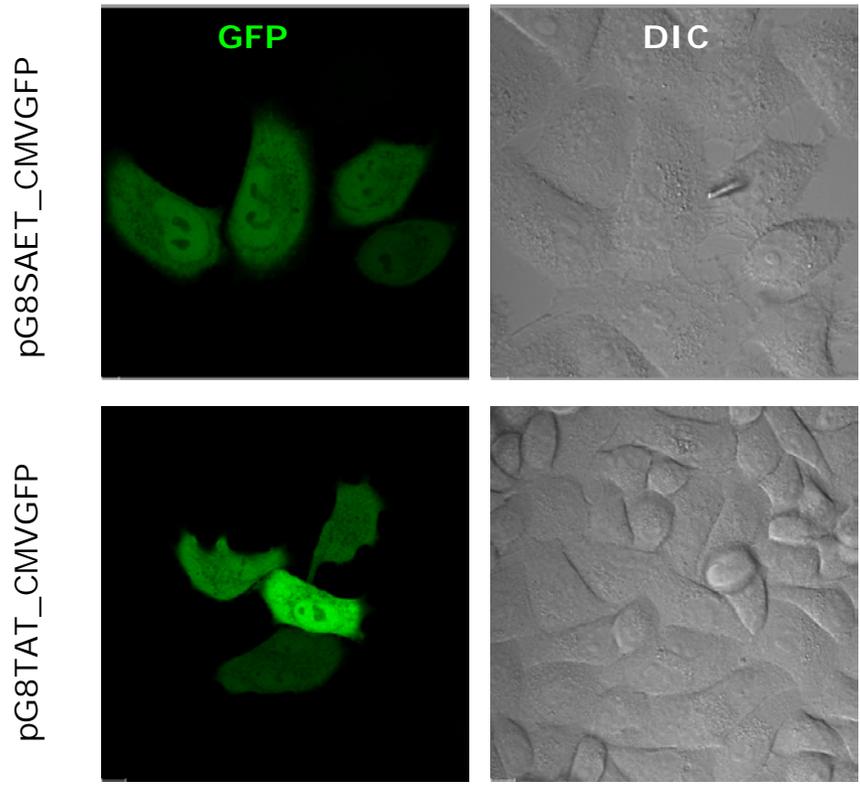


Figura 16. Expresión de GFP en células HeLa transfectadas con los fagémidos pG8SAET_CMVGFP (arriba) y pG8TAT_CMVGFP (abajo).

