



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Instituto de Biotecnología

Estudio de los factores que afectan la replicación y empaquetamiento de DNA en cápsides de virus adeno-asociado 2 en células de insecto.

TESIS

Que para optar por el grado de:

Doctora en Ciencias

Presenta:

MC. Lilí Esmeralda Gallo Ramírez

Tutora:

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera.

Instituto de Biotecnología UNAM

Cuernavaca Morelos, Diciembre de 2012



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.

Este trabajo se desarrolló en el departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera en el laboratorio del Dr. Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la beca CONACyT 169462, y de los proyectos PAPIIT-UNAM IN223210, IN223805, IN224409, SEP-CONACyT 46225-Z y 2008-01-101847 y CONACyT Ciencia Básica 101847.

Agradecimientos.

A la Dra. Laura Palomares por su dirección y confianza durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Tonatiuh Ramírez por sus consejos y críticas para la mejora de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Ramón González García-Conde.

Dr. Rafael Vázquez Duhalt.

A los miembros del jurado, quienes proporcionaron sugerencias para la edición y mejora de este documento:

Dra. Ana Soledad Sandoval Rodríguez.

Dra. Susana Castro Obregón.

Dr. Antonio de León Rodríguez.

Dr. Roberto Pablo Stock Silberman.

Dr. Yimy Alexander Mena Méndez.

A las M.C. Vanessa Hernández Rodríguez y Ana Ruth Pastor Flores por su apoyo técnico, así como a Karin Levy Pop por su invaluable apoyo administrativo.

A la unidad de docencia del IBT por su apoyo administrativo: Ing. Jalil Saab, José Antonio Bolaños y Gloria Villa.

A los amigos del grupo EG y OTR que fueron parte de esta etapa y alegraron mi estancia con su amistad y experiencia en el laboratorio, muy en particular al Dr. Plascencia Villa por su invaluable amistad y apoyo profesional.

Dedicatoria.

A mi familia, que me creó y siempre ha creído en mí:

Papalote: a ti que has sido ejemplo de trabajo, dedicación y ética. Gracias por brindarme todo lo que necesité para desarrollarme.

A ti mamá: porque desde niña me enseñaste que al estudiar y prepararme profesionalmente estaba recibiendo el más preciado regalo que podían obsequiarme.

Irasema: por tu generosidad y cuidado, por estar siempre ahí y ser un respaldo importante en la familia.

Ely: por enseñarme de pequeña el placer de aprender, por ser mi compañera de juegos y ñoñeces.

Irais: por tu espontaneidad y ligereza con las que alegras mucho mi vida con tu compañía y sonrisas, por seguirme la corriente en mis locuras.

Chuy: porque siempre has sido un motor para dar lo mejor de mí cada día y porque a través de tu pasión, la guitarra, logras tocar mi corazón.

A mis cachetonas Yaretz y Ziania: llegaron en momentos difíciles y nos llenaron de felicidad y alegría. Y porque aún en la distancia y las dificultades logran unirnos a todos.

A Reyna Romero, mi profe y amiga, quien me indujo a empezar en esta bella aventura académica y de vida.

A mis grandes amigas, con quienes he compartido lágrimas y sonrisas todos estos años: Arianna, Liz, Kika, Marthita, Jessy, Patsy y Laura. Pese a la distancia que nos separa, su compañía, apoyo y las risas compartidas en vacaciones fueron un impulso para mí.

A mi familia de Cuernavaca: Gloria, Claudia, Toño, Ciro, Pablo, Roberto, René, Katy. Porque forman parte importante de ésta y muchas historias de mi vida.

A los amigos que coseché a mi paso por la UNAM: Germancho, Ana, Karla, Arlette, Yossef, Luary, Maudacio, Adrián, Orlando y ZP, Celina, Mabel, Liliana, Cuick, José Alberto, Celia, Io, Esteban, Marthita. Al #YS4: Mars, Aurora y Piña, gracias por su comprensión, apoyo y compañía en la etapa terminal de este camino.

Índice General.	i
Índice de figuras	v
Índice de tablas	ix
Lista de Abreviaturas	x
1. Resumen.	1
2. Abstract.	3
3. Introducción.	5
4. Antecedentes.	6
4.1 Terapia Génica.	6
4.1.1 Virus adeno-asociado como vector para terapia génica.	6
4.2 Biología del virus adeno-asociado.	8
4.2.1 Elementos que conforman al VAA-2.	9
4.2.1.1 Genoma de virus adeno-asociado.	9
4.2.1.2 Proteínas estructurales.	11
4.2.1.3 Proteínas no estructurales.	13
4.2.1.3.1 Replicación del DNA de VAA.	15
4.2.1.3.2 Empaquetamiento del DNA de VAA.	18
4.3 Producción de vectores de virus adeno-asociado.	19
4.3.1 Producción de vVAA utilizando el sistema de células de mamífero.	19
4.3.2 Sistema de células de insecto-baculovirus.	20
4.3.2.1 Interacciones célula de insecto-baculovirus.	21

4.3.2.2 Baculovirus.	22
4.3.2.3 Ciclo de infección de baculovirus.	23
4.3.2.4 Aspectos generales del cultivo de células de insecto-baculovirus: multiplicidad de infección, tiempo de infección.	27
4.3.2.5 Producción de vectores de virus adeno-asociado en el SCI-BV.	29
5. Hipótesis.	31
6. Objetivo general.	31
6.1 Objetivos específicos.	31
7. Materiales y métodos.	32
7.1 Construcción de baculovirus recombinantes.	32
7.1.1 Clonación para la construcción de plásmidos recombinantes.	32
7.1.1.1 Transformación de células <i>E. coli</i> químico-competentes y preparación de minipreps.	34
7.1.2 Producción de bácmidos recombinantes.	36
7.1.3 Transfección de células de insecto con bácmidos recombinantes.	36
7.1.4 Ensayo en caja para el aislamiento de placas virales.	37
7.1.5 Infección de células con placas virales.	38
7.1.6 Propagación de stocks virales a partir de placas aisladas.	38
7.1.7 Determinación de títulos virales.	39
7.2 Líneas celulares, cultivo celular y baculovirus recombinantes.	40
7.3 Microscopía de inmuno-fluorescencia y microscopía electrónica de células infectadas.	41
7.3.1 Preparación de células para microscopía de inmuno-fluorescencia.	41
7.3.2 Preparación de células para microscopía de transmisión electrónica.	42
7.4 Cinéticas de replicación de genomas de VAA.	42
7.5 Purificación y análisis de DNA viral.	43

7.5.1	Extracción de DNA a partir de fracciones de pellet.	43
7.5.2	Extracción de DNA a partir de sobrenadantes de cultivo celular.	44
7.5.3	Cuantificación de DNA viral mediante PCR cuantitativa (qPCR).	45
7.5.4	Análisis de DNA mediante Southern blot.	46
7.6	Extracción de proteína total y cápsides de VAA.	48
7.7	Análisis de proteínas Rep.	48
7.8	Purificación de cápsides de VAA.	49
7.9	Cuantificación de DNA encapsidado.	49
7.10	Cuantificación de cápsides de VAA.	49
8.	Resultados y Discusión.	51
8.1	Construcción de baculovirus recombinantes.	51
8.2	Localización intracelular de proteínas de VAA en células de insecto.	59
8.3	Análisis de replicación de genomas de VAA en ausencia de Rep78.	72
8.3.1	Extracción de DNA a partir de células de insecto.	72
8.3.2	Desarrollo de curvas de cuantificación absoluta para qPCR utilizando el Rotor-Gene 6000.	73
8.3.3	Cinéticas de infección de células H5 empleando distintas MDI de BacGFP-Rep52.	75
8.3.4	Replicación de DNA viral en ausencia de Rep78.	77
8.4	Evaluación de la replicación de genomas de VAA en presencia de Rep78.	82
8.4.1	Cinéticas de infección de células H5 utilizando los baculovirus BacGFP y BacRep78.	83
8.4.2	Desarrollo de curvas de cuantificación absoluta para qPCR utilizando el MX3005P.	84
8.4.3	Replicación de DNA viral en presencia de Rep78.	86

8.4.4	Evaluación del rescate de genomas de VAA en presencia de Rep78 y resolución de formas replicativas.	91
8.5 Análisis de empaquetamiento de gVAA en presencia de Rep78 y Rep52.		95
8.5.1	Cinéticas de infección cuádruple utilizando los baculovirus BacCap, BacGFP, BacRep78 y BacRep52.	95
8.5.2	Cinéticas de producción de DNA viral en cultivos infectados utilizando los baculovirus BacCap, BacGFP, BacRep78 y BacRep52.	96
8.5.3	Evaluación del rescate de genomas de VAA y resolución de formas replicativas en cultivos con infección cuádruple con los baculovirus BacCap, BacGFP, BacRep78 y BacRep52.	99
8.5.4	Eficiencia de empaquetamiento.	101
9. Conclusiones.		104
10. Productos Generados.		107
10.1	Artículos Arbitrados.	107
10.2	Presentaciones en Congresos Nacionales e Internacionales.	107
11. Bibliografía.		108
12. Apéndices.		114

Índice de figuras.

Figura 1. Reconstrucción de la cápside de VAA-2.	9
Figura 2. Genoma de VAA-2.	10
Figura 3. Estructura secundaria de la ITR de VAA-2.	10
Figura 4. Información genética contenida en el gen cap de VAA-2 para la expresión de proteínas estructurales y de ensamblaje.	11
Figura 5. Información genética contenida en el gen rep de VAA-2 para la expresión de proteínas no estructurales.	13
Figura 6. Representación esquemática de los dominios funcionales de las proteínas no estructurales de VAA-2.	14
Figura 7. Replicación del genoma de VAA-2.	16
Figura 8. Micrografías electrónicas de NPV. A) Baculovirus ocluidos en cristal de polihedrina. B) Baculovirus no ocluidos de AcMNPV escapando de la membrana plásmática de una célula H5 infectada con el baculovirus.	23
Figura 9. Descripción esquemática del ciclo de infección de baculovirus.	24
Figura 10. Productos obtenidos mediante digestión de pFBDSLRS con enzimas de restricción. A) Mapa de restricción de pFBDSLRS. B) Análisis electroforético de productos de digestión.	51
Figura 11. Plásmidos recombinantes. a) pFBRep78, b) pFBRep52 y c) pFBGR-Rep52.	52
Figura 12. Análisis de PCR de colonia de células E. coli OneShot transformadas con los plásmidos recombinantes pFBRep52 (a), pFBGR-Rep52 (b) y pFBRep78 (c).	53
Figura 13. Análisis de restricción de DNA plasmídico purificado de diferentes colonias transformadas con pFBRep52 (a), pFBRep78 (b) y pFBGR-Rep52 (c).	54
Figura 14. PCR de colonias DH10Bac transformadas con los plásmidos recombinantes pFBRep52 y pFBRep78.	55
Figura 15. Micrografía de células Sf9 tras 120 h post-transfección. a) células no transfectadas, b) células transfectadas con DHBacRep78, c) células transfectadas con DHBacGFP-Rep52, d) expresión de EGFP en células transfectadas con DHBacGFP-Rep52.	56
Figura 16. Placas virales (halos incoloros) obtenidas infectando con BacRep52, P0.	57
Figura 17. Análisis de expresión de proteína recombinante a partir de diferentes placas virales. a)	

Detección de proteína Rep en placas virales de BacRep52 y BacRep78. b) Detección de proteína GP64 de baculovirus en placas virales de BacRep52 y BacRep78. c) Detección de proteína Rep en la placa viral de BacGFP-Rep52.	58
Figura 18. Detección por inmunofluorescencia de proteína VP desensamblada en células H5 infectadas con BacCap	61
Figura 19. Detección por inmunofluorescencia de proteína VP ensamblada en células H5 infectadas con BacCap.	62
Figura 20. Detección por inmunofluorescencia de proteína Rep78 y Rep52 en células H5 infectadas con BacRep78 o BacRep52.	64
Figura 21. Detección por inmunofluorescencia de proteínas Rep y VP (ensamblada y desensamblada) en células H5 co-infectadas con BacCap y BacRep78 o BacRep52.	65
Figura 22. Detección por inmunofluorescencia de proteínas Rep en células H5 co-infectadas con BacGFP y BacRep78 o BacRep52.	66
Figura 23. Detección por inmunofluorescencia de cápsides de VAA en células H5 co-infectadas con BacCap, BacRep78 y BacGFP-Rep52.	68
Figura 24. Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido de células H5 infectadas con BacCap (B y C), o BacGFP (D).	69
Figura 25. Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido de células H5 infectadas con BacCap, BacRep78 y BacGFP-Rep52	70
Figura 26. Rendimientos de recuperación de DNA a diferentes concentraciones de células H5 utilizando el DNAsy® Blood and Tissue Kit (QIAGEN).	73
Figura 27. (a) Curva estándar de cuantificación absoluta obtenida para el gen <i>egfp</i> utilizando el Rotor-Gene 6000 (b) Perfil de amplificación de estándares usados en la obtención de la curva de cuantificación del gen <i>egfp</i> .	74
Figura 28. Evolución de los perfiles de concentración (a) y viabilidad (b) celular de cultivos de células H5 infectados a distintas MDI de BacGFP-Rep52.	76
Figura 29. Rendimientos de recuperación de DNA en cultivos infectados a diferentes MDI de BacGFP-Rep52.	77
Figura 30. Cuantificación de genomas de baculovirus (p35) y gVAA (<i>egfp</i>) en las fracciones de pellet (A y B) y sobrenadante (C y D) de cultivos infectados a diferentes MDI de BacGFP-Rep52.	78
Figura 31. Tasas de replicación de los genes p35 (A) y <i>egfp</i> (B) para cultivos infectados a diferentes MDI de BacGFP-Rep52.	81

Figura 32. Evolución de los perfiles de concentración (a) y viabilidad (b) celular de cultivos de células H5 infectados con BacGFP y/o BacRep78.	83
Figura 33. Rendimientos de recuperación de DNA en cultivos infectados con BacGFP y/o BacRep78.	84
Figura 34. a) Curva estándar de cuantificación absoluta para el gen <i>rep</i> utilizando el termociclador MX3005P, b) Perfil de amplificación de estándares utilizados en la obtención de la curva de cuantificación del gen <i>rep</i> , c) Curva de disociación obtenida con los estándares y oligonucleótidos usados para la cuantificación del gen <i>rep</i> .	85
Figura 35. Cuantificación de gBac (p35), gVAA (egfp) y genomas de BacRep78 (rep78) en las fracciones de pellet (A, B y C, respectivamente) y sobrenadante (C, D y E, respectivamente) de cultivos infectados con BacGFP y/o BacRep78.	87
Figura 36. Tasas de replicación de los genes p35 (A), egfp (B) y rep78 (C) para la fracción de pellet de cultivos infectados con BacGFP y/o BacRep78 calculadas en los períodos de 0-6 hpi y de 6-24 hpi.	89
Figura 37. Análisis de rescate de gVAA a partir de DNA de baculovirus y resolución de formas replicativas. a) Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. b) Southern blot utilizando una sonda específica para el gen de egfp marcada radioactivamente.	92
Figura 38. Rescate de gVAA y resolución de formas replicativas en cultivos co-infectados con BacGFP y BacRep78.	93
Figura 39. Concentración relativa de Rep78 en cultivos co-infectados con BacGFP y BacRep78.	93
Figura 40. Evolución de los perfiles de concentración (a) y viabilidad (b) celular de cultivos de células H5 co-infectados con BacCap, BacGFP, BacRep78 y BacRep52.	96
Figura 41. Cuantificación de gBac (p35) y gVAA (egfp) en la fracción de pellet de cultivos co-infectados con BacGFP, BacCap, BacRep78 y BacRep52.	97
Figura 42. Tasas de replicación de los genes p35 (A) y egfp (B) para la fracción de pellet de cultivos infectados con con BacGFP, BacCap, BacRep78 y BacRep52, calculadas en los períodos de 0-6 hpi y de 6-24 hpi.	98
Figura 43. Rescate de gVAA en cultivos co-infectados con BacGFP, BacCap, BacRep78 y BacRep52.	99
Figura 44. Concentración relativa de Rep78 (a) y Rep52 (b) en cultivos co-infectados con BacGFP, BacCap, BacRep78 y BacRep52.	101
Figura 45. Cuantificación de genomas empaquetados a partir de muestras purificadas mediante gradientes de iodixanol.	102
Figura 46. Curva estándar de cuantificación de cápsides de VAA-2 obtenida utilizando el Kit de	

ELISA comercial de Progen Biotechnik GMBH.

102

Figura 47. Cuantificación de cápsides obtenidas en la fracción de pellet tras 96 hpi.

103

Índice de tablas.

Tabla 1. Digestión de plásmidos con enzimas de restricción.	33
Tabla 2. Conversión de extremos romos en extremos cohesivos utilizando DNA Vent polimerasa.	33
Tabla 3. Ligación de fragmentos de DNA para la generación de plásmidos recombinantes.	34
Tabla 4. Tratamiento de plásmidos con CIP para evitar auto-ligación.	34
Tabla 5. Condiciones de reacción para análisis de PCR de colonia.	35
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en análisis de PCR de colonia.	35
Tabla 7. Baculovirus recombinantes.	40
Tabla 8. Anticuerpos utilizados para detectar proteínas de VAA por inmuno-fluorescencia.	41
Tabla 9. Condiciones de infección en cinéticas de replicación de ADN viral.	43
Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados en análisis de qPCR.	45
Tabla 11. Condiciones de reacción para análisis de qPCR.	46
Tabla 1. Parámetros de validación de la curva estándar de qPCR realizada con el Rotor-Gene 6000	74
Tabla 13. Rendimiento de DNA viral en la fracción de pellet celular (0 hpi) en cultivos infectados con BacGFP-Rep52.	79
Tabla 14. Parámetros de validación de la curva estándar de qPCR realizada con el MX3005P.	86

Lista de Abreviaturas.

AN	Alcalin nucleasa
A/T	Adenina/Timina
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> Mono-Núcleo Poliedrovirus
Ad	Adenovirus
ATP	Adenosin-trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CCI	Concentración celular al momento de la infección
cél	Célula
CIP	Alcalin-fosfatasa de intestino de ternera
CMV	Citomegalovirus
Cq	Ciclo de cuantificación
DBP	Proteína de unión a DNA
dCTP	Deoxi-citidina 5´trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNApol	DNA polimerasa
dNTPs	Deoxi-nucleósidos 5´Trifosfato
DRP	Partículas con DNA resistente a DNAsa
dsDNA	DNA de doble cadena
EGFP	Proteína verde fluorescente potenciada.
FBS	Suero fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
gBac	genomas de baculovirus
GSK	Glaxo Smith Klaine
GTA	Glutaraldehído
gVAA	Genomas de virus adeno-asociado
h	Hora
H5	Células High Five™
HEK	Células de riñón de embrión humano
HeLa	Células de Henrietta Lacks
hpi	Horas post-infección
<i>hrs</i>	Regiones homólogas
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
ITR	Terminaciones invertidas repetidas
KDa	Kilodaltones
Kpb	Kilopares de bases
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	Miliampers
MAb	Anticuerpo monoclonal

MDI	Multiplicidad de infección
Mg	miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MRF	Forma replicativa monomérica
mRNA	RNA mensajero
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
Ng	Nanogramos
NLS	Señal de localización nuclear
nm	Nanómetros
NTC	Control sin templado
ORF	Marco de lectura abierto
PAb	Anticuerpo policlonal
Pb	Pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfatos
PBST	PBS-Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PV	Partículas virales totales
qPCR	PCR cuantitativo
RBE	Elemento de unión a proteínas Rep
<i>RCR</i>	Replicación del círculo rodante
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rx	Reacción
SCI-BV	Sistema de células de insecto-baculovirus
SDS	Sodio-dodecil-sulfato
seg	segundo
SFM	Medio libre de suero
SOC	Medio super óptimo con represión catabólica
ssDNA	DNA de cadena sencilla
TCID ₅₀	Dosis de infección media
TCLD ₅₀	Dosis letal media
TDI	Tiempo de infección
<i>trs</i>	Sitio terminal de resolución
U	Unidades enzimáticas
UFP	Unidades formadoras de placas
VAA	Virus adeno-asociado
VAA-2	Virus adeno-asociado tipo 2
vVAA	Vector de virus adeno-asociado
xg	Gravedades
μ_{egfp}	Tasa de replicación del gen <i>egfp</i> (h^{-1})

μ_{p35}

Tasa de replicación del gen *p35* (h^{-1})

μ_{rep78}

Tasa de replicación del gen *rep78* (h^{-1})

μL

Microlitro

1. Resumen.

La producción de vectores derivados del virus adeno-asociado (vVAA) tiene importancia debido a su empleo como vectores para terapia génica. El sistema de células de insecto-baculovirus (SCI-BV) ha emergido como una plataforma atractiva para la producción de vVAA a escala industrial pues, a diferencia de la plataforma tradicional basada en células humanas, facilita el escalamiento del proceso y permite la producción a altas concentraciones celulares. En el SCI-BV se han obtenido rendimientos específicos de partículas que contienen DNA similares a los del sistema de células humanas. No obstante, se observa una alta concentración de cápsides vacías, lo que sugiere que el empaquetamiento de los genomas de virus adeno-asociado (gVAA) es limitante en el SCI-BV.

En este trabajo se estudiaron por primera vez, los factores que afectan el proceso de replicación y empaquetamiento de DNA en cápsides de virus adeno-asociado en células de insecto con el propósito de generar información que permita diseñar estrategias para la obtención de mayores rendimientos de cápsides virales con DNA. Como parte de ello, se analizó la distribución intracelular de los elementos involucrados en la producción del vVAA (proteínas de la cápside y las proteínas no estructurales Rep78 y Rep52) para determinar si ésta constituía un factor limitante en la interacción de estos componentes y en el subsecuente ensamblaje del vector. Por otra parte, se caracterizó cinéticamente el proceso de replicación de los gVAA a fin de analizar el efecto de la concentración de las proteínas no estructurales de VAA sobre la producción y la estabilidad del DNA viral. Adicionalmente, se analizó la disponibilidad de los gVAA y su eficiencia de empaquetamiento durante la expresión de todos los componentes del vector.

Mediante estudios de inmunofluorescencia se determinó que la localización intracelular de los distintos componentes del vVAA no limitó su interacción y, por tanto, tampoco la producción del vector. Durante la caracterización del proceso de replicación del DNA viral se determinó que en ausencia de la proteína Rep78, los gVAA se replican integrados al DNA del baculovirus y que no hay escisión espontánea significativa de estos genomas durante la replicación de stocks virales de bajo número de pase, como se había reportado previamente. Se encontró que la concentración de los gVAA incrementó hasta 14 veces al expresar la proteína Rep78, y que la concentración máxima alcanzada resultó independiente de la concentración de Rep78. Esta concentración máxima de gVAA se identificó como limitante para la producción de vectores de VAA. Por otra parte, sí se observó un efecto positivo de la concentración de

Rep78 sobre la eficiencia de rescate de los gVAA del DNA del baculovirus y en la resolución de concatámeros para la generación de genomas monoméricos disponibles para el empaquetamiento. Se determinó además que la coexistencia de gVAA monoméricos y Rep78 disminuye la degradación de ambos componentes, por lo que su interacción parece inducir una protección mutua. Al expresar todos los componentes necesarios para la producción de vVAA, se determinó que la tasa de replicación de los gVAA disminuyó con respecto a la observada al expresar sólo Rep78. Esto indica que la replicación del DNA del baculovirus representa una fuerte competencia por los precursores o la maquinaria de replicación, lo que también constituye un elemento que limita la producción de gVAA.

La información generada en este estudio constituye una herramienta valiosa para el diseño de nuevos baculovirus recombinantes y la implementación de estrategias de cultivo/infección enfocadas a incrementar la producción de vVAA en células de insecto.

2. Abstract.

Adeno-associated viral vectors (AAVv) are used as vehicles in human gene therapy. The insect cell-baculovirus expression system (IC-BEVS) is a promising platform for AAV vector production at large scale. It has advantages over the traditional production platform based on human cells as it facilitates the production at high cell densities and is readily scalable. Vector yields obtained in the IC-BEVS are similar to those of the human cell-based system. However, a high amount of empty capsids is observed, suggesting that vector genome packaging is a limiting factor in this system.

Factors that affect AAV genome (AAVg) replication and packaging processes in insect cells were assessed in this work for the first time, in order to generate information useful for the desing of rational strategies targeted at increasing DNA-containing AAV capsid yields in the IC-BEVS. Accordingly, the intracellular distribution of the elements required to produce AAVv in insect cells (structural proteins and the non-structural proteins Rep52 and Rep78) was evaluated to determine whether it limits their interaction and the subsequent vector assembly. Also, the AAVg replication process was characterized to determine the effect of the concentration of non-structural proteins in AAVg production and stability. Additonally, AAVg availability and packaging when all other AAV elements were expressed was studied.

Immunofluorescence studies revealed that vector assembly was not limited by the intracellular distribution of its components. The kinetic characterization of viral DNA replication process revealed that AAVg replicates within the baculovirus DNA in absence of the non-structural protein Rep78. No excision of AAVg from the baculovirus DNA was detected when low-pass baculovirus stocks replicate, in contrast with previous reports. It was found that AAVg concentration increased 14-fold when Rep78 was expressed, and that the maximum gAAV concentration was constant regardless of Rep78 concentration. The maximum AAVg concentration limited the concentration of AAVv DNA-containing particles. Even when Rep78 concentration did not affect maximum AAVg yields, it was found that it had an influence on gAAV rescue from baculovirus DNA and resolution of concatamers to generate monomeric genomes required for packaging into capsids. A mutual protection between Rep78 and AAVg against degradation was observed. The AAVg replication rate decreased when all AAVv elements were expressed in comparison with replication rates observed when only Rep78 was coexpressed. This implies that

baculovirus DNA replication competes for the replication machinery and precursors, which represents an additional limiting factor during AAVg production.

These results are useful to propose strategies for increasing AAVv yields in insect cells, such as designing new recombinant baculovirus constructions and to develop culture and infection.

3. Introducción.

La terapia génica se ha empleado en estudios clínicos desde hace varios años en el tratamiento de padecimientos de origen genético principalmente. A la lista de padecimientos genéticos se han añadido otros de origen no genético que han despertado especial interés debido a la ineficacia de los tratamientos tradicionales como son los neuro-degenerativos, los cardiovasculares y distintos tipos de cáncer. A la fecha se llevan a cabo cerca de 1800 estudios clínicos basados en este tipo de terapia, de éstos cerca de 1200 emplean vectores de origen viral [1]. Hasta el 2012, salvo por la terapia contra cáncer escamoso de cabeza y cuello aplicado en China desde 2004 (Gendicine™) [2], la terapia génica en humanos sólo se había aplicado en de ensayos clínicos. Sin embargo, años de pruebas e información generada a base de aciertos y lamentables errores han puesto los cimientos para el diseño de vectores y protocolos clínicos más seguros y efectivos que, al parecer, en breve podrán reivindicarse con la aprobación, por parte de una agencia regulatoria internacional, del primer medicamento génico basado en vectores virales para el tratamiento de deficiencias en el metabolismo de lípidos [3]. Esto sin duda, constituirá un motor que aumentará la inversión económica e impulsará nuevos desarrollos en el campo de la terapia génica a base de estos vectores.

De los vectores virales utilizados en este tipo de terapia los derivados del virus adeno-asociado (vVAA) han emergido como una alternativa atractiva para la expresión prolongada del gen terapéutico con bajos riesgos para el paciente debido a su naturaleza no patogénica. Es por ello que el interés de emplearlos para el tratamiento de diversos padecimientos ha aumentado considerablemente en los últimos años, al grado de posicionarse como los primeros vectores que se utilizarán en una terapia con aprobación internacional [3]. No obstante, el uso de vVAA en estudios clínicos debe afrontar la limitante que impone el requerimiento de altos títulos de partículas virales por dosis aplicada. En este tenor, algunos esfuerzos se han enfocado al diseño de vectores con cápsides con tropismo múltiple o modificaciones para evadir el reconocimiento de anticuerpos neutralizantes presentes en un alto porcentaje de la población. Pero resulta necesario señalar que el reto en el diseño molecular de estos vectores ha sido acompañado del reto ingenieril que implica incrementar la producción de vVAA con actividad biológica a través procesos eficientes, escalables y seguros.

Hoy día, la producción de vVAA se lleva a cabo empleando dos vertientes. En la vertiente tradicional se utilizan cultivos de células humanas que se transfectan con plásmidos para llevar a cabo la expresión de las proteínas involucradas en el ensamblaje del vector. Este proceso puede resultar altamente eficiente en términos de producción de proteína y ensamblaje (revisado en [4]). No obstante, presenta problemas de escalamiento y genera preocupación en torno a la bioseguridad del sistema de producción ante la posible presencia de agentes patógenos en las células empleadas para replicar el vector. En la otra vertiente, de más reciente desarrollo, se emplean cultivos de células de insecto que se infectan con baculovirus recombinantes para expresar los elementos necesarios para ensamblar al vector. Este sistema ha permitido obtener rendimientos de vVAA similares a los alcanzados en cultivos de células humanas a la vez que ofrece una alternativa escalable y segura para la producción a nivel industrial.

Se ha observado que durante la producción de vVAA en células de insecto la producción específica de cápsides virales (cápsides/célula) sobrepasa por un orden de magnitud a la de células humanas. Esto parece favorable en términos del potencial que posee el sistema de células de insecto para la producción del vector viral. Por otra parte, los rendimientos de partículas del vector viral con DNA empaquetado son iguales a los que se alcanzan en células humanas, por lo que “la habilidad” del sistema de células de insecto para producir más cápsides sólo se ve reflejada en un mayor porcentaje de cápsides vacías que no poseen actividad biológica. Un exceso de cápsides vacías puede ser consecuencia de una limitada capacidad de replicación de DNA viral o de un proceso de empaquetamiento de DNA que ha sido sobrepasado en su capacidad. Las limitaciones en ambos procesos pueden deberse a las capacidades propias de la maquinaria celular, a la concentración en que se producen los diferentes componentes involucrados en la replicación o empaquetamiento como consecuencia de las estrategias de infección o del diseño molecular de los baculovirus recombinantes, así como a la distribución intracelular de dichos componentes. No obstante, la información disponible referente a estos aspectos es prácticamente nula.

Este trabajo se desarrolló con la finalidad de identificar los factores que limitan la obtención de mayores rendimientos de cápsides con DNA empaquetado en el sistema de células de insecto teniendo como base las hipótesis previamente expuestas. Constituye el primer estudio sobre los factores que afectan la replicación y empaquetamiento de DNA en cápsides de VAA en células de insecto, así como el único estudio cinético sobre la replicación y estabilidad de los genomas recombinantes de VAA.

4. Antecedentes.

4.1 Terapia Génica.

El interés en el estudio de la producción de vectores de virus Adeno-asociado (vVAA) radica en su empleo en terapia génica. La terapia génica constituye una alternativa al tratamiento de padecimientos genéticos, degenerativos e infecciosos donde la medicina tradicional ha encontrado limitaciones. Esta terapia involucra la administración de material genético a células de tejidos específicos. El objetivo es expresar proteínas cuya producción es deficiente en las células blanco a fin de recuperar alguna función. O bien, se busca inhibir o regular la expresión de genes que alteran ciertos procesos celulares o que permiten la replicación de agentes patógenos como algunos virus. Para llevar a cabo la entrega de material genético al interior de la célula se requiere de vehículos o vectores de transporte, los cuales pueden ser de origen viral o no. Los vectores virales presentan una ventaja sobre los vectores de origen no viral, tales como los liposomas y polímeros poli-catiónicos, debido a la afinidad de las cápsides virales para unirse e internalizarse con especificidad a ciertos tipos celulares mediante receptores celulares, además de poseer una mayor eficiencia de transporte del material genético al interior de la célula (revisado en: [5]). De los vectores virales actualmente utilizados en pruebas clínicas destacan los derivados de adenovirus, lentivirus, retrovirus, herpes y virus adeno-asociado (VAA).

4.1.1 Virus adeno-asociado como vector para terapia génica.

Los vectores de virus adeno-asociado poseen características que les confieren gran potencial para el desarrollo de nuevas terapias. Por ejemplo, generan baja respuesta celular inmune (revisado en:[6]), por lo cual son idóneos para el tratamiento de órganos sensibles a la inflamación. También poseen la capacidad de transducir células que han dejado de dividirse, lo que los hace buenos candidatos para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central (revisado en: [7]). Permiten además una expresión prolongada del transgen mediante la formación de cadenas concataméricas de DNA episomal [8]. La variedad de serotipos conocidos (1 al 9) permite transducir de forma más específica un amplio número de tejidos (revisado en: [9-10]). Debido a su tamaño, son capaces de sortear barreras físicas como los vasos capilares y la lámina basal de células de músculo que otros vectores no pueden penetrar [11]. No obstante, las limitaciones más importantes de los vVAA están relacionadas con el reducido

tamaño del transgen que pueden empaquetar (menor a 4.5 Kb) y la baja eficiencia para pasar de DNA de cadena sencilla (ssDNA) a DNA de doble cadena (dsDNA) al interior del núcleo de la célula blanco, proceso indispensable para permitir la expresión del transgen [12-15]. La presencia de anticuerpos neutralizantes contra las cápsides de VAA [16], debido a la activación de la respuesta inmune humoral, constituye otro obstáculo importante para la transducción y expresión del transgen durante la re-administración del vector (revisado en:[6, 10]). En conjunto, estas limitaciones imponen la necesidad de administrar altas dosis del vector para obtener niveles apropiados de expresión del gen terapéutico.

Actualmente los vVAA se emplean en pruebas clínicas para el tratamiento de padecimientos como fibrosis cística, hemofilia B, mal de Parkinson, Alzheimer, artritis reumatoide, distrofia muscular de Duchenne, problemas de degeneración de retina y algunos tipos de cáncer [1]. La principal limitación de estos vectores para el desarrollo de terapias a nivel clínico, es la disponibilidad de stocks virales con títulos de partículas que contienen DNA (partículas con DNA resistente a DNAsas, DRP) suficientemente altos como para cubrir las dosis requeridas, mismas que pueden llegar hasta 2×10^{12} DRP/Kg [10].

Un vector derivado de virus adeno-asociado está constituido por las proteínas virales que se ensamblan en la cápside y por el genoma recombinante contenido en el interior de ésta. A diferencia del virus, el vector viral carece de la capacidad de replicarse y, por tanto, de generar una infección en la célula hospedera. Esto debido a que, pese a conservar las secuencias necesarias para su replicación y empaquetamiento, el genoma del vector carece de las secuencias que codifican a las proteínas virales, mismas que han sido sustituidas por la secuencia del gen que se desea expresar durante la terapia. Por tanto, para la producción de vectores de virus adeno-asociado resulta necesario proveer en *trans* las proteínas que participan en la replicación y el ensamblaje del virus silvestre.

4.2 Biología del virus adeno-asociado.

El virus adeno-asociado pertenece a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus*. Es un virus denominado de replicación defectuosa ya que requiere de la co-infección con virus “auxiliares”, tales como adenovirus o herpesvirus, para llevar a cabo su ciclo de replicación [17]. En ausencia del virus auxiliar, el VAA integra específicamente su genoma al cromosoma humano 19q13.4 [18]. El virus adeno-asociado tiene como principales hospederos a mamíferos primates, entre ellos el humano. No obstante algunos serotipos se han aislado de bovinos, equinos y aves. Actualmente se han identificado 10

diferentes serotipos, 9 de los cuales se utilizan en pruebas pre-clínicas o clínicas (revisado en:[10]). La infección con VAA jamás ha sido asociada con efectos patógenos en sus hospederos, razón por la cual se le considera inocuo y relativamente seguro para su empleo en terapia humana [17]. De los serotipos caracterizados, el más ampliamente estudiado es el 2 (VAA-2), mismo que ha servido como modelo de estudio en este trabajo.

VAA-2 es un virus desnudo, su cápside posee un diámetro de 25 nm (figura 1). La cápside viral está conformada por 60 unidades proteicas dispuestas en simetría icosaédrica [19]. Dichas unidades son las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3. El genoma de VAA es DNA lineal de cadena sencilla y codifica para dos grupos de proteínas: proteínas involucradas en la formación de la cápside y proteínas involucradas en la replicación y empaquetamiento del ADN viral. A continuación se describen a detalle los elementos involucrados en la replicación de VAA.

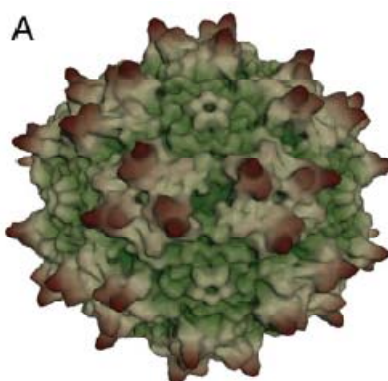


Figura 1. Reconstrucción de la cápside de VAA-2 (tomado de: [20]).

4.2.1 Elementos que conforman al VAA-2.

4.2.1.1 Genoma de virus adeno-asociado.

El genoma de VAA-2 es de DNA lineal de cadena sencilla (ssDNA) de 4.68 Kb de longitud, flanqueado por terminaciones invertidas repetidas (ITR). Las secuencias codificantes del genoma viral están contenidas en los genes *cap* y *rep*. El gen *cap* codifica para las proteínas involucradas en el ensamblaje de la cápside bajo el promotor p40, mientras el gen *rep* codifica para las proteínas no estructurales bajo los promotores p5 y p19 (figura 2). Los transcritos generados por ambos genes son procesados por medio de *splicings* para dar origen a un total de 8 diferentes proteínas virales (revisado en [17]).

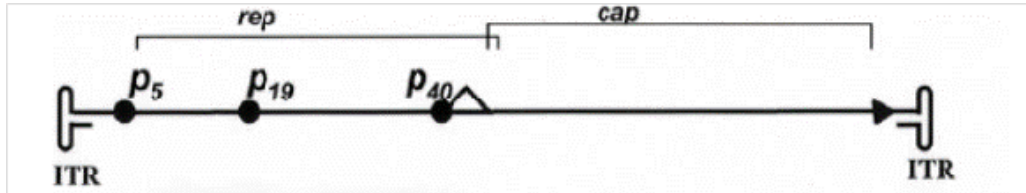


Figura 2. Genoma de VAA-2 (modificado de:[21]).

Las ITR están constituidas por los 145 nucleótidos terminales del genoma; estos son palíndromes auto-complementarios que forman un dúplex intramolecular en forma de T que actúa como primer durante la replicación al proporcionar un extremo 3'OH libre (figura 3). Las ITR son esenciales para la conversión del ssDNA a DNA de doble cadena (dsDNA), proceso indispensable para la posterior transcripción del genoma, así como para la producción de múltiples copias del genoma durante la replicación viral (revisado en: [22]). Dentro de estas secuencias terminales está incluido un elemento de unión a proteínas Rep (RBE) ubicado en la región del brazo A-A' de la ITR [23], mismo que contiene 4 repeticiones imperfectas del tetranucleótido 5'GCTC3' [24-25]. En el brazo D-D' de la ITR se encuentra ubicado un dominio denominado sitio terminal de resolución (*trs*) [23]. Este dominio contiene la secuencia 5'GT/TGGCC3' [26], misma que es sensible a la actividad endonucleasa de Rep78 y Rep68. Estos elementos resultan indispensables durante el rescate, la replicación y el empaquetamiento del genoma viral [27-29]. Las ITRs son las únicas secuencias del genoma viral que se requieren *in cis* para replicar y empaquetar ADN durante la producción de vVAA.

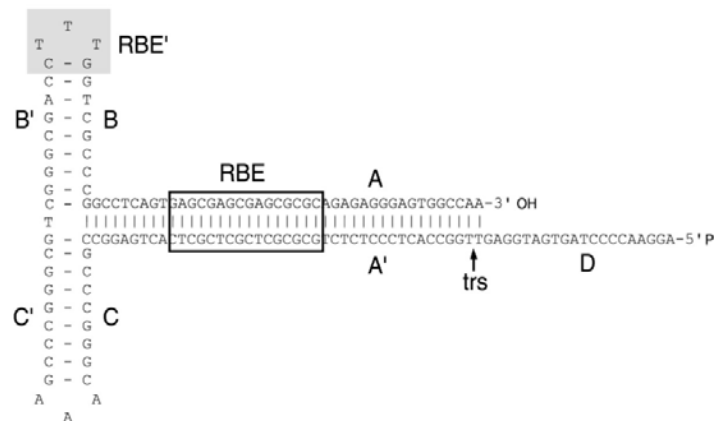


Figura 3. Estructura secundaria de la ITR de VAA-2. A-A', B-B' y C-C' representan brazos auto-complementarios de la ITR. El recuadro señalado como RBE indica la secuencia correspondiente al elemento de unión a proteínas Rep. La zona sombreada y señalada como RBE' indica una secuencia de estabilización para la unión de proteínas Rep. El sitio terminal de resolución (*trs*) está indicado con una flecha (tomado de [30]).

4.2.1.2 Proteínas estructurales.

La cápside viral está conformada por las proteínas VP1 (87 KDa), VP2 (74 KDa) y VP3 (61 KDa) en una relación estequiométrica 1:1:10 [17, 31]. Éstas son proteínas no glicosiladas [32] que poseen la misma secuencia de aminoácidos en su extremo C-terminal y que difieren entre sí únicamente en la longitud de su extremo N-terminal. Se encuentran codificadas en el gen *cap* de VAA, el cual se expresa bajo el control del promotor p40 (figura 4). Tras la transcripción del gen *cap*, el mRNA sufre un proceso de *splicing* alternativo a partir del cual se producen 2 transcritos de diferente peso molecular, uno de 2.6 Kb y otro de 2.3 Kb. VP1 se expresa a partir del mensajero de 2.6 Kb, VP2 y VP3 se expresan a partir del mensajero de 2.3 Kb utilizando codones de inicio distintos [33]. El transcrito de menor peso molecular constituye cerca del 50% del RNAm de VAA-2 en células infectadas en presencia de adenovirus, mientras que el de 2.6 Kb se encuentra en cantidades mucho menores [34]. El codón de inicio de VP2 es un codón ACG que provoca que los niveles de expresión de esta proteína sean menores a los de VP3. Por tanto, la expresión de las proteínas VP de VAA-2 está regulada tanto a nivel transcripcional como traduccional propiciando que VP1, VP2 y VP3 se expresen en una relación similar a aquélla en la cual se ensamblan [33]. A partir de un segundo marco de lectura abierto, el gen *cap* codifica para la proteína activadora de ensamblaje, AAP (23 KDa), que no forma parte de la cápside viral pero es esencial para su formación [35].

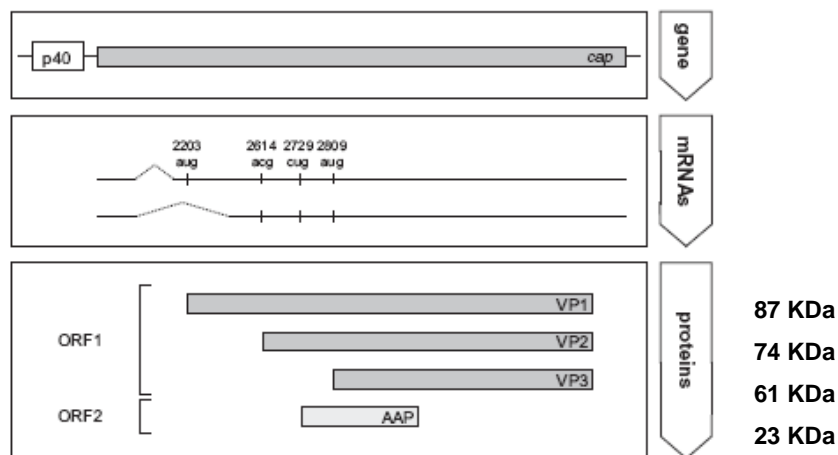


Figura 4. Información genética contenida en el gen *cap* de VAA-2 para la expresión de proteínas estructurales y de ensamblaje (tomado y modificado de: [35]). mRNAs: RNAs mensajeros, ORF: marco de lectura abierto.

A diferencia de otros virus, las proteínas estructurales de VAA carecen de la capacidad de auto-ensamblarse *in vitro* en ausencia de proteínas celulares [36]. Durante la replicación de VAA en células

de mamífero, las proteínas de la cápside se sintetizan en el citoplasma celular y son transportadas hacia el interior del núcleo, y posteriormente al nucléolo, sitio donde ocurre el ensamblaje [37-38]. Se ha observado que la concentración de las proteínas VP1 y VP2 es mayor en el interior del núcleo en comparación con el citoplasma, mientras que VP3 se encuentra uniformemente distribuida [38]. Durante la formación de las cápsides virales participan proteínas celulares asociadas al nucléolo tales como la nucleofosmina [39] y la nucleolina [40], y la proteína AAP codificada por el gen *cap* de VAA (ver figura 4) [35]. En etapas tardías de infección, en presencia de las proteínas Rep, las cápsides son liberadas del nucléolo hacia el nucleoplasma o incluso el citoplasma [38].

A fin de determinar el papel estructural y funcional de las proteínas codificadas en el gen *cap* se han producido partículas pseudo-virales de VAA-2 en células de mamífero y de insecto que contienen sólo una o dos de las proteínas estructurales [35, 38, 41-43]. Se ha encontrado que la ausencia de VP1 o mutaciones en la región N-terminal que afectan el motivo fosfolipasa A2, provocan una reducción en la capacidad transductora de las partículas virales al afectar el tráfico intracelular de la cápside hacia el núcleo, pero no afectan el ensamblaje [35, 38, 41-44]. La ausencia de VP3 tampoco afecta el ensamblaje, sin embargo provoca una disminución en la eficiencia de empaquetamiento de los genomas virales [41]. En células humanas se logró producir cápsides ensambladas expresando sólo VP3 añadiendo a la proteína una señal de localización nuclear [43]. En células de insecto, expresando las diferentes proteínas estructurales con baculovirus recombinantes independientes, no se observó formación de cápsides virales en ausencia de la proteína VP2 [42]. Los resultados discordantes obtenidos en células de insecto y células de mamífero respecto al requerimiento de VP2 para llevar a cabo el ensamblaje de la cápside viral llevaron a la posterior identificación y caracterización de la proteína AAP. Esta proteína, si bien no forma parte de la cápside viral, es esencial para el transporte de las proteínas VP al nucléolo, así como para el proceso de ensamblaje tras la acumulación de las VP en este organelo [35]. Recientemente se ha propuesto que es la ausencia de AAP, y no de VP2, en el sistema de células de insecto quien limita el ensamblaje de cápsides.

No existen reportes sobre el rendimiento de producción de proteínas VP, ni sobre los rendimientos de ensamblaje de cápsides en infecciones con el virus silvestre. En células de insecto, infectadas con el baculovirus BacCap [45], hemos obtenido concentraciones de hasta 99 µg/mL de VP3, 26 µg/mL de VP2 y 34 µg/mL de VP1. Analizando estos rendimientos se puede observar que la relación molar en que se producen estas proteínas dista de la reportada para cápsides ensambladas, y que la concentración de

VP1 y VP2 es mayor que la requerida para agotar toda la proteína VP3 durante el ensamblaje de cápsides [46].

4.2.1.3 Proteínas no estructurales: replicación y empaquetamiento de DNA de VAA.

Las proteínas no estructurales, si bien no forman parte de la cápside viral, son componentes necesarios en el proceso de replicación del virus, por lo que inicialmente fueron llamadas “replicasas” (revisado en [17]). Estas proteínas, son denominadas Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40, en referencia a su peso molecular aparente. Rep78 y Rep68 se expresan bajo el promotor *p5*, y difieren entre sí en los 85 aminoácidos del extremo C-terminal debido a un *splicing* en el transcrito. Rep52 y Rep40 se expresan bajo el promotor *p19* y difieren entre sí de la misma forma que las Rep de mayor peso molecular (revisado en: [17, 22]) (figura 5). Durante la replicación del virus silvestre, las proteínas Rep se sintetizan antes que las proteínas estructurales [38, 47]. Las proteínas Rep poseen una señal de localización nuclear en la zona cercana al extremo C-terminal (figura 6), por tanto, tras ser sintetizadas en el citoplasma son transportadas al interior del núcleo donde ocurre la replicación del DNA viral [38]. En etapas más avanzadas de infección las proteínas Rep y VP co-localizan en el núcleo, donde se han detectado complejos de cápsides virales con Rep78 y Rep52 principalmente, así como complejos de proteínas Rep con el DNA viral [37-38, 48-49].

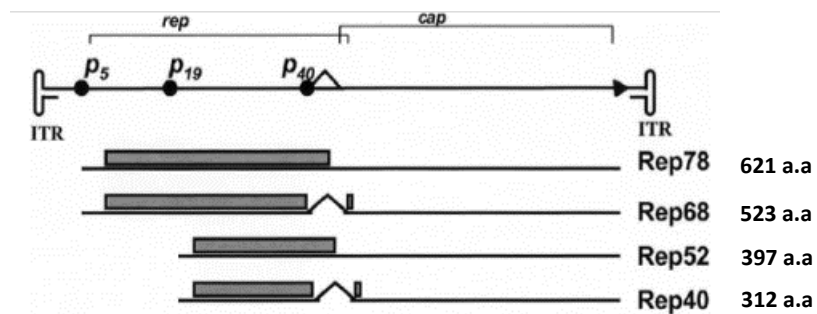


Figura 5. Información genética contenida en el gen *rep* de VAA-2 para la expresión de proteínas no estructurales (tomado y modificado de:[21]).

Todas las proteínas Rep poseen actividad helicasa de polaridad 3'-5' dependiente de ATP [50-52]. Únicamente las dos de mayor peso molecular presentan secuencias específicas de unión a DNA en el dominio constituido por los 224 aminoácidos del extremo N-terminal [23, 53], además de un dominio con actividad endonucleasa en el mismo extremo terminal (figura 6). En este dominio están localizados

dos motivos con secuencia de aminoácidos similar a la de motivos previamente asociados al mecanismo de replicación de círculo rodante o “*rolling-circle replication*” (RCR). El motivo RCR2 está asociado a la unión de cationes divalentes, mientras que el motivo RCR3 contiene un residuo catalítico de tirosina en el residuo 156 que participa en el ataque nucleofílico y la unión covalente al grupo fosfodiéster del DNA sustrato. Este residuo de tirosina es esencial para la actividad endonucleasa de la proteína, y contrariamente también participa en el proceso de ligación durante la recombinación de cadenas de ssDNA [54]. Rep78 es capaz de interactuar con otras moléculas de la misma proteína, y en presencia de las ITR interactúa formando complejos hexaméricos [55-56], donde la presencia de los residuos 164-484 del N-terminal de la proteína juegan un papel importante para la oligomerización [55]. Esta secuencia de aminoácidos la comparte también la proteína Rep68. Rep52 y Rep40 carecen de los 224 residuos del extremo N-terminal, por lo que su capacidad para formar interacciones proteína-proteína se encuentra reducida. No obstante, se ha reportado que Rep40 es capaz de unirse tanto a ssDNA o dsDNA en forma de dímeros [57].

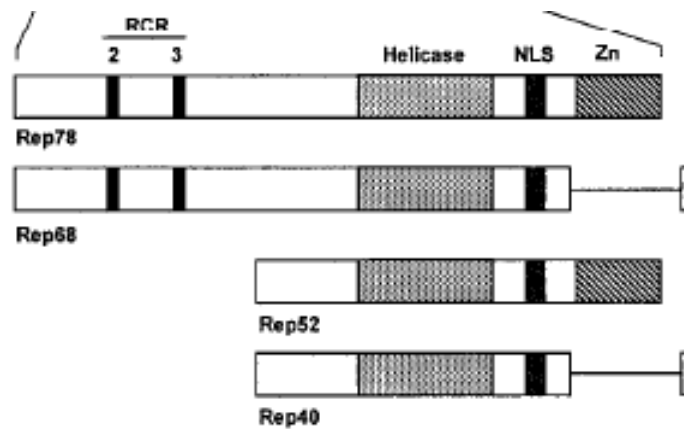


Figura 6. Representación esquemática de los dominios funcionales de las proteínas no estructurales de VAA-2 (tomado de [54]). RCR 2 y 3 indican los motivos asociados al mecanismo “*rolling-circle replication*”. NLS indica la zona que contiene la señal de localización nuclear.

Rep78 se une tanto a dsDNA [23] como a ssDNA [54], y es capaz de realizar el corte en el *trs* de ambos sustratos. Para llevar a cabo su actividad endonucleasa, Rep78 requiere de la presencia de ATP cuando el templado es dsDNA, y de iones como Mn^{2+} si se trata de ssDNA [54]. Estas observaciones muestran que primero es necesario desenrollar la doble cadena de DNA para posteriormente realizar el corte en el *trs*. Se ha propuesto que la oligomerización de Rep78 en presencia de las ITR induce el ensamblaje de

los dominios con actividad helicasa de la proteína para formar un hexámero que puede llevar a cabo el desenrollamiento de la doble cadena [29]. Para la proteína Rep40 se ha observado que la presencia de ATP favorece la unión a dsDNA [57], lo que sugiere que la capacidad de unión al DNA de la proteína está asociada con su actividad helicasa. La acumulación de ssDNA inhibe la actividad endonucleasa de Rep78 y Rep68 hasta 10 veces y, aunque en menor medida, también reduce su capacidad de unión a dsDNA [50]. La actividad helicasa de las proteínas Rep78, Rep68 y Rep40 requiere de un extremo 3' OH libre, aunque Rep40 también presenta actividad helicasa teniendo como templado dsDNA con extremos romos [52]. Por otra parte, Rep68 también puede desenrollar dúplex híbridos de RNA/DNA [21]. En el proceso de replicación del genoma viral, tanto *in vivo* como *in vitro*, Rep78 y/o Rep68 resultan indispensables [28, 58-59]. Por su parte, el empaquetamiento de genomas en cápsides previamente ensambladas sólo se lleva a cabo en presencia de Rep52 y/o Rep40 [60]. Debido a su relevancia, los procesos de replicación y empaquetamiento de DNA de VAA se describen detalladamente a continuación.

Replicación del DNA de VAA.

Como se mencionó previamente, la proteína Rep78 posee dominios que le permiten reconocer secuencias específicas de unión al DNA [23, 53], desenrollarlo [50-52] y llevar a cabo un corte sitio-específico en sólo una de las cadenas de DNA mediante la participación de dominios catalíticos involucrados también en la ligación de ssDNA [26, 54]. Estas funciones también son llevadas a cabo por proteínas que participan en el mecanismo de replicación del círculo rodante, mecanismo que involucra la replicación asimétrica de las cadenas líder y retrasada teniendo como sustrato dsDNA. Se ha propuesto que la replicación de los parvovirus se lleva a cabo mediante un modelo similar, denominado mecanismo de la horquilla rodante o "*rolling-hairpin method*" (figura 7). En este modelo el sustrato es ssDNA y se lleva a cabo la formación de un auto-iniciador de la replicación mediante la formación de estructuras secundarias en secuencias palindrómicas auto-complementarias.

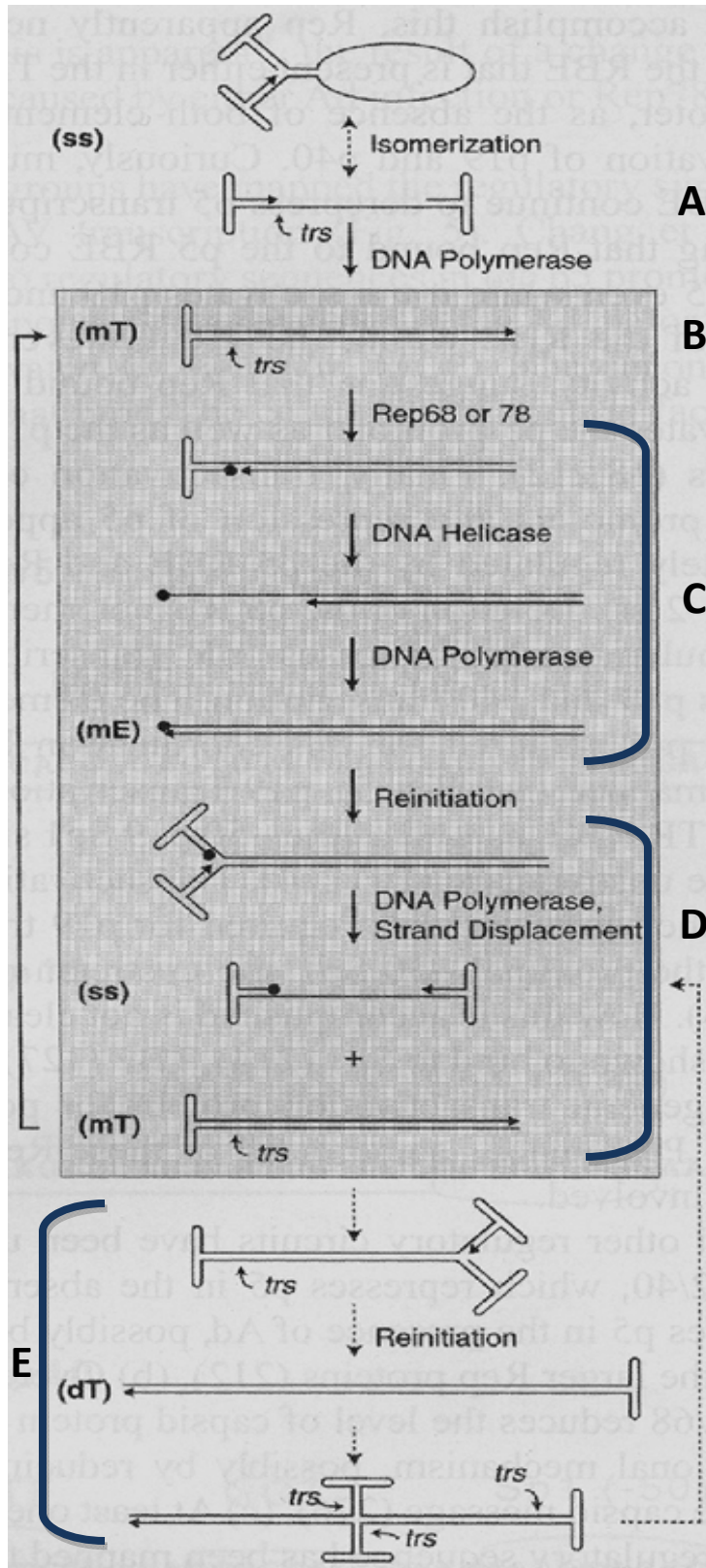


Figura 7. Replicación del genoma de VAA-2. A) Formación del *primer* intra-molecular en las ITR, B) Extensión de la cadena de DNA y formación de un dúplex intra-molecular, C) Rep78/Rep68 cortan en el *trs* formando un enlace covalente con la cadena de DNA, la cadena complementaria se extiende para generar un genoma monomérico de doble cadena. D) Reinicio del ciclo de replicación tras la formación de nuevos *primers* intra-moleculares en las ITR. E) Síntesis de formas replicativas multiméricas no resueltas en la zona del *trs* por la actividad endonucleasa de Rep78/Rep68 (tomado y modificado de [16]).

Al inicio del proceso de replicación del genoma de VAA (figura 7), la ITR forma un dúplex intra-molecular en forma de T (ver figura 3) que sirve como iniciador para la replicación y la formación de una doble cadena de DNA a partir de su extremo 3' OH. Esta hebra de DNA dúplex posee un extremo ligado covalentemente y es llamada forma replicativa monomérica (MRF). La MRF es transcrita y a partir de la traducción de los mensajeros se producen las proteínas Rep78 y Rep68. Estas proteínas se unen al RBE de la ITR ligada covalentemente y realizan un corte en el *trs* de sólo una de las cadenas de DNA [23, 26, 54]. Se ha observado que Rep78 permanece covalentemente unida al extremo 5' del sitio de corte. Tras la resolución de la MRF, se lleva a cabo la extensión de la cadena complementaria para formar un genoma monomérico de doble cadena, mismo que funciona como templado en un nuevo ciclo de replicación. La MRF, no resuelta mediante el corte en el *trs*, también puede servir como templado en ciclos de replicación sucesivos. En este caso, se generan formas replicativas multiméricas o constituidas por un dúplex intra-molecular que contiene múltiples copias de la secuencia del genoma viral en forma concatamérica (revisado en [17]). En tejido muscular transducido con vVAA se ha observado la formación de concatámeros episomales de forma circular que permiten la expresión del transgen por períodos prolongados de tiempo [8].

En síntesis, la función primaria de Rep78 y Rep68 es resolver el extremo de la ITR cerrado covalentemente para obtener 2 hebras de DNA que sirvan de templado en posteriores ciclos de replicación, y producir genomas virales monoméricos disponibles para su empaquetamiento. Este proceso podría requerir de una relación estequiométrica adecuada entre el número de copias de DNA y la concentración de proteínas Rep para que la replicación se lleve a cabo de manera eficiente. Sin embargo, durante la caracterización de la amplificación de los genomas virales poco se ha estudiado el efecto de las concentraciones de los diferentes componentes involucrados, información que sin duda resultaría de gran utilidad para optimizar la replicación en sistemas recombinantes.

Durante la replicación del DNA viral, participan elementos adicionales a las proteínas Rep. Algunos de estos elementos provienen de la célula hospedero, mientras que otros son expresados por el virus auxiliar. Por ejemplo, se ha observado que la presencia de la proteína nucleofosmina y la proteína humana de unión a ssDNA, RPA, estimulan tanto la interacción de Rep78 con las ITR como la actividad endonucleasa [39, 61-62]. Adicionalmente, la presencia de las proteínas de unión a ssDNA de Adenovirus (Ad-DBP) y Herpesvirus (ICP8) estimula también la unión de Rep78/Rep68 a las ITR y aumenta la actividad endonucleasa [61-62].

Empaquetamiento del DNA de VAA.

El dominio helicasa de Rep52 y Rep40 es esencial para el proceso de empaquetamiento, por lo que se ha propuesto que estas proteínas desenrollan la doble cadena de DNA al mismo tiempo que la introducen en la cápside [60]. Si bien todas las proteínas Rep poseen actividad helicasa dependiente de ATP, sólo las Rep de bajo peso molecular pueden llevar a cabo el empaquetamiento. Este proceso se lleva a cabo introduciendo sólo una de las cadenas de DNA a través del poro formado por el eje de simetría 5 [63-64] de la cápside previamente formada, a partir su extremo 3' [60]. La identificación de complejos de cápsides y proteínas Rep, principalmente Rep78 [48], en ausencia del genoma viral indican la formación de complejos de pre-empaquetamiento. Se ha detectado que el dominio localizado entre los aminoácidos 322 y 482 de las Reps participa en la interacción directa con la cápside viral [49].

La longitud de la cadena de DNA que puede introducirse a la cápside está limitada por el diámetro de ésta. Aunque el genoma de VAA es de aproximadamente 4.7 Kb, se ha observado empaquetamiento de genomas recombinantes con longitud de hasta 5.2 Kb [65]. Por tanto, una resolución ineficiente de la MRF del genoma viral resultará en la producción de formas replicativas multiméricas o concatámeros que ya no son sujetos de empaquetamiento, reduciendo así el porcentaje de partículas virales biológicamente activas.

En infecciones con VAA silvestre, las proteínas Rep son los primeros productos de la transcripción viral [47]. La replicación de DNA viral inicia desde las 10 hpi y alcanza un máximo hasta las 20 hpi, tiempo en que la concentración de proteínas Rep y VP también es máxima. A partir de las 12 hpi se observa la presencia de ssDNA, producto del empaquetamiento de los genomas virales en las cápsides previamente ensambladas. La acumulación de ssDNA es máxima después de las 24 hpi, tiempo en que la síntesis de Reps y VPs ha disminuido [47]. Estas observaciones indican que la síntesis de proteínas virales, así como la replicación y el empaquetamiento de genomas se llevan a cabo simultáneamente, lo que podría sugerir que los centros de replicación, transcripción y empaquetamiento de genomas virales sean los mismos.

4.3 Producción de vectores de virus adeno-asociado.

Para producir un vector de virus adeno-asociado es necesario producir la cápside viral, el genoma recombinante y las proteínas involucradas en su replicación y empaquetamiento. Estos elementos se pueden producir mediante la transfección de células de mamífero con plásmidos, o mediante la infección de células de insecto con baculovirus recombinantes.

4.3.1 Producción de vVAA utilizando el sistema de células de mamífero.

Tradicionalmente, los vVAA se han producido mediante expresión transitoria utilizando cultivos de células HEK293 o HeLa, ambas derivadas de humano. La producción de los vectores se lleva a cabo transfecando células con dos diferentes plásmidos que contienen los genes *cap* y *rep* en un plásmido, y el genoma recombinante de VAA en otro. Adicionalmente, este sistema requiere de la función del virus auxiliar para llevar a cabo la expresión de los genes de VAA y la replicación del genoma recombinante. La forma en que se proveen los genes auxiliares de adenovirus ha evolucionado. Inicialmente, se realizaba infectando con cepas de adenovirus (Ad) silvestre, sin embargo, el riesgo de obtener stocks de vVAA contaminados con el virus auxiliar limitaba las posibilidades de empleo en terapia humana. El uso de Ad silvestre se sustituyó por Ad recombinantes con deleciones en la región E1 (Ad Δ E1). Esta deleción los hace virus no competentes, por lo que son capaces de replicarse únicamente en células HEK293 que poseen estos genes virales. No obstante, la infección con Ad Δ E1 genera partículas virales que, aunque no son infecciosas, también deben ser purificadas del stock de VAA. Actualmente, se ha incrementado el número de protocolos que han sustituido la infección con Ad Δ E1 por la transfección con un tercer plásmido que codifica para las proteínas de Ad que proporcionan actividad auxiliar durante la producción de VAA (revisado en: [4]). La producción de VAA con actividad biológica se lleva a cabo únicamente en células que han sido transfecadas con todos los plásmidos y que, por tanto, expresan todos los elementos de VAA así como las proteínas auxiliares de Ad. En este sistema de expresión es necesario asegurar que la concentración de cada plásmido añadido al cultivo sea suficiente para transfectar el mayor porcentaje de células. La producción y purificación de plásmido añade un cuello de botella al sistema de producción en la gran escala. Los rendimientos de partículas de vVAA con DNA

empaquetado resistente a actividad DNAsa (DRP, por *DNase resistant particles*) que se obtienen en estos sistemas son del orden de $10^3 - 10^4$ DRP/cél.

Se han desarrollado protocolos de producción empleando la línea HEK293 adaptada a crecer en suspensión utilizando medios de cultivo libres de suero, lo que favorece la producción a gran escala. También se ha mejorado la eficiencia de transfección utilizando poli-etilenglicol como agente de transfección. No obstante, el escalamiento de las condiciones de transfección a la gran escala resulta complicado. Además, durante la producción de biofármacos para uso en terapia humana resulta indispensable asegurar la inocuidad de los diferentes componentes empleados en la producción (DNA plasmídico, agentes de transfección, líneas celulares, medio de cultivo, etc.), por lo que a nivel industrial resulta más conveniente reducir el número de componentes utilizados para la producción.

Otra vertiente de la producción de vVAA en células de mamífero involucra el desarrollo y uso de líneas celulares estables. Se utilizan células HeLa modificadas sólo con los genes *cap* y *rep* de VAA, denominadas líneas celulares empaquetadoras, las cuales son transfectadas con el plásmido que contiene el genoma recombinante de VAA. Los genes auxiliares se proveen ya sea transfectando con un plásmido o infectando con Ad. En células empaquetadoras se han obtenido rendimientos de 10^3-10^5 DRP/cél. Por otra parte, se utilizan líneas celulares modificadas con los genes *cap* y *rep* de VAA y el genoma recombinante de VAA, denominadas líneas productoras, donde las funciones auxiliares se proveen también infectando con Ad. Los rendimientos obtenidos en células productoras alcanzan 10^4-10^6 DRP/cél (revisado en [4]). Resulta evidente que el empleo de líneas celulares productoras incrementa considerablemente la productividad específica de vVAA. Sin embargo, el desarrollo de líneas celulares estables es un proceso muy complejo y largo que limita la versatilidad del sistema para la producción de vectores con nuevos serotipos y diferentes transgenes de interés. Además, el empleo de células HeLa obliga al uso de Ad silvestre para lograr la expresión de los genes de VAA para evadir la necesidad de transfectar con plásmidos, por lo que la inocuidad del sistema de producción se ve comprometida en pro del incremento en los rendimientos.

4.3.2 Sistema de células de insecto-baculovirus.

Tomando en cuenta las limitaciones que enfrenta la producción de vVAA en células de mamífero se exploró el sistema de células de insecto-baculovirus como plataforma alternativa de producción [45],

obteniendo resultados que han alentado la implementación de este sistema para la producción del vector a gran escala.

Desde hace varias décadas, el sistema de células de insecto-baculovirus (SCI-BV) ha sido utilizado ampliamente para expresar proteínas con modificaciones post-traduccionales de complejidad media y producir partículas pseudo-virales a nivel laboratorio. No obstante, el interés en este sistema para su empleo a nivel industrial ha incrementado en los últimos años. En el 2009 la FDA aprobó el fármaco Cervarix® (GSK), una vacuna para prevenir el cáncer cérvico-uterino, misma que constituye el primer biofármaco para uso humano producido en este sistema. El SCI-BV, además de contar con la aprobación de las instancias regulatorias para la producción de biofármacos, posee otras ventajas atractivas para su uso a nivel industrial. Entre ellas, el escalamiento del proceso de producción es relativamente sencillo debido a que se cuenta con líneas celulares bien caracterizadas adaptadas a crecer en suspensión. Además, en este sistema es posible implementar cultivos de alta densidad celular para incrementar la productividad volumétrica. A diferencia del sistema de células de mamífero donde la transfección con plásmidos constituye una limitación del proceso, en el SCI-BV se puede infectar con bajas cantidades de baculovirus recombinantes que se replicarán y propagarán la infección a células que inicialmente no fueron infectadas (revisado en: [66-67]).

De las líneas celulares más ampliamente utilizadas en este sistema destacan la Sf9, Sf21 (ambas derivadas de *Spodoptera frugiperda*) y High Five™ o H5 (derivada de *Tricoplusia ni*), todas disponibles comercialmente y adaptadas a crecer en suspensión en medios libres de suero. Sf9 es la línea celular utilizada por excelencia para la amplificación y titulación de stocks virales debido a su alta productividad de baculovirus infecciosos. Por su parte, la línea H5 muestra una mayor productividad específica de proteína recombinante (revisado en: [66-67]). No obstante, la alta actividad proteolítica observada en esta línea celular [68] constituye una fuerte preocupación para el proceso de producción, en particular durante las etapas de purificación. Por esta razón, a nivel industrial se ha adoptado como principal línea productora de proteína recombinante a la línea celular Sf9 o líneas derivadas de ésta.

4.3.2.1 Interacciones célula de insecto-baculovirus.

Los sistemas de expresión mediante baculovirus recombinantes disponibles comercialmente están basados en el baculovirus *Autographa californica* nucleopoliedrovirus (AcMNPV) modificado. El

AcMNPV es capaz de infectar una gran variedad de insectos lepidópteros. Su genoma es DNA de doble cadena de 134 Kpb de longitud y contiene aproximadamente 150 marcos de lectura abiertos [69]. La cápside viral, constituida principalmente por la proteína VP39, posee un diámetro de 30-60 nm y una longitud de 250-300 nm.

Los sistemas de expresión recombinantes hacen uso de uno de los promotores más fuertes que existen en la naturaleza, el promotor *polh*. Dicho promotor permite la expresión de proteína recombinante en niveles tan altos que pueden constituir hasta el 50% del rendimiento total de proteína en el cultivo (revisado en: [67]). Además del promotor *polh* se utilizan los promotores *p10*, *gp64* e *ie1*, que controlan la expresión de diferentes genes a distintos tiempos y niveles de expresión.

La producción de proteínas recombinantes en el SCI-BV es un proceso que depende de la interacción que existe entre el baculovirus y la célula huésped durante la infección viral. Por tanto, resulta indispensable entender el ciclo de replicación del baculovirus y los cambios citológicos que éste provoca en la célula tras la infección. A continuación se describen aspectos generales de la biología del baculovirus y su ciclo de replicación.

4.3.2.2 Baculovirus.

Los baculovirus tienen como hospederos naturales a animales invertebrados como los pertenecientes al orden *Diptera*, *Hymenoptera* y *Lepidoptera*, principalmente. Estos virus pertenecen a la familia *Baculoviridae* y su nombre se deriva de la morfología que posee su cápside, misma que asemeja un báculo. Los baculovirus se dividen en dos géneros: los nucleopoliedrovirus (NPV) y los granulovirus (GV). Los NPV contienen varias partículas virales ocluidas en un mismo cristal de estructura poliédrica, mientras que los GV contienen sólo una partícula viral en una estructura oval. Los virus infecciosos existen en dos morfologías distintas: como virus ocluidos, y como virus gemados o no ocluidos (ver figura 8). Los virus gemados son liberados de la célula huésped tras completar el empaquetamiento de DNA en la cápside viral, el escape de estos virus implica la adquisición de parte de la membrana de la célula huésped enriquecida con la proteína viral GP64. Los virus ocluidos, por su parte, permanecen en el interior del núcleo celular inmersos en un cristal (cuerpo de oclusión) constituido principalmente por la proteína poliedrina (revisado en: [70-71]). En la mayoría de los baculovirus recombinantes comerciales se ha eliminado la secuencia codificante para la poliedrina pero se mantiene el promotor

polh, de esta manera es posible expresar la proteína recombinante bajo el control transcripcional de este promotor. En estos baculovirus recombinantes no se presenta la morfología ocluida, aún cuando la proteína de interés se exprese bajo un promotor distinto a *polh*.

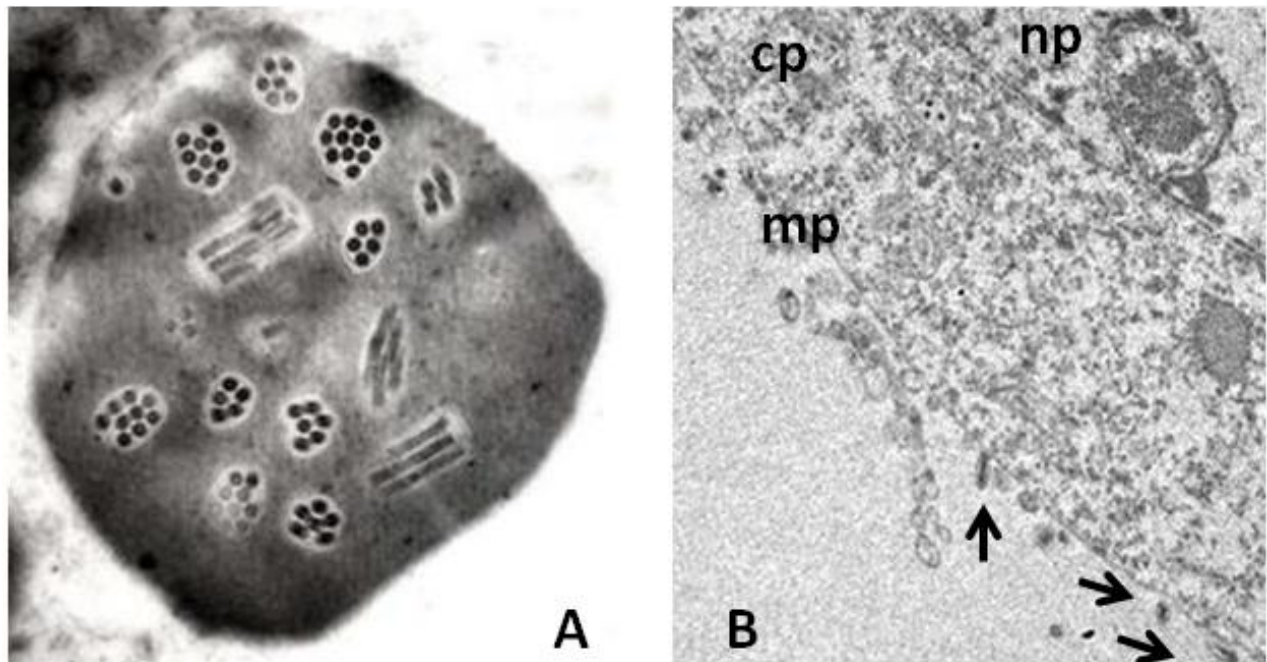


Figura 8. Micrográficas electrónicas de NPV. A) Baculovirus ocluidos en cristal de polihedrina. B) Baculovirus no ocluidos de AcMNPV escapando de la membrana plásmática de una célula H5 infectada con el baculovirus BacCap (la flecha indica los baculovirus no-ocluídos, np: nucleoplasma, cp: citoplasma, mp: membrana plasmática). Imagen A tomada de Proteus Services for Industry website.

4.3.2.3 Ciclo de infección de baculovirus.

El proceso de infección de insectos lepidópteros por el baculovirus silvestre inicia por vía oral. Los cuerpos de oclusión que contienen a los viriones son disueltos en el intestino medio de la larva debido a la presencia de proteasas y al pH alcalino que puede oscilar entre 10 y 12. Los virus ocluidos son entonces liberados y pueden llevar a cabo una infección primaria en las células del intestino medio para posteriormente extender la infección al resto del organismo. El ciclo de replicación del baculovirus ha sido dividido en 4 etapas de infección (figura 9).