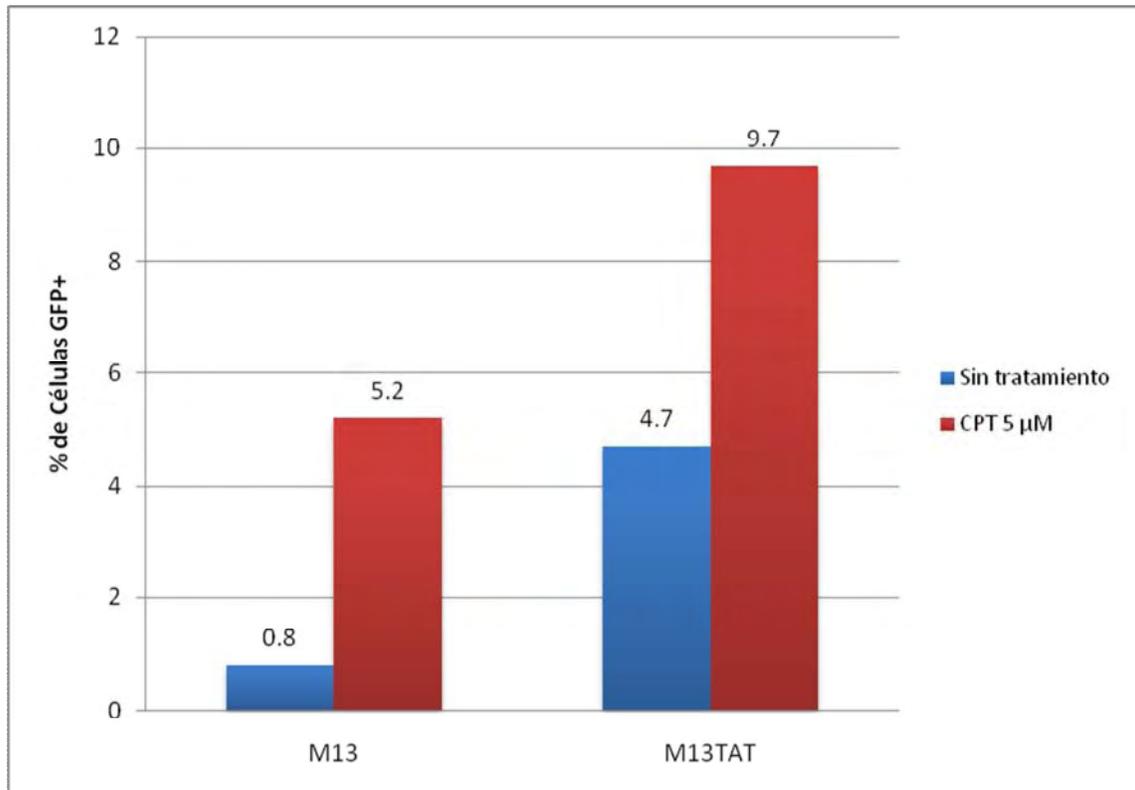


Figura 17. Transducción de células de Cos-1 con los fagos M13 y M13TAT. El número de eventos analizados fue de 5000 y se restaron los controles celulares. CPT, camptotecina.

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La búsqueda de mejores vectores para la transferencia de material genético a células de mamífero ha llevado a la exploración de virus distintos a los de mamífero como una alternativa que supere los obstáculos de los vectores más utilizados: los vectores derivados de virus de mamíferos. Se propuso que los bacteriófagos podían constituir un buen vehículo para el transporte de material genético porque consisten, como los demás virus, de un esqueleto proteico que protege al material genético en su interior. Además, los bacteriófagos no producirían proteínas virales que provoquen una respuesta inmunológica muy fuerte y serían incapaces de replicarse en células de mamífero. Se hicieron diversos estudios para evaluar el potencial de los bacteriófagos como vectores y se observó que la eficiencia de transducción era muy baja, por lo que se procedió a modificarlos química y genéticamente para mejorar su eficiencia de transducción. En este estudio, nosotros utilizamos la técnica de despliegue en fagos para modificar al bacteriófago M13 y analizamos su entrada a células de mamífero así como también evaluamos su eficiencia de transducción. La modificación del bacteriófago M13 consistió en desplegar el péptido TAT como fusión a la proteína de la cápside de mayor abundancia, la proteína pVIII. El péptido TAT es un segmento (aminoácidos del 47 al 57) de la proteína Tat del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) que se caracteriza por su alta capacidad para transducir células de mamífero.

Decidimos utilizar la proteína pVIII para el despliegue del péptido TAT porque este sistema permite el despliegue del péptido en múltiples copias de la proteína de la cápside, lo cual facilitaría la interacción entre el fago y la célula.

El título de los fagos recombinantes M13TAT fue 100 veces menor al obtenido en la producción de los fagos no modificados (M13). Para obtener

títulos suficientes (1×10^{13} ut) para realizar los experimentos, se tuvo que modificar el protocolo de amplificación: se incrementaron los volúmenes de los cultivos, así como también la cantidad de fago auxiliar adicionada.

Con la finalidad de conocer si el fago sin modificar era capaz de entrar a células de mamífero lo incubamos con tres líneas celulares diferentes: HeLa, HepG2 y Cos-1. Este fago difiere del fago silvestre M13 en su longitud y el ADN en su interior. Es más corto porque el material genético que encapsida es el del fagémido (3395 nucleótidos) y no el genoma viral completo (6407 nucleótidos). Los resultados indican que éste es capaz de entrar a las células de mamífero HeLa y Cos-1, aunque no sabemos cuál es su eficiencia de entrada. En experimentos previos no se habían observado fagos sin modificar que fueran capaces de entrar a las células de mamífero, quizás porque los métodos de detección empleados no eran tan sensibles como la microscopía confocal (Larocca et al., 2002).

El fago M13TAT se une a la membrana plasmática de células de mamífero y se concentra en vesículas de gran tamaño

Después evaluamos la unión de los fagos recombinantes M13TAT a las células de mamífero. Observamos que los fagos se unían a la superficie celular y en algunas zonas de la membrana citoplasmática se formaban vesículas cuyo tamaño era de $1.03 \pm 0.36 \mu\text{m}$ ($n = 25$). Se ha demostrado que el mecanismo de entrada del péptido TAT consiste en su interacción con la superficie celular y la estimulación de la macropinocitosis para su posterior inclusión en vesículas de gran tamaño, los macropinosomas (Gump y Dowdy, 2007). Estas vesículas se asemejan a las observadas por nosotros después de 30 min de la adición de los virus. Los datos sugieren que la entrada de los fagos recombinantes M13TAT a las células está mediada por TAT porque involucra la interacción con la membrana plasmática para la formación de las vesículas y la consecuente internalización como se observa en la Figura 9e.