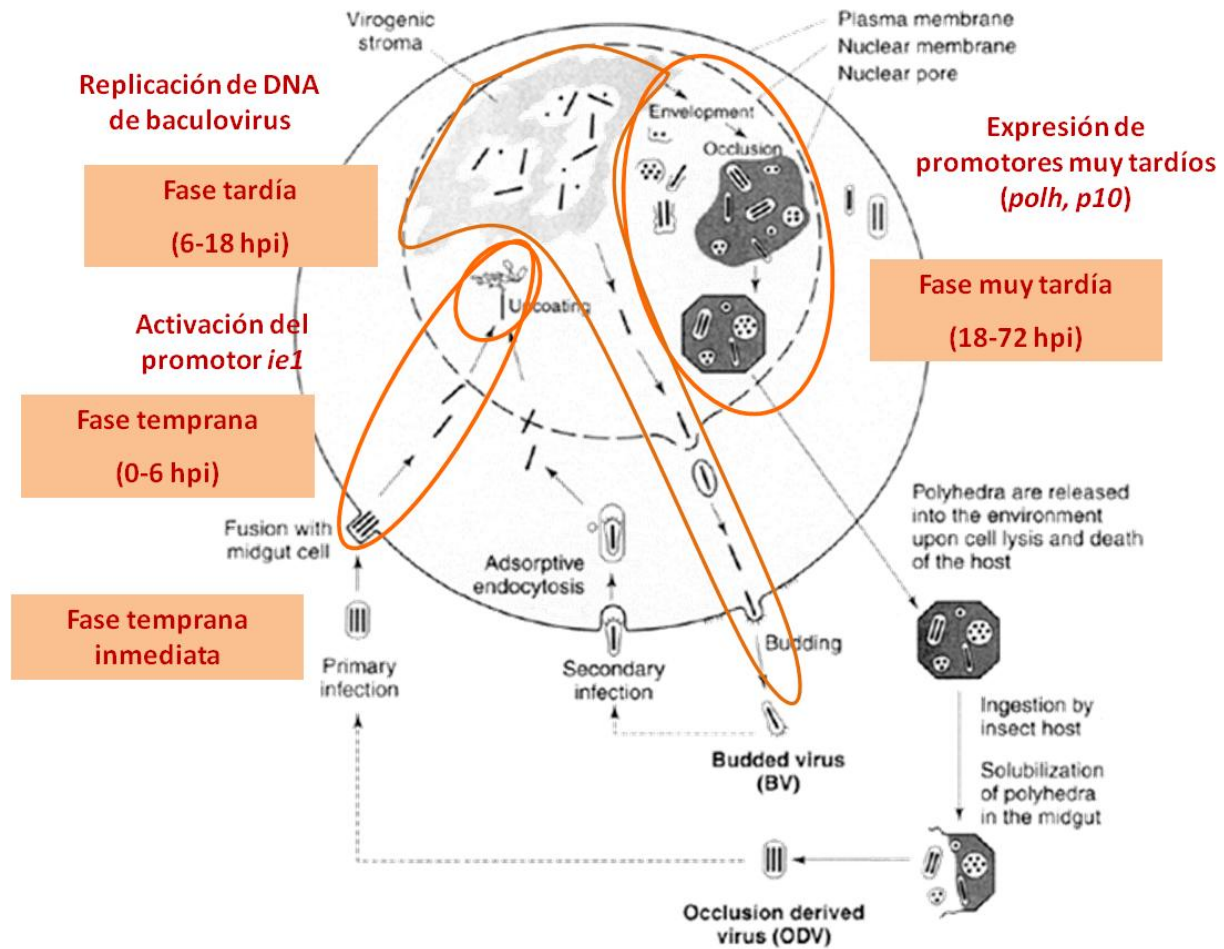


Figura 9. Descripción esquemática del ciclo de infección de baculovirus (modificado de [72]).

a) *Fase temprana inmediata (0 horas post-infección, hpi)*: inicia con la liberación de los viriones a partir de los cuerpos de oclusión, y el contacto con los receptores celulares.

b) *Fase temprana (0-6 hpi)*: inicia cuando los virus penetran al interior de la célula mediante un proceso de endocitosis mediado por receptor. Tras la acidificación del endosoma, los viriones son liberados al citoplasma para continuar su tráfico hacia el núcleo celular. Se ha observado que la polimerización de túbulos de actina dirige las cápsides virales en su tráfico a través del citoplasma. Finalmente, los virus penetran en el núcleo celular a través del complejo de poros nucleares (revisado en: [71, 73]). Una vez en el interior, el DNA es liberado de la cápside viral e inicia la cascada transcripcional que dará lugar a la nueva progenie viral. Uno de los primeros genes en transcribirse es el que codifica para la proteína *ie1*. Esta proteína tiene la capacidad de unirse a las regiones homólogas (*hrs*) del genoma de baculovirus [74], las cuales están constituidas por unidades de aproximadamente 70

pb que contienen un palíndromo imperfecto de 30 pb. Las *hrs* se encuentran distribuidas a lo largo del genoma viral en 8 sitios y fungen como orígenes de replicación y como potenciadores transcripcionales. iE1 posee también la capacidad de interactuar con otros factores de transcripción, así como con los complejos transcripcionales formados por la RNA polimerasa II de la célula. De esta forma, reclutando complejos transcripcionales a las *hrs* del genoma viral, iE1 actúa como transactivador de la transcripción de genes tempranos involucrados en la replicación del DNA tales como: DNA pol, LEF-1 (primasa), LEF-2 (factor accesorio de la primasa), LEF-3 (ssDBP), P143 (helicasa). Durante la transcripción de los genes tempranos el baculovirus hace uso de la maquinaria transcripcional celular y, mediante mecanismos aún no caracterizados, provoca una disminución regulada en los niveles de transcripción de algunos genes de la célula hospedera. La transcripción de los genes tempranos se encuentra regulada por secuencias tales como la caja TATA y la secuencia consenso CATG (o CATT), y se extiende hasta el final de la fase tardía de infección (revisado en: [75-76]).

c) *Fase tardía de infección (6-18 hpi)*: esta fase inicia con la replicación del DNA viral y está caracterizada por la marginación de la cromatina a la periferia del núcleo y la formación de un sub-compartimento nuclear de alta densidad conocido como estroma virogénico [77]. El estroma virogénico se genera tras la acumulación de las proteínas virales necesarias para sostener la replicación del DNA viral (iE1, LEF-3, P143) [74, 78]. En este sitio se llevan también a cabo la transcripción de genes tardíos y el ensamblaje de las cápsides virales, procesos que al parecer ocurren de forma simultánea (revisado en: [79]). En esta etapa de infección, la transcripción de los genes tardíos se lleva a cabo utilizando la RNA polimerasa II codificada por el baculovirus. La replicación del DNA inicia una vez que se han alcanzado concentraciones suficientes de las proteínas involucradas en este proceso. No obstante, resulta necesario además que estas proteínas formen el andamiaje que dé lugar a los complejos de replicación dentro del estroma virogénico [74]. Se ha observado que la proteína estructural VP39 colocaliza con los sitios de replicación del DNA, por lo que el ensamblaje de las cápsides parece tener lugar en los mismos sub-compartimentos nucleares donde se replica el DNA [78]. El DNA viral es empaquetado en cápsides pre-ensambladas y parte de la progenie viral inicia su tráfico hacia el exterior de la célula, donde la polimerización de túbulos de actina juega nuevamente un papel importante en el tránsito de los viriones desde el núcleo hacia la membrana plasmática. Al escapar de la membrana plasmática los virus adquieren una envoltura lipídica en la cual está contenida la glicoproteína viral GP64, responsable de reconocer el receptor en las células blanco para extender la infección viral. Debido a la relevancia del tema de la replicación del DNA viral en este trabajo, a continuación se describe un panorama general

sobre este complejo mecanismo y la participación de algunas de las proteínas más destacadas en este proceso.

La helicasa P143 contribuye al desdoblamiento de la doble cadena de DNA exponiendo a ambas cadenas a ser templadas para la replicación y permitiendo la entrada de la maquinaria de transcripción. La ssDBP LEF-3 se une a las cadenas sencillas separadas tras el desdoblamiento de la doble hélice para prevenir la formación de estructuras secundarias e incluso la re-naturalización de la doble hélice. Se ha observado que LEF-3 es responsable de transportar a P143 a los centros de replicación [74]. LEF-3 interactúa también con una alcalin-nucleasa (AN) regulando su función, ya sea para desdoblar el DNA o para enrollarlo. Se cree que los complejos formados por AN/LEF-3 participan en procesos de recombinación del DNA. Existe otra DBP (Ac25) con propiedades similares a las de LEF-3. Esta DBP también lleva a cabo el desdoblamiento o enrollamiento de la doble hélice, compite además con LEF-3 por los sitios de unión al ssDNA y es capaz de protegerlo de la hidrólisis causada por los complejos AN/LEF-3. Por otra parte, la DNA polimerasa viral (DNA Pol) es la responsable de llevar a cabo la replicación del DNA a partir de las cadenas separadas por la DNA helicasa. Para hacerlo requiere de un extremo 3'OH, mismo que es proporcionado por un oligonucleótido de RNA sintetizado por la DNA primasa LEF-1. La función de LEF-2 no está bien definida, pero se sabe que interactúa con LEF-1 y con el ssDNA, y que es esencial durante la replicación del DNA. El genoma de AcMNPV no codifica para topoisomerasas ni DNA ligasas, enzimas indispensables para el proceso de replicación del DNA, por tanto estas actividades enzimáticas deben provenir de la maquinaria celular. Aún no se ha vislumbrado claramente cuál es el mecanismo mediante el cual se replica el DNA viral. La formación de concatámeros del genoma sugiere que éste se replica mediante el mecanismo del círculo rodante, mientras que la inserción de concatámeros en distintos sitios del genoma sugiere que el mecanismo de replicación es dependiente de recombinación. Es posible que la replicación se lleve a cabo mediante una combinación de ambos mecanismos, lo que explicaría la producción de cadenas de DNA de tamaño mucho mayor al del genoma viral y la aparición de múltiples ramas de replicación a partir de los diferentes *hrs* contenidos en el genoma. Así, la resolución final de los genomas para generar genomas circulares disponibles para empaquetarse en las cápsides pre-ensambladas podría llevarse a cabo mediante una recombinación final entre las regiones *hrs* del genoma. El mismo proceso de recombinación entre las regiones homólogas podría ser el responsable de la pérdida de secuencias codificantes del genoma y la propagación de virus defectuosos-interferentes observados en cultivos celulares (revisado en: [76]).

d) *Fase muy tardía de infección (18-72 hpi)*: esta fase inicia con el fin de la replicación del DNA viral. Se caracteriza por la supresión de la expresión de los genes tempranos y tardíos, y el inicio de la

expresión de los llamados genes muy tardíos como el de poliedrina y P10. Los niveles de expresión de estos genes son inusualmente altos, por lo que se ha sacado provecho de ello para el diseño de sistemas de expresión utilizando baculovirus recombinantes. Los altos niveles de expresión son consecuencia de la presencia de una secuencia rica en A/T río abajo del promotor que funciona como potenciadora de la transcripción, así como del alto número de copias del genoma viral que permanecen en el núcleo sin empaquetar y que sirven como templado para la transcripción. Adicionalmente, la presencia de VLF-1, una proteína que actúa como factor de transcripción muy tardío, incrementa la transcripción mediante la interacción directa con las regiones potenciadoras ricas en A/T. En esta fase se lleva a cabo la formación de los cuerpos de oclusión, donde la progenie viral que no abandonó el núcleo es embebida primeramente por una membrana nuclear para posteriormente ser ocluída en los cristales de poliedrina. Al parecer la proteína P10 está involucrada en la formación de estos cristales, aunque estructuralmente no forma parte de ellos. La formación de los cuerpos de oclusión y su liberación al medio ambiente tras la lisis celular completa el ciclo de infección del baculovirus (revisado en:[80]). Cabe resaltar que la única diferencia en el proceso de replicación de baculovirus silvestres y recombinantes es que los últimos no generan cuerpos de oclusión.

4.3.2.4 Aspectos generales del cultivo de células de insecto-baculovirus: multiplicidad de infección, tiempo de infección.

La concentración celular al momento de la infección (CCI o tiempo de Infección, TDI) y la multiplicidad de infección (MDI) son algunas de las variables que afectan de manera importante el desempeño de los cultivos de células de insecto y, por tanto, gran parte de los estudios en el SCI-BV versan sobre la manipulación de estas condiciones y cómo la relación entre ambas impacta en la productividad (revisado en:[66-67]). La MDI se refiere al número de virus infecciosos añadidos al cultivo por cada célula, y se expresa en unidades formadoras de placa por célula (UFP/cél). Dado que la MDI define la proporción entre virus infecciosos y células en un cultivo, la fracción de células infectadas al momento de la adición del baculovirus (infección primaria) dependerá de esta variable. Para calcular la probabilidad de infección de una célula con un baculovirus se ha utilizado la distribución de Poisson obteniendo resultados experimentales similares a los predichos por el modelo [81-82]. La distribución de Poisson permite expresar la probabilidad de ocurrencia de un número de eventos independientes entre sí en un tiempo fijo si se conoce la tasa media con que ocurren dichos eventos. Resulta factible utilizar este modelo predictivo dado que la infección de una célula por un baculovirus es un evento

independiente de la infección de otras células, y que es posible medir la tasa de infección en un tiempo determinado de cultivo. La probabilidad de infección a una MDI específica está dada por la ecuación 1, donde $P_{(n)}$ es la probabilidad de que una célula sea infectada por n partículas infecciosas. De acuerdo con esta ecuación, al incrementar la MDI aumenta la probabilidad de que una célula sea infectada más de una vez. Esto implica que el número de copias del gen recombinante dentro de la célula aumenta, por lo cual es posible incrementar también la expresión del producto de interés. Esta es una razón por la cual la manipulación de la MDI tiene efectos sobre la productividad del sistema.

Ecuación 1

$$P_{(n)} = \frac{MDI^n e^{-MDI}}{n!}$$

Las células que resultan infectadas en la infección primaria dejan de dividirse y son las responsables de la producción inicial de proteína recombinante, así como de la primera progenie de baculovirus liberada al medio de cultivo. Las células que inicialmente no fueron infectadas, y siguieron replicándose, pueden ser infectadas por estos baculovirus (infección secundaria), y así sucesivamente. Esto permite que sea posible infectar a MDI tan bajas como 0.0001 UFP/cél obteniendo buenos rendimientos [83].

Por su parte, el TDI se refiere a la concentración celular alcanzada en el cultivo al momento de la infección. De modo que, indirectamente esta variable hace referencia a la concentración de nutrientes en el medio de cultivo. En cultivos infectados a altos TDI el rendimiento de producto es mayor cuando se utilizan altas MDI. Por otra parte, la disminución en la productividad específica en cultivos de alta densidad celular está relacionada con la limitación de nutrientes [84-86]. Por tanto, la infección a altas MDI asegura que prácticamente el total de la población sea infectada al momento de añadir el virus y que los nutrientes del medio de cultivo sean empleados para la producción de proteína recombinante y no para la replicación celular. No obstante, las estrategias de alimentación o adición de nutrientes han permitido incrementar la productividad específica y mejorar los rendimientos en cultivos de alta densidad celular a bajas MDI [87]. Por otro lado, los rendimientos en cultivos infectados a TDI bajos aumentan cuando se utilizan MDI bajas [83, 88]. Esto se relaciona con la capacidad del cultivo para sostener la replicación celular lo que permite, por un lado, mantener la propagación viral en células no infectadas y, por otro, sostener la producción de proteína recombinante en condiciones de no limitación de nutrientes.

4.3.2.5 Producción de vectores de virus adeno-asociado en el SCI-BV.

El primer sistema desarrollado para producir vVAA en células de insecto, mismo que se ha utilizado en la mayoría de los estudios referentes a la optimización del proceso, consta de 3 baculovirus recombinantes denominados BacCap, BacRep y BacGFP [45]. BacCap contiene el cassette para la expresión las proteínas del gen *cap* de VAA-2 bajo el control del promotor *polh*. BacRep expresa las proteínas no estructurales Rep78 y Rep52 (involucradas en replicación y empaquetamiento de los genomas de VAA) bajo el control de los promotores *ie1* atenuado ($\Delta ie1$) y *polh* respectivamente. Y BacGFP contiene el genoma recombinante del vVAA de 2.65 Kpb, mismo que expresa EGFP como proteína reportera bajo los promotores *p10* y de *CMV* para su expresión en células de insecto y de mamífero, respectivamente. El ensamblaje de vVAA utilizando este sistema requiere que una misma célula sea infectada con los 3 distintos baculovirus recombinantes para que se expresen todos los componentes del vector. La producción del vector empieza en la etapa temprana de infección del baculovirus (0-6 hpi), momento en que se activa el promotor $\Delta ie1$ permitiendo la expresión de la proteína Rep78. Rep78 debe ser transportada al núcleo celular, en particular a la zona del estroma virogénico donde se llevará a cabo la replicación de DNA. En la etapa tardía de infección (6-18 hpi) inicia la replicación del DNA de baculovirus y con él la replicación del genoma recombinante de VAA (gVAA). Durante esta etapa continúa la expresión de la proteína Rep78. En presencia de esta proteína, por medio de su actividad endonucleasa, los gVAA pueden ser escindidos del genoma de baculovirus, permitiendo la replicación independiente de los gVAA. A partir de las 18 hpi, en la etapa muy tardía de infección, el promotor $\Delta ie1$ se inactiva y cesa la expresión de Rep78. Por otra parte, se activan los promotores *polh* y *p10* e inicia la expresión de Rep52 y de las proteínas de la cápside de VAA. Las proteínas de la cápside y Rep52 deben ser transportadas al núcleo celular para que se lleve a cabo el ensamblaje de las cápsides y el empaquetamiento del DNA. En esta misma fase se expresa también la proteína reportera EGFP indicando la presencia de los gVAA. Los gVAA resueltos por Rep78 en forma monomérica se empaquetan en las cápsides ensambladas por la acción de la proteína Rep52. Únicamente las cápsides que han encapsidado DNA poseerán potencial para actuar como vectores terapéuticos. Como puede observarse, la producción de vVAA funcionales es un proceso orquestado en diferentes etapas que requiere de la expresión de diversos elementos y su adecuada interacción. Para ello es necesario que estos elementos se localicen en sitios específicos dentro de la célula y que su concentración no sea limitante.

Con el sistema desarrollado por Urabe et al. [45] los rendimientos específicos de partículas de vVAA con DNA resistente a nucleasas (DRP), del orden de 10^4 DRP/cél, pueden ser iguales o incluso mayores a los obtenidos mediante transfección de células HEK293 [89-90]. Los estudios sobre producción de vVAA en el SCI-BV se han enfocado principalmente a incrementar los rendimientos desde una perspectiva de cultivo, modificando la MDI de los diferentes baculovirus o manipulando el TDI, o a la implementación de plataformas de purificación apropiadas para este sistema [91-100]. Mediante la manipulación de la MDI de los baculovirus ha sido posible observar que la producción de vVAA es un proceso complejo, donde variaciones en la concentración de alguno de los componentes del vector impacta en el rendimiento de partículas con capacidad transductora [91, 94]. Por ejemplo, una disminución en la concentración relativa de la proteína Rep52 provoca una reducción casi proporcional en el rendimiento de partículas transductoras, constituyendo, al parecer, el factor que más influye sobre los rendimientos de partículas con actividad biológica [94]. Previamente se había observado que la relación de cápsides totales (PV) con respecto a cápsides con DNA en el SCI-VB es aproximadamente 60 PV/DRP [95], mientras que en células de mamífero es de 4 PV/DRP [89, 101]. Estos datos sugieren que en el SCI-BV la replicación y el empaquetamiento de los genomas virales son etapas limitantes en la producción de vVAA, y que por tanto existe un gran potencial para incrementar los rendimientos específicos de DRP si se mejoran estos procesos. No obstante, hasta este trabajo se desconocía si dichas limitaciones podrían ser causadas por la localización intracelular de los componentes de VAA, misma que impidiera su interacción para llevar a cabo el ensamblaje, o por la concentración relativa de los diferentes componentes pues no existían estudios acerca del efecto de la concentración de Rep52 sobre la eficiencia de empaquetamiento de DNA en el SCI-BV, ni acerca del efecto de la concentración de Rep78 sobre la replicación y rescate de gVAA para su posterior empaquetamiento. Este trabajo, por tanto, constituye el primer análisis sobre las etapas de replicación y empaquetamiento de DNA en el sistema de células de insecto baculovirus, así como sobre la localización intracelular de los componentes de VAA en este sistema. La información generada en este estudio permitirá entender mejor el proceso de ensamblaje de vVAA en células de insecto, así como definir estrategias de infección o diseño de baculovirus para obtener mejores rendimientos de DRP.

5. Hipótesis.

Mediante la manipulación de la concentración de Rep78 y Rep52 es posible incrementar la replicación y empaquetamiento de DNA en cápsides de virus adeno-asociado tipo 2 en el SCI-BV.

6. Objetivo general.

Desarrollar estrategias para incrementar la replicación y el empaquetamiento de DNA en cápsides de virus adeno-asociado tipo 2 con miras a la obtención de mejores rendimientos de producción de vectores con capacidad transductora utilizando el SCI-BV.

6.1 Objetivos específicos.

- Generar un baculovirus que exprese la proteína Rep52 y que además contenga el genoma recombinante de VAA-2. Adicionalmente, construir 2 baculovirus que expresen individualmente las proteínas Rep52 y Rep78 de VAA-2.
- Determinar la localización intracelular de las proteínas Rep y VP durante su expresión individual y simultánea en células de insecto.
- Caracterizar cinéticamente el proceso de replicación de DNA viral en células de insecto y determinar si existe pérdida de los genomas recombinantes de VAA-2 en ausencia de Rep78.
- Estudiar el efecto de la concentración de Rep78 en la replicación de genomas recombinantes de VAA-2.
- Evaluar el efecto de la concentración de Rep52 y Rep78 en el empaquetamiento de genomas recombinantes de VAA-2.
- Obtener información sobre el efecto de la estequiometría de los componentes necesarios en la producción de partículas de VAA-2 con capacidad transductora para elucidar estrategias de producción de vectores para terapia génica.

7. Materiales y Métodos.

7.1 Construcción de baculovirus recombinantes.

Para construir los baculovirus recombinantes se utilizó el sistema Bac-to-Bac® (Invitrogen; Carlsbad, CA), así como los plásmidos pFBDSLRS (contiene el casete de expresión de Rep78 y Rep52) y pFBGR (contiene el genoma recombinante de VAA) [45]. El proceso de clonación para obtener los plásmidos recombinantes, la posterior caracterización y la propagación de los stocks virales se describe a continuación.

7.1.1 Clonación para la construcción de plásmidos recombinantes.

Se digirió el plásmido pFBDSLRS [45] con la enzima *SpeI* según las condiciones de reacción indicadas en la tabla 1. El plásmido digerido se purificó utilizando el Kit PCR QIAquick® (QIAGEN) y se resuspendió en un volumen final de 50 µL. A continuación, a fin de convertir los extremos cohesivos del vector a extremos romos, se incubó el plásmido con la enzima DNA Vent polimerasa (NEBioLabs) utilizando las condiciones descritas en la tabla 2. Tras 30 min de reacción, se purificó nuevamente el plásmido con el Kit PCR QIAquick® eluyendo con un volumen de 50 µL. Posteriormente, el plásmido se digirió simultáneamente con las enzimas *XbaI* y *SphI* para escindir los fragmentos del plásmido correspondientes a las secuencias promotoras y codificantes de las proteínas Rep78 y Rep52, respectivamente (condiciones de reacción en tabla 1). Los fragmentos de DNA correspondientes a estas secuencias fueron purificados a partir de geles de agarosa al 0.8% utilizando el Kit QIAquick® gel extraction (QIAGEN). Paralelamente, se llevaron a cabo dos digestiones independientes utilizando el plásmido pFastBac-1 y las enzimas *SnaBI-XbaI* o *SnaBI-SphI* para eliminar la región correspondiente al promotor *polh* en este vector, además de una reacción de digestión con el plásmido pFBGR [45] y la enzima *HindIII* (condiciones de reacción en tabla 1). Los plásmidos se corrieron en geles de agarosa al 0.8%, se cortaron las bandas de interés y purificaron utilizando el Kit QIAquick® gel extraction (QIAGEN). Posteriormente se llevaron a cabo reacciones de ligación utilizando las condiciones señaladas en la tabla 3. El casete de expresión de Rep78 se ligó con el plásmido pFastBac-1 previamente tratado con *SnaBI-XbaI* para generar el plásmido pFBRep78. Mientras que el casete de expresión de Rep52 se ligó con el plásmido pFastBac-1 previamente tratado con *SnaBI-SphI* para generar el plásmido pFBRep52. Previo a su ligación, tanto el

plásmido pFBGR tratado con *HindIII* como el casete de expresión de Rep52 fueron incubados por separado con DNA Vent polimerasa (NEBioLabs) para obtener extremos romos, y posteriormente purificados con el Kit PCR QIAquick® (QIAGEN). A continuación, sólo el plásmido fue tratado con la enzima alcalin-fosfatasa de intestino de ternera (CIP) (NEBioLabs) para evitar su auto-ligación. Las condiciones del tratamiento con CIP se indican en la tabla 4. La CIP se eliminó purificando con el Kit PCR QIAquick® (QIAGEN) y eluyendo con un volumen de 30 µL. La ligación de pFBGR tratado con CIP y el casete de expresión de Rep52 tratado con DNA Vent polimerasa (NEBioLabs) se llevó a cabo tal como se describe en la tabla 3. Del producto de esta ligación se obtuvo el plásmido pFBGR-Rep52.

Tabla 2. Digestión de plásmidos con enzimas de restricción.

Templado:	250–500 µg de DNA
Enzima de restricción:	<i>SnaBI</i> : 5 U <i>XbaI</i> : 10 U <i>SphI</i> : 5 U <i>SpeI</i> : 10 U <i>HindIII</i> : 10 U <i>BamHI</i> : 10 U
Buffer de reacción 10X:	4 µL
BSA 100X:	0.4 µL
Agua libre de nucleasas:	Volumen para completar 40 µL
Condiciones de Reacción:	37°C, 6-8 h 37°C, 2 h (sólo en reacciones con <i>SnaBI</i>)
Inactivación de enzimas:	65°C, 20 min. 80°C, 20 min (sólo en reacciones con <i>SnaBI</i>).

Tabla 3. Conversión de extremos cohesivos en extremos romos utilizando DNA Vent polimerasa.

Templado:	130 ng de DNA
Thermopol Buffer 10X:	5 µL
Mezcla dNTP's (10 mM):	1 µL
Vent DNA polimerasa (2U/µL):	0.25 µL
MgSO ₄ (100 mM):	2 µL
Agua libre de nucleasas:	Volumen para completar 50 µL
Condiciones de reacción:	72°C, 30 min

Tabla 4. Tratamiento de plásmidos con CIP para evitar auto-ligación.

Vector:	100 ng
NE Buffer 3 10X:	5 μ L
CIP (10U/ μ L):	1 μ L
Agua libre de nucleasas:	Volumen para completar 50 μ L
Condiciones de reacción:	37°C, 1 h

Tabla 5. Ligación de fragmentos de DNA para la generación de plásmidos recombinantes.

Vector linearizado:	20-50 ng de DNA
Inserto:	Relación molar de 3:1 ó 5:1 con respecto al plásmido linearizado.
Buffer de ligación 10X:	1 μ L
T4 DNA ligasa (400 U/ μ L):	1 μ L
Agua libre de nucleasas:	Volumen para completar 10 μ L
Condiciones de reacción:	12°C, 16 h
Inactivación de enzima	65°C, 10 min

Se utilizaron las mezclas de ligación de pFBRep78, pFBRep52 y pFBGR-Rep52 para transformar células *E. coli* One Shot (Invitrogen; Carlsbad, CA) químico-competentes tal como se describe a continuación.

7.1.1.1 Transformación de células *E. coli* químico-competentes y preparación de minipreps.

Se añadió toda la mezcla de ligación a un vial con 50 μ L de células *E. coli* One-Shot. Se incubó en hielo durante 20 min. Se llevó a cabo un choque térmico a 42°C por 2 min (sin agitación). Posteriormente se incubó nuevamente en hielo durante 10 min. Se añadieron 400 μ L de medio SOC (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.05% NaCl, 10 mL KCl 250 mM pH7, 10 mL MgCl₂ 1M y 10 mL glucosa 2 M esterilizada por filtración) y se incubó a 37°C durante 1.5 h. Finalmente se sembraron 50 y 100 μ L de células en placas LB + ampicilina (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, 1.5% agar, 0.1 mg/mL ampicilina, pH 7.0). Las placas se incubaron a 37°C durante aproximadamente 12 h.

Para cada una de las transformaciones, se analizaron diversas colonias bacterianas mediante PCR de colonia (ver condiciones de reacción en tabla 5) utilizando oligonucleótidos específicos (tabla 6). Las colonias que contenían las secuencias de Rep78 o Rep52 se crecieron en minipreps para producir DNA plasmídico. Brevemente, se inocularon 3-5 mL de medio LB + ampicilina (0.1 mg/mL) con las colonias seleccionadas y se dejaron incubando a 37°C en agitación a 300 rpm durante 12 – 16h. La purificación de DNA plasmídico se llevó a cabo utilizando el kit QIAprep spin miniprep de QIAGEN® (QIAprep® Miniprep Handbook, 2006).

Tabla 6. Condiciones de reacción para análisis de PCR de colonia.

Templado:	Céulas resuspendidas en 5µL de agua estéril.
Taq Buffer 10X:	5 µL
Mezcla dNTP's (10 mM):	1 µL
Taq DNA polimerasa (2U/µL):	0.25 µL
Oligonucleótido F (10 µM):	2.5 µL
Oligonucleótido R (10 µM):	2.5 µL
Agua libre de nucleasas:	Volumen para completar 50 µL
Programa de amplificación:	95°C, 5 min (1 ciclo) ----- 95°C, 1 min 55-60 °C, 1 min (35 ciclos) 72°C, 5 min ----- 72°C, 5 min (1 ciclo)

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en análisis de PCR de colonia.

Gen que amplifican	Secuencia del oligonucleótido	Longitud del amplicón
<i>Δle1-rep78</i>	rbacF: 5' TTT ACT GTT TTC GTA ACA GTT TTG 3' Rrep78: 5' CCA AAT CCA CAT TGA CCA GAT C 3'	1600 pb
<i>polh-rep52</i>	pFastF: 5' GGA TTA TTC ATA CCG TCC CAC 3' pFastR: 5' CTC ACA AAT GTG GTA TGG CTG 3'	1350 pb

Los plásmidos purificados se analizaron mediante digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III para corroborar su tamaño y patrón de digestión (ver condiciones de reacción en tabla 1). Una vez corroborada la identidad de cada plásmido se procedió a llevar a cabo la reacción de transposición con b́acmidos utilizando las células DH10Bac (Invitrogen; Carlsbad, CA), tal como se describe a continuación.

7.1.2 Producción de b́acmidos recombinantes.

Se utilizó la metodología descrita en el manual Bac-to Bac™ Baculovirus Expression System. Se mezclaron 50 µL de células DH10Bac con aproximadamente 1 ng de plásmido y se dejaron incubar en hielo por 30 min. Se llevó a cabo un shock térmico calentando a 42°C por 45 segundos y posteriormente enfriando en hielo 2 min. Se añadieron 300 µL de medio SOC. Se incubó durante 4 horas a 37°C agitando a 225 rpm. Se sembraron 50 y 100 µL de estas células en placas LB que contenían lo siguiente: kanamicina (50 µg/mL), gentamicina (7 µg/mL), tetraciclina (10 µg/mL), X-gal (300 µg/mL) e IPTG (40 µg/mL). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h para diferenciar colonias blancas de azules. Se tomaron colonias blancas para llevar a cabo un análisis de PCR de colonia utilizando los oligos M13 (ver condiciones de amplificación en tabla 5). Las colonias seleccionadas tras este análisis se sembraron en medio LB líquido que contenía los antibióticos de selección de las placas de agar a la misma concentración, y se dejaron incubando a 37°C en agitación a 300 rpm durante 12 – 16h. Se purificó el b́acmido utilizando el kit QIAprep spin miniprep de QIAgen®. Con esta metodología se produjeron los b́acmidos DHBacRep78, DHBacRep52 y DHBacGFP-Rep52 a partir de la transposición con los plásmidos pFBRep78, pFBRep52 y pFBGR-Rep52, respectivamente. Estos b́acmidos se utilizaron posteriormente para transfectar células de insecto.

7.1.3 Transfección de células de insecto con b́acmidos recombinantes.

A partir de los b́acmidos recombinantes se produjeron los baculovirus BacRep78, BacRep52 y BacGFP-Rep52 empleando la metodología descrita en el manual Bac-to Bac™ Baculovirus Expresión System, tal como se describe a continuación. Se utilizaron células Sf9 con viabilidad superior al 98%. En placas de cultivo de 6 pozos se sembraron 9×10^5 cél/pozo, en 2 mL de medio SF-900 II SFM (GIBCO-Invitrogen; Carlsbad, CA) con 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomycin. Se dejaron adherir las células

por 1 hora. Se prepararon las soluciones de transfección A y B. Solución A: 1.5-3 μg de bácmido (DHBacRep78, DHBacRep52 o DHBacGFP-Rep52) en 100 μL de medio SF-900 II sin antibiótico. Solución B: 12 μL de celfectina (Invitrogen; Carlsbad, CA) diluida lentamente en 100 μL de medio SF-900 II SFM sin antibiótico. Se mezclaron ambas soluciones y se dejó incubar 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió lentamente a la mezcla 0.8 mL de medio SF-900 II SFM. Las células se lavaron con 2 mL de medio SF-900 II SFM sin antibiótico, se aspiró el medio de lavado y se añadió la mezcla de las soluciones A y B. Las células se incubaron por 5 -7 h con agitación. Finalmente, se removió la mezcla de transfección, se añadieron 2 mL de medio SF-900 II SFM con antibiótico y se dejó incubando a 27°C durante 72-96 h. (Cuando fue necesario, no se removió la mezcla de transfección y sólo se añadió 1 mL de medio SF-900 II SFM con antibiótico para dejar incubando a 27°C durante 72-96 h). Las células transfectadas fueron monitoreadas utilizando un microscopio invertido para detectar efectos citopáticos como consecuencia de la replicación viral. Al finalizar el periodo de incubación se recuperó el sobrenadante centrifugando 5 min a 500 xg y se almacenó a 4°C. A continuación, se utilizó el sobrenadante almacenado a 4°C para llevar a cabo un ensayo en placa.

7.1.4 Ensayo en caja para el aislamiento de placas virales.

Se utilizaron células Sf9 con viabilidad mayor al 95%. Las células se sembraron en cajas de 6 pozos a 1 $\times 10^6$ cél/pozo en de 2 mL de medio de Grace con 10% FBS. Se prepararon diluciones 1/5 y 10^{-1} a 10^{-4} de los stocks virales en medio de Grace con 10% de FBS. Las cajas se incubaron 1 h en reposo para que las células se adhirieran. Posteriormente se retiró el medio y se agregaron 0.75 mL de las diluciones virales. Las cajas infectadas se incubaron a temperatura ambiente por 3-4 h. A continuación se removió el inóculo y se añadió una capa de 3 mL de agarosa de bajo punto de fusión (1 vol de agarosa de bajo punto de fusión al 3% + 0.8 vol de medio de Grace 2x + 0.2 vol de FBS) a una temperatura de 37°C. Las cajas se incubaron a 27°C en ambiente húmedo por 4 días. Al concluir este período se añadió a cada pozo 2 mL de una segunda capa de agarosa (1 vol de agarosa al 1.2% + 0.8 vol de medio de Grace 2x + 0.2 vol de FBS + 0.02 vol de rojo neutro al 1%). Se incubó durante 4 h a 27°C en ambiente húmedo para posteriormente identificar las placas virales por la formación de halos incoloros que se generan por la incapacidad de las células muertas para retener el colorante rojo neutro. Cuando se utilizó BacGFP-Rep52, la identificación de placas virales se llevó a cabo también mediante la evaluación de la expresión de EFGP utilizando microscopía de epifluorescencia. Las placas seleccionadas se colectaron picando el

agar con una punta estéril, se resuspendieron en 1 mL de medio de Grace 1x con 0.5% de FBS y se almacenaron en oscuridad a 4°C.

7.1.5 Infección de células con placas virales.

Se sembraron cajas de 6 pozos con células Sf9, 1×10^6 cél/pozo, en 2 mL de medio SF-900 II SFM. Se incubó en reposo a 27°C por 1 h. Se eliminó el medio de cultivo y los pozos se infectaron con 0.5 mL de las placas seleccionadas previamente para posteriormente incubar 1 h en agitación. Se añadieron 1.5 mL de SF-900 II SFM a cada pozo y se incubó a 27°C por 96 h. Se centrifugaron las cajas a 2000 xg por 10 min. El sobrenadante, considerado el stock viral pase 0 (P0), se almacenó a 4°C. El pellet celular se utilizó para evaluar la expresión de proteína recombinante en los pozos infectados.

Se tomaron 12.5 µL de cada muestra de pellet y se resuspendieron en 50 µL de buffer de carga SDS. Se desnaturalizó la proteína calentando a 99°C durante 20 min. Los análisis de Western blot se llevaron a cabo tal como se describe en la sección 7.7 utilizando los anticuerpos monoclonales Mab259.5 (PROGEN Biotechnik GmbH; Heidelberg, Alemania) y FastPlax™ (NOVAGEN, EMD Chemicals), específicos para proteínas Rep de VAA y para la proteína GP64 de baculovirus, respectivamente.

Para cada uno de los 3 nuevos baculovirus recombinantes se seleccionó a la mejor placa productora de proteína Rep para expandir los stocks virales.

7.1.6 Propagación de stocks virales a partir de placas aisladas.

Se infectaron 30 mL de células Sf9 en medio SF-900 II SFM a una concentración de $0.75-1 \times 10^6$ cél/mL con 100 µL del sobrenadante recuperado de la infección de células Sf9 en cajas de 6 pozos con la mejor placa productora de proteína recombinante de cada baculovirus. A las 96 hpi, los cultivos se cosecharon y centrifugaron a 1000xg. El sobrenadante se colectó y se almacenó en oscuridad a 4°C añadiendo 0.5% de FBS. A estos stocks virales se les denominó stock pase 1 (P1). La propagación de posteriores stocks virales se realizó infectando cultivos de células Sf9 en medio SF-900 II a $0.75-1 \times 10^6$ cél/mL a una MDI de 0.1 – 0.05 ufp/cél.

7.1.7 Determinación de títulos virales.

Los títulos virales se determinaron utilizando el método desarrollado por Mena et al. (2003). Se utilizaron cultivos de células Sf9 con viabilidad mayor a 95%. Se inocularon cajas de 96 pozos de fondo plano con 5×10^3 cél/pozo en 50 μ L de medio SF-900 II SFM. Se prepararon diluciones seriales 1 a 1×10^{-10} de los stocks virales usando medio SF-900 II SFM. Se infectaron 16 pozos por cada dilución con 10 μ L/pozo. Adicionalmente, se incluyeron 16 pozos control, no infectados, a los cuales se añadieron 10 μ L/pozo de medio SF-900 II sin virus. Las placas se incubaron a 27°C en ambiente húmedo. Seis días post-infección se añadieron 10 μ L/pozo de una solución stock (5 g/L) de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se incubó durante 2 h. Las placas se centrifugaron a 2000xg por 10 min, y se retiró el sobrenadante. Los cristales de MTT se solubilizaron con 50 μ L de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas modelo 550 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; USA). Los datos de absorbancia se ajustaron a la ecuación 2 utilizando el paquete Sigmaplot (SPSS, Chicago IL, USA).

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{D}{D_0}\right)^b} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

donde Y es la absorbancia, Y_0 es la absorbancia mínima (concentración celular viable mínima detectada, 100% de respuesta), a es la absorbancia máxima (0% de respuesta), D es la dilución, D_0 es la dilución a la cual la respuesta fue del 50% ($1/TCLD_{50}$), y b es la pendiente. A partir de la ecuación 3 se calculó la dosis letal media del cultivo ($TCLD_{50}/mL$), donde V es el volumen de la dilución viral añadida a cada pozo. La $TCLD_{50}/mL$ se utilizó para calcular la dosis de infección media ($TCID_{50}/mL$), tal como se muestra en la ecuación 4. El título viral se determinó a partir de la $TCID_{50}/mL$, según se muestra en la ecuación 5.

$$TCLD_{50} / mL = \frac{1}{D_0 V} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

$$\log TCID_{50} / mL = 0.912(\log TCLD_{50} / mL) + 1.674 \quad \text{(Ecuación 4)}$$

$$UFP = TCID_{50} / mL * 0.69 \quad \text{(Ecuación 5)}$$

7.2 Líneas celulares, cultivo celular y baculovirus recombinantes.

Se utilizó la línea celular Sf9 en la producción, amplificación y titulación de los stocks virales. La línea High Five™ (H5) (Invitrogen; Carlsbad, CA) se utilizó en los estudios de infección para producir vVAA. Ambas líneas se mantuvieron en medio SF-900 II SFM. Los cultivos celulares se mantuvieron en matraces de 250 mL con 30 mL de volumen de trabajo, a 27°C y 114 rpm. Los pases celulares se efectuaron a partir de cultivos en etapa exponencial con concentraciones celulares no mayores a 4×10^6 cél/mL. Las células se sub-cultivaron a 0.75×10^6 cél/mL y 0.5×10^6 cél/mL para Sf9 y H5, respectivamente. La concentración celular de los cultivos se calculó utilizando una cámara de Neubauer, mientras que la viabilidad se determinó mediante exclusión de azul de tripano. Los baculovirus recombinantes utilizados se enlistan en la tabla 7.

Tabla 8. Baculovirus recombinantes.

Baculovirus	Gen recombinante	Promotor
BacCap [45]	Cap (un solo ORF para VP1, VP2 y VP3, y un ORF para AAP)	<i>polh</i>
BacGFP [45]	EGFP (flanqueado por las ITR de VAA-2)	<i>p10</i> , para expresión en cél. de insecto. <i>CMV</i> , para expresión en cél. de mamífero.
BacRep78 [□]	Rep78 de VAA-2	<i>ie1</i> atenuado ($\Delta ie1$)
BacRep52 [□]	Rep52 de VAA-2	<i>Polh</i>
BacGFP-Rep52 [□]	EGFP (flanqueado por las ITR de VAA-2) y Rep52 de VAA-2	<i>EGFP</i> : <i>p10</i> , para expresión en cél. de insecto. <i>CMV</i> , para expresión en cél. de mamífero. <i>Rep52</i> : <i>polh</i>

[□] Baculovirus contruídos en este trabajo.

7.3 Microscopía de inmuno-fluorescencia y microscopía electrónica de células infectadas.

7.3.1 Preparación de células para microscopía de inmuno-fluorescencia.

Se infectaron cultivos de células H5 a una MDI de 5 UFP/cél de cada uno de los baculovirus utilizados ya sea en infección individual o en infección múltiple. Las células se procesaron tal como se describe a continuación. Se colocaron 500 µL de células en un portaobjetos cubierto con poli-Lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se dejaron reposar 30 min para su adhesión. Se realizó un lavado con 1 mL de PBS. Las células se fijaron 15 min con una solución de PBS-formaldehído al 4%. Posteriormente se lavó dos veces con PBS. Las células se permeabilizaron incubando 15 min con una solución de PBS con deoxicolato de sodio al 0.2% y BSA al 2%. Posteriormente se lavó dos veces con PBS. A continuación, se incubaron las células durante 1 h con anticuerpos primarios diluidos 1:100 en PBS-BSA al 0.2%, y se lavó dos veces con PBS. Finalmente, se incubaron las células durante 1 h con anticuerpo secundarios acoplados a fluoróforos diluidos 1:100 también en PBS-BSA al 0.2%. Las células se incubaron unos minutos en ambiente seco a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se añadieron 10 µL solución Slow-Fade® Gold con DAPI (Invitrogen; Carlsbad, CA) para teñir los núcleos celulares y se cubrieron las células con un cubreobjetos sellando los extremos del mismo utilizando esmalte. Las muestras se observaron en un microscopio ApoTome (Carl Zeiss; Jena, Alemania). Los anticuerpos primarios utilizados para detectar proteínas de VAA, obtenidos de PROGEN Biotechnik GMBH, se describen en la tabla 8.

Tabla 9. Anticuerpos utilizados para detectar proteínas de VAA por inmuno-fluorescencia.

Anticuerpo	Proteína que reconoce
MAB B1 (no. cat. 61058)	VP1, VP2, VP3 desensamblada de VAA 1-6 (nativa y desnaturalizada).
MAB A20 (no. cat. 61055)	Cápsides de VAA-2
MAB 76.3 (no. cat. 65173)	Rep78 y Rep52 de VAA-2 (nativa y desnaturalizada).
PAb contra VP (no. cat. 61084)	Proteína VP ensamblada y desensamblada de VAA-2 y 3.

MAB: anticuerpo monoclonal. PAb: anticuerpo policlonal.

7.3.2 Preparación de células para microscopía de transmisión electrónica.

Las muestras para microscopía de transmisión electrónica se procesaron tal como se describe a continuación. A 1 mL de cultivo con 1×10^6 cél/mL se añadieron 110 μ L de solución de glutaraldehído (GTA) al 25% en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.5, y se dejó incubar durante 15 min. Las células se centrifugaron a 650xg y se descartó el sobrenadante. Se fijaron las células incubando 15 min con GTA 2.5% y 4% de paraformaldehído. Posteriormente, se llevó a cabo un lavado con buffer de fosfatos 0.1 M y otro con agua destilada. A continuación, las células se incubaron 1h en oscuridad con tetróxido de osmio al 1%. Posteriormente se llevó a cabo otro lavado con buffer de fosfatos 0.1 M y agua destilada. Las células se deshidrataron gradualmente mediante incubaciones de 10 min en soluciones de etanol al 70, 80 y 90%, y dos incubaciones adicionales en etanol al 100%. Las células se embebieron en una mezcla 1:1 de óxido de polipropileno y resina EPON 812 (Shell Corporation). La resina se curó *over night* y se polimerizó utilizando las siguientes condiciones de incubación: 35°C/2h, 50°C/24h y 70°C/*over night*. Se realizaron cortes finos que se tiñeron con acetato de uranilo al 25% (p/v) para posteriormente ser visualizados en un microscopio electrónico Zeiss EM900 (Göttingen, Alemania) operado a 80 kV.

7.4 Cinéticas de replicación de genomas de VAA.

Las infecciones se realizaron en cultivos con medio fresco a una concentración celular de 1×10^6 cél/mL y una viabilidad superior a 98%. Tal como se mencionó previamente, la concentración celular se calculó utilizando una cámara de Neubauer, y la viabilidad se determinó mediante exclusión de azul de tripano. Se tomaron muestras cada 24 h a partir de las 0 hpi. Adicionalmente, se tomó muestra a las 6 ó 7 hpi. Los cultivos se cosecharon a un tiempo máximo de 120 hpi o al alcanzar una viabilidad de 30%. En cada punto de análisis se tomó muestra para extracción de DNA y proteína. Las muestras se centrifugaron a 650 xg por 15 min a 4°C, para posteriormente separar pellet y sobrenadante. Ambas fracciones se almacenaron a -80°C hasta el momento de llevar a cabo la extracción. Las condiciones de infección de los diferentes experimentos realizados se muestran la tabla 9.

Tabla 10. Condiciones de infección en cinéticas de replicación de ADN viral.

Experimento	Condiciones de infección
Replicación de gVAA en ausencia de Rep78	Infección individual con BacGFP-Rep52 a MDI 0.1, 1, 5 y 10 ufp/cél.
Replicación de gVAA en presencia de Rep78	<p><i>Infecciones control:</i> Infección individual con BacGFP y BacRep78 a MDI 1 ufp/cél.</p> <p><i>Condiciones evaluadas:</i> Cultivos infectados con BacGFP a MDI constante de 1 ufp/cél y co-infectados con BacRep78 a MDI variable de 0.1, 1 y 5 ufp/cél.</p>
Replicación y empaquetamiento de DNA en presencia de Rep78 y Rep52	<p><i>Infección control sin Rep52:</i> Cultivo infectado con BacGFP, BacCap y BacRep78 a MDI de 1 ufp/cél de cada baculovirus.</p> <p><i>Condiciones evaluadas:</i> Cultivos infectados con BacGFP, BacCap y BacRep78 a MDI de 1 ufp/cél de cada baculovirus y BacRep52 a MDI variable de 0.1, 1 y 5 ufp/cél. Cultivo infectado con BacGFP, BacCap y BacRep52 a MDI de 1 ufp/cél de cada baculovirus y BacRep78 a MDI de 5 ufp/cél.</p>

7.5 Purificación y análisis de DNA viral.

7.5.1 Extracción de DNA a partir de fracciones de pellet.

Se extrajo DNA total a partir de extractos de pellet celular provenientes de 0.5 ó 0.75 mL de cultivo utilizando el DNAsy® Blood and Tissue Kit (QIAGEN). Brevemente, los pellets se resuspendieron en 180 µL de buffer ATL. Se añadieron 20 µL de proteinasa-K y se incubó a 56°C durante 12-16 h. Posteriormente, se añadieron 4 µL RNAsa a 100 mg/mL y se dejó incubando 2 min a temperatura ambiente. Se añadieron 400 µL de una mezcla buffer AL-etanol absoluto 1:1 y se mezcló vigorosamente con vórtex. Se tomó todo el contenido de la mezcla y se colocó en una columna DNeasy Mini spin con tubo de colecta. Se centrifugó a 6000xg por 1 min y se descartó el eluyente. A continuación, se añadieron 500 µL de buffer AW1 para centrifugar 1 min a 6000xg. Se descartó el eluyente y posteriormente se añadieron 500 µL de buffer AW2. La columna se centrifugó 3 min a 20,000xg para eliminar residuos de etanol. Se descartó el eluyente y se colocó la columna en un tubo de colecta limpio. Se añadió a la columna 300 ó 150 µL de buffer Tris- HCl 10 mM, pH 8.5. Se incubó 1 min a

temperatura ambiente y finalmente se eluyó el DNA centrifugando 1 min a 6000xg. El DNA se almacenó a -20°C hasta su análisis. La concentración y calidad del DNA purificado se determinó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop-1000 (Thermo Scientific).

7.5.2 Extracción de DNA a partir de sobrenadantes de cultivo celular.

Se obtuvo DNA a partir de 0.5 ó 0.75 mL de sobrenadante de cultivo utilizando el Easy-DNA™ Kit (Invitrogen) siguiendo el protocolo de extracción de DNA de baculovirus. Se añadió solución de poli-etilenglicol (PEG) 8000 al 20% en NaCl 1 M a 4°C en relación volumétrica 1:1 con respecto al sobrenadante celular. Se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 30 min. Se centrifugó a 11,250 xg durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante. El pellet se centrifugó 2 min más a la misma velocidad y temperatura. Posteriormente, se retiró el sobrenadante residual con una pipeta. Se resuspendió el pellet en 100 µL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, pH 8.0). A continuación, se añadieron 143 µL de solución A y se aplicó un vórtex por 1 min. Se incubó 6 min a 65°C. Tras este período, se agregaron 58 µL de solución B y se mezcló vigorosamente aplicando un vórtex hasta homogenizar la mezcla. A continuación, se añadieron 258 µL de cloroformo y nuevamente se aplicó un vórtex para homogenizar. La mezcla se centrifugó a 11,250 xg por 10 min a 4°C para separar las fases y crear una interfase. Utilizando una pipeta, se recuperó la fase acuosa (fase superior) y se transfirió a un tubo eppendorf nuevo. A esta fase se añadieron 500 µL de etanol absoluto a -20°C y se mezcló por inversión. Se precipitó el DNA incubando por 30 min a -20°C para posteriormente centrifugar a 11,250 xg por 5 min a 4°C. Se removió el etanol del pellet utilizando una pipeta. A continuación se añadieron 500 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 11,250 xg por 5 min a 4°C. Nuevamente, se retiró el etanol utilizando una pipeta. El pellet se centrifugó nuevamente a 11,250 xg por 3 min a 4°C, y el etanol residual se removió con una pipeta. El pellet se dejó secando al aire libre. Finalmente, el pellet de DNA se resuspendió en 20 ó 100 µL de buffer Tris- HCl 10 mM, pH 8.5; y se almacenó a -20°C hasta su análisis.

7.5.3 Cuantificación de DNA viral mediante PCR cuantitativa (qPCR).

Para la cuantificación de genomas virales mediante qPCR se utilizó un termociclador en tiempo real Rotor-Gene6000 (Corbett Life Science) o MX3005P (Agilent Technologies) y se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes de interés. Se utilizó el gen de *p35* de AcMNPV para cuantificar el número de genomas de baculovirus, y el gen de *egfp* para cuantificar los genomas de VAA. El gen *rep52* fue utilizado para determinar número de genomas de baculovirus provenientes específicamente de BacRep78 o BacRep52. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar estos genes se describen en la tabla 10.

Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados en análisis de qPCR.

Gen que amplifican	Secuencia	Longitud del amplicón
<i>egfp</i>	F: 5' GGG CAC AAG CTG GAG TAC A3' R: 5' ATG TTG TGG CGG ATG TTG AAG 3'	101 pb
<i>p35 (AcMNPV)</i>	F: 5' TTG ATG GCG AAC AAT TTG AAG AG 3' R: 5' GTT TTT CGA CGC TTC GTT GTA A 3'	98 pb
<i>rep (rep78/rep52 VAA-2)</i>	F: 5' ACT CAC GGA CAG AAA GAC TGT TTA G 3' R: 5' CCA TGA TAT GAT GAA TGT AGC ACA G 3'	100 pb

La determinación del número de genomas virales se llevó a cabo mediante cuantificación absoluta empleando curvas estándar desarrolladas utilizando como DNA templado los plásmidos pFBGR [45], pFBRep52 (descrito en la sección 7.1.1) y p35-TOPO. El plásmido p35-TOPO se construyó clonando el amplicón obtenido con los oligonucleótidos F: 5' CCG GTA GAA ATC GAC GTG TC 3' y R: 5' TTG CCC CAG CTC GAT TCT G 3' en el plásmido pCR[®]8/GW/TOPO[®] (Invitrogen). Estos oligos amplifican un fragmento del gen *p35* de AcMNPV. En dicho fragmento de amplificación, que posee una longitud de 750 pb, está contenida la región que reconocen los oligonucleótidos de *p35* utilizados en el análisis de qPCR (ver tabla 10).

Se realizaron curvas de cuantificación para los 3 genes evaluados en cada uno de los termocicladores utilizados. Para ello se prepararon diluciones seriales en el rango de 1×10^8 - 1×10^1 copias por reacción de los plásmidos mencionados previamente. Se incluyeron controles de amplificación sin templado para evaluar auto-alineamiento de los oligos utilizados, así como controles negativos de amplificación para determinar amplificación inespecífica o ruido de fondo proveniente del DNA de la muestra. Para la

cuantificación del gen *p35* se utilizó DNA de células no infectadas como control negativo de amplificación, mientras que para los genes *egfp* y *rep52* se utilizó DNA extraído de células infectadas individualmente con los baculovirus BacRep78 y BacGFP [45] (descritos en tabla 7), respectivamente.

Las condiciones de reacción para el desarrollo de curvas estándar y análisis de muestras problema se describen en la tabla 11. Previo al análisis, las muestras de DNA procedentes de extractos de pellet se diluyeron en agua libre de nucleasas (SIGMA) a una concentración final de 20-60 ng/ μ L.

Tabla 12. Condiciones de reacción para análisis de qPCR.

DNA templado:	1 μ L (diluciones frescas a 20-60 ng/ μ L)	
Sybr® Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems):	10 μ L	
Oligonucleótido F (25 μ M):	0.8 μ L	
Oligonucleótido R (25 μ M):	0.8 μ L	
Agua libre de nucleasas:	Volumen para completar 20 μ L	
Programa de amplificación:	95°C, 10 min	(1 ciclo)

	95°C, 15 seg	
	60 °C, 30 seg	(40 ciclos)
	72°C, 30 seg *	

	55-95°C, 1°C/5 seg * (curva de disociación)	(1 ciclo)

* Adquisición de datos.

7.5.4 Análisis de DNA mediante Southern blot.

El análisis de DNA mediante Southern blot se llevó a cabo con la finalidad de analizar las formas replicativas de los genomas de VAA producidos durante la infección con el baculovirus BacGFP (descrito en tabla 7) y evaluar su eficiencia de rescate a partir del DNA de baculovirus. La metodología utilizada se describe a continuación.

Las muestras de DNA provenientes de fracción de pellet se corrieron en geles de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM) teñidos con bromuro de etidio. La transferencia a

membranas de nitrocelulosa Hybond (GE Healthcare) se llevó a cabo mediante difusión con NaOH 0.4 N durante 12-24 h. La transferencia completa del DNA se corroboró visualizando los geles de agarosa en un sistema foto-documentador Molecular Image ChemiDoc™ XRS+ (BioRad). Las membranas se lavaron con buffer SSC 3X (SSC 1X: NaCl 0.15 M, citrato de sodio 15 mM, pH 7.0) hasta la neutralización de su pH. Posteriormente, se llevó a cabo una pre-hibridación de las membranas incubando a 42°C durante 6h con la siguiente mezcla: 2500 µL de formamida, 1250 µL de SSC 20X, 250 µL de reactivo de Denhardt 100X, 20 µL de EDTA 0.25 M pH 8.0, 50 µL de Tris 1 M pH 7.5, 50 µL de SDS al 10%, 755 µL de agua destilada y 125 µL de DNA de timo de ternera previamente desnaturalizado (incubando a 95°C por 5 min y enfriando súbitamente en hielo). A continuación, las membranas se hibridaron a 42°C durante 12h con una sonda específica contra el gen de *egfp* marcada radioactivamente y previamente desnaturalizada. Al finalizar el período de hibridación se lavaron las membranas tal como se indica a continuación: 30 min a temperatura ambiente con 10 mL de SDS 0.1% en SSC 2X; dos lavados de 30 min a temperatura ambiente con SDS 0.1% en SSC 0.1X; y 10 min a temperatura ambiente con 10 mL de SDS 0.1% en SSC 0.1X. Las membranas marcadas radioactivamente se incubaron con papel fotográfico (Kodak Company) en obscuridad durante diferentes períodos de exposición. Los filmes se revelaron y fueron analizados con el sistema foto-documentador Molecular Image ChemiDoc™ XRS+ y el software Image Lab® versión 2.0.1 (BioRad).

La preparación de la sonda contra el gen de *egfp* se detalla a continuación. La sonda de DNA se sintetizó mediante amplificación por PCR utilizando los oligos descritos en la tabla 10. Su purificación se llevó a cabo utilizando el Kit PCR QIAquick® (QIAGEN). El marcaje radioactivo de la sonda se llevó a cabo de la siguiente forma. Se tomaron 200 ng de DNA diluido en 40 µL de agua destilada. Se desnaturalizó incubando a 95°C por 5 min, y enfriando súbitamente en hielo. Posteriormente, se añadieron 1-2.5 µL de [α -³²P]dCTP (Perking Elmer/Metrix) y agua destilada para completar un volumen final de 50 µL. Esta mezcla se colocó en un tubo de reacción del sistema RediPrime™ II (Amersham Biosciences) y se incubó a 37°C durante 0.5-1 h.

7.6 Extracción de proteína total y cápsides de VAA.

Se utilizó el método descrito por Chahal et al. [100]. Brevemente, para cada muestra se tomó el pellet celular procedente de 1 mL de cultivo. Las células se resuspendieron a una concentración de 10×10^6 cél/mL en buffer de lisis (Tris-base 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM y benzonasa 5U/ 1×10^6 cél, pH 7.5). Se incubó 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se añadió 1/10 volúmenes de $MgSO_4$ 375 mM para alcanzar una concentración final de 37.5 mM. Se llevó a cabo otra incubación de 30 min a temperatura ambiente para posteriormente realizar 3 ciclos de congelado-descongelado utilizando hielo seco-baño maría a 37°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 625xg durante 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

7.7 Análisis de proteínas Rep.

Se analizó la proteína proveniente de la fracción de pellet celular. Las muestras se prepararon mezclando 18 µL de extracto de proteína con 6 µL de buffer de carga 4X (1 mL de Tris 0.5 mM pH 6.8, 1.6 mL de SDS al 10%, 200 µL azul de bromofenol al 0.2% p/v, 800 µL de glicerol y 400 µL de β-mercaptoetanol). La proteína se desnaturizó hirviendo 10 min. Se cargaron 15-20 µL de proteína en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10%. La electroforesis se llevó a cabo a amperaje constante (30 mA) utilizando buffer Tris-glicina (Tris 24.8 mM, glicina 0.192 M, EDTA 2 mM y 0.1% SDS, pH 8.8).

Posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa Hybond™-C Extra (Amersham Biosciences) en sistema semi-húmedo a corriente constante (100 mA) durante 1.5-2 h usando buffer de glicina (glicina 192 mM, Tris 25 mM, etanol 20% v/v). Tras la transferencia, las membranas se incubaron durante 2 h en solución de bloqueo (PBS-Tween 20 al 0.1%, con leche descremada al 5%). Posteriormente, se llevó a cabo un ciclo de lavados tal como se describe a continuación: 1 lavado de 20 min y 3 lavados de 5 min con buffer PBS-Tween 20 al 0.1% (PBST). Las membranas se incubaron, a temperatura ambiente durante 4 h, con el anticuerpo monoclonal Mab259.5 para proteínas Rep (PROGEN Biotechnik GMBH), diluido 1:1000 en PBST-leche descremada 0.1%. Posteriormente, se llevó a cabo otro ciclo de lavado. A continuación, se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories) diluido 1:10,000 en PBST-leche descremada 0.1%. Tras la incubación se realizó un nuevo ciclo de lavado. Finalmente, las membranas se revelaron ya sea utilizando carbazol (4.9 mL de carbazol

a 8 mg/mL, 12 mL de buffer de acetatos 0.05 M pH5, 30 µL de peróxido de hidrógeno al 30%), el reactivo TMB (Invitrogen) o el reactivo quimioluminiscente Western Lightning® Plus-ECL (Perkin Elmer, Inc.). Las membranas se analizaron con el sistema foto-documentador Molecular Image ChemiDoc™ XRS+ y el software Image Lab® versión 2.0.1 (BioRad).

7.8 Purificación de cápsides de VAA.

Se purificaron cápsides a partir de pellet celular proveniente de 5 mL de cultivo de muestras tomadas a las 72 y 96 hpi. La extracción de cápsides se realizó tal como se describió en la sección 7.6. Los extractos celulares se colocaron en tubos de ultracentrífuga de 5 mL donde se prepararon gradientes de iodixanol utilizando OptiPrep™, tal como lo sugiere el proveedor. Brevemente, se colocaron las siguientes fracciones en forma ascendente: 0.7 mL iodixanol 54% con rojo neutro, 0.7 mL iodixanol 40%, 0.85 mL iodixanol 25% con rojo neutro, 1.2 mL iodixanol 15% y 1.4 mL de extracto celular. Las muestras se centrifugaron utilizando un rotor SW50.1 a 48,000 rpm durante 2 hrs a 18°C. Para coleccionar las cápsides se insertó una jeringa de insulina en la interfase de las fracciones de iodixanol al 54 y 40 %. Posteriormente se aspiraron 0.56 mL de la fracción de iodixanol al 40%. Las muestras se almacenaron a 4°C ó -20°C hasta su análisis.

7.9 Cuantificación de DNA encapsidado.

Las fracciones obtenidas a partir de los gradientes de iodixanol se analizaron mediante qPCR utilizando las condiciones mencionadas en la sección 7.5.3. Para las reacciones de qPCR se analizaron muestras crudas (tal como se obtuvieron de los gradientes de iodixanol) y diluídas 1:100 en agua libre de nucleasas. Se incluyeron controles de amplificación con estándares de concentración conocida a los que se añadió iodixanol al 40% para descartar interferencia en la reacción de amplificación.

7.10 Cuantificación de cápsides de VAA.

Se utilizó el kit de ELISA comercial para VAA-2 (Progen Biotechnik GMBH; Heidelberg, Alemania). Se prepararon diluciones de las muestras problemas y los estándares de cuantificación del kit en el “buffer

de muestra" 1X del kit. Se tomaron 100 μ L de estas diluciones y se colocaron en los pozos de la placa de ELISA y se incubó 1h a 37 °C. Se vació el contenido de los pozos. Se añadieron 200 μ L de buffer de lavado 1X, se incubó por 5 seg, se eliminó el contenido de los pozos y la placa se secó invirtiéndola sobre papel absorbente. El lavado se llevó a cabo 2 veces. Se añadieron 100 μ L de conjugado de biotina y se incubó 1h a 37 °C. Posteriormente, se eliminó el líquido y se realizaron 2 lavados más. Se añadieron 100 μ L de conjugado de estreptavidina y se incubó 1h a 37 °C. Nuevamente, se eliminó el líquido y se realizaron 2 lavados más. A continuación se añadieron 100 μ L de conjugado de biotina y se incubó 15 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 100 μ L de solución "Stop". Se midió la absorbancia a 450 nm dentro de los 30 min posteriores.

8. Resultados y Discusión.

8.1 Construcción de baculovirus recombinantes.

En el baculovirus BacRep [45] la expresión de Rep78 y Rep52 se lleva a cabo mediante una construcción molecular en configuración cabeza-cabeza. Dado que en la secuencia nucleotídica de Rep78 está contenida toda la secuencia de Rep52, esta configuración genera un palíndromo perfecto que puede ser susceptible de recombinación homóloga. Kohlbrenner et al. [93] demostraron la inestabilidad de dicha construcción en pases sucesivos del virus, donde se observó disminución en la expresión de ambas proteínas al aumentar el número de pase del stock viral. La disminución en la expresión de Rep78 y Rep52 por efecto del número de pase del stock se evitó mediante la expresión individual de las proteínas Rep. Por tanto, en este trabajo se evitó trabajar con BacRep y se procedió a la construcción de nuevos baculovirus para expresar individualmente estas proteínas.

Como se mencionó en la sección 7.1.1, los casetes de expresión de Rep78 y Rep52 con sus respectivos promotores, *Δie1* y *polh*, se obtuvieron mediante digestión del plásmido pFBDSLRS con enzimas de restricción. Como se observa en la figura 10, las longitudes de estos casetes de expresión corresponden a las calculadas a partir del mapa de digestión de pFBDSLRS.

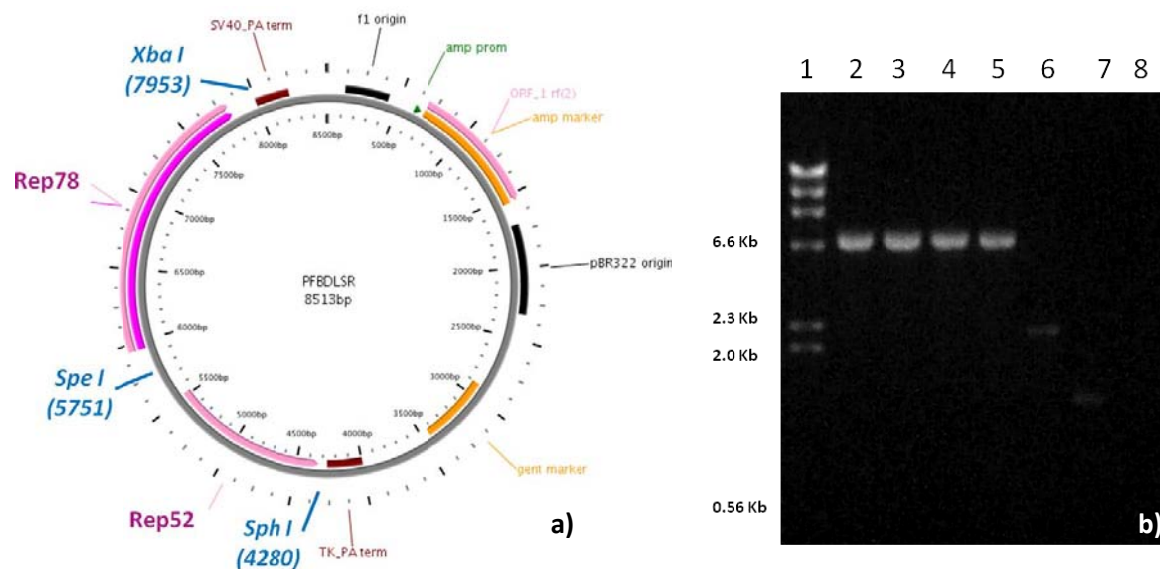


Figura 10. Productos obtenidos mediante digestión de pFBDSLRS con enzimas de restricción. A) Mapa de restricción de pFBDSLRS (elaborado usando *PlasMapper* [102]). B) Análisis electroforético de productos de digestión. 1: Marcador Λ -Hind III, 2 y 3: pFastBac1-*Xba I*, 4 y 5: pFastBac1-*Sph I*, 6: fragmento de Rep78 purificado, 7: fragmento de Rep52 purificado, 8: vacío.

A partir de la clonación de los fragmentos correspondientes a los genes Rep78 y Rep52 en los plásmidos pFastBac-1 y pFBGR, se esperaba obtener las construcciones que se muestran en la figura 11 para los plásmidos pFBRep78, pFBRep52 y pFBGR-Rep52. La identidad de las construcciones generadas se llevó a cabo, primero, mediante un análisis de PCR de colonia para seleccionar clonas y amplificar los plásmidos recombinantes y, posteriormente, mediante un análisis de restricción de los plásmidos purificados a partir de las colonias seleccionadas (ver sección 7.1.1).

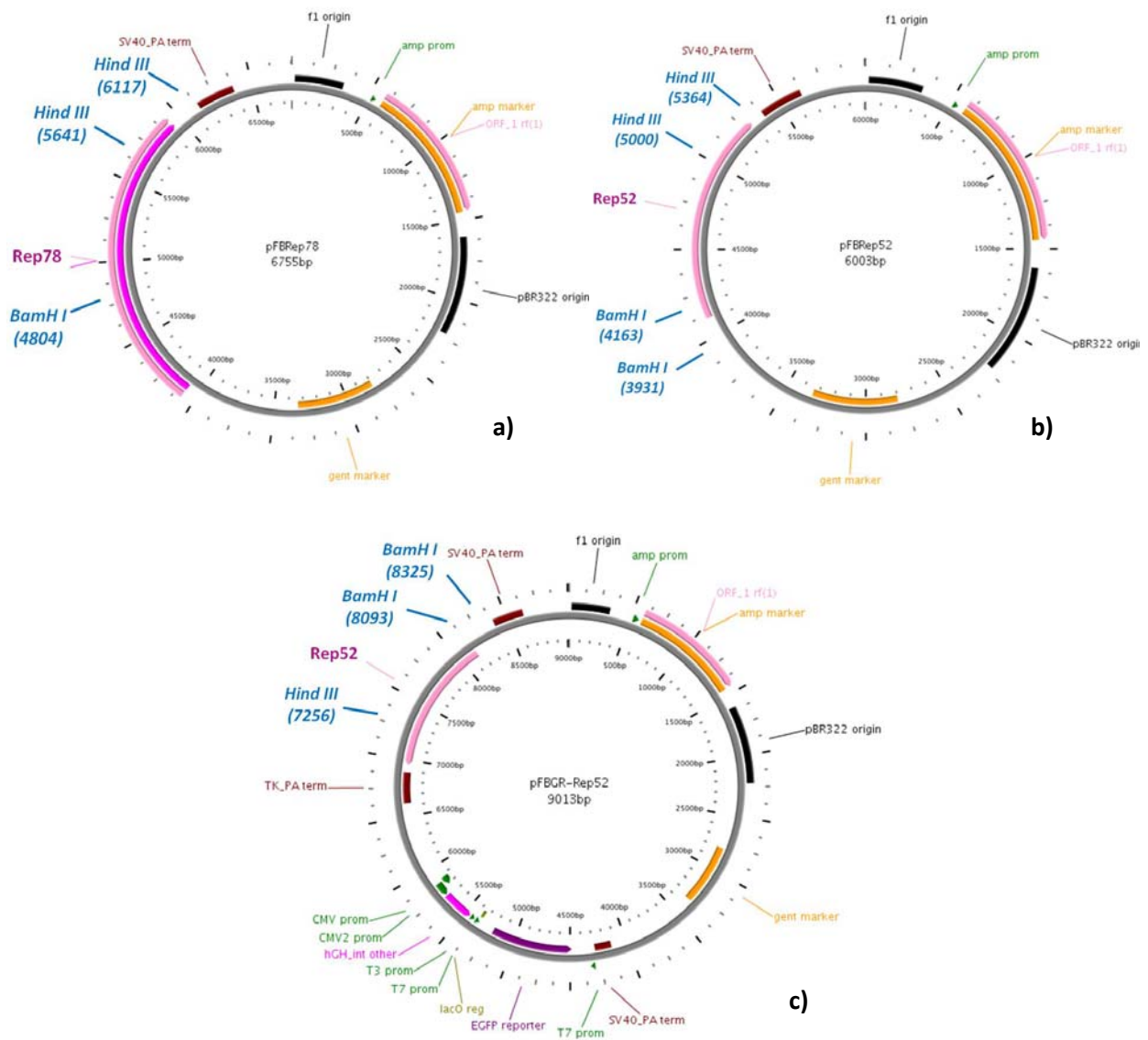


Figura 11. Plásmidos recombinantes (elaborados usando *PlasMapper* [102]): a) pFBRep78, b) pFBRep52 y c) pFBGR-Rep52.

Mediante el análisis de PCR de colonia se corroboró la presencia de las secuencias correspondientes a Rep52 y Rep78 mediante la obtención de un producto de amplificación de 1.3 Kpb y 1.6 Kpb, respectivamente (figura 12). De la transformación con el plásmido pFBRep52, 14 de las 15 colonias seleccionadas resultaron positivas, mientras que de la transformación con el plásmido pFBGR-Rep52, sólo una de las 10 colonias analizadas resultó positiva. Por otra parte, en la transformación con el plásmido pFBRep78, se detectaron 4 positivas de 8 analizadas. Para Rep78 se observó también la presencia de una banda de tamaño menor al esperado (aprox. 1.3 Kpb). Esto puede ser debido a que el oligonucleótido rbac-F, utilizado para detectar Rep78, también presentaba otros posibles sitios de hibridación en el plásmido pFastBac-1 según análisis de alineamiento de secuencias empleando el software LALIGN [103]. Para cada plásmido, se seleccionaron algunas de las colonias positivas a la reacción de PCR para un posterior análisis de restricción que permitiera corroborar la identidad de las construcciones.

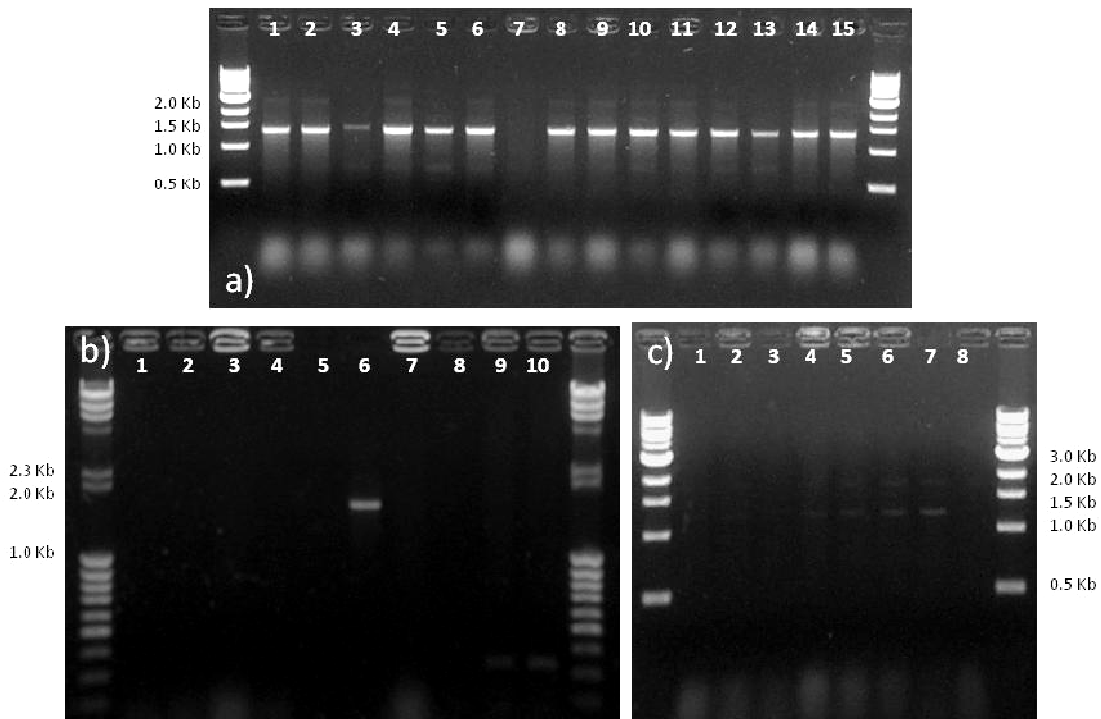


Figura 12. Análisis de PCR de colonia de células *E. coli* OneShot transformadas con los plásmidos recombinantes pFBRep52 (a), pFBGR-Rep52 (b) y pFBRep78 (c). El número de carril indica el número asignado a cada colonia bacteriana.

Con base en el mapa de restricción de los diferentes plásmidos (figura 12), los productos de digestión con las enzimas *BamHI* y *HindIII* esperados para cada uno de los plásmidos recombinantes son los que se describen a continuación. Para pFBRep52, se esperaban fragmentos de 232 y 5771 pb digiriendo con *BamHI*, y fragmentos de 364 y 5639 pb digiriendo con *HindIII*. Para pFBRep78, se esperaba un fragmento de 6755 pb digiriendo con *BamHI* (correspondiente al plásmido linearizado), y fragmentos de 476 y 6279 pb digiriendo con *HindIII*. Para pFBGR-Rep52, se esperaba un fragmento de 9013 pb digiriendo con *BamHI* (también correspondiente al plásmido linearizado), y fragmentos de 232 y 8781 pb digiriendo con *HindIII*. Como se puede observar en la figura 13, el patrón de restricción obtenido para cada uno de los plásmidos fue el esperado, con lo que se confirmó la identidad de los mismos. Adicionalmente, se corroboró la integridad de los casetes de expresión de los distintos plásmidos mediante secuenciación (datos no mostrados).

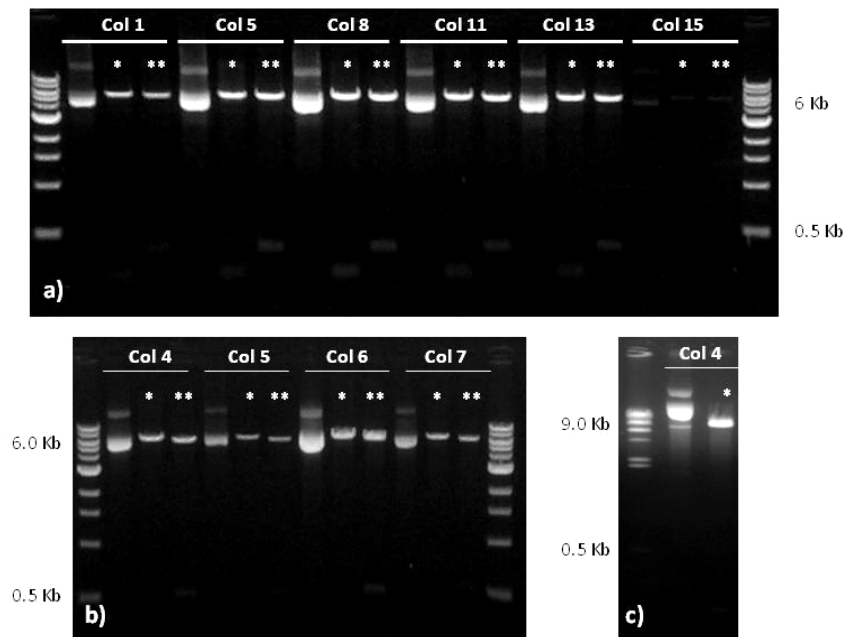


Figura 13. Análisis de restricción de DNA plasmídico purificado de diferentes colonias transformadas con pFBRep52 (a), pFBRep78 (b) y pFBGR-Rep52 (c). Para cada colonia se muestra plásmido sin digerir, digerido con *BamHI* (*) y digerido con *HindIII* (**).