El fago M13TAT se distribuye en vesículas dentro de las células

Posteriormente analizamos la distribución de los fagos M13TAT en células Cos-1 y HepG2 en dos tiempos (2 h y 3 h) posteriores a la adición de los fagos a las células. Encontramos que luego de dos horas de incubación los fagos se localizaban principalmente en vesículas cuya distribución era homogénea. La cantidad de vesículas en el interior de las células HepG2 era mayor que la de las células Cos-1. La distribución punteada de los fagos M13TAT en el interior de las células Cos-1 y HepG2 se asemeja a la observada por otros que han estudiado el tráfico intracelular del péptido TAT (Potocky, Menon, y Gellman, 2003; Wadia et al., 2004).

Entrada del fago M13TAT al núcleo de células de mamífero

Para conocer si el fago M13TAT podía llegar al núcleo de las células se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en el cual los núcleos celulares se tiñeron con Rojo radiante y se utilizaron los fagos marcados con Alexa-488, M13TAT- Alexa488. No se observó co-localización entre los fagos y el núcleo de las células. El hecho de que no se observen fagos en el núcleo no significa que estos no lo alcancen. Se debe recordar que la marca que utilizamos para rastrearlos se une a las proteínas de la cápside y puede que el fago no entre por sí mismo al núcleo sino que se desensamble en el macropinosoma y sólo el material genético entre al núcleo. Así que es mejor determinar la eficiencia de transducción.

Eficiencia de transducción de células de mamífero por el fago M13TAT

Determinamos el número de células transducidas en función de las células que expresaron el producto del gen reportero, la proteína verde fluorescente (GFP). Los niveles de expresión obtenidos fueron bajos (4.7%) por lo que utilizamos compuestos químicos que por diferentes mecanismos se sabe que aumentan los niveles de transducción viral.

El butirato de sodio inhibe las desacetilasas de histonas con lo cual evita el posible silenciamiento del gen reportero. El butirato de sodio a la concentración empleada en este ensayo (5 mM) no incrementó los niveles de expresión y resultó tóxico para las células.

Diversos estudios han demostrado que una fracción importante de los péptidos que penetran células (CPPs) en su camino al núcleo queda atrapada en endosomas y es degradada (Shiraishi y Nielsen, 2006). La cloroquina se ha utilizado con éxito para incrementar los niveles de expresión de células transducidas por el péptido TAT (Wadia et al., 2004). En las imágenes del fago M13TAT dentro de las células lo observamos contenido en vesículas y sugerimos que entraba a la célula por la misma vía que lo hace el péptido TAT, por lo tanto pensamos que la desestabilización de los endosomas provocaría un aumento en el número de fagos que podían acceder al núcleo. Bajo las condiciones experimentales la cloroquina no aumentó los niveles de expresión del gen reportero y produjo un efecto tóxico para las células.

Estudios recientes indican que el paso limitante en la expresión genética mediada por el virus adeno-asociado es la conversión de ADN de cadena sencilla a ADN de cadena doble (Prasad et al., 2007). Se ha comprobado que la conversión de ADN de cadena sencilla a cadena doble también es un paso limitante en la transducción de células de mamífero mediada por fago filamentoso. El uso de CPT incrementó en un 45% los niveles de transducción de células de carcinoma humano por un fago M13 que despliega el factor de crecimiento epidermal como fusión de la proteína pIII (Burg et al., 2002). Las células tratadas con camptotecina 5 μ M presentaron mayores niveles de expresión de GFP que las células no tratadas. La eficiencia de transducción del fago M13TAT sin tratamiento fue del 4.7% y con la camptotecina se incrementó al 9.7%.