Con los plásmidos obtenidos se llevaron a cabo las reacciones de transposición en células DH10Bac para generar b́acmidos recombinantes. La inserción de secuencias recombinantes en el b́acmido se lleva a cabo mediante transposición de los elementos Tn7 contenidos tanto en el plásmido como en el

bácmido. Este proceso provoca la interrupción de la expresión del gen lacZ del bácmido, facilitando la distinción de colonias con bácmido recombinante (blancas) de colonias con bácmido no recombinante (azules) usando X-gal como marcador de selección. Después de transformar con los 3 plásmidos producidos se seleccionaron colonias blancas para su análisis mediante PCR de colonia utilizando los oligos M13 F (-20) y R. En dicho ensayo se tomaron colonias azules como controles negativos de amplificación. Utilizando estos oligos se pueden obtener distintos productos de amplificación. El bácmido que no ha sufrido transposición con el plásmido pFastBac genera un producto de 300 pb, mientras que el bácmido que ha sufrido transposición con el plásmido recombinante genera un producto cuya longitud es igual a: 2.3 Kpb + la longitud del gen recombinante. Los resultados del análisis de PCR de colonia para los bácmidos DHBacRep52 y DHBacRep78 se muestran en la figura 14.

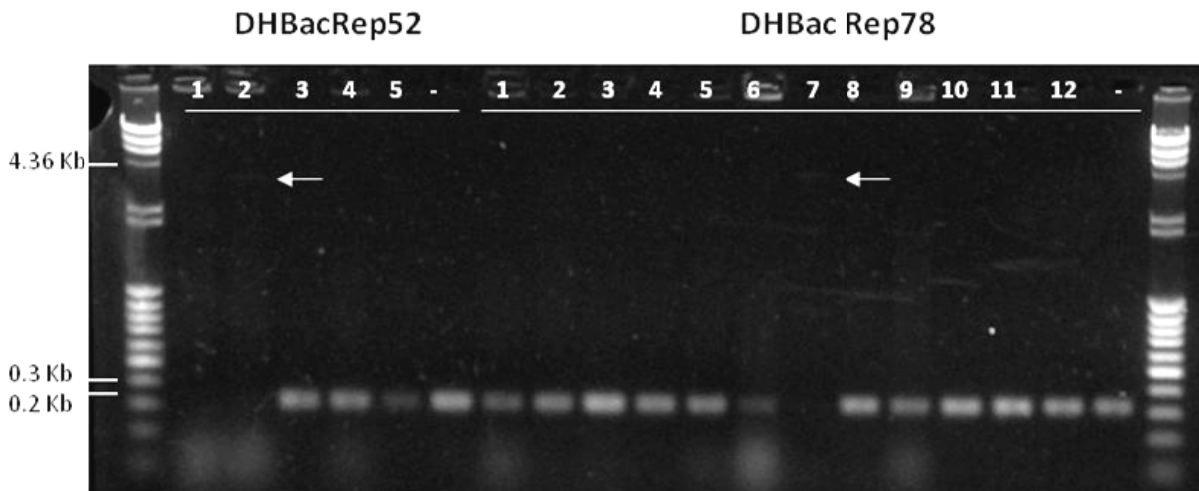


Figura 14. PCR de colonias DH10Bac transformadas con los plásmidos recombinantes pFBRep52 y pFBRep78. Las flechas señalan los productos de amplificación de las colonias recombinantes. El número indica la clave de la colonia y (-) indica control negativo.

Para DHBacRep52 y DHBacRep78 se esperaban productos de amplificación de 3.6 y 3.9 Kpb, respectivamente. En DHBacRep52, sólo las colonias 1 y 2 generaron un producto de amplificación de aproximadamente 3.5 Kpb (similar al esperado según el tamaño del gen clonado), mientras que el resto de las colonias generaron un producto de igual tamaño al del control negativo. En DHBacRep78 sólo la colonia 7 generó un producto de casi 4.0 Kpb, mientras que en el resto de las colonias analizadas se observó un producto de longitud igual al del control negativo. Se purificó el bácmido recombinante de las colonias positivas. El análisis del bácmido DHBacGFP-Rep52 se llevó a cabo de la misma manera

(datos no mostrados). La identidad e integridad de los genes clonados se confirmó nuevamente mediante secuenciación.

Posteriormente, se llevó a cabo la transfección de células de insecto con los 3 bácmidos recombinantes. El bácmido contiene todas las secuencias necesarias para producir baculovirus de modo que es posible identificar a las células donde el baculovirus se está replicando a través de los efectos citopáticos que la infección viral les genera. Algunos de los efectos citopáticos más evidentes son el agrandamiento del núcleo, así como el aumento de tamaño [79, 84, 104-105] y granulosidad de las células [105]. Dichos cambios morfológicos son fácilmente detectables al microscopio, lo que permite monitorear a las células en diferentes períodos de incubación sin detener la producción de baculovirus recombinantes. Por tanto, en este estudio se llevó a cabo el monitoreo de células para detectar efectos citopáticos tras la transfección. Como se observa en la figura 15, se observaron efectos citopáticos en las células transfectadas con los diferentes bácmidos en comparación con el control no transfectado. Adicionalmente, la expresión de la proteína EGFP sirvió como reportera de la presencia de DNA viral en las células transfectadas con el bácmido DHBacGFP-Rep52.

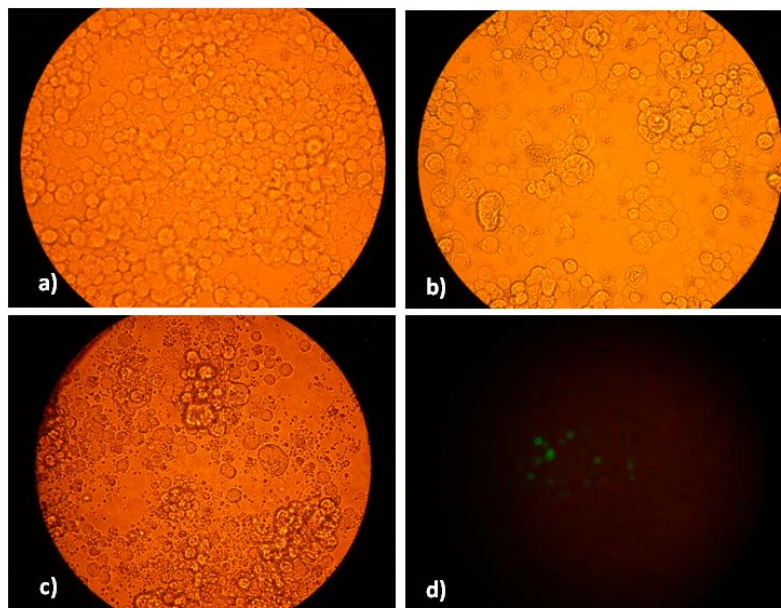


Figura 15. Micrografía de células Sf9 tras 120 h post-transfección. a) control de células no transfectadas, b) células transfectadas con DHBacRep78, c) células transfectadas con DHBacGFP-Rep52, d) expresión de EGFP en células transfectadas con DHBacGFP-Rep52. (Aumento 40X).

De los sobrenadantes recuperados de las células transfectadas con los 3 diferentes bácmidos se recuperó la primera generación de baculovirus recombinantes denominado stock pase 0 (P0). Con estos baculovirus se llevaron a cabo ensayos en caja para aislar placas virales (figura 16), a partir de los cuales se aislaron 6 placas virales para BacRep52, 5 para BacRep78 y 1 para BacGFP-Rep52.



Figura 16. Placas virales (halos incoloros) obtenidas infectando con BacRep52, P0. Control: células sin infectar.

De las placas virales de BacRep52 analizadas todas produjeron proteína recombinante (figura 17), y se seleccionó la placa 3 por ser la mejor productora. De las placas virales de BacRep78, sólo la número 2 produjo proteína recombinante. Se observó que los niveles de producción de Rep78 fueron mucho más bajos a los de Rep52, aún cuando la producción de baculovirus (evaluada mediante la expresión de la proteína GP64) fue similar en ambos casos. Cabe resaltar que Rep78 se expresa bajo el promotor *Δie1* que se mantiene activo hasta el final de la fase tardía (18 hpi), por lo que su expresión muy posiblemente había cesado mucho antes de las 96 hpi cuando se evaluó la producción de proteína recombinante.

Cabe resaltar que con la construcción contenida en BacRep78 también se expresa Rep52 pues no se modificó el codón de inicio de transcripción de dicha proteína. No obstante, tal como se menciona en reportes previos [93], los niveles de expresión de Rep52 son considerablemente más bajos que los de Rep78, a tal grado que al expresar Rep78 con el baculovirus BacRep78 generado en este trabajo no se aprecia Rep52 (figura 17).

Adicionalmente, se corroboró la expresión de Rep52 en la única placa aislada para BacGFP-Rep52. Con esto, quedó confirmada la construcción y funcionalidad de los stocks virales producidos en este trabajo.

Las placas virales seleccionadas se utilizaron para amplificar los diferentes stocks virales que fueron utilizados en experimentos posteriores.

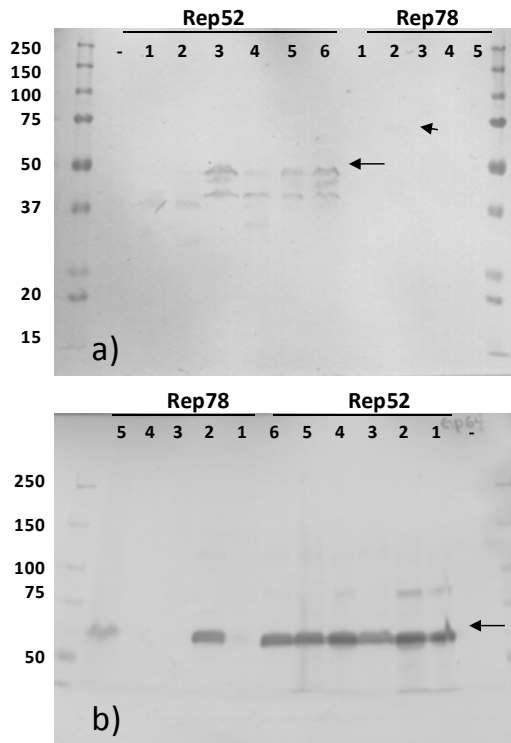


Figura 17. Análisis de Western blot para corroborar la expresión de proteína recombinante a partir de extractos de células Sf9 infectadas con diferentes placas virales. a) Detección de proteína Rep en placas virales de BacRep52 y BacRep78. b) Detección de proteína GP64 de baculovirus en placas virales de BacRep52 y BacRep78. c) Detección de proteína Rep en la placa viral de BacGFP-Rep52. Las flechas indican la banda de la proteína de interés. (-): control de células no infectadas. (+): proteína Rep52 expresada en células infectadas con BacRep52.

8.2 Localización intracelular de proteínas de VAA en células de insecto.

Durante la infección de células humanas con el VAA silvestre los diferentes componentes virales presentan una distribución intracelular específica [37-38], misma que está dada a causa de la presencia de señales de localización nuclear dentro de la secuencia de aminoácidos de algunas proteínas virales o a causa de su interacción con proteínas celulares [39-40]. Esta distribución intracelular de los elementos virales tiene un impacto en el ciclo de replicación del virus. La importancia de la localización intracelular de las proteínas estructurales es tal que el ensamblaje de la cápside sólo se lleva a cabo en compartimentos nucleolares [38-39] y que modificaciones en la capacidad de transporte de dichas proteínas al interior del núcleo celular resultan, por tanto, en un abatimiento en la capacidad de formación de cápsides [35, 106].

Desde hace una década se ha utilizado el sistema de células de insecto para la producción de vVAA [45]. No obstante, poco se sabe respecto a la interacción de los componentes de VAA con las proteínas celulares en este sistema recombinante. La infección con el baculovirus provoca cambios importantes en la morfología celular induciendo un agrandamiento del núcleo, la aparición del estroma virogénico como un sub-compartimento nuclear y disgregación de los cuerpos nucleolares o su marginalización del estroma virogénico [74, 77-79]. Al inicio de este trabajo se desconocía si estos cambios citológicos podrían tener repercusiones en la distribución intracelular de las proteínas de VAA en células de insecto y en su capacidad de interacción para la formación de vectores biológicamente funcionales. Por tanto, el propósito de este estudio fue caracterizar la distribución intracelular de las proteínas de VAA en estas células para determinar si ésta constituye una limitación para producción de vVAA. De los resultados obtenidos en este estudio se preparó la publicación "*Intracellular localization of adeno-associated viral proteins expressed in insect cells*" (Gallo-Ramírez L.E., Ramírez O.T. and Palomares L.A.) [107], misma que se incluye en la sección de Apéndices.

Lo primero que se realizó fue la caracterización de la distribución intracelular de distintos elementos expresados individualmente. Para ello se infectaron células que sólo produjeran las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 (VP), la proteína Rep78 o la proteína Rep52, y su distribución celular se analizó a las 24, 48, 72 y 96 hpi. Al analizar la localización intracelular de las proteínas estructurales se encontró que la proteína desensamblada tendía a distribuirse tanto en citoplasma como en el núcleo (figura 18). Conforme aumentó el tiempo de infección también aumentó la población de células con proteína en el núcleo, lo que parece indicar que su transporte al interior de este organelo es dependiente de concentración. AAP es una proteína cuya secuencia está contenida en el gen *cap* de

VAA y se ha visto que contribuye al transporte de proteínas VP al nucléolo [35]. Aunque en este trabajo no se evaluó AAP, es posible que la concentración intracelular de esta proteína aumentara con el paso del tiempo tal como se observó con las proteínas VP expresadas bajo el mismo gen y por ello su translocación al núcleo aumenta con la concentración de proteína.

La proteína VP desensamblada se distribuyó a lo largo de todo el núcleo. No obstante, se presentaron regiones sub-nucleares donde la concentración de proteína era notoriamente mayor al resto del núcleo. Por su parte, la proteína VP ensamblada sólo se detectó en el núcleo (figura 19), donde también se observaron zonas de alta concentración de cápsides, algunas veces en la parte central del núcleo y otras en la periferia. Esta observación concuerda con lo reportado previamente, donde el ensamblaje se lleva a cabo de forma específica en el núcleo [38]. No obstante, pese a existir zonas de alta densidad de cápsides éstas también se localizaron en el resto del núcleo, a diferencia de células de mamífero donde se localizan específicamente en el nucléolo. Esto puede deberse a que durante la infección con baculovirus se disgrega este organelo, lo que podría propiciar que las proteínas que lo constituyen (y que posiblemente participan en el ensamblaje de las cápsides) estén distribuidas también a lo largo del estroma virogénico.

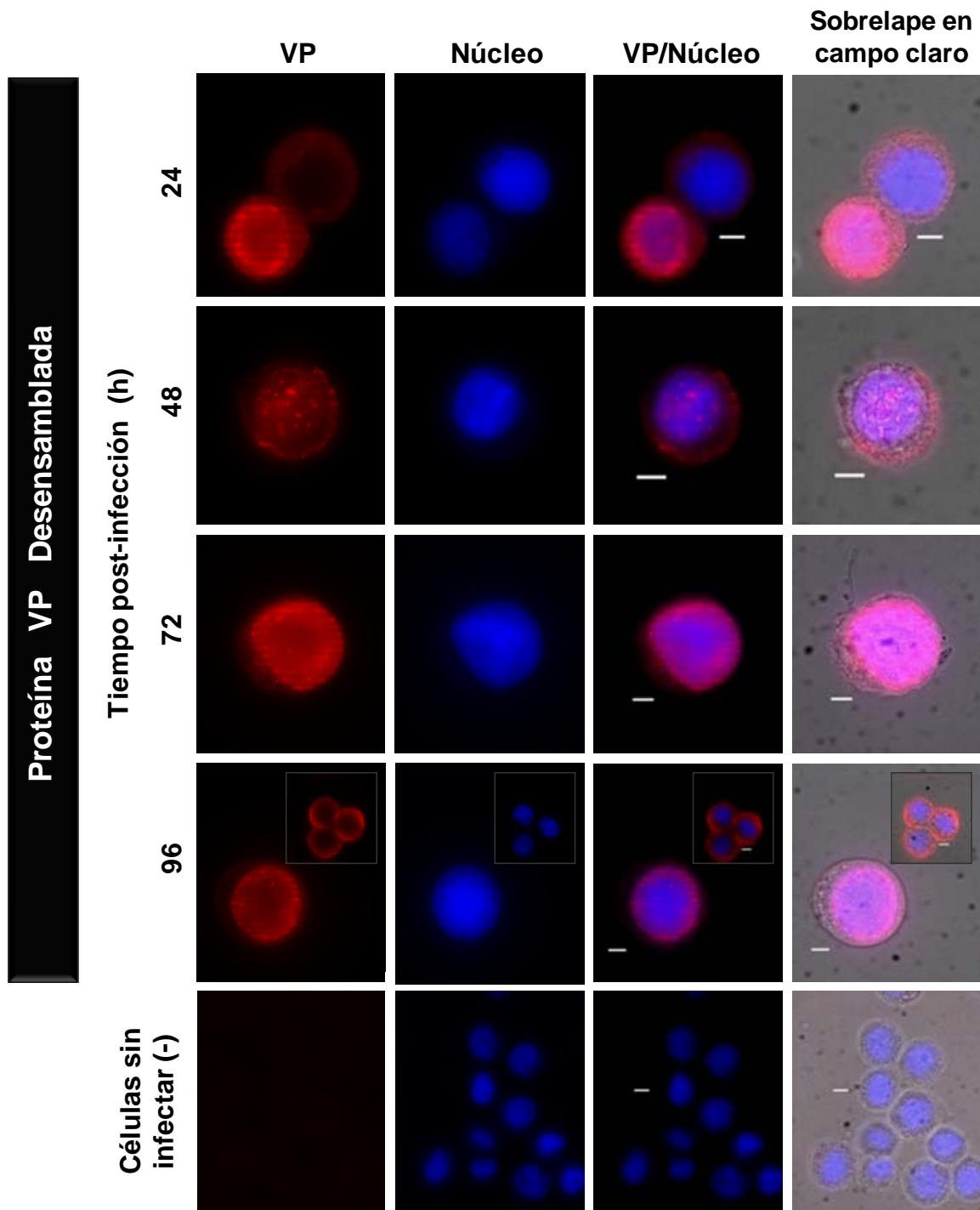


Figura 18. Detección por inmunofluorescencia de proteína VP desensamblada en células H5 infectadas con BacCap (Aumento 63X). La detección de la proteína se realizó utilizando el MAb B1 y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa Fluor 568. Los núcleos se tiñeron con DAPI. La barra indica una longitud de 6.5 μm .

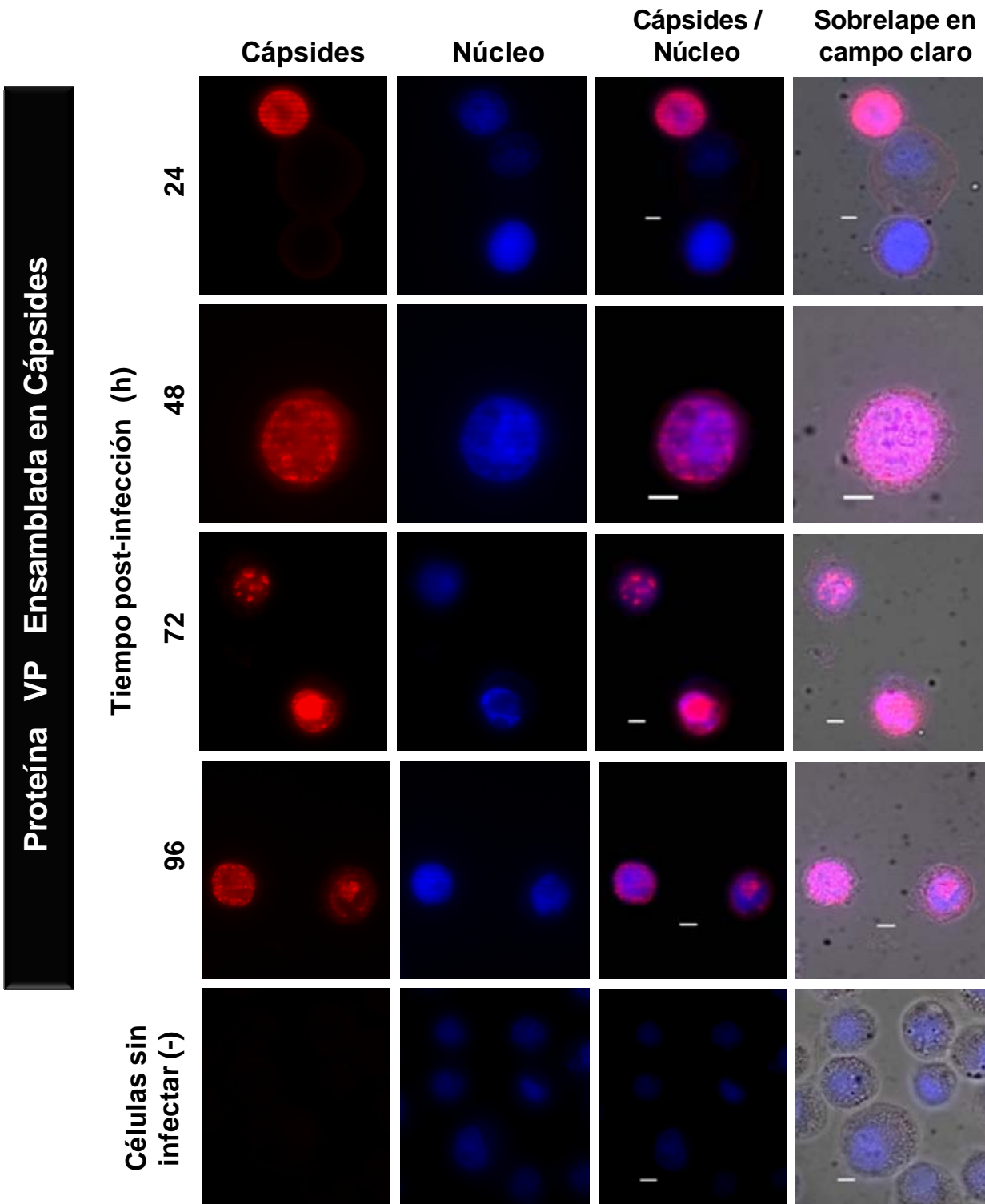


Figura 19. Detección por inmunofluorescencia de proteína VP ensamblada en células H5 infectadas con BacCap (Aumento 63X). La detección de la proteína se realizó utilizando el MAb A20 y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa Fluor 568. Los núcleos se tiñeron con DAPI. La barra indica una longitud de 6.5 μm .

Rep78 y Rep52 presentaron una distribución exclusivamente nuclear cuando se expresaron de forma individual, incluso a tiempos temprano de infección, por lo que la translocación de estas proteínas al núcleo parece llevarse a cabo inmediatamente después de su síntesis (figura 20). A diferencia de las proteínas VP que parecen depender de la proteína AAP [35] y nucleofosmina [39] para su transporte al núcleo, las proteínas Rep sólo dependen de su señal de localización nuclear, es posible que por ello su transporte no dependa del incremento en la concentración de otras proteínas.

Rep52 se distribuyó de forma prácticamente uniforme a lo largo del núcleo y su localización no se modificó con el tiempo de infección. Por su parte, Rep78 tuvo una distribución menos uniforme. A las 24 hpi se observaron altas concentraciones de proteína en la zona central del núcleo principalmente, pero a las 48 hpi la concentración de Rep78 decayó notoriamente y la proteína se encontró formando pequeños agregados a lo largo de todo el núcleo. A las 72 y 96 hpi ya no fue posible detectar la proteína. La expresión de Rep78 está controlada por el promotor *Δie1* [45], el cual se encuentra activo hasta la etapa tardía de infección (18 hpi aproximadamente). A partir de ese tiempo de infección la producción de Rep78 cesa y por tanto, la disminución en su concentración a través del tiempo debe estar asociada a degradación. En cambio, la expresión de Rep52 está controlada por el promotor *polh* y se mantiene activa (a altos niveles) hasta períodos más tardíos. Esto explica las diferencias en concentración entre ambas proteínas. Las diferencias en la distribución intra-nuclear de rep78 y Rep52 pueden deberse a la diferencia en la secuencia aminoacídica entre ambas. Rep78 posee un dominio adicional de 224 a.a. en su extremo N-terminal que le confiere capacidad de unión específica al DNA [23, 53], así como capacidad de formación de complejos hexaméricos consigo misma [55]. Rep78 también es capaz de actuar como regulador transcripcional de genes adenovirales o de herpesvirus, así como de genes de la célula hospedero a través de la formación de complejos con el DNA y proteínas virales o con proteínas celulares [62, 108], respectivamente. Por tanto, es posible que su interacción con proteínas celulares o del baculovirus propicie una distribución nuclear dirigida principalmente a la zona del estroma virogénico, tal como se observó en este estudio. Por su parte, la formación de agregados de Rep78 puede estar relacionada tanto con su capacidad de generar complejos consigo misma, tanto como por su capacidad de formar complejos con otras proteínas, tal como se mencionó previamente.

Cabe mencionar que con el cassette de expresión de Rep78 también se produce Rep52 pues no se modificó el codón de inicio de expresión de dicha proteína. Sin embargo, tal como se demostró en éste (figura 17) y otros estudios previos [93], la concentración de Rep52 es considerablemente menor a la de Rep78 por lo que puede considerarse despreciable para efectos de este análisis.

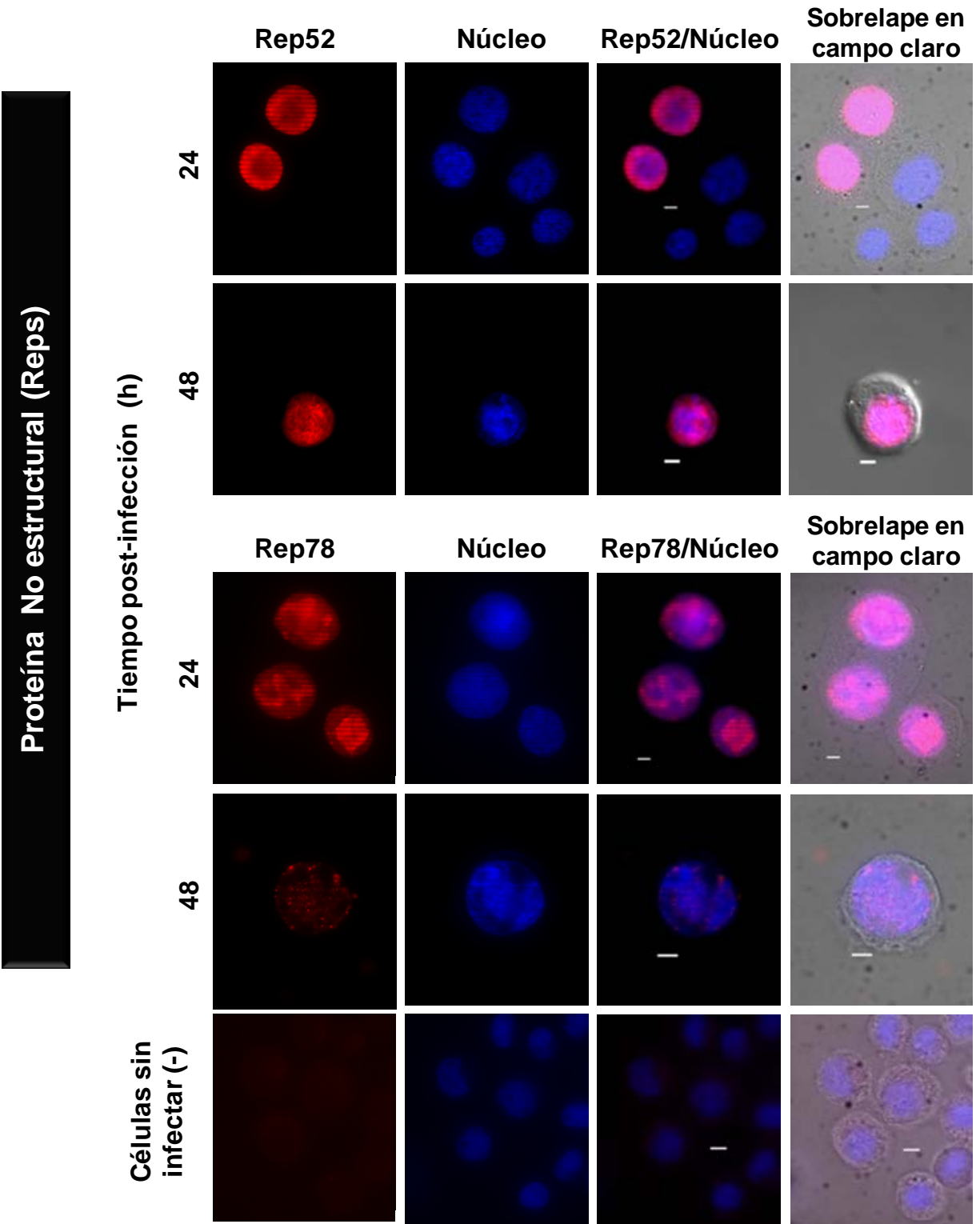


Figura 20. Detección por inmunofluorescencia de proteína Rep78 y Rep52 en células H5 infectadas con BacRep78 o BacRep52 (Aumento 63X). La detección de la proteína se realizó utilizando el MAb 76.3 y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa Fluor 568. Los núcleos se tiñeron con DAPI. La barra indica una longitud de 6.5 μm .

Una vez caracterizada la distribución intracelular de proteína VP, cápsides y las proteínas Rep78 y Rep52 durante su expresión individual, se procedió a caracterizar su distribución durante su co-expresión con otros elementos como las proteínas estructurales (figura 21) o los gVAA (figura 22).

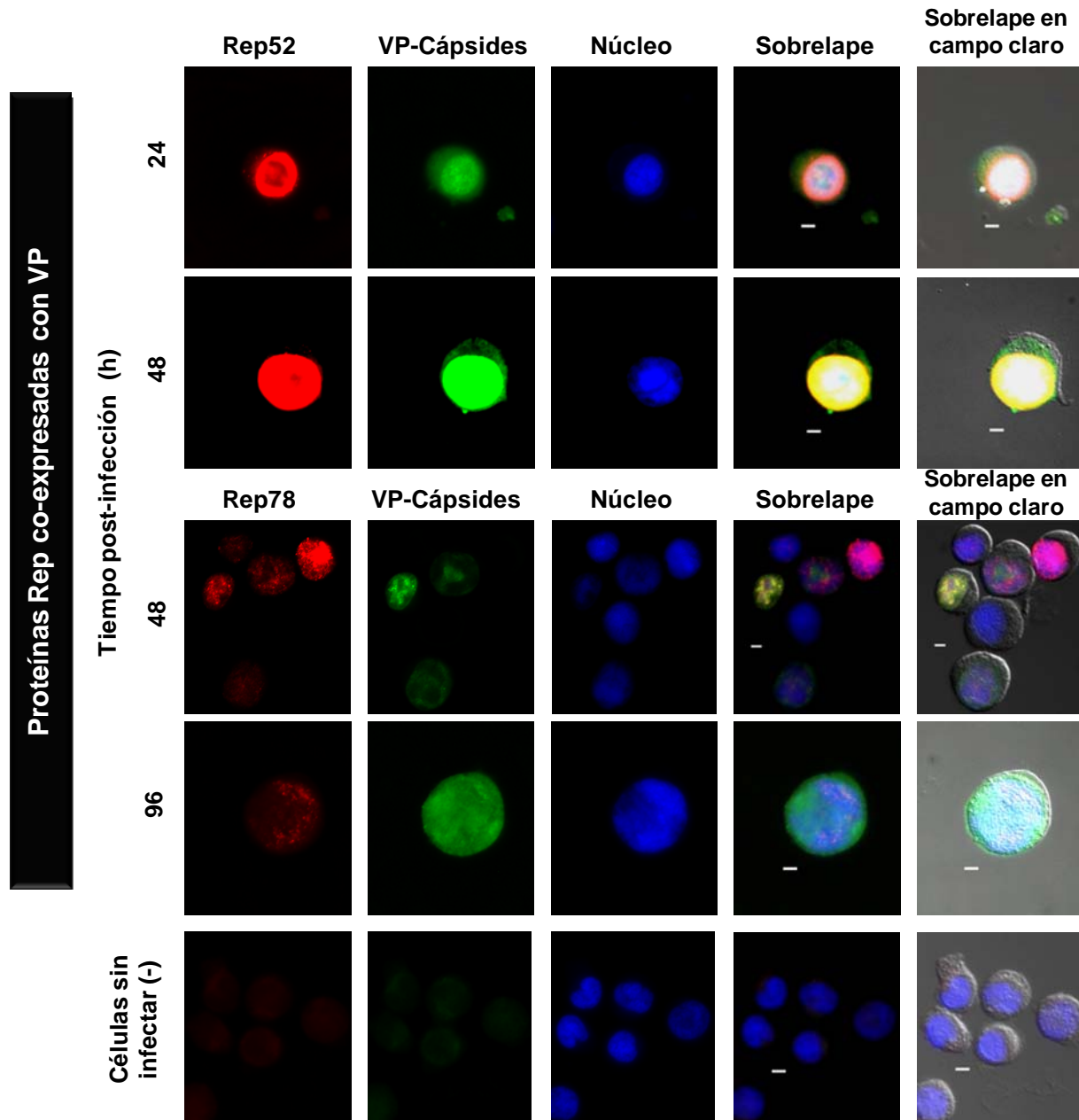


Figura 21. Detección por inmunofluorescencia de proteínas Rep y VP (ensamblada y desensamblada) en células H5 co-infectadas con BacCap y BacRep78 o BacRep52 (Aumento 40X). Las proteínas Rep se detectaron utilizando el MAAb 76.3 y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa Fluor 568. La proteína VP se detectó con un PAb y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488. Los núcleos se tiñeron con DAPI. La barra indica una longitud de 6.5 μm.

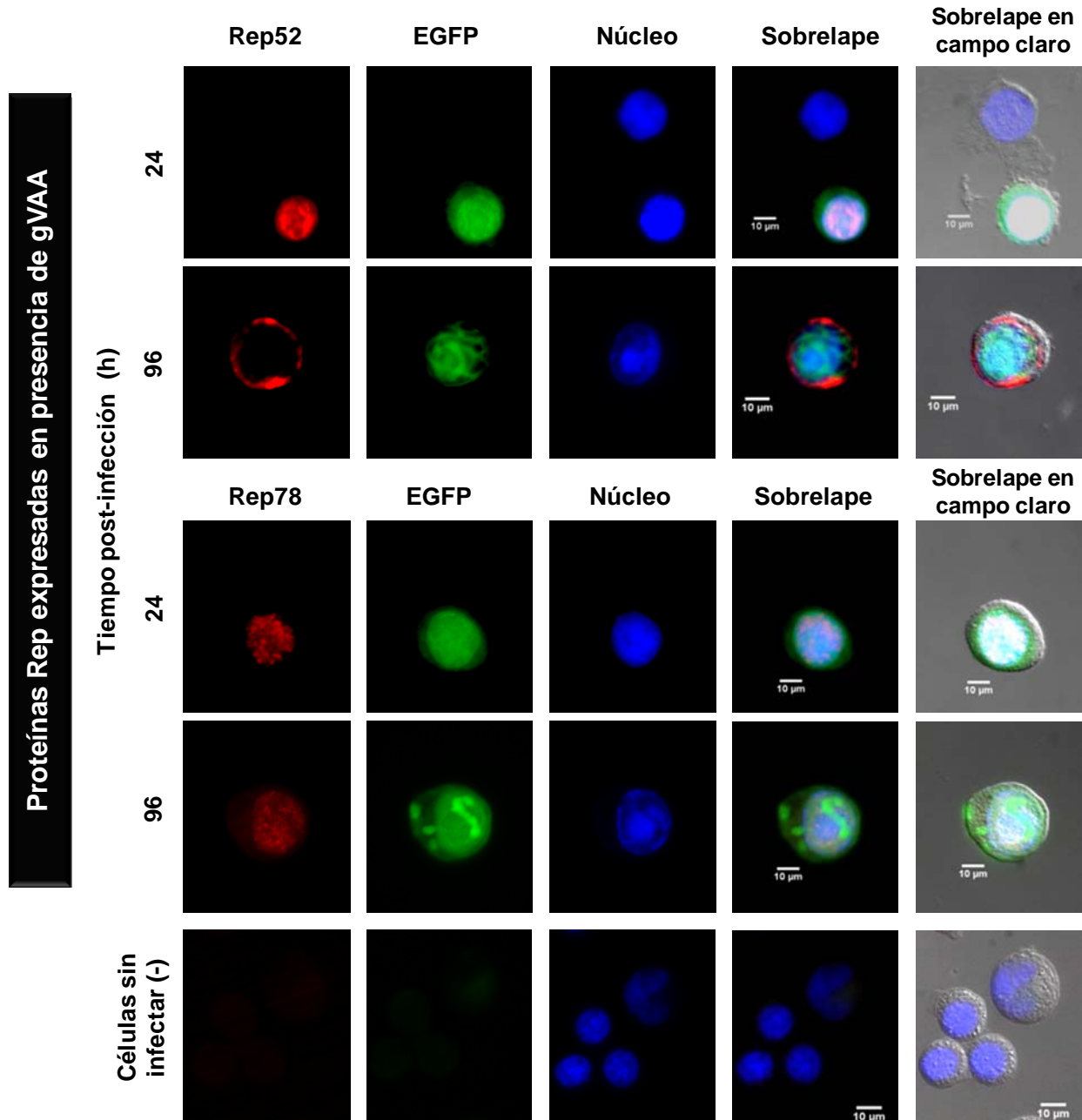


Figura 22. Detección por inmunofluorescencia de proteínas Rep en células H5 co-infectadas con BacGFP y BacRep78 o BacRep52 (Aumento 40X). Las proteínas Rep se detectaron utilizando el MAb 76.3 y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa Fluor 568. La presencia de los gVAA se detectó mediante la expresión de EGFP. Los núcleos se tiñeron con DAPI. La barra indica una longitud de 6.5 μm .

En comparación con la expresión individual, Rep52 no mostró diferencias en su distribución intracelular durante su co-expresión con las proteínas estructurales (figura 21). Su distribución celular tampoco cambió en presencia de los gVAA excepto a las 96 hpi, cuando Rep52 fue excluida del núcleo, tiempo en

que se observó la formación de macro-estructuras de tipo tubular en la célula (figura 22). No se determinó si estas estructuras fluorescentes estaban conformadas sólo por EGFP o sólo tenían esta proteína asociada a ellas.

En cambio, durante su co-expresión con proteínas VP o los gVAA, Rep78 sí modificó su distribución intracelular y concentración con respecto a su expresión individual. Rep78 formó agregados de alta concentración desde las 24 hpi y fue detectable a tiempos tan tardíos como las 96 hpi en las células que co-expresaban ya sea VP o los gVAA (figuras 21 y 22). Sólo en algunas células fue evidente que Rep78 co-localizó perfectamente en los sitios de acumulación de proteína VP. Rep78 tiene capacidad de formar complejos con las proteínas de la cápside [48], por lo que la co-localización de ambas proteínas puede implicar una interacción directa entre ellas.

El estroma virogénico es el sitio donde se lleva a cabo la replicación del DNA de baculovirus [74, 78] y se espera que también lo sea para los gVAA. Para que se lleve a cabo la replicación de los gVAA de forma independiente a la de baculovirus, es necesario que Rep78 realice cortes específicos en el *trs* de las ITR por lo que es necesaria la interacción directa entre Rep78 y los gVAA. La aparición de agregados o cúmulos con alta densidad de Rep78 en presencia de los gVAA implica que éstos inducen que la proteína se concentre en sitios específicos posiblemente relacionados con centros de replicación de DNA viral. Así mismo, la detección de Rep78 a tiempos muy tardíos de infección en presencia de las VP o los gVAA implica que la reducción de su degradación se debe a su interacción física con dichos elementos.

Después de corroborar la interacción directa de Rep78 con las proteínas de la cápside y los gVAA se procedió a realizar una infección triple con los baculovirus BacCap, BacRep78 y BacGFP-Rep52 para evaluar la localización de las cápsides cuando se expresan todos los elementos necesarios para formar vVAA. En células humanas, la distribución de las cápsides virales cambia con la co-expresión de proteínas Rep [38]. Aún se desconoce el mecanismo por el cual estas proteínas inducen la liberación de cápsides a partir de los cuerpos nucleolares al resto del núcleo o incluso el citoplasma, pero parece constituir parte importante del ciclo de infección del virus. En células de insecto se encontró que, durante la co-expresión de todos los elementos, las cápsides tendieron a distribuirse principalmente en la periferia nuclear formando cúmulos más pequeños a los observados cuando se produjeron de forma independiente (figura 23).

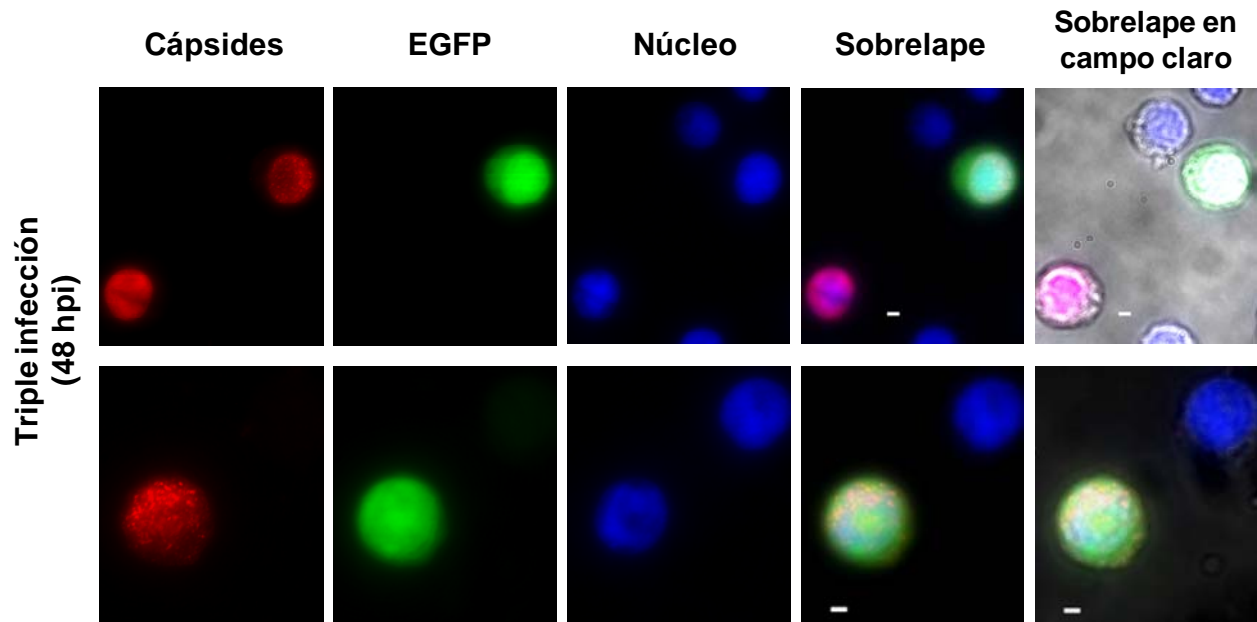


Figura 23. Detección por inmunofluorescencia de cápsides de VAA en células H5 co-infectadas con BacCap, BacRep78 y BacGFP-Rep52 (Aumento 40X). Las cápsides se detectaron utilizando el MAb A20 y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa Fluor 568. La presencia de los gVAA se detectó mediante la expresión de EGFP. La expresión de Rep52 se infirió a partir de la expresión de EGFP cuya expresión fue inducida mediante el mismo baculovirus (BacGFP-Rep52). Los núcleos se tiñeron con DAPI. La barra indica una longitud de 6.5 μm .

A fin de caracterizar los sitios de ensamblaje o acumulación de las cápsides virales se llevó a cabo un estudio de microscopía electrónica de barrido utilizando cortes de células infectadas ya sea sólo con BacCap, o coinfectadas con BacCap, BacRep78 y BacGFP-Rep52. Se observaron diferencias notables en la morfología de las células infectadas con respecto a la de las células no infectadas (figura 24). En las células no infectadas fue muy evidente la presencia de cuerpos nucleolares de gran tamaño (figura 24 A), mientras que en las células infectadas éstos ya no fueron distinguibles en células donde la presencia de baculovirus era abundante (figura 24 C y D). En células con signos de infección temprana se distinguió de forma clara una zona de alta densidad en la parte central del núcleo (figura 24 B), correspondiente al estroma virogénico, mismo que ya no fue claramente identificable en células con signos de infección tardíos. Cuando estuvieron presentes, los cuerpos nucleolares se ubicaron en la periferia del estroma virogénico. Así mismo, se observaron cuerpos fibrilares en la mayoría de las células analizadas. Estas observaciones coinciden con cambios citológicos generados a partir de la infección con el baculovirus ya ampliamente documentados [79].

En las células infectadas sólo con BacCap no se identificaron cápsides de VAA. Pero sí en aquellas co-infectadas con BacCap, BacRep78 y BacGFP-Rep52 (figura 25).

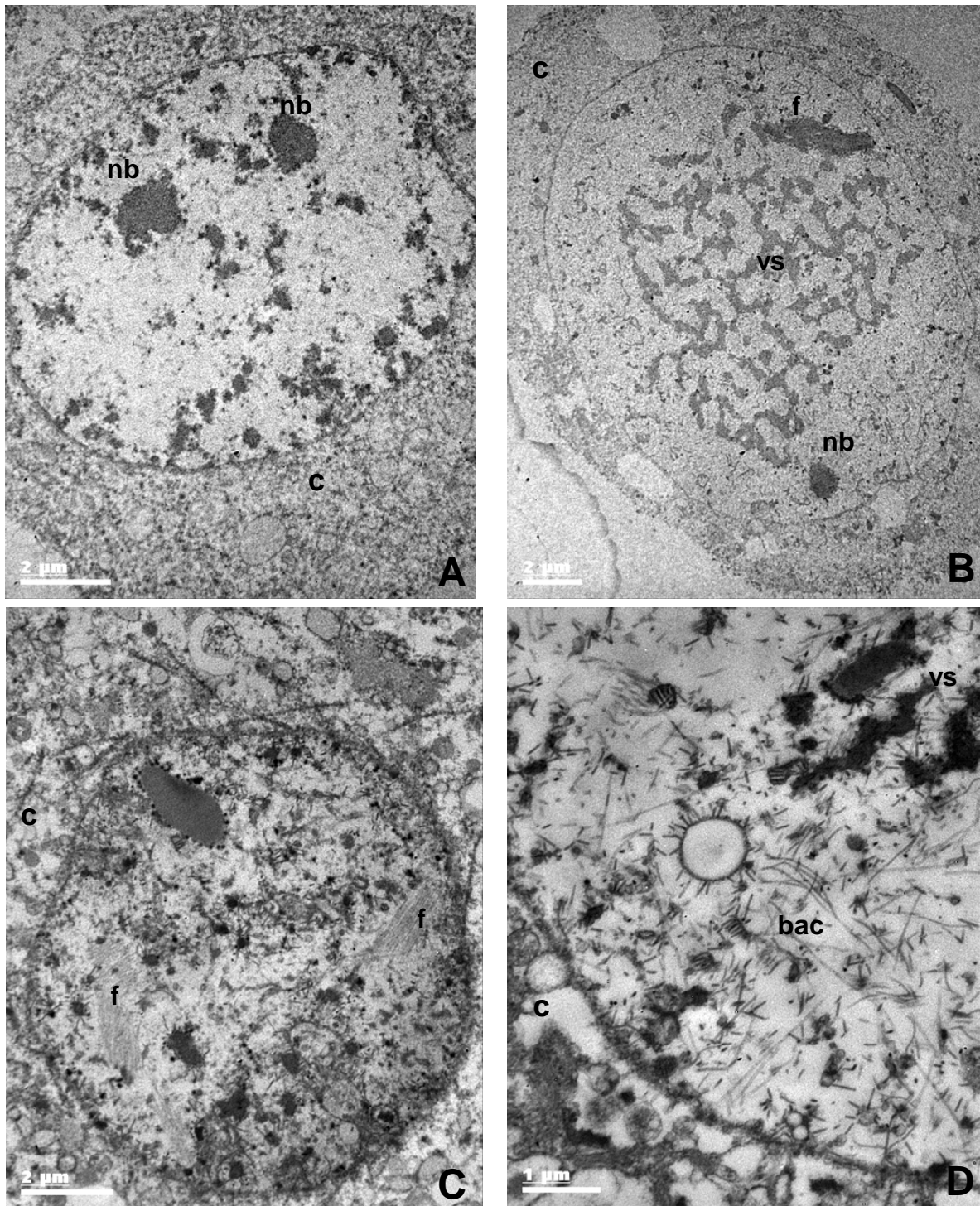


Figura 24. Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido de células H5 infectadas con BacCap (B y C), o BacGFP (D) (Aumentos, A-C: 7,000, D: 12,000). Se analizaron además células sin infectar (A). vs: estroma virogénico, f: cuerpos fibrilares de proteína baculoviral, c: citoplasma, nb: cuerpos nucleolares, bac: baculovirus.

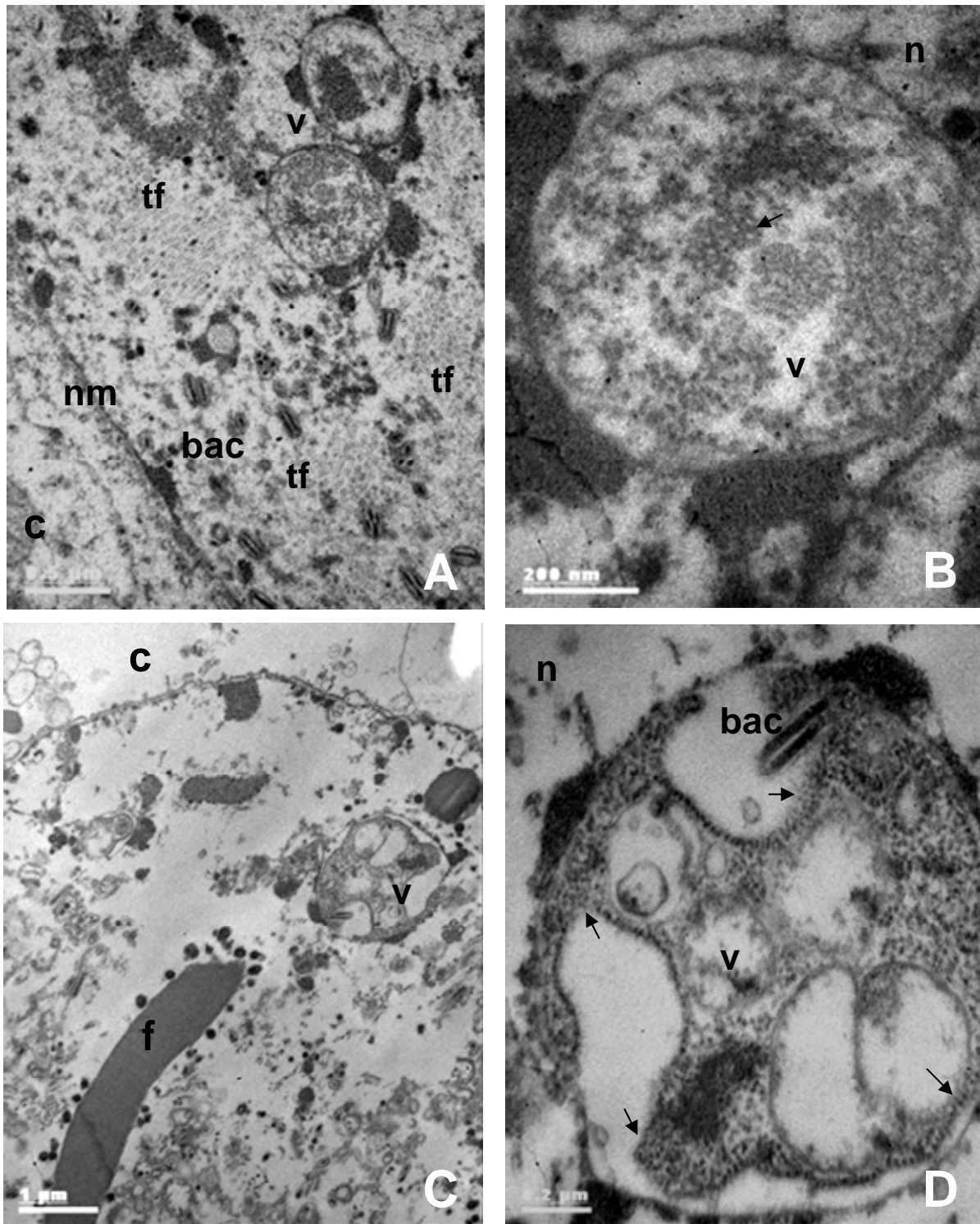


Figura 25. Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido de células H5 infectadas con BacCap, BacRep78 y BacGFP-Rep52 (Aumentos, A: 20,000; B: 85,000; C: 12,000; D: 50,000). v: vesículas, f: cuerpos fibrilares de proteína baculoviral, tf: corte transversal de cuerpos fibrilares, c: citoplasma, n: núcleo, nm: membrana nuclear, bac: baculovirus. La flecha indica las cápsides de VAA.

Las cápsides de VAA se detectaron en células que contenían baculovirus envueltos en membrana, signo característico de la etapa de infección muy tardía. Estas células en estado de infección muy tardía se caracterizaron además por la presencia de abundantes vesículas en la zona correspondiente a la periferia nuclear o zona del anillo. Fue precisamente en vesículas localizadas en esta zona donde se detectaron las cápsides de VAA. Es difícil determinar si estas vesículas constituyen los centros de ensamblaje de las cápsides virales o si se originan como parte del proceso de replicación del baculovirus en la etapa muy tardía de infección y las cápsides de VAA ya ensambladas quedan embebidas en ellas. Es posible que la detección de cápsides de VAA presentes en la zona central del núcleo no haya sido posible debido a la alta densidad de proteína y material genético concentrados en esa zona. Sin embargo, la detección de las cápsides en vesículas ubicadas en la zona del anillo coincide con la detección previa de pequeños cúmulos de cápsides en la zona de la periferia nuclear cuando se expresan todos los componentes de VAA (figura 23).

En conjunto, estos resultados apuntan a que existe una interacción directa entre los componentes de VAA en el interior de la célula de insecto que modifica la distribución y estabilidad de algunos componentes, y que los cambios citológicos generados a partir de la infección con baculovirus no constituyen una limitación para el correcto ensamblaje del vector en este sistema recombinante. Cabe resaltar que éste constituye el primer estudio sobre la caracterización de la distribución intracelular de los componentes de VAA y su interacción en células de insecto.

8.3 Análisis de replicación de genomas de VAA en ausencia de Rep78.

Los genomas de VAA se encuentran flanqueados por las ITRs que son secuencias palindrómicas y auto-complementarias que, por su naturaleza, podrían resultar susceptibles de eventos de recombinación durante la replicación del DNA de baculovirus. Kohlbrenner et al. [93] reportaron que al incrementar el número de pase del stock de baculovirus de BacGFP se observa una disminución en el número de genomas de VAA en los stocks de virus, sugiriendo que éstos se pierden durante el proceso de replicación del baculovirus, incluso en ausencia de la proteína Rep78. Esto constituye una limitación importante respecto a la amplificación del stock viral debido a la acumulación de partículas virales sin la construcción de interés en cada ciclo de amplificación del virus.

Considerando estos antecedentes se decidió estudiar la replicación de genomas de VAA en ausencia de Rep78 a fin de evaluar el efecto de la pérdida espontánea de estos genomas en el proceso global de replicación antes de evaluar la de replicación en presencia de esta proteína. Con este propósito se infectaron cultivos de células H5 a diferentes MDI del baculovirus BacGFP-Rep52 y posteriormente se determinó la producción de DNA viral mediante qPCR. Los resultados obtenidos en este estudio se incluyen en el artículo *“Adeno-associated viral vector genomes replication during baculovirus infection limits DNA-containing capsid production in insect cells”*. Gallo-Ramírez L.E., Ramírez O.T. and Palomares L.A., mismo que se incluye en los Apéndices de esta tesis.

Cabe resaltar que para poder llevar a cabo este estudio fue necesario, primeramente, establecer métodos de extracción y cuantificación de DNA que permitieran evaluar de forma confiable los cambios en la concentración del DNA viral. El desarrollo de estos métodos se muestra antes de las cinéticas de crecimiento celular y de producción de DNA viral.

8.3.1 Extracción de DNA a partir de células de insecto.

Primero, se llevó a cabo un ensayo para determinar el número de células necesario para obtener un rendimiento de recuperación de DNA constante con el propósito de disminuir las pérdidas de DNA viral y evitar subestimar su concentración por efecto del método de extracción. A partir de un mismo lote de células H5 se efectuaron diluciones para obtener 0.5, 1, 2, 3 4 y 5 millones de células. A partir de estas diluciones se extrajo DNA total utilizando el DNAsy® Blood and Tissue Kit (QIAGEN) como se indica en la sección 7.5.1. Finalmente, la concentración de DNA se determinó utilizando Nanodrop. Los resultados

obtenidos en este ensayo se muestran en la figura 26. La concentración de DNA total obtenido aumentó con la concentración celular. Sin embargo este aumento no fue lineal, tal como puede observarse en la línea de rendimiento de DNA, donde resulta evidente que los mayores rendimientos de DNA/10⁶ cél se obtienen en el intervalo de 0.5-1x10⁶ cél, por lo que se decidió llevar a cabo la extracción de DNA a partir de extractos celulares en este rango de concentración.

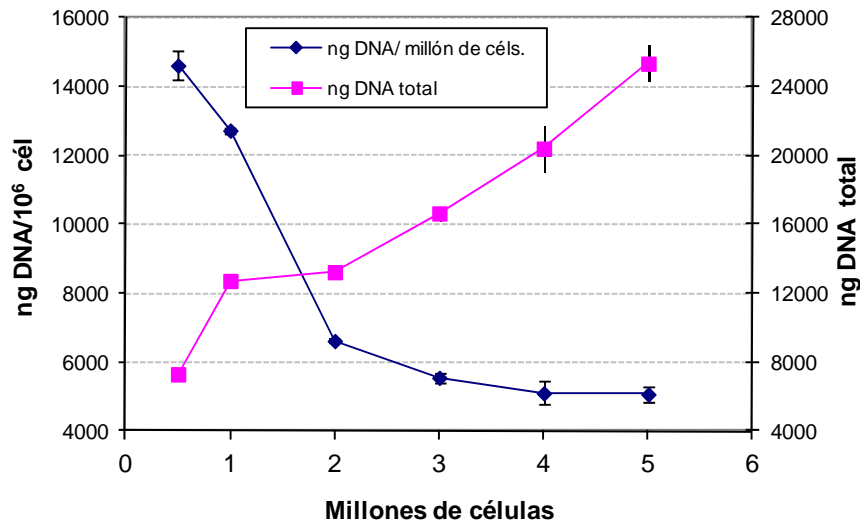


Figura 26. Rendimientos de recuperación de DNA a diferentes concentraciones de células H5 utilizando el DNAsy® Blood and Tissue Kit (QIAGEN). Las barras representan el error estándar de dos experimentos independientes.

8.3.2 Desarrollo de curvas de cuantificación absoluta para qPCR utilizando el Rotor-Gene 6000.

Las curvas de cuantificación para las cinéticas de infección con BacGFP-Rep52 se desarrollaron tal como se describe en la sección 7.5.3 utilizando el termocilador Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science). En la figura 27 se muestra la curva obtenida para la cuantificación absoluta del gen de *egfp*. Los parámetros de eficiencia (m) y linealidad (r^2) de las curvas obtenidas para los tres genes evaluados estuvieron dentro del rango aceptable. Dichos parámetros, así como los valores de ciclo de cuantificación (C_q) de los controles negativos de amplificación (NEG) y controles negativos sin templado (NTC) se presentan en la tabla 12. Para todas las curvas se encontró que el intervalo confiable de cuantificación fue de 10^2 - 10^8 copias del gen/rx, por lo que las muestras problema se diluyeron para que el número de copias de DNA viral estuviera comprendido en este mismo intervalo. No obstante, en las muestras problema se

consideró como amplificación no detectable cuando los valores de concentración fueron del mismo (o menor) orden de magnitud que los obtenidos en los NEG para cada gen.

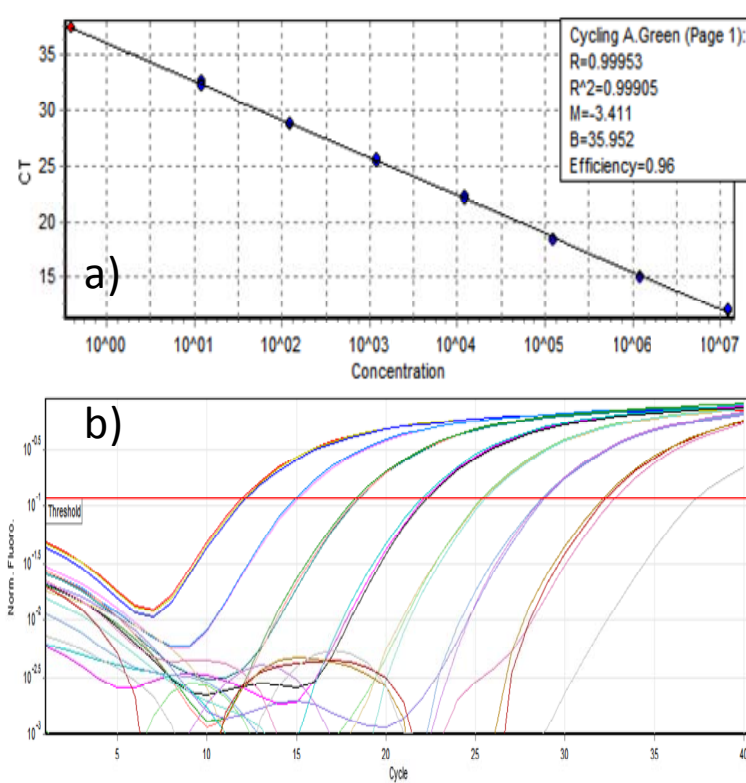


Figura 27. (a) Curva estándar de cuantificación absoluta obtenida para el gen *egfp* utilizando el Rotor-Gene 6000 (b) Perfil de amplificación de estándares usados en la obtención de la curva de cuantificación del gen *egfp*. Cada conjunto de líneas corresponde a una dilución serial de la curva de cuantificación.

Tabla 13. Parámetros de validación de la curva estándar de qPCR realizada con el Rotor-Gene 6000

Gen	Rango dinámico (copias/rx)	Eficiencia (%)	M	b	r ²	C _q del NTC	C _q del NEG (Pellet)	C _q del NEG (Sob.)
<i>p35</i>	10^2 - 10^8	100	-3.333	35.933	0.998	39.1	27.21	33.25
<i>egfp</i>	10^2 - 10^8	96	-3.428	38.640	0.998	37.33	27.93	36.82
<i>rep</i>	10^2 - 10^8	92	-3.542	37.300	0.999	35.23	27.68	34.72

Cq: ciclo de cuantificación. NTC: Control sin templado. NEG: Control negativo de amplificación. Sob: Sobrenadante.

8.3.3 Cinéticas de infección de células H5 empleando distintas MDI de BacGFP-Rep52.

Al ocurrir la infección con baculovirus las células son arrestadas en una pseudo-fase S del ciclo celular, éstas no se replican más y los cultivos dejan de crecer aunque se encuentren metabólicamente activos. Conforme progresa el ciclo de infección la producción de proteína viral aumenta mientras que la de proteína celular prácticamente se abate. En la fase muy tardía de infección la maquinaria celular se encuentra básicamente agotada y la viabilidad de los cultivos empieza a disminuir pues las células no poseen la capacidad de llevar a cabo las tareas de mantenimiento celular. Debido a esto, la concentración y viabilidad celulares resultan parámetros útiles para monitorear el proceso de infección de un cultivo ya que reflejan el estado de las células tras la adición del virus.

En la figura 28 se muestran los perfiles de concentración y viabilidad celular de los cultivos infectados usando distintas MDI de BacGFP-Rep52. A lo largo de la cinética, la concentración y viabilidad celular en los cultivos no infectados fueron mayores a las de los cultivos infectados. Tras la infección la concentración y viabilidad celular disminuyeron al aumentar la MDI. Como se puede observar, los cultivos infectados a MDI de 10 UFP/cél dejaron de crecer desde el momento de la infección, mientras que al infectar con 0.1 UFP/cél la concentración celular aumentó 2.5 veces. Esto implica que al utilizar la MDI mayor prácticamente todas las células resultaron infectadas desde tiempos tempranos de infección. Por el contrario, en el mismo período de tiempo, muy pocas células resultaron infectadas al utilizar la MDI menor.

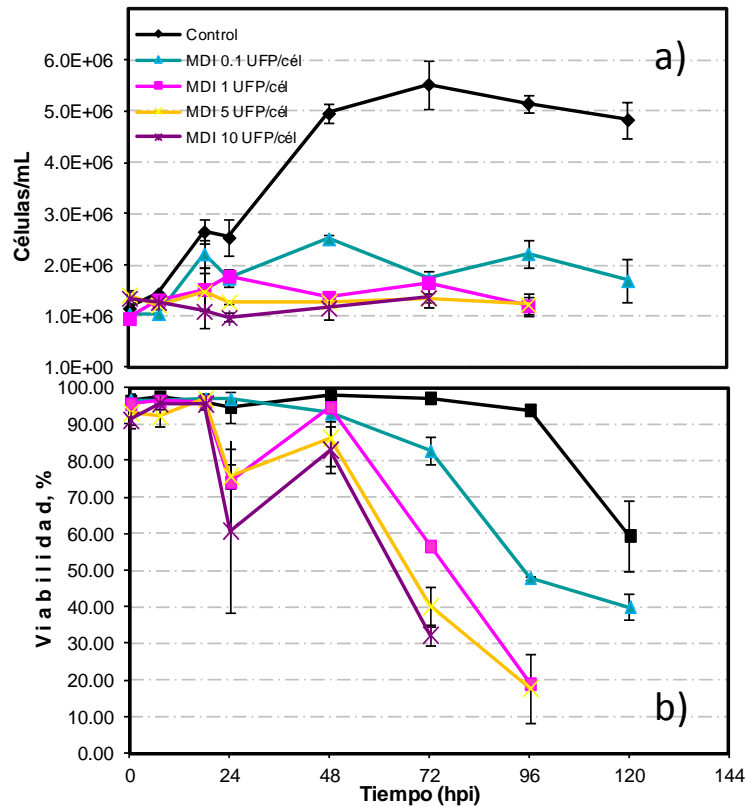


Figura 28. Evolución de los perfiles de concentración (a) y viabilidad (b) celular de cultivos de células H5 infectados a distintas MDI de BacGFP-Rep52. Las barras representan el error entre mediciones por triplicado realizadas en 2 cultivos independientes.

Por otra parte, se determinó el contenido de DNA en las células como parámetro adicional para evaluar el estado de infección del cultivo. Los rendimientos de recuperación de DNA en cultivos infectados con BacGFP-Rep52 se muestran en la figura 29. El rendimiento de DNA en los cultivos no infectados se mantuvo casi constante a lo largo del tiempo, oscilando entre $1-1.4 \times 10^5$ ng DNA/ 10^6 cél, valor similar al obtenido previamente (ver figura 26). Esto indica que el método de extracción de DNA total empleado es reproducible y confiable para la posterior cuantificación mediante qPCR. No se observó una diferencia significativa en el contenido de DNA total en los cultivos infectados a las diferentes MDI aunque los rendimientos de DNA/ 10^6 cél sí fueron mayores al de los controles sin infectar, por lo que este incremento en el contenido de DNA celular se puede atribuir directamente a la replicación del DNA viral. Resulta lógico que aumente el contenido de DNA en las células infectadas con baculovirus. En etapas tempranas de infección la célula se encuentra en un estado metabólico activo. La maquinaria celular, bajo la dirección de baculovirus, se enfoca a la producción de proteínas virales involucradas en la

replicación de DNA. Este proceso que se lleva a cabo a lo largo de la etapa tardía de infección (6-18 hpi). Es por esto que el contenido de DNA de células infectadas aumenta con respecto al de las células no infectadas.

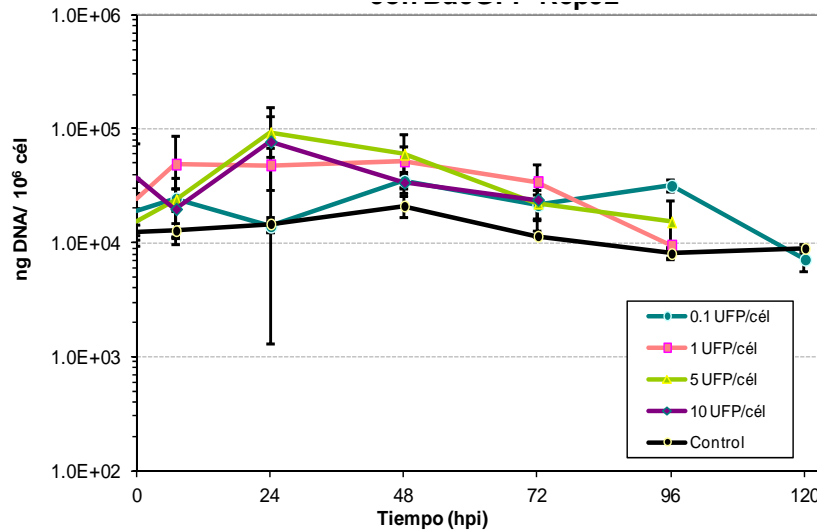


Figura 29. Rendimientos de recuperación de DNA en cultivos infectados a diferentes MDI de BacGFP-Rep52. La extracción se llevó a cabo a partir de 0.5×10^6 células. El control se refiere a cultivos sin infectar. Las barras representan el error entre mediciones por triplicado realizadas en 2 cultivos independientes.

8.3.4 Replicación de DNA viral en ausencia de Rep78.

En este trabajo se propuso utilizar el gen *p35* de AcMNPV para la cuantificación de genomas de baculovirus. *p35* es un gen mono-copia que codifica para la proteína anti-apoptótica P35 y que se sabe que tiende a conservarse durante la replicación de virus defectuosos [109]. Los virus defectuosos (DIP) pierden un gran porcentaje de las secuencias del genoma viral y con ello la capacidad de replicarse de forma autónoma y de expresar proteína recombinante. Durante la co-infección con virus no defectuosos el genoma de los DIP se replica con más rapidez, por lo que el porcentaje de éstos incrementa considerablemente en comparación con el virus no defectuoso. Tomando en cuenta lo anterior, *p35* resulta un gen sumamente atractivo para evaluar la acumulación de virus defectuosos en stocks virales destinados a la producción de proteína recombinante. Esto podría llevarse a cabo utilizando un segundo gen localizado en la región del genoma que se pierde en los DIP. Por lo general, en esa zona está contenida la secuencia del gen recombinante, por lo que la evaluación de su número de copias en conjunto con las de *p35* puede constituir un método para determinar la estabilidad de los

stocks de baculovirus. En este estudio, la replicación de genomas de VAA se evaluó utilizando el gen de *egfp* contenido en la construcción de los baculovirus BacGFP y BacGFP-Rep52. La estabilidad del stock viral se evaluó entonces comparando el número de copias de *p35* y *egfp*.

A fin de caracterizar el proceso de producción del DNA viral y evaluar la posible pérdida espontánea de los genomas de VAA en distintas etapas de infección del cultivo se cuantificó el número de copias de DNA viral tanto en la fracción celular y como en la de sobrenadante a lo largo del tiempo de cultivo. Los perfiles de replicación de DNA de baculovirus (*p35*) y de los gVAA (*egfp*) en los cultivos infectados a diferentes MDI de BacGFP-Rep52 se presentan en la figura 30.

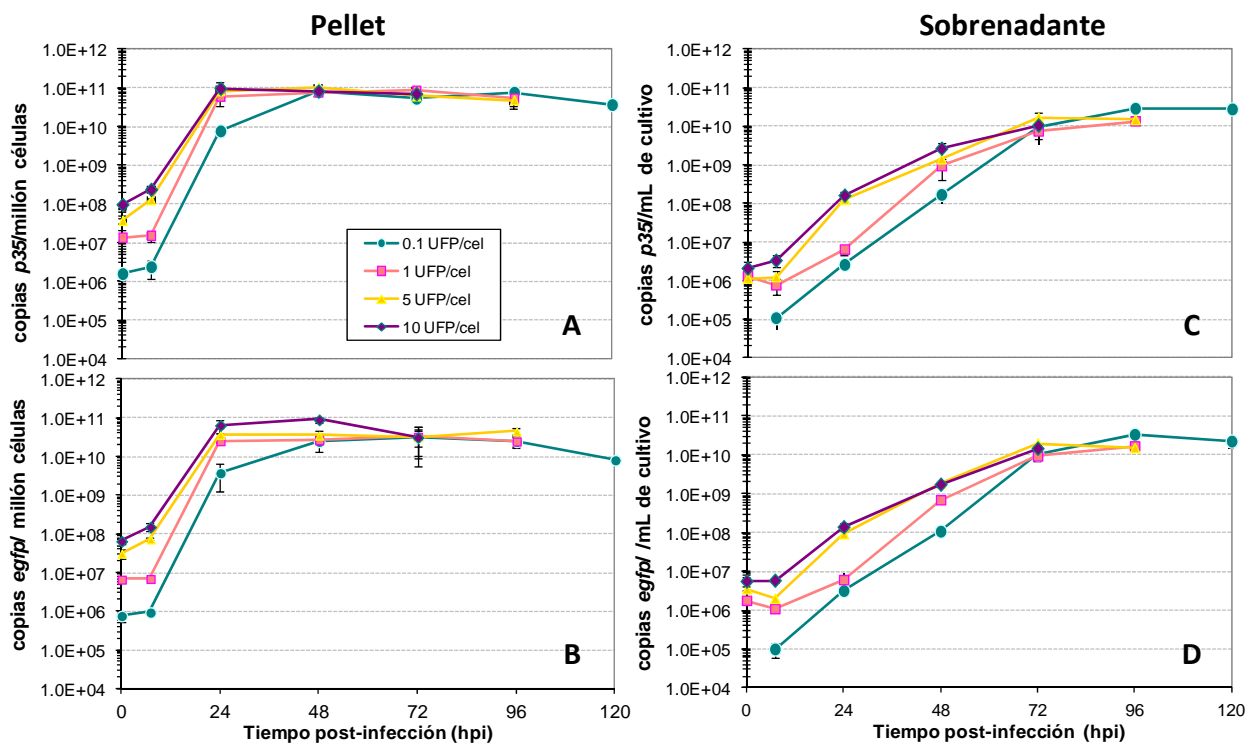


Figura 30. Cuantificación de genomas de baculovirus (*p35*) y gVAA (*egfp*) en las fracciones de pellet (A y B) y sobrenadante (C y D) de cultivos infectados a diferentes MDI de BacGFP-Rep52. Las barras indican la desviación estándar de mediciones realizadas por triplicado en dos cultivos independientes.

El perfil de replicación de ambos genes evaluados fue igual en cada una de las fracciones del cultivo. En la fracción de pellet (figura 30 A y B) el número de copias de genomas virales al tiempo 0 hpi fue proporcional a la MDI utilizada (tabla 13). Por tanto, a estas MDI la unión de los virus a las células no está limitada por los receptores. Independientemente de la MDI se alcanzó un *plateau* en la concentración máxima de genomas de baculovirus (gBac) y gVAA, a las 24 hpi para las MDI de 1,5 y 10

UFP/cél y a las 48 hpi para la MDI de 0.1 UFP/cél. La concentración máxima ($7.14 \pm 1.18 \times 10^{10}$ copias gBac / 10^6 cél y $3.59 \pm 1.37 \times 10^{10}$ copias gVAA / 10^6 cél) se mantuvo casi constante a lo largo del tiempo para todos los cultivos y decayó un 15-30% a las 96 ó 120 hpi.

A partir de los datos mostrados en la tabla 13 se determinó que, a las 0hpi, la relación de gBac en pellet por cada UFP añadida al cultivo fue de 11.8 ± 3.3 gBac/UFP. Esta relación de partículas virales (gBac) por UFP es cercana a las previamente reportadas para algunos stocks virales [110]. Esto indica que prácticamente todas las partículas virales se unieron a las células en un corto período de tiempo tras su adición al cultivo al cultivo. Este resultado refuerza la observación de que a las condiciones de infección usadas la unión viral a las células no estuvo limitada por receptores, tal como se evidenció en la figura 30.

Utilizando los datos presentados en la tabla 13 se determinó también que, a las 0 hpi, la relación de gBac/gVAA en la fracción de pellet fue de 1.66 ± 0.30 gBac/gVAA, misma que se mantuvo prácticamente constante hasta las 96 hpi para los cultivos infectados a 0.1, 1 y 10 UFP/cél. Esto indica que durante la replicación del baculovirus, y en ausencia de Rep78, no existe escisión de los gVAA a partir de los gBac al interior de la célula, o que en caso de haberla los gVAA liberados se replican de forma independiente dentro de la célula a la misma tasa que los gBac. Por este motivo se planteó la determinación de DNA en la fracción de sobrenadante como una estrategia para detectar la escisión de los gVAA a partir de los gBac, pues aunque los gVAA se repliquen independientemente dentro de la célula ya no formarán parte del genoma de la progenie viral liberada el medio de cultivo. Los perfiles de cuantificación de DNA viral en la fracción de sobrenadante se muestran en la figura 30 C y D.

Tabla 14. Rendimiento de DNA viral en la fracción de pellet celular (0 hpi) en cultivos infectados con BacGFP-Rep52.

MDI (UFP/cél)	UFP/mL (añadidas)	gBac/mL (copias de <i>p35</i>/mL)	gVAA/mL (copias de <i>egfp</i>/mL)	gBac/gVAA (<i>p35/egfp</i>)
0.1	1×10^5	$(1.12 \pm 0.22) \times 10^6$	$(5.53 \pm 0.83) \times 10^5$	2.03 ± 0.51
1	1×10^6	$(1.26 \pm 0.48) \times 10^7$	$(6.26 \pm 0.67) \times 10^6$	2.01 ± 0.79
5	5×10^6	$(5.17 \pm 0.55) \times 10^7$	$(4.52 \pm 0.54) \times 10^7$	1.14 ± 0.18
10	1×10^7	$(1.30 \pm 0.52) \times 10^8$	$(8.84 \pm 2.34) \times 10^7$	1.48 ± 0.71

gBac: Genomas de baculovirus. gVAA: Genomas de VAA.