El péptido TAT ha sido utilizado con éxito para el mejoramiento de la eficiencia de transducción de otros virus (Eguchi et al., 2001; Han et al., 2007; Kurachi et al., 2007). Se utilizó la tecnología de despliegue en fagos para modificar el bacteriófago Lamda desplegando en la proteína D de la cápside el péptido TAT. El fago recombinante transdujo células Cos-1 con una eficiencia del 30% luego de 48 horas de incubación (Eguchi et al., 2001). Así mismo, se generó un adenovirus que presentaba el péptido TAT fusionado a la fibra por medio de la cual infecta células que tengan el receptor CAR (receptor de adenovirus y coxsackaevirus). Este virus modificado fue capaz de infectar de manera eficiente células que no expresaban el receptor CAR (Han et al., 2007; Kurachi et al., 2007).

Recientemente se encontró que la proteína pVIII del fago filamentoso fd se une a la señal de localización nuclear del péptido TAT e inhibe la capacidad del péptido de penetrar y transducir células de mamífero (Krichevsky et al., 2005). Por tanto es posible que los bajos niveles de transducción observados se deban a que se forme una asociación entre el péptido TAT y la proteína pVIII del fago M13.

IX. CONCLUSIONES

- El fago M13 sin modificar es capaz de entrar a las células de mamífero HeLa y Cos-1.
- El análisis de la entrada del fago recombinante M13TAT a células de mamífero sugiere que la entrada del fago M13TAT a células de mamífero está mediada por el péptido TAT.
- La eficiencia de transducción del fago M13TAT fue baja (4.7%) pero mayor a la del fago M13 (0.8%) y el tratamiento con camptotecina la incrementó a 9.7%.

X. PERSPECTIVAS

Estudios recientes han demostrado que la eficiencia de la transducción en células de mamífero utilizando fagos es baja comparada con la de los vectores virales, sin embargo, es similar a la obtenida con vectores no virales (1-10%). Nosotros pensamos que una forma de mejorar la eficiencia de transducción es que el casete de expresión que transporta el fago se integre en el genoma de la célula transducida. Actualmente nos encontramos en la fase de construcción de un fagémido que contenga el casete de expresión de GFP flanqueado por las secuencias ITR (Inverted Terminal Repeat) del virus adeno-asociado. Estas secuencias dirigen la integración del casete de expresión en el genoma de la célula transducida, con lo cual se logra la expresión estable del gen.

Con el objetivo de mejorar la eficiencia de transducción del bacteriófago M13 se ha aprovechado la tecnología de despliegue en fagos y se le han hecho modificaciones en las dos principales proteínas de la cápside, pIII y pVIII. Las modificaciones consisten en añadir a la cápside una molécula que sirva como ligando de un receptor celular o simplemente un péptido que penetre células con facilidad. Al parecer en el contexto del fago M13 las características que hacen de TAT un dominio proteico de transducción se encuentran inhibidas. Un estudio sugiere que la similitud de las secuencias de pVIII y TAT es lo que provoca su interacción. Por otro lado, en un estudio donde mutaron ciertas bases de la secuencia del péptido TAT en busca de mejorar sus propiedades como dominio proteico de transducción encontraron dos péptidos cuya capacidad de penetrar en células de mamífero era mayor que la del péptido TAT (Kamada et al., 2007). Pensamos que se podría probar si la transducción de células de mamífero con fagos que desplieguen estos péptidos es bloqueada por pVIII. Así mismo, estamos generando un fagémido para la producción de un fago que

despliegue la proteína Gp64, responsable de la entrada del baculovirus en células de mamífero, en su superficie.

XII. APÉNDICE

Bacterias competentes por cloruro de rubidio

1. La cepa bacteriana DH5 α , TOP10 ó HB101 se siembra en 5 mL de medio LB sin antibióticos y se deja incubando con agitación constante toda la noche a 37 °C.
2. Frente al mechero, se toma una alícuota de 1 mL de la cepa crecida durante toda la noche y se resiembra en 100 mL de LB. Se incuba con movimiento hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 0.6 a 630 nm. (Nota: emplear como blanco el medio LB solo).
3. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, se centrifuga a 4000 rpm x 10 minutos a 4 °C, y se desecha el sobrenadante.
4. Resuspender frente al mechero en 15 mL de TFB1.
5. Incubar en hielo por 20 minutos.
6. Centrifugar a 4000 rpm x 10 minutos a 4 °C, y se desecha el sobrenadante.
7. Resuspender frente al mechero en 4 mL de TFB2.
8. Incubar en hielo por 20 minutos.

Distribuir en ALICUTOAS DE 200 μ L cada una y almacenar a -70 °C. La posterior descongelación se realiza en hielo.