El número de copias de gBac y gVAA en el sobrenadante a las 0 hpi no tuvo relación con la MDI utilizada. El número de genomas virales se incrementó a partir de las 7 hpi, tiempo cercano al inicio de la fase tardía de infección, y se alcanzó la concentración máxima de ambos genomas virales a las 96 hpi. La concentración máxima de gBac en sobrenadante representó 30% de la concentración máxima en pellet, excepto para la MDI de 10 UFP/cél donde representó el 15%. Debido a esto se concluye que el *plateau* observado en la fracción de pellet se debe al cese en la replicación de DNA viral y no a la liberación de baculovirus no ocluidos. Estos resultados también coinciden con observaciones previas que indican que los altos niveles de expresión de los genes muy tardíos se deben al alto contenido de DNA viral que permanece en la célula tras la liberación de los virus no ocluidos [80].

A las 0 hpi a relación promedio de gBac/gVAA en sobrenadante, y por tanto también en el stock viral utilizado, fue de 0.71 ± 0.25 gBac/gVAA, mientras que a las 96 hpi ésta fue de 0.99 ± 0.16 gBac/gVAA, mostrando que en la progenie viral liberada al medio de cultivo no hubo pérdida significativa de los gVAA.

Otra forma de evaluar la replicación de los gBac y los gVAA fue mediante el cálculo de las tasas de replicación de los genes *p35* y *egfp*, respectivamente. Para ello se utilizó la ecuación 6:

$$Vg_1 = Vg_0 * e^{\mu(\tau_1 - \tau_0)} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde μ representa la tasa de replicación (h^{-1}), τ_0 y τ_1 son el tiempo inicial y final de evaluación, respectivamente. Mientras que Vg_0 y Vg_1 representan la concentración del gen al inicio y al final del periodo de evaluación, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 31.

Para las diferentes MDI, las tasas de replicación de *p35* y *egfp* (μ_{p35} y μ_{egfp} , respectivamente) fueron iguales entre sí para cada período evaluado, demostrando que ambos genes se replicaron conjuntamente. Por tanto, se comprobó que no existe pérdida significativa de los gVAA a partir del DNA de baculovirus en ausencia de Rep78, al menos en stocks virales con número de pase 2.

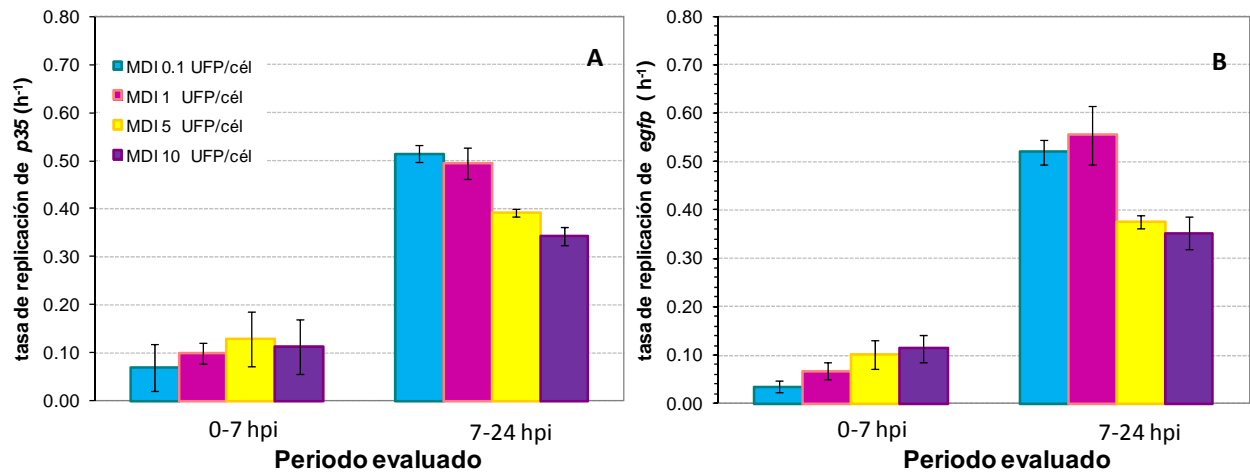


Figura 31. Tasas de replicación de los genes *p35* (A) y *egfp* (B) para cultivos infectados a diferentes MDI de BacGFP-Rep52. Dichas tasas de replicación se calcularon para la fracción de pellet en los períodos de 0-7 hpi y de 7-24 hpi. Las barras indican la desviación estándar de mediciones realizadas por triplicado en dos cultivos independientes.

8.4 Evaluación de la replicación de genomas de VAA en presencia de Rep78.

Durante la producción de vVAA en células de insecto se obtiene un alto porcentaje de cápsides que no contienen DNA [95]. Esto sugiere dos escenarios: 1) la producción de cápsides de VAA supera a la producción de genomas disponibles de empaquetarse, ó 2) el empaquetamiento de los genomas es una etapa limitante durante la producción del vector. En esta etapa del estudio se continuó con la caracterización cinética del proceso de replicación del DNA de VAA, ahora en presencia de la proteína Rep78, a fin de identificar limitaciones relacionadas a este proceso durante el ensamblaje del vector.

Como se mencionó en la sección 0 el proceso de replicación de los genomas de VAA requiere de las proteínas Rep78 y/o Rep68. Durante la replicación del DNA viral en ausencia de estas proteínas los gVAA se replican integrados a las moléculas de DNA del baculovirus (tal como se demostró en la sección 8.3). Rep78/Rep68 inducen el rescate de estos genomas mediante cortes específicos en los *trs* de las ITRs. El rescate de los gVAA permite que su replicación se lleve a cabo de forma independiente a la de los genomas de baculovirus. La longitud del gVAA es de 2.65 Kpb, mientras que la del gBac es de 134 Kpb, por lo que se esperaría que los gVAA se replicaran a una tasa mayor debido a su longitud menor. No obstante, la afinidad de la maquinaria celular y viral por el reconocimiento de secuencias contenidas en el DNA de uno u otro virus puede resultar un factor importante durante el proceso de replicación, de modo que no resulta sencillo predecir el perfil de replicación de ambos genomas durante la replicación *in vivo*. Es por ello, que la caracterización cinética de este proceso resultó esencial para obtener información sobre la producción de gVAA en células de insecto.

Rep78, además de efectuar el rescate de los gVAA a partir del DNA del baculovirus, resuelve las formas replicativas de los gVAA para dar lugar a la producción de genomas monoméricos disponibles para el empaquetamiento en cápsides. Con base en esto, es posible inferir que cambios en la concentración de esta proteína pueden afectar el proceso de rescate y/o resolución de de formas replicativas de los gVAA. Es por ello que en este estudio se evaluó el efecto de la concentración de Rep78 sobre la replicación de los gVAA, su rescate a partir del DNA de baculovirus y la resolución de formas replicativas. Los resultados obtenidos en este estudio se presentan a continuación, así como en el artículo "*Adeno-associated viral vector genomes replication during baculovirus infection limits DNA-containing capsid production in insect cells*". Gallo-Ramírez L.E., Ramírez O.T. and Palomares L.A, mismo que se incluye en los Apéndices de esta tesis.

8.4.1 Cinéticas de infección de células H5 utilizando los baculovirus BacGFP y BacRep78.

Se infectaron cultivos de células H5 a diferentes multiplicidades de infección de BacGFP y/o BacRep78 (ver tabla 9). Los perfiles de crecimiento y viabilidad celular a lo largo del tiempo de cultivo se muestran en la figura 32. Al igual que durante la infección con BacGFP-Rep52 (ver sección 8.3.3), los cultivos no infectados presentaron la mayor concentración y viabilidad celular a lo largo del cultivo. Durante la infección, la viabilidad celular fue más alta infectando sólo con BacGFP, mientras que al co-infectar la viabilidad celular disminuyó más rápidamente al aumentar la MDI de BacRep78. Hasta las 72 hpi, la viabilidad celular decayó más rápidamente infectando sólo con BacRep78 en comparación con las co-infecciones utilizando 1 UFP/cél de BacRep78. Estos resultados concuerdan con reportes previos que indican que la infección con BacGFP ayuda a mantener una viabilidad mayor en los cultivos que al infectar con otros baculovirus [94], aunque se desconoce el mecanismo que favorece este efecto.

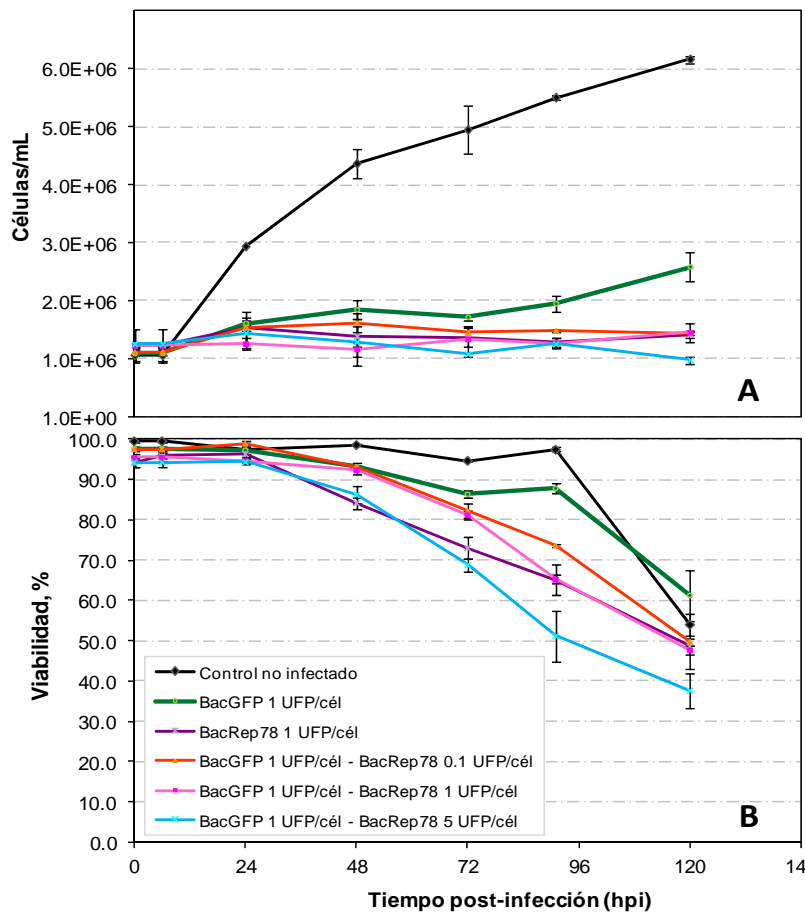


Figura 32. Evolución de la concentración (a) y viabilidad (b) celular de cultivos de células H5 infectados con BacGFP y/o BacRep78. Las barras representan el error entre mediciones por triplicado realizadas en 2 cultivos independientes.

También se evaluó la producción de DNA total en los cultivos (figura 33). Los rendimientos de DNA total/ 10^6 cél de los cultivos control y los cultivos infectados fueron mayores a los observados previamente (ver sección 8.3.3). No obstante, nuevamente el contenido de DNA total fue mayor en los cultivos infectados como consecuencia de la replicación de DNA viral. A partir de estos extractos de DNA total se llevó a cabo la cuantificación de los gBac y los gVAA, pero primero fue necesario desarrollar nuevas curvas de cuantificación estándar para qPCR, tal como se muestra en la siguiente sección.

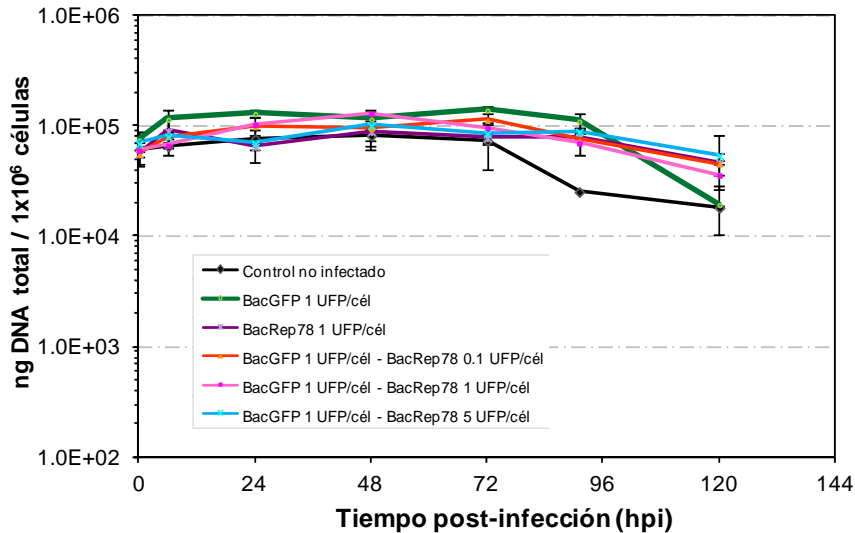


Figura 33. Rendimientos de recuperación de DNA en cultivos infectados con BacGFP y/o BacRep78. La extracción se llevó a cabo a partir de 0.75×10^6 cél. Las barras representan el error entre mediciones por triplicado realizadas en 2 cultivos independientes.

8.4.2 Desarrollo de curvas de cuantificación absoluta para qPCR utilizando el MX3005P.

Las curvas de cuantificación para las cinéticas de infección con BacGFP y/o BacRep78 se desarrollaron tal como se describe en la sección 7.5.3 utilizando el termocilador MX3005P (Agilent Technologies). En la figura 34 se muestra la curva obtenida para la cuantificación absoluta del gen de *rep* con sus respectivos parámetros, el perfil de cuantificación y la curva de disociación.

Los parámetros de eficiencia (m) y linealidad (r^2) de las curvas obtenidas para los tres genes evaluados estuvieron dentro del rango aceptable. Dichos parámetros, así como los valores de C_q de los NEG y los NTC se presentan en la tabla 14. Para todas las curvas se encontró que el intervalo confiable de cuantificación fue de 10^2 - 10^8 copias del gen/rx. Por lo que las muestras problema se diluyeron para que el número de copias de DNA viral estuviera comprendido en este mismo intervalo.

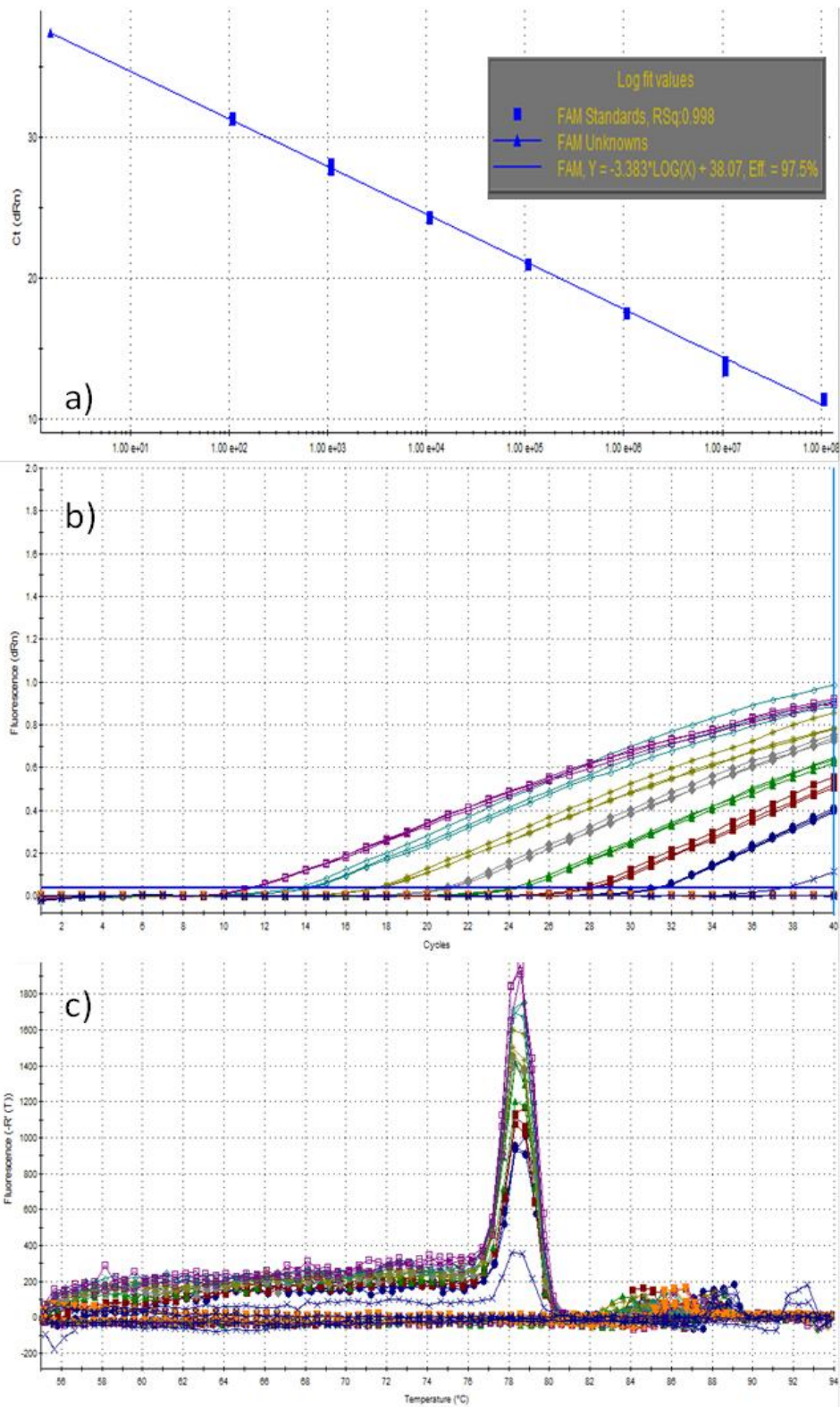


Figura 34. a) Curva estándar de cuantificación absoluta para el gen *rep* utilizando el termociclador MX3005P, b) Perfil de amplificación de estándares utilizados en la obtención de la curva de cuantificación del gen *rep*, c) Curva de disociación obtenida con los estándares y oligonucleótidos usados para la cuantificación del gen *rep*. Ct: C_q .

Tabla 15. Parámetros de validación de la curva estándar de qPCR realizada con el MX3005P.

Gen	Rango dinámico (copias/rx)	Eficiencia (%)	m	b	r ²	C _q del NTC	C _q del NEG (Pellet)	C _q del NEG (Sob.)
<i>p35</i>	1.24x10 ² -10 ⁸	97.5	-3.383	35.71	0.998	35.05	27.29	32.28
<i>egfp</i>	1.13 x 10 ² -10 ⁸	97.8	-3.376	38.66	0.999	37.27	26.43	29.0
<i>Rep</i>	1.08 x 10 ² -10 ⁸	97.5	-3.383	36.73	0.996	37.85	27.30	34.31

C_q: ciclo de cuantificación. NTC: Control sin templado. NEG: Control negativo de amplificación. Sob: Sobrenadante.

8.4.3 Replicación de DNA viral en presencia de Rep78.

Nuevamente se utilizó el gen *p35* de AcMNPV para determinar el número de genomas de baculovirus, el de *egfp* para el número de gVAA, y adicionalmente se utilizó el gen *rep* para cuantificar el número de genomas de baculovirus correspondientes exclusivamente a BacRep78. Los perfiles de replicación de DNA viral se muestran en la figura 35. Los perfiles de replicación de la fracción de pellet presentaron el mismo perfil que los observados durante la infección individual con BacGFP-Rep52 (figura 30). Es de notar que a las MDI de 1 y 5 UFP/cél de BacRep78 la concentración de gBac se incrementó hasta en un orden de magnitud en el período de 0-6 hpi. La concentración máxima, $9.09 \pm 2.57 \times 10^{10}$ copias gBac/10⁶cél, se alcanzó a las 24 hpi y se mantuvo prácticamente constante hasta las 91 hpi. En esta misma fracción, la concentración de gVAA fue la misma para todos los cultivos de las 0 a las 6 hpi coincidiendo con el hecho de que todos fueron infectados a la misma MDI de BacGFP. La concentración máxima de gVAA en el cultivo infectado sólo con BacGFP fue de $5.04 \pm 0.83 \times 10^{10}$ copias gVAA/10⁶cél, mientras que al co-infectar con BacRep-78 se incrementó hasta $5.47 \pm 1.10 \times 10^{11}$ gVAA/10⁶cél. Considerando que se han reportado rendimientos de cápsides en células de insecto de hasta 7×10^{11} cápsides/10⁶ cél [95], se puede inferir que la producción de gVAA sí puede constituir una limitante para la producción de vectores. La concentración máxima de gVAA en cultivos co-infectados con BacRep78 a 0.1 UFP/cél se alcanzó a las 72 hpi mientras que a MDI de 1 y 5 UFP/cél se alcanzó a las 24 hpi. La relación inicial (0 hpi) entre gVAA y UFP del virus añadido al cultivo fue de 8.6 ± 1.8 gVAA/UFP, similar a la previamente obtenida para el baculovirus BacGFP-Rep52 (sección 8.3.4) y otros stocks virales [110]. Para el baculovirus BacGFP, la relación gBac/gVAA a las 0 hpi fue 1.35 ± 0.53 , misma que se mantuvo

constante a lo largo del cultivo. Con esto se confirma que tampoco no existe pérdida de gVAA en ausencia de Rep78 en los stocks virales de segundo pase de BacGFP.

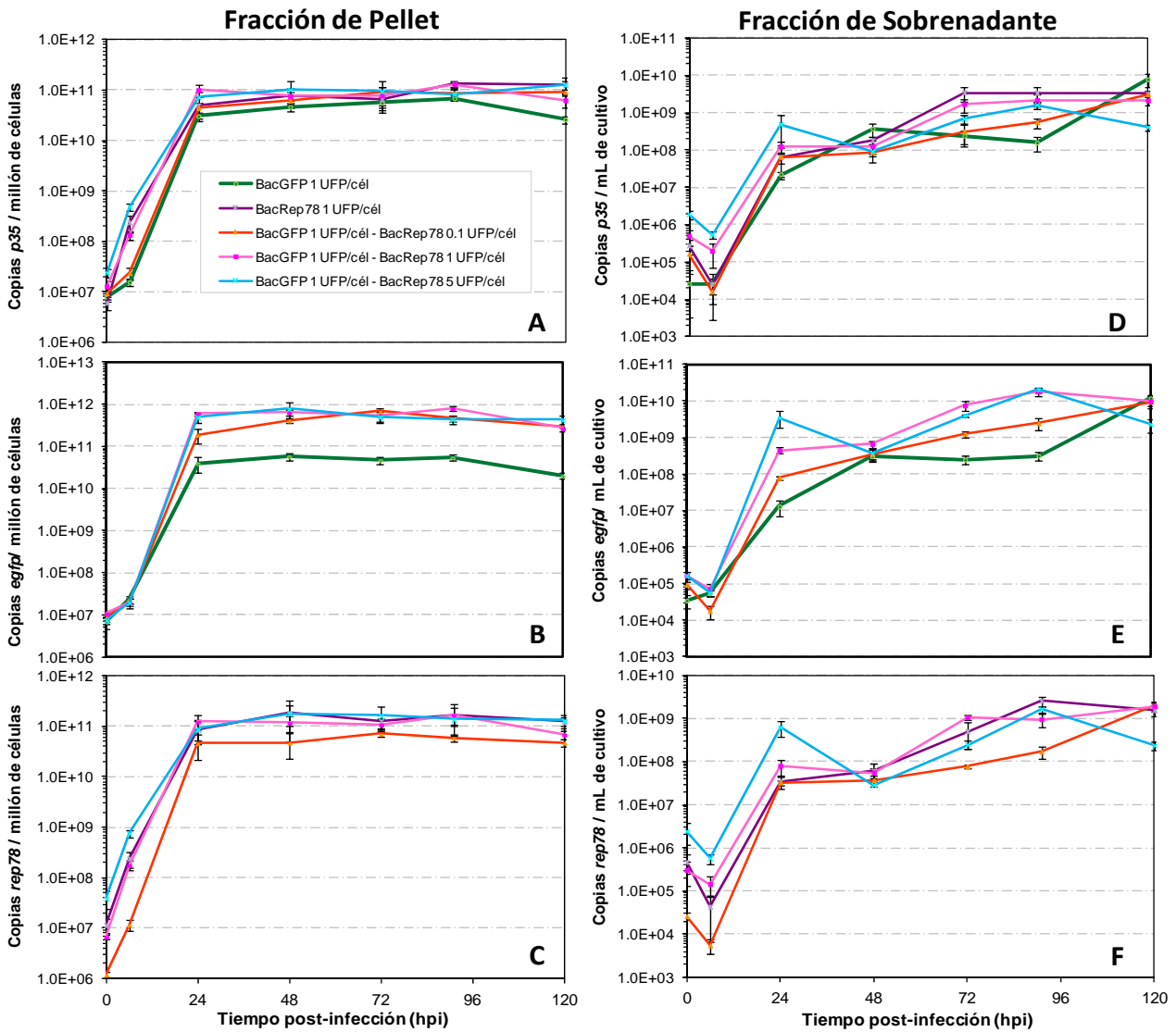


Figura 35. Cuantificación de gBac (*p35*), gVAA (*egfp*) y genomas de BacRep78 (*rep78*) en las fracciones de pellet (A, B y C, respectivamente) y sobrenadante (D, E y F, respectivamente) de cultivos infectados con BacGFP y/o BacRep78. Las barras indican la desviación estándar de mediciones realizadas por triplicado en dos cultivos independientes.

La concentración inicial (0 hpi) del gen *rep78* en pellet fue proporcional a la MDI de BacRep78, tal como se observó durante la infección individual con BacGFP-Rep52 (tabla 13), y se incrementó en 1Log para todas las MDI en el período de las 0 a 6 hpi. Esto parece indicar que la expresión de Rep78 promueve la replicación de gBac. La concentración máxima de copias del gen *rep78* fue de $5.62 \pm 1.73 \times 10^{10}$

copias/ 10^6 cél a 0.1 UFP/cél y $1.40 \pm 0.55 \times 10^{11}$ copias/ 10^6 cél para 1 y 5 UFP/cél de BacRep78. Para este baculovirus, la relación inicial (0 hpi) entre copias de *rep78* y UFP del virus añadido al cultivo fue de 9.6 ± 2.4 copias *rep78*/UFP, también similar a las previamente obtenidas en éste y otros trabajos [110].

La liberación de baculovirus a sobrenadante siguió el comportamiento previamente observado para el baculovirus BacGFP-Rep52 (sección 8.3.4), aunque la concentración máxima alcanzada tras 91 hpi fue 1 orden de magnitud menor. La concentración máxima de gBac en la fracción de sobrenadante fue 10 veces menor a la de pellet, mientras que la de copias de *rep78* fue hasta 100 veces menor. No se encontró explicación para esta disminución en la liberación específica de BacRep78 al medio de cultivo pues la producción de gBac en pellet con este baculovirus se dio a los mismos niveles que con BacGFP. De las 0 a las 6 hpi la concentración genomas de BacRep78 (*p35* y *rep78*) disminuyó casi en un orden de magnitud. Sin embargo, esta disminución no explica el incremento en la concentración de DNA viral en la fracción de pellet en este mismo período.

Por otra parte, se calcularon las tasas de replicación de los tres genes evaluados (figura 36). De las 0 a las 6 hpi, la μ_{egfp} fue igual para todos los cultivos (figura 36). La μ_{p35} y μ_{egfp} de los cultivos infectados sólo con BacGFP fueron iguales que al infectar sólo con BacGFP-Rep52 (sección 8.3.4). En los cultivos infectados sólo con BacRep78, la tasa de replicación del gen *rep78* (μ_{rep78}) fue igual a la μ_{p35} , indicando una replicación conjunta de ambos genes. Sin embargo, ésta última fue 6 veces mayor a la de cultivos infectados sólo con BacGFP, indicando que BacRep78 se replica más rápido que BacGFP, posiblemente debido a la presencia de Rep78. En este mismo período, co-infectando a 0.1 UFP/cél de BacRep78, la μ_{p35} fue igual que en el cultivo infectado sólo con BacGFP, pero casi 4 veces menor a la μ_{rep78} . Para todos los cultivos infectados a 1 ó 5 UFP/cél de BacRep78, la μ_{rep78} fue 30% más alta que a la MDI de 0.1 UFP/cél de BacRep78. Para estos mismos cultivos, la μ_{rep78} fue $25-35\%$ mayor que la μ_{p35} . Por otra parte, la μ_{egfp} fue prácticamente la misma para todos los cultivos. En cultivos co-infectados, μ_{p35} representa la tasa de replicación promedio de BacGFP y BacRep78. Por tanto, μ_{p35} es menor que μ_{rep78} en cultivos co-infectados debido a que el baculovirus BacGFP se replica a una tasa menor. Esto puede explicarse debido a que a las MDI utilizadas la infección es asincrónica [82], de modo que hay células infectadas sólo por uno de los baculovirus. La replicación del DNA viral (ya sea gBac o gVAA) se ve favorecida en presencia de Rep78, de modo que la tasa de replicación en las células infectadas sólo con BacGFP es menor que en aquéllas infectadas sólo con BacRep78 o co-infectadas con ambos baculovirus.

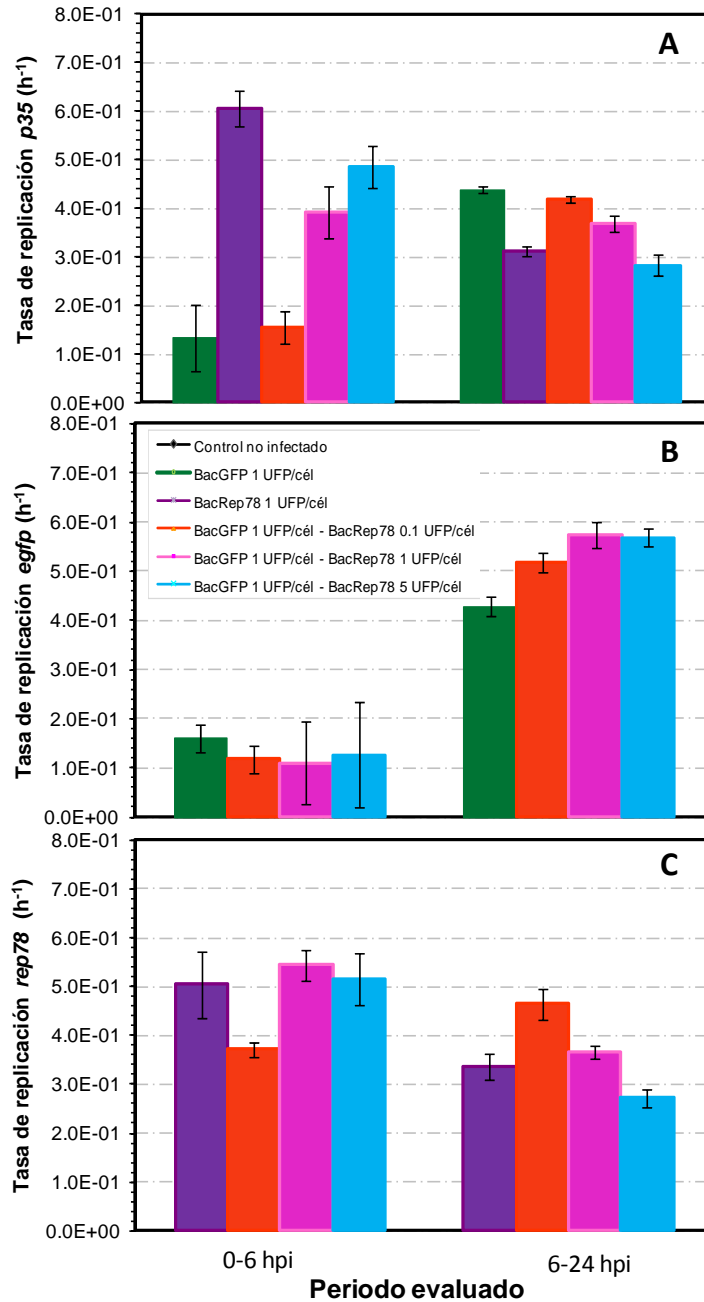


Figura 36. Tasas de replicación de los genes *p35* (A), *egfp* (B) y *rep78* (C) para la fracción de pellet de cultivos infectados con BacGFP y/o BacRep78 calculadas en los períodos de 0-6 hpi y de 6-24 hpi. Las barras indican la desviación estándar de mediciones realizadas por triplicado en dos cultivos independientes.

Para el período de las 6 a las 24 hpi, μ_{p35} y μ_{egfp} fueron iguales en los cultivos infectados sólo con BacGFP, indicando nuevamente la replicación conjunta de ambos genomas virales. En los cultivos infectados sólo con BacRep78, μ_{p35} y μ_{rep78} fueron iguales, aunque 25% menores a la μ_{p35} de los cultivos infectados sólo

con BacGFP. En cultivos co-infectados, para cada MDI utilizada, la μ_{p35} y μ_{rep78} fueron iguales. A 0.1 UFP/cél de BacRep78 la μ_{p35} fue igual que al infectar sólo con BacGFP. En comparación con estos cultivos, la μ_{p35} disminuyó 20% y 30% al co-infectar a 1 ó 5 UFP/cél, respectivamente. La μ_{p35} de los cultivos co-infectados a 5 UFP/cél fue igual que al infectar sólo con BacRep78. En los cultivos infectados sólo con BacGFP o co-infectados con 0.1 UFP/cél de BacRep78, de las 6 a las 24 hpi, la μ_{p35} fue aproximadamente 0.4 h^{-1} mientras que para los otros cultivos fue menor. Esto puede deberse a que, dado que la μ_{p35} fue mayor de las 0 a las 6 hpi, la replicación del DNA cesó en un período de tiempo menor al considerado en este estudio. Rosinski et al. (2002) [111] reportaron que independientemente de la MDI, la tasa de replicación viral máxima era de 0.4 h^{-1} . También reportaron una reducción en el tiempo que se alcanzó la concentración máxima al incrementar la MDI, por lo que es posible que la concentración máxima de gBac y *rep78* también se haya alcanzado en un tiempo menor en los cultivos infectados a $\text{MDI} \geq 1$ UFP/cél. Por otra parte, la μ_{egfp} fue mayor en los cultivos co-infectados con BacRep78. En comparación con el cultivo no infectado, la μ_{egfp} se incrementó 25% al co-infectar con 0.1 UFP/cél de BacRep78 y 35% al co-infectar con 1 y 5 UFP/cél.

La expresión de Rep78 no incrementó la concentración final de copias del gen *rep78*, pero sí aumentó su tasa de replicación. Esto indica que la concentración final de DNA en la célula está limitada por sustratos o por la maquinaria celular, lo cual implica una limitación intrínseca del sistema para la producción de gVAA. No se indagó en el mecanismo por el cual Rep78 promueve la replicación del DNA de baculovirus. Se sabe que esta proteína puede afectar la replicación de Adenovirus [112] o Herpesvirus [113] mediante interacción directa con su DNA. Por tanto, es posible que también interactúe de forma directa con los gBac. Rep78 también interactúa con proteínas virales y celulares que promueven la replicación y la transcripción [39, 61-62, 108], incluyendo las DBP de Adenovirus y Herpesvirus [62]. En el estudio de distribución intracelular (sección 8.2) se determinó que Rep78 se distribuye principalmente en la zona del estroma virogénico [107], esto podría implicar que Rep78 interactúa con proteínas que forman el andamiaje de replicación del DNA de baculovirus, lo que pudiera explicar un incremento en la replicación. No obstante, se requerirá de más estudios para determinar el mecanismo mediante el cual Rep78 promueve la replicación de los gBac.

8.4.4 Evaluación del rescate de genomas de VAA en presencia de Rep78 y resolución de formas replicativas.

El rescate de los gVAA a partir del DNA del baculovirus es indispensable para su replicación independiente, mientras que la resolución de las formas replicativas de los gVAA es esencial para la obtención de genomas monoméricos que pueden empaquetarse en las cápsides virales. Por tanto, se evaluó el efecto de la MDI de BacRep78 sobre el rescate de los gVAA y la resolución de las formas replicativas a lo largo del cultivo. El análisis se llevó a cabo mediante Southern blot utilizando una sonda de DNA específica para el gen *egfp*, tal como se describe en la sección 7.5.4.

En la figura 37 se muestra el patrón de bandeo de los extractos de DNA total de la fracción de pellet de cultivos infectados. Mediante tinción con bromuro de etidio se observaron bandas de la longitud de los genomas monoméricos (2.65 Kpb) y diméricos (5.3 Kpb) de VAA en los cultivos co-infectados con BacGFP y BacRep78, pero no en las infecciones individuales con estos baculovirus. La hibridación de estas bandas con la sonda de DNA corroboró la identidad de los genomas monoméricos y diméricos. No hubo reconocimiento inespecífico de la sonda en la muestra del control negativo. Se consideró que la señal de radioactividad observada a la misma "latitud" de la membrana que la obtenida en extractos de los cultivos infectados sólo con BacGFP corresponde a los gVAA unidos al DNA de baculovirus, incluso en los extractos de DNA provenientes de cultivos co-infectados. El barrido en el carril del control positivo indica degradación.

El análisis densitométrico de estas películas se sintetiza en la figura 38. A las 24 hpi, tiempo en que se alcanzó la concentración máxima de gVAA, entre el 60 y 70% de los gVAA no se encuentran unidos al DNA de baculovirus y cerca del 50% corresponden a gVAA monoméricos. Los genomas no unidos a baculovirus constituyen la suma de los gVAA monoméricos y diméricos observados por Southern blot. La fracción de gVAA no unidos a baculovirus como en los gVAA monomérico disminuyó al transcurrir el tiempo de cultivo. Esta disminución fue más dramática cuando la MDI de BacRep78 fue de 0.1 UFP/cél, presentándose de las 24 a las 48 hpi una reducción del 20 y 25% para gVAA no unidos a baculovirus y gVAA monoméricos, respectivamente. Para los cultivos co-infectados a 1 y 5 UFP/cél de BacRep78 la fracción de gVAA disminuyó entre el 20 y 30%, respectivamente, en el período de las 48 a 91 hpi. Cabe resaltar que al producir vVAA en células de insecto la concentración máxima de cápsides virales se

alcanza en este mismo período, por lo que la disminución de los gVAA monoméricos afectará negativamente el empaquetamiento.