TFB1	100 mL	TFB2	100 mL
RbCl	1.2 g	MOPS	2 mL de stock 0.5 M pH 6.8
MnCl \cdot 4 $_2$ O	0.99 g	RbCl	0.12 g
AcK	3 mL de stock 1M pH 7.5	CaCl $_2$ \cdot 2H $_2$ O	1.1 g
CaCl $_2$ \cdot 2H $_2$ O	0.15 g	Glicerol	11.9 mL ó 15 g
Glicerol	11.9 mL ó 15 g	Aforar con H $_2$ O a	100 mL
Aforar con H $_2$ O a	100 mL		

Ajustar TBF1 a pH 5.8 con ác. Acético 0.2 M

Producción de fagos M13

1. Transformar bacterias TG1 con el fagémido.
2. Sembrar las bacterias transformadas e incubar a 37 °C por 18 h.
3. Tomar una colonia e inocular 4 mL de LB con ampicilina.
4. Incubar a 37 °C con agitación hasta que alcance una D.O. de 0.7 a 1.0.
5. Agregar al cultivo 10 MOIS de fago auxiliar M13K07.
6. Incubar a 37 °C sin agitación por 30 min y con agitación por 30 min.
7. Inocular con este cultivo 100 mL de medio 2YT con ampicilina y kanamicina.
8. Incubar a 30 °C con agitación por 20 h aproximadamente.
9. Centrifugar el cultivo a 8,000 rpm por 20 min en tubos de policarbonato estériles (25 mL de cultivo/tubo).
10. Transferir el sobrenadante a tubos iguales en frío.
11. Agregar a cada tubo 1/6 del volumen de la sol. 20% de PEG/NaCl 2.5 M.
12. Dejar precipitando a 4 °C por toda la noche.
13. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 min a 4 °C.
14. Retirar todo el sobrenadante (usar una pipeta si es necesario).
15. Volver a centrifugar para asegurarse de retirar todo el líquido.
16. Agregar 20 µL de PBS a cada tubo cubriendo el pellet y dejarlos en hielo por 10 min.
17. Resuspender el pellet de cada tubo sin tocarlo.
18. Agregar 200 µL de PBS a uno de los tubos y mezclar con la pipeta.
19. Pasar todo el volumen de este tubo a cada uno de los tubos para concentrar todos los fagos en un solo tubo.
20. Conservar a 4 °C.

Marcaje de fagos M13 con Alexa-488

1. Transferir un volumen de suspensión de fagos equivalente a $1 \times 10^{12-13}$ ut a un tubo de microcentrífuga.
2. Agregar 0.3 volúmenes de una solución fría (4 °C) de PEG/NaCl (20% p/v, polietilenglicol (PEG) 8000/2.5M NaCl). Mezclar y dejar que el fago precipite por 1 h en hielo. Se obtienen mejores resultados si se deja precipitando toda la noche a 4 °C.
3. Centrifugar a 8000 rpm por 30 min en el mismo tubo a 4 °C. Retirar la mayor cantidad posible de sobrenadante y resuspender el botón en 50 μ L de una solución amortiguadora de bicarbonato de sodio 1 M.
4. Agregar 25 μ L de una solución "stock" de Alexa-488 10 mg/mL.
5. Ajustar el volumen a 100 μ L con la solución amortiguadora de bicarbonato de sodio. Permitir que la reacción transcurra por lo menos 1 h a temperatura ambiente, en la obscuridad y con agitación constante.
6. Separar los conjugados del fluorocromo que no reaccionó precipitando dos veces con PEG/NaCl cómo en el punto 2 de este protocolo.
7. Resuspender los fagos marcados en 100 μ L de solución balanceada de Hank con CaCl_2 1 mM y MgCl_2 .

Inmunofluorescencia de fago M13

Sembrar las células de mamífero (2×10^4 células HepG2 o 1×10^4 células HeLa) en sistemas de portaobjetos con cámara Lab- Tek II (Lab-Tek II Chamber Slide, Nalgene) e incubar por 48 h.

1. Lavar los portaobjetos dos veces con PBS a temperatura ambiente (T.A.).
2. Incubar con paraformaldehído 4% en PBS a T.A. por 10 min.
3. Hacer dos lavados de 5 min con PBS a T.A.
4. Permeabilizar con una solución de Tritón X-100/PBS 0.1% recién preparada por 20 min a T.A.
5. Hacer dos lavados de 5 min con PBS a T.A.
6. Incubar los portaobjetos con una solución BSA/PBS 3% por 60 min a T.A.
7. Preparar diluciones del anticuerpo primario en BSA/PBS 3% (anticuerpos anti-M13 o anti-pVIII o suero anti-M13).
8. Adicionar el anticuerpo primario diluido e incubar por 2 h o bien durante toda la noche a 4 °C.
9. Hacer dos lavados de 5 min con PBS a T.A.
10. Preparar diluciones del anticuerpo secundario en BSA/PBS 3%.
11. Adicionar el anticuerpo secundario e incubar por 1 h a T.A. en la oscuridad.
12. Hacer dos lavados de 5 min con PBS a T.A.

Para la tinción de los núcleos con DAPI:

13. Adicionar una solución de DAPI de 5 µg/mL en PBS e incubar por 15 min.
14. Hacer dos lavados de 5 min con PBS a T.A.
15. Dejar secar los portaobjetos lejos de la luz directa.
16. Montar con suficiente medio de montaje (DABCO) para cubrir las células.
17. Guardar los portaobjetos a -20 °C en la oscuridad.

PBS= Buffer salino de fosfatos

BSA= Albúmina sérica bovina

DAPI= 4, 6-diamino-2-fenilindol

DABCO= 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octano

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell* (4th ed.). New York: Garland Science.
- Alexander, I. E., Russell, D. W., y Miller, A. D. (1994). DNA-damaging agents greatly increase the transduction of nondividing cells by adeno-associated virus vectors. *J Virol*, 68(12), 8282-8287.
- Arap, M. A. (2005). Phage display technology: applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*, 28, 1-9.
- Balakrishnan, L., y Milavetz, B. (2008). HDAC inhibitors stimulate viral transcription by multiple mechanisms. *Virology*, 5, 43.
- Barbas, C. F. (2001). *Phage display : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Baron, S. (1996). *Medical microbiology* (4th ed.). Galveston, Tex.: University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Boyce, F. M., y Bucher, N. L. (1996). Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(6), 2348-2352.
- Burg, M. A., Jensen-Pergakes, K., Gonzalez, A. M., Ravey, P., Baird, A., y Larocca, D. (2002). Enhanced phagemid particle gene transfer in camptothecin-treated carcinoma cells. *Cancer Res*, 62(4), 977-981.
- Caron, N. J., Quenneville, S. P., y Tremblay, J. P. (2004). Endosome disruption enhances the functional nuclear delivery of Tat-fusion proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 319(1), 12-20.
- Clark, J. R., y March, J. B. (2006). Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends Biotechnol*, 24(5), 212-218.
- Claros, G., Saladrigas, M. V., y González-Halphen, D. (2004). Vocabulario inglés-español de bioquímica y biología molecular (5° entrega). *Panace@*, 5(16), 109-126.
- Corey, D. R., Shiau, A. K., Yang, Q., Janowski, B. A., y Craik, C. S. (1993). Trypsin display on the surface of bacteriophage. *Gene*, 128(1), 129-134.
- Di Giovine, M., Salone, B., Martina, Y., Amati, V., Zambruno, G., Cundari, E., et al. (2001). Binding properties, cell delivery, and gene transfer of

- adenoviral penton base displaying bacteriophage. *Virology*, 282(1), 102-112.
- Durai, R., Yang, S. Y., Seifalian, A. M., y Winslet, M. C. (2008). Principles and applications of gene therapy in colon cancer. *J Gastrointestin Liver Dis*, 17(1), 59-67.
- Eguchi, A., Akuta, T., Okuyama, H., Senda, T., Yokoi, H., Inokuchi, H., et al. (2001). Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *J Biol Chem*, 276(28), 26204-26210.
- Foecking, M. K., y Hofstetter, H. (1986). Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene*, 45(1), 101-105.
- Frankel, A. D., y Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6), 1189-1193.
- Gao, X., Kim, K. S., y Liu, D. (2007). Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *Aaps J*, 9(1), E92-104.
- Green, M., y Loewenstein, P. M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*, 55(6), 1179-1188.
- Greenwood, J., Willis, A. E., y Perham, R. N. (1991). Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from Plasmodium falciparum circumsporozoite protein as antigens. *J Mol Biol*, 220(4), 821-827.
- Gump, J. M., y Dowdy, S. F. (2007). TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends Mol Med*, 13(10), 443-448.
- Gupta, B., Levchenko, T. S., y Torchilin, V. P. (2005). Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(4), 637-651.
- Han, T., Tang, Y., Ugai, H., Perry, L. E., Siegal, G. P., Contreras, J. L., et al. (2007). Genetic incorporation of the protein transduction domain of Tat into Ad5 fiber enhances gene transfer efficacy. *Virol J*, 4, 103.
- Hart, S. L., Knight, A. M., Harbottle, R. P., Mistry, A., Hunger, H. D., Cutler, D. F., et al. (1994). Cell binding and internalization by filamentous phage displaying a cyclic Arg-Gly-Asp-containing peptide. *J Biol Chem*, 269(17), 12468-12474.

- Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P., y Strauss, M. (1995). Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(22), 10099-10103.
- Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P., y Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res*, 19(15), 4133-4137.
- Kamada, H., Okamoto, T., Kawamura, M., Shibata, H., Abe, Y., Ohkawa, A., et al. (2007). Creation of novel cell-penetrating peptides for intracellular drug delivery using systematic phage display technology originated from Tat transduction domain. *Biol Pharm Bull*, 30(2), 218-223.
- Kaplan, I. M., Wadia, J. S., y Dowdy, S. F. (2005). Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control Release*, 102(1), 247-253.
- Kehoe, J. W., y Kay, B. K. (2005). Filamentous phage display in the new millennium. *Chem Rev*, 105(11), 4056-4072.
- Klausner, R. D., Donaldson, J. G., y Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol*, 116(5), 1071-1080.
- Krichevsky, A., Rusnati, M., Bugatti, A., Waigmann, E., Shohat, S., y Loyter, A. (2005). The fd phage and a peptide derived from its p8 coat protein interact with the HIV-1 Tat-NLS and inhibit its biological functions. *Antiviral Res*, 66(1), 67-78.
- Ku, J., y Schultz, P. G. (1995). Alternate protein frameworks for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(14), 6552-6556.
- Kurachi, S., Tashiro, K., Sakurai, F., Sakurai, H., Kawabata, K., Yayama, K., et al. (2007). Fiber-modified adenovirus vectors containing the TAT peptide derived from HIV-1 in the fiber knob have efficient gene transfer activity. *Gene Ther*, 14(15), 1160-1165.
- Larocca, D., y Baird, A. (2001). Receptor-mediated gene transfer by phage-display vectors: applications in functional genomics and gene therapy. *Drug Discov Today*, 6(15), 793-801.
- Larocca, D., Burg, M. A., Jensen-Pergakes, K., Ravey, E. P., Gonzalez, A. M., y Baird, A. (2002). Evolving phage vectors for cell targeted gene delivery. *Curr Pharm Biotechnol*, 3(1), 45-57.

- Larocca, D., Kassner, P. D., Witte, A., Ladner, R. C., Pierce, G. F., y Baird, A. (1999). Gene transfer to mammalian cells using genetically targeted filamentous bacteriophage. *Faseb J*, 13(6), 727-734.
- Larocca, D., Witte, A., Johnson, W., Pierce, G. F., y Baird, A. (1998). Targeting bacteriophage to mammalian cell surface receptors for gene delivery. *Hum Gene Ther*, 9(16), 2393-2399.
- Loser, P., Huser, A., Hillgenberg, M., Kumin, D., Both, G. W., y Hofmann, C. (2002). Advances in the development of non-human viral DNA-vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther*, 2(2), 161-171.
- Luz-Madrigal, A., Clapp, C., Aranda, J., y Vaca, L. (2007). In vivo transcriptional targeting into the retinal vasculature using recombinant baculovirus carrying the human flt-1 promoter. *Virology*, 4, 88.
- Makrides, S. C. (1999). Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. *Protein Expr Purif*, 17(2), 183-202.
- Malik, P., Terry, T. D., Gowda, L. R., Langara, A., Petukhov, S. A., Symmons, M. F., et al. (1996). Role of capsid structure and membrane protein processing in determining the size and copy number of peptides displayed on the major coat protein of filamentous bacteriophage. *J Mol Biol*, 260(1), 9-21.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., y Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348(6301), 552-554.
- McCafferty, J., Jackson, R. H., y Chiswell, D. J. (1991). Phage-enzymes: expression and affinity chromatography of functional alkaline phosphatase on the surface of bacteriophage. *Protein Eng*, 4(8), 955-961.
- Mullen, L. M., Nair, S. P., Ward, J. M., Rycroft, A. N., y Henderson, B. (2006). Phage display in the study of infectious diseases. *Trends Microbiol*, 14(3), 141-147.
- Muller, Y. A., Li, B., Christinger, H. W., Wells, J. A., Cunningham, B. C., y de Vos, A. M. (1997). Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(14), 7192-7197.
- Niidome, T., y Huang, L. (2002). Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther*, 9(24), 1647-1652.

- Potocky, T. B., Menon, A. K., y Gellman, S. H. (2003). Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells. *J Biol Chem*, 278(50), 50188-50194.
- Poul, M. A., y Marks, J. D. (1999). Targeted gene delivery to mammalian cells by filamentous bacteriophage. *J Mol Biol*, 288(2), 203-211.
- Prasad, K. M., Xu, Y., Yang, Z., Toufektsian, M. C., Berr, S. S., y French, B. A. (2007). Topoisomerase inhibition accelerates gene expression after adeno-associated virus-mediated gene transfer to the mammalian heart. *Mol Ther*, 15(4), 764-771.
- Rozalén J, C. V., Jordan J. (2003). Terapia génica. Vectores de expresión. *OFFARM*, 22(8), 102-108.
- Ruben, S., Perkins, A., Purcell, R., Joung, K., Sia, R., Burghoff, R., et al. (1989). Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol*, 63(1), 1-8.
- Russel, M. L., HB.; Clackson, T. (2004). Introduction to phage biology and phage display. In C. T. y. L. HB. (Ed.), *Phage Display: a practical approach* (pp. 1-26). New York: Oxford University Press.
- Seglen, P. O., Grinde, B., y Solheim, A. E. (1979). Inhibition of the lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methylamine, chloroquine and leupeptin. *Eur J Biochem*, 95(2), 215-225.
- Shiraishi, T., y Nielsen, P. E. (2006). Enhanced delivery of cell-penetrating peptide-peptide nucleic acid conjugates by endosomal disruption. *Nat Protoc*, 1(2), 633-636.
- Sidhu, S. S. (2001). Engineering M13 for phage display. *Biomol Eng*, 18(2), 57-63.
- Sidhu, S. S. (2005). *Phage display in biotechnology and drug discovery*. Boca Raton: CRC Press/Taylor y Francis.
- Sidhu, S. S., Weiss, G. A., y Wells, J. A. (2000). High copy display of large proteins on phage for functional selections. *J Mol Biol*, 296(2), 487-495.
- Sieczkarski, S. B., y Whittaker, G. R. (2002). Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol*, 83(Pt 7), 1535-1545.

- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228(4705), 1315-1317.
- Stefanidakis, M., y Koivunen, E. (2004). Peptide-mediated delivery of therapeutic and imaging agents into mammalian cells. *Curr Pharm Des*, 10(24), 3033-3044.
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A., y Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*, 4(5), 346-358.
- Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M., y Giacca, M. (2001). Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, 276(5), 3254-3261.
- Uppala, A., y Koivunen, E. (2000). Targeting of phage display vectors to mammalian cells. *Comb Chem High Throughput Screen*, 3(5), 373-392.
- Verma, I. M., y Somia, N. (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature*, 389(6648), 239-242.
- Verma, I. M., y Weitzman, M. D. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem*, 74, 711-738.
- Vida, T. A., y Emr, S. D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol*, 128(5), 779-792.
- Vives, E., Brodin, P., y Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 272(25), 16010-16017.
- Volpicella, M., Ceci, L. R., Gallerani, R., Jongsma, M. A., y Beekwilder, J. (2001). Functional expression on bacteriophage of the mustard trypsin inhibitor MTI-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 280(3), 813-817.
- Wadia, J. S., y Dowdy, S. F. (2005). Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(4), 579-596.
- Wadia, J. S., Stan, R. V., y Dowdy, S. F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med*, 10(3), 310-315.

Weiss, G. A., Wells, J. A., y Sidhu, S. S. (2000). Mutational analysis of the major coat protein of M13 identifies residues that control protein display. *Protein Sci*, 9(4), 647-654.

Widersten, M., y Mannervik, B. (1995). Glutathione transferases with novel active sites isolated by phage display from a library of random mutants. *J Mol Biol*, 250(2), 115-122.

<http://www.mardre.com/homepage/mic/tem/samples/bio/virus/m13a.htm>

<http://www.genedelivery.ox.ac.uk/Gene%20Therapy/Vectors/Synthetic%20Vectors/General%20Synthetic%20Vectors/Non-viral%20Vectors.htm>