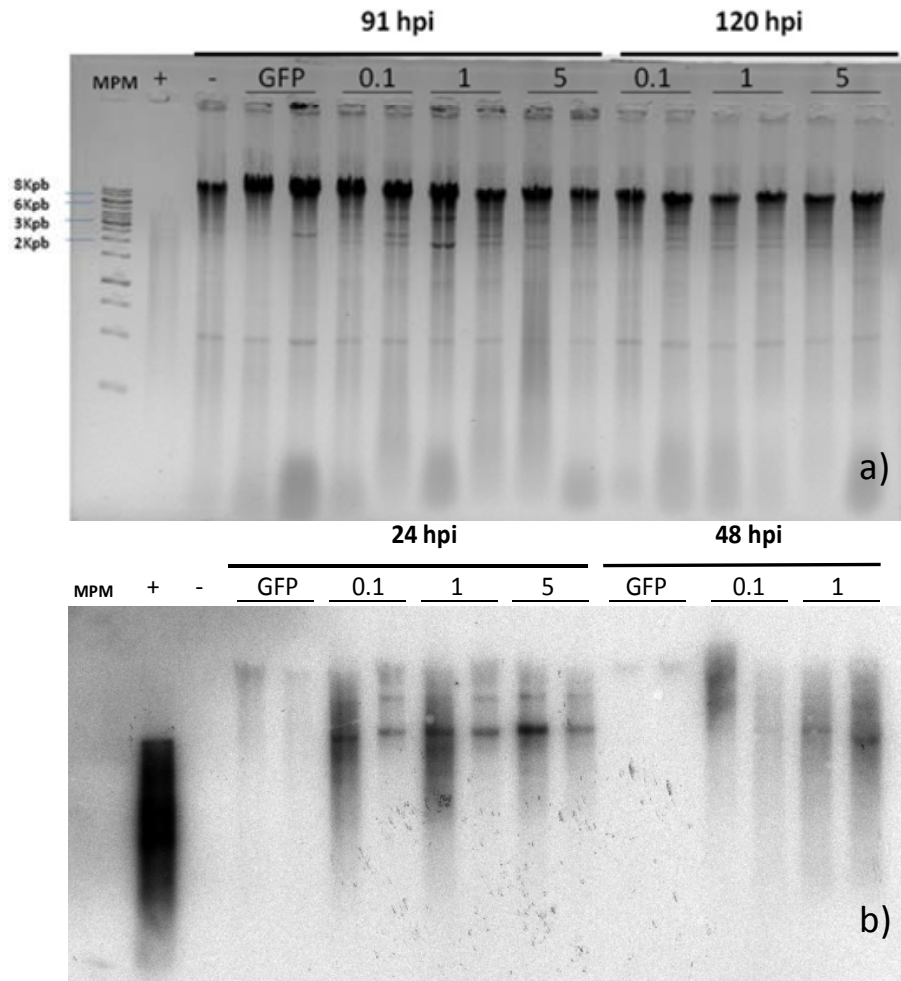


Figura 37. Análisis de rescate de gVAA a partir de DNA de baculovirus y resolución de formas replicativas. a) Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. b) Southern blot utilizando una sonda específica para el gen de *egfp* marcada radioactivamente. MPM: marcador de peso molecular (Gene Ruler™ 1 Kb ladder), +: gVAA en forma monomérica escindido de pFBGR mediante enzimas de restricción (control positivo), -: DNA de células infectadas con BacRep78 (control negativo), GFP: DNA de células infectadas sólo con BacGFP. 0.1, 1 y 5 indican la MDI de BacRep78 en cultivos co-infectados con 1 UFP/cél de BacGFP.

La relación inversa entre la degradación de gVAA monoméricos y la MDI de BacRep78 sugiere un efecto protector de la proteína Rep78 hacia los genomas virales. Previamente se observó que la presencia de los gVAA tuvo un efecto protector sobre Rep78 disminuyendo su degradación (sección 8.2) [107]. Entonces, es posible que a consecuencia de su interacción ambos componentes resulten protegidos.

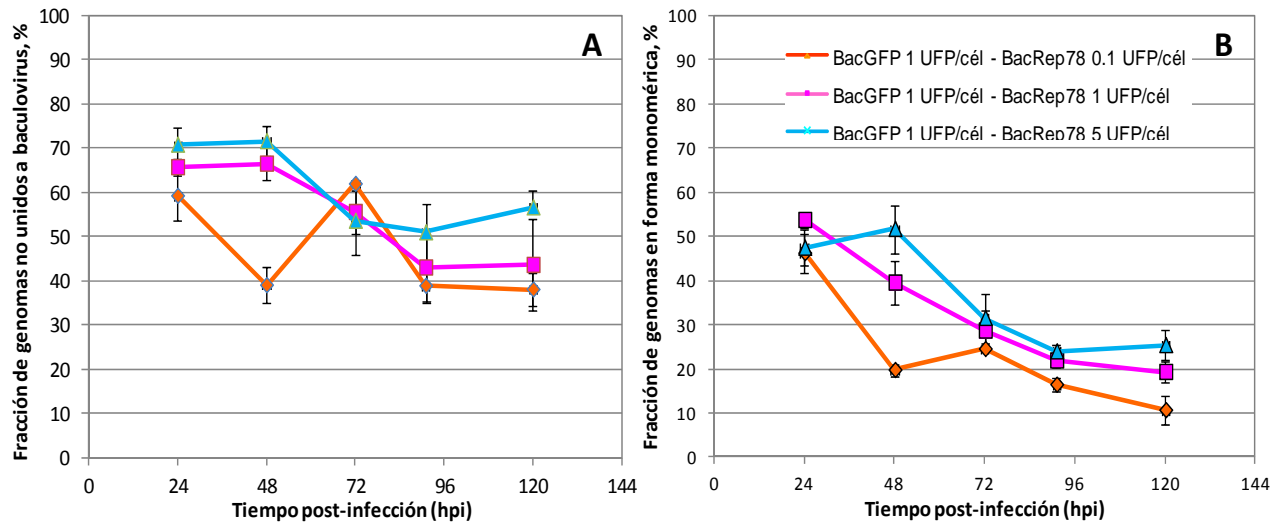


Figura 38. Rescate de gVAA y resolución de formas replicativas en cultivos co-infectados con BacGFP y BacRep78. Las barras indican el error de mediciones realizadas en dos cultivos independientes.

Adicionalmente, se determinó la expresión de relativa de Rep78 en los diferentes cultivos a fin de evaluar el efecto de su concentración sobre el rescate, resolución y protección de los gVAA. Los resultados se presentan en la figura 39. La concentración más alta se alcanzó a las 24 hpi en el cultivo infectado sólo con BacRep78, misma que decayó considerablemente a las 48 hpi y dejó de ser detectable después de este tiempo. Estos resultados coinciden con los observados previamente mediante microscopía de fluorescencia al expresar sólo Rep78 (sección 8.2) [107].

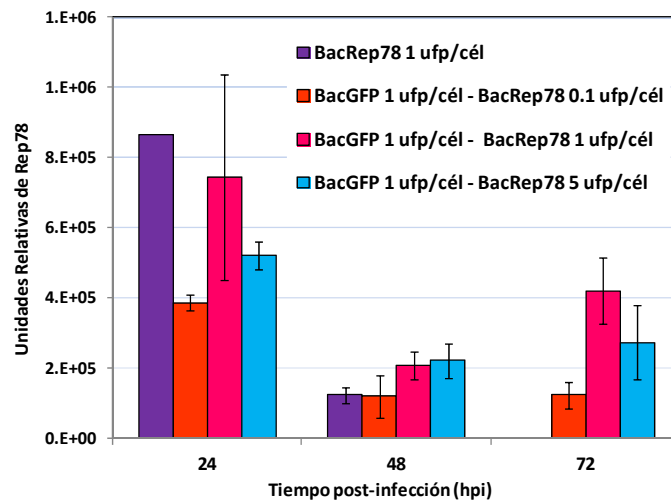


Figura 39. Concentración relativa de Rep78 en cultivos co-infectados con BacGFP y BacRep78. Las barras indican el error de mediciones realizadas en dos cultivos independientes.

La concentración relativa de Rep78 también disminuyó de manera importante (casi 4 veces) de las 24 a las 48 hpi y se mantuvo prácticamente constante hasta las 72 hpi, después de este tiempo la proteína no fue detectable en ningún cultivo. La concentración de Rep78 del cultivo co-infectado a 0.1 UFP/cél siempre fue menor a la de los otros cultivos co-infectados, aunque no se observó diferencia significativa en las condiciones de 1 y 5 UFP/cél de BacRep78.

En conjunto, estos resultados indican un efecto de protección mutua entre los gVAA y Rep78, y sugieren que es posible disminuir la degradación de los gVAA monoméricos manteniendo los niveles de proteína Rep78.

8.5 Análisis de empaquetamiento de gVAA en presencia de Rep78 y Rep52.

Tras la replicación del DNA viral, los gVAA se empaquetan en las cápsides previamente ensambladas. Durante este proceso Rep78 parece actuar como puente de unión formando complejos con el DNA y las cápsides virales [48-49]. Por su parte, Rep52 es la responsable de llevar a cabo el empaquetamiento del genoma a la vez que provoca el desenrollamiento de la doble cadena de DNA mediante su actividad helicasa [60]. En este estudio se evaluó también el efecto de la concentración de Rep52 sobre la eficiencia de empaquetamiento de gVAA en cultivos co-infectados con los baculovirus BacCap, BacGFP, BacRep78 y BacRep52. Las condiciones de infección utilizadas en este experimento se describen en la tabla 9.

Los resultados obtenidos en este estudio se presentan a continuación, así como en el artículo *“Adeno-associated viral vector genomes replication during baculovirus infection limits DNA-containing capsid production in insect cells”*. Gallo-Ramírez L.E., Ramírez O.T. and Palomares L.A, mismo que se incluye en los Apéndices de esta tesis.

8.5.1 Cinéticas de infección cuádruple utilizando los baculovirus BacCap, BacGFP, BacRep78 y BacRep52.

Se infectaron cultivos de células H5 con los cuatro baculovirus recombinantes tal como se describe en la tabla 9. Los perfiles de crecimiento y viabilidad celular se muestran en la figura 40. El crecimiento y la viabilidad celular en los cultivos no infectados evolucionó tal como ocurrió durante las infecciones individuales con BacGFP-Rep52 (figura 28) y en co-infecciones con BacGFP y BacRep78 (figura 32). Los cultivos infectados dejaron de crecer tras la adición del virus y la viabilidad celular disminuyó de la misma forma en todos los cultivos.

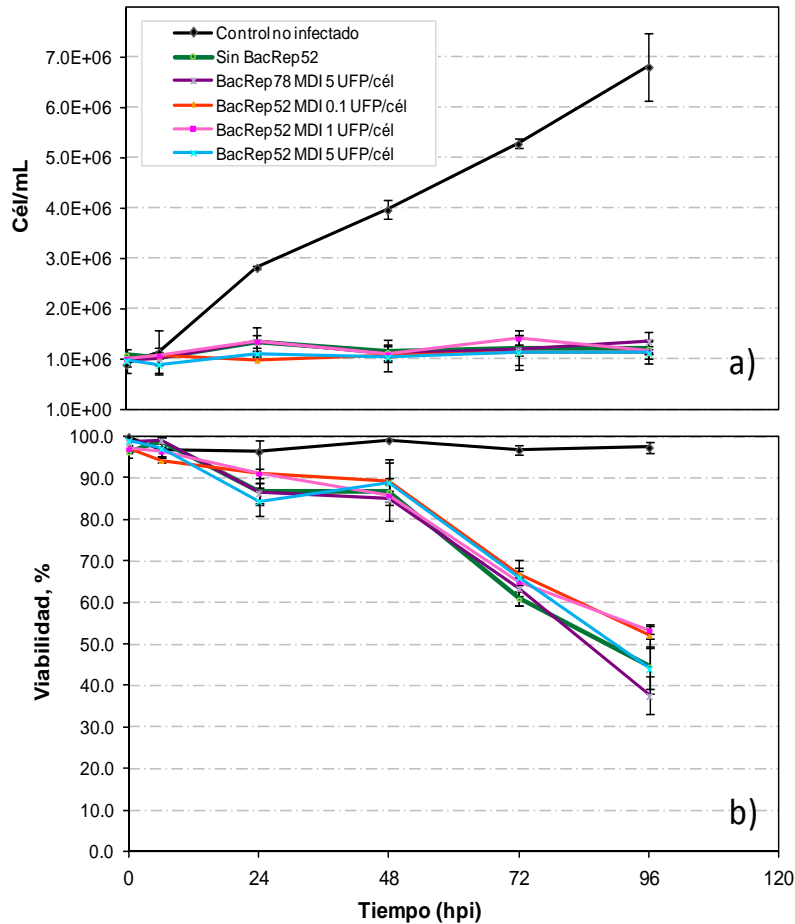


Figura 40. Evolución de la concentración (a) y viabilidad (b) celular de cultivos de células H5 co-infectados con BacCap, BacGFP, BacRep78 y BacRep52. Las barras indican la desviación estándar de mediciones realizadas por triplicado en dos cultivos independientes. La MDI de cada uno de los baculovirus utilizados es 1 UFP/cél, excepto para el baculovirus señalado en la leyenda.

8.5.2 Cinéticas de producción de DNA viral en cultivos infectados utilizando los baculovirus BacCap, BacGFP, BacRep78 y BacRep52.

A fin de evaluar la concentración de gVAA producidos durante la infección cuádruple, se llevó a cabo un análisis de qPCR de las fracciones de pellet de estos cultivos. Los perfiles de replicación del DNA viral (gBac y gVAA) se presentan en la figura 41. La concentración de ambos genomas virales evolucionó de la misma forma que en los cultivos co-infectados con BacGFP y BacRep78 (figura 35). Para todos los cultivos, la concentración máxima de gBac fue de aproximadamente 2×10^{11} gBac / 10^6 cél, misma que se mantuvo casi constante a lo largo del tiempo. La concentración de gBac se incrementó 1 Log en el período de las 0 a las 6 hpi, mientras que no se observó incremento significativo en los gVAA en este mismo período.

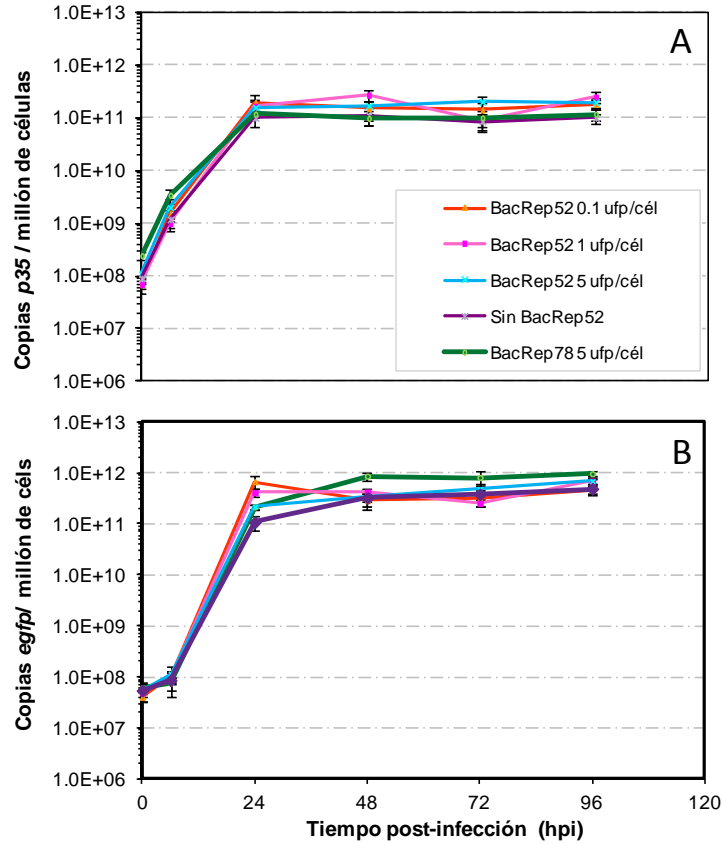


Figura 41. Cuantificación de gBac (*p35*) y gVAA (*egfp*) en la fracción de pellet de cultivos co-infectados con BacGFP, BacCap, BacRep78 y BacRep52. Las barras indican la desviación estándar de mediciones realizadas por triplicado en dos cultivos independientes. La MDI de cada uno de los baculovirus utilizados es 1 UFP/cél, excepto para el baculovirus señalado en la leyenda.

La concentración máxima de gVAA fue de $6-7 \times 10^{11}$ gVAA/ 10^6 cél para todos los cultivos, excepto al infectar con 5 UFP/cél de BacRep78 que fue cercana a 1×10^{12} gVAA/ 10^6 cél. Este cultivo es el que en teoría expresaría más Rep78, por tanto tiene sentido esperar concentraciones de gVAA mayores. Cabe destacar la concentración inicial de gVAA en estos cultivos fue entre 3 y 6 veces mayor a la de los cultivos infectados sólo con BacGFP y BacRep, no obstante, la concentración máxima fue prácticamente igual en ambos experimentos.

También se determinaron las tasas de replicación para ambos genes (figura 42). De las 0 a las 6 hpi, la μ_{egfp} fue igual a la de cultivos co-infectados sólo con BacGFP y BacRep78, no obstante, de las 6 a las 24 hpi disminuyó en un 20% con respecto a estos mismos cultivos (figura 36). De las 0 a las 6 hpi, la μ_{p35} también fue similar a la observada para estos cultivos, no obstante, en el período de las 6 a las 24 hpi

fue más baja indicando que la saturación del sistema de replicación se llevó a cabo a tiempos aún más tempranos que en los cultivos de doble infección.

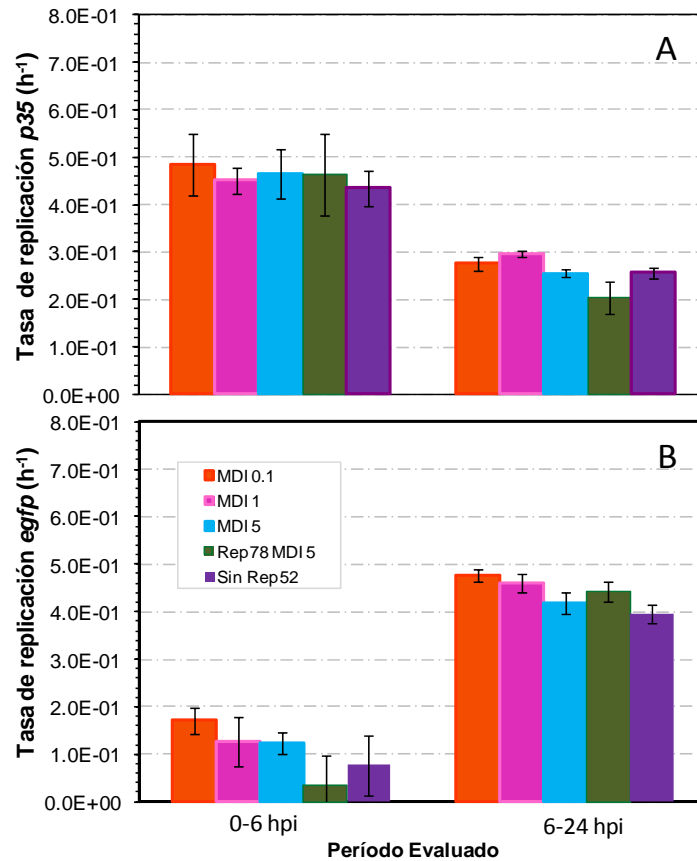


Figura 42. Tasas de replicación de los genes *p35* (A) y *egfp* (B) para la fracción de pellet de cultivos infectados con BacGFP, BacCap, BacRep78 y BacRep52, calculadas en los períodos de 0-6 hpi y de 6-24 hpi. Las barras indican la desviación estándar de mediciones realizadas por triplicado en dos cultivos independientes. La MDI de cada uno de los baculovirus no indicados en la leyenda es 1 UFP/cél. Las MDI 0.1, 1 y 5 se refieren a BacRep52.

El incremento en el número de baculovirus infectantes, y por tanto de gBac, propició un aumento en la μ_{p35} a tiempos tempranos del cultivo, pero no así para μ_{egfp} . Por otra parte, propició una saturación más temprana del sistema de replicación. Al parecer, en el período de 6 a las 24 hpi, la μ_{p35} fue igual a la de cultivos co-infectados con 1 y 5 UFP/cél de BacGFP y BacRep78, respectivamente. No obstante, en este mismo período, la μ_{egfp} disminuyó un 30% respecto a los mismos cultivos. Esto indica que existe una competencia directa entre los gBac y gVAA durante la replicación y que un aumento en la proporción de gBac con respecto a los gVAA (como en una infección cuádruple) afecta negativamente la tasa de

replicación de los gVAA. Por tanto, deberán diseñarse estrategias de infección o diseño de nuevos baculovirus para disminuir la relación gBac/gVAA.

8.5.3 Evaluación del rescate de genomas de VAA y resolución de formas replicativas en cultivos con infección cuádruple con los baculovirus BacCap, BacGFP, BacRep78 y BacRep52.

Durante la evaluación de las formas replicativas del gVAA se obtuvieron los mayores porcentajes de gVAA monomérico, de 40 y 55%, en los cultivos infectados con BacRep78 MDI 5 UFP/cél y sin infectar con BacRep52, respectivamente (figura 43). Estos valores se mantuvieron casi constantes hasta las 96 hpi, a diferencia de lo previamente observado en cultivos coinfectados con BacRep78 y BacGFP donde el contenido de gVAA monoméricos decayó al aumentar el tiempo de infección. No se observó correlación entre la MDI de BacRep52 y el porcentaje de rescate de gVAA.

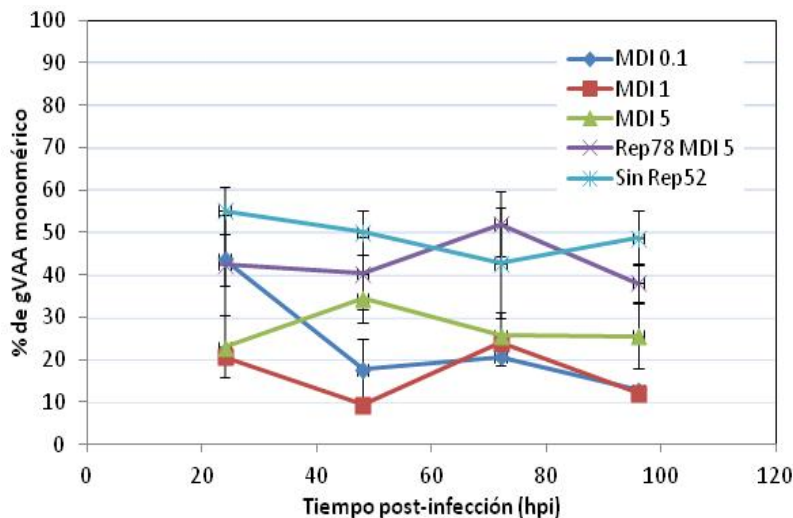


Figura 43. Rescate de gVAA en cultivos co-infectados con BacGFP, BacCap, BacRep78 y BacRep52. Las barras indican el error de mediciones realizadas en dos cultivos independientes. La MDI de cada uno de los baculovirus no indicados en la leyenda es 1 UFP/cél. Las MDI 0.1, 1 y 5 se refieren a BacRep52.

También se evaluó la expresión de proteínas Rep en los cultivos. Se observó que ambas proteínas Rep fueron detectables en todos los cultivos hasta las 96 hpi (figura 44). La concentración máxima de Rep78 se alcanzó a las 48 hpi en el cultivo infectado con BacRep78 a MDI 5 UFP/cél. Después de este tiempo de infección, la concentración decayó a los valores observados a las 24 hpi. En los cultivos co-infectados

con BacRep52 a MDI 0.1 UFP/cél se observó un incremento en la concentración de Rep78 con el tiempo de cultivo, mientras que a MDI 1 UFP/cél la concentración se mantuvo casi constante a partir de las 48 hpi. En los cultivos co-infectados con BacRep52 a MDI de 5 UFP/cél la concentración bajó casi 4 veces después de las 48 hpi. En los cultivos no infectados con BacRep52 se observó un aumento casi lineal en la concentración de Rep78 entre las 24 y las 72 hpi. Resulta evidente que el comportamiento de la concentración de Rep78 fue muy variable pese a que la MDI de BacRep78 se mantuvo constante en 4 de las 5 condiciones evaluadas. Es posible que estas variaciones tengan relación con la carga metabólica impuesta por los otros 3 baculovirus añadidos al cultivo y a la competencia por la replicación de los diferentes genomas virales y la expresión de sus proteínas recombinantes.

Con respecto a la concentración relativa de Rep52 también se observó gran variabilidad en el comportamiento de los cultivos (figura 44). La concentración máxima de Rep52 se obtuvo en la misma condición y tiempo que la concentración máxima de Rep78, en los cultivos infectados a MDI 5 UFP/cél de BacRep78 a las 48 hpi. La detección de Rep52 en el cultivo donde no se infectó con BacRep52 puede deberse a la expresión de esta proteína mediante el casete de expresión de Rep78, tal como se observó previamente [93]. En los cultivos no infectados con BacRep52 se esperaba una concentración menor a la obtenida en los cultivos donde sí se infectó con dicho baculovirus, no obstante, los niveles de expresión fueron mayores en algunos tiempos de infección. Estos niveles inesperados de Rep52 podrían también estar relacionados con un efecto de degradación de la proteína Rep78. Dado que en el extremo carboxilo de Rep78 está contenida toda la secuencia de aminoácidos de Rep52, ambas proteínas son reconocidas con la misma afinidad por el anticuerpo monoclonal utilizado en este estudio. Es por ello que algunos productos de degradación de Rep78 podrían ser reconocidos como proteína Rep52 al poseer un peso molecular similar al de esta proteína y la secuencia de reconocimiento del anticuerpo.

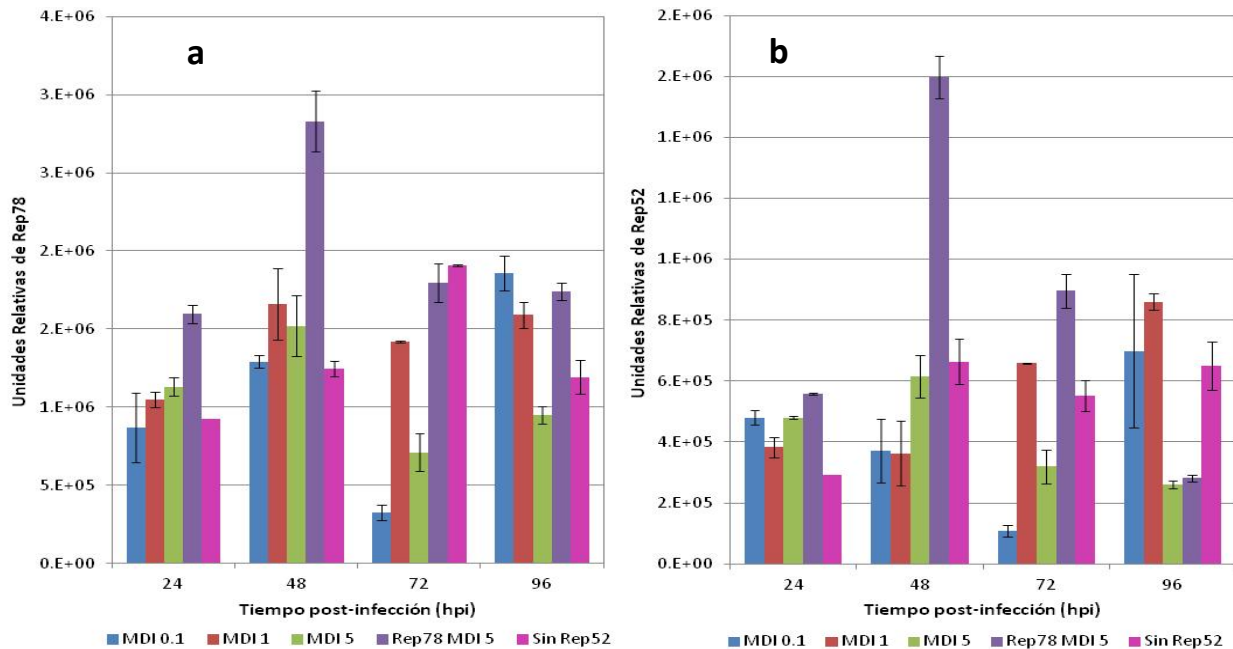


Figura 44. Concentración relativa de Rep78 (a) y Rep52 (b) en cultivos co-infectados con BacGFP, BacCap, BacRep78 y BacRep52. Todos los cultivos fueron desarrollados por duplicado. La MDI indica las UFP/cél de BacRep52 con que se infectaron los cultivos. Rep78 MDI 5 indica infección con 5 UFP/cél de BacRep78. Sin Rep52 indica que los cultivos no fueron infectados con BacRep52.

8.5.4 Eficiencia de empaquetamiento.

Al evaluar la eficiencia de empaquetamiento en cápsidas purificadas mediante gradientes de iodixanol se obtuvieron rendimientos hasta 3 órdenes de magnitud menores a los reportados previamente [91, 94] (figura 45), y también 3 órdenes de magnitud por debajo de la concentración de gVAA alcanzada en los diferentes cultivos desarrollados en este trabajo. El mayor rendimiento se observó a las 96 hpi en el cultivo infectado a 1 UFP/cél de BacRep52 donde, coincidentemente, se observó la mayor concentración relativa de Rep52 en este tiempo de infección. La expresión de Rep52 en los cultivos no infectados con BacRep52 (figura 44) explica la presencia de cápsidas con DNA empaquetado en esta condición de cultivo. Cabe mencionar que la concentración de gVAA empaquetados en extractos de cultivos sin purificar coincide con la de los cultivos purificados mediante gradientes de iodixanol. Estos datos descartan que los bajos rendimientos observados sean consecuencia de pérdida de cápsidas durante la formación del gradiente de iodixanol.

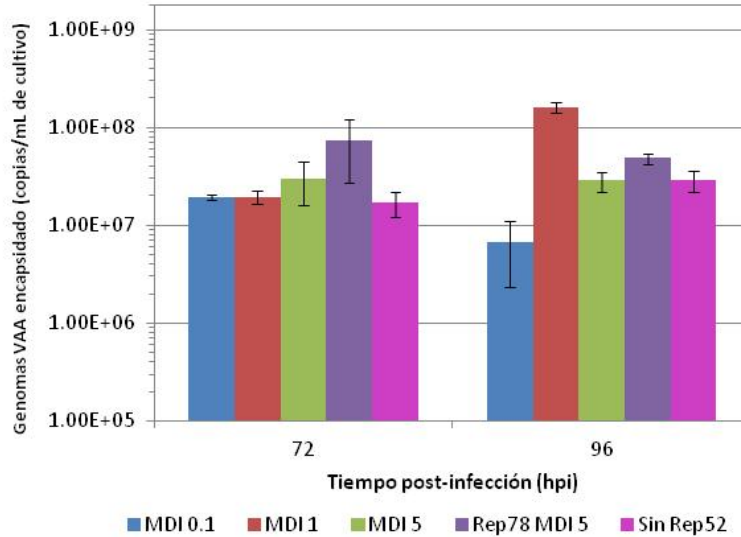


Figura 45. Cuantificación de genomas empaquetados a partir de muestras purificadas mediante gradientes de iodixanol. La MDI indica las UFP/cél de BacRep52 con que se infectaron los cultivos. Rep78 MDI 5 indica infección con 5 UFP/cél de BacRep78. Sin Rep52 indica que los cultivos no fueron infectados con BacRep52.

Además de la concentración de proteína Rep52 y de gVAA en forma monomérica, otro factor que puede afectar los rendimientos de empaquetamiento es la concentración de cápsides. Éstas se cuantificaron utilizando un kit comercial basado en un ensayo de ELISA (Progen Biotechnik GMBH) (ver figura 46). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 47.

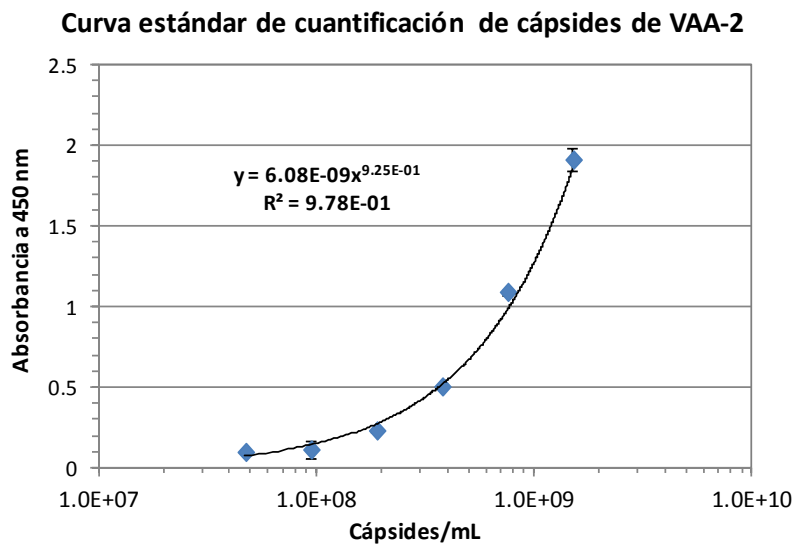


Figura 46. Curva estándar de cuantificación de cápsides de VAA-2 obtenida utilizando el Kit de ELISA comercial de Progen Biotechnik GMBH.

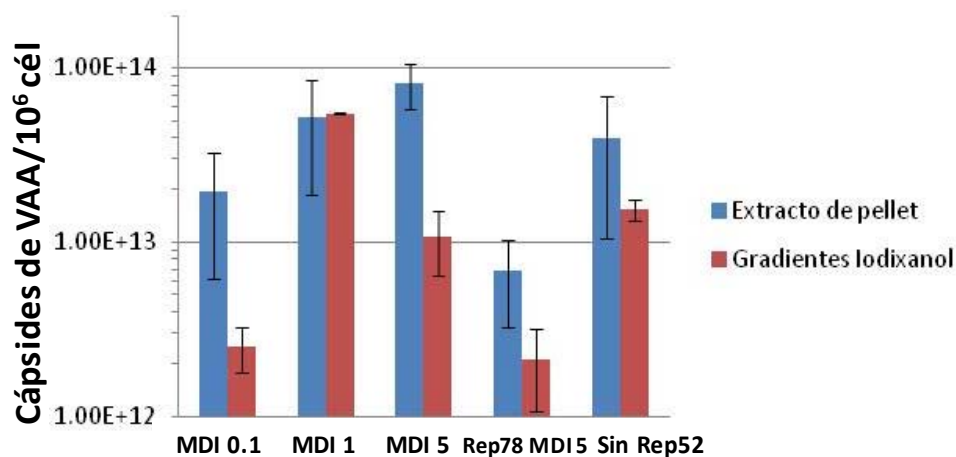


Figura 47. Cuantificación de cápsides obtenidas en la fracción de pellet tras 96 hpi. La MDI indica las UFP/cél de BacRep52 con que se infectaron los cultivos. Rep78 MDI 5 indica infección con 5 UFP/cél de BacRep78. Sin Rep52 indica que los cultivos no fueron infectados con BacRep52.

Como se puede observar, los rendimientos de cápsides son incluso más altos que los reportados previamente en el sistema de células de insecto [94-95], por lo que la disponibilidad de cápsides no pudo ser una limitante para el empaquetamiento. Es posible que las condiciones de infección utilizadas no hayan sido las más favorables para la interacción de todos los componentes y el subsecuente ensamblaje del vector. Se ha reportado que utilizando $MDI \geq 5$ UFP/cél de un baculovirus cerca del 95% de la población celular se encuentra infectada poco tiempo después de añadir el virus [81-82], y que conforme disminuye la MDI utilizada también disminuye el porcentaje de células infectadas con el baculovirus. Durante este estudio se utilizaron $MDI \leq 5$ UFP/cél de los distintos baculovirus, lo cual implica que el porcentaje de infección inicial en la población, para cada uno de los baculovirus, fue baja. Es posible que una célula se re-infecte con nuevos baculovirus en tiempos posteriores de cultivo con la progenie viral liberada por otras células. No obstante, los nuevos virus que entran a la célula deben lograr replicar su DNA para asegurar la expresión de sus genes. Si la re-infección con nuevos baculovirus ocurre cerca del final de la etapa tardía de infección la relación entre el número de copias de genomas de los diferentes baculovirus puede ser muy variable, dando como consecuencia diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes recombinantes de cada baculovirus. Con base en esto, es posible sugerir que la estrategia de infección cuádruple a bajas MDI disminuyó las posibilidades de que una misma célula se infectara por los diferentes baculovirus usados para la expresión de VAA (BacCap, BacGFP, BacRep78 y BacRep52). Reduciendo también la posibilidad de ensamblar partículas de VAA con DNA y por lo tanto no representa una estrategia de infección adecuada.

9. Conclusiones.

Los baculovirus recombinantes construidos en este trabajo permitieron manipular de forma individual la expresión de las proteínas Rep78 y Rep52 para el desarrollo de los estudios de replicación y empaquetamiento de DNA.

El estudio de la distribución de los componentes de VAA al interior de la célula reveló que las proteínas de VAA se distribuyen e interactúan de forma similar a lo observado en células de mamífero pese a la compartimentalización nuclear generada por la infección con baculovirus. A partir de los cambios de distribución y estabilidad de la proteína Rep78 en presencia de los gVAA y las cápsides virales se determinó que la interacción de estos componentes no está limitada por dicha compartimentalización nuclear. Con esta información se determinó que la localización intracelular de los componentes de VAA no representa una limitación para la producción de vectores de VAA en células de insecto y que las limitaciones podría ser causa de otros factores tales como la estequiometría de los componentes o limitaciones propias de la maquinaria celular.

A diferencia de los estudios sobre producción de VAA en células de mamífero, en este estudio no fue posible identificar mediante microscopía electrónica los sitios de ensamblaje de las cápsides virales. No obstante, se determinó por primera vez, que las partículas virales se acumulan en vesículas nucleares en etapas tardías de infección, tal como ocurre con los cuerpos de oclusión de baculovirus. Esta información resulta relevante para la mejora o implementación de protocolos de recuperación de partículas.

A partir del estudio de cuantificación de DNA viral en ausencia de Rep78 se concluyó que no existe pérdida espontánea significativa de los gVAA en stocks P2 de los baculovirus BacGFP y BacGFP-Rep52 durante la replicación de baculovirus en células H5. Esto indica que es posible manejar stocks de baculovirus que porten el genoma recombinante de VAA con mayor número de pase sin que represente un problema de estabilidad o escalamiento del proceso de infección.

A partir del estudio de cuantificación de DNA viral en presencia de Rep78 se determinó que con la construcción actual del genoma recombinante de VAA, se alcanza una concentración máxima de gVAA que resulta independiente de la concentración de Rep78. Dicha concentración de gVAA sí podría constituir una limitante durante la producción de vectores, pues la concentración de genomas libres en forma monomérica es del mismo orden de magnitud que la concentración de cápsides obtenida usualmente en este sistema. Por lo tanto, la manipulación de la MDI de BacRep78 no representa una alternativa viable para incrementar la producción de genomas, y resulta entonces necesario implementar modificaciones en las construcciones de los baculovirus para favorecer la replicación de DNA de VAA sobre la del DNA de baculovirus.

La concentración de Rep78 sí tiene efecto sobre la eficiencia de rescate de los gVAA y su resolución a la forma replicativa monomérica. Además, muestra un efecto de protección sobre la degradación de los gVAA. Pese a que el aumento en la concentración de Rep78 no produce un efecto directo sobre la concentración de gVAA sí influye en la forma monomérica en que éstos se presentan, así como en su disponibilidad en tiempos tardíos de infección cuando ocurre el empaquetamiento. Por este motivo, resulta necesario destacar la importancia de obtener altas concentraciones de proteína Rep78 desde tiempos tempranos de infección, cuando ocurre la replicación del DNA viral, y mantenerlas a tiempos tardíos de infección a fin de evitar la degradación de los gVAA monoméricos. De ahí que el diseño de nuevos baculovirus para la expresión de esta proteína deba contemplar estos aspectos a fin de incrementar la producción y estabilidad de los gVAA.

Es posible que la sola modificación de los baculovirus recombinantes no sea suficiente para incrementar los rendimientos de VAA a concentraciones no limitantes. Es por ello que se propone implementar estrategias de alimentación o formulación de medio de cultivo encaminadas a incrementar el contenido de precursores involucrados en las vías de síntesis de DNA y disminuir las limitaciones de la maquinaria celular en estas vías.

La estrategia de infección cuádruple a bajas MDI no resulta útil para evaluar el efecto de la concentración de las proteínas Rep78 y Rep52 en el empaquetamiento de genomas virales. No obstante, fue posible determinar que la producción de vVAA utilizando 4 baculovirus puede resultar afectada de manera importante al emplear bajas MDI. Adicionalmente, mediante este estudio se observó que la producción de cápsides de VAA en células H5 supera por un orden de magnitud a los rendimientos reportados en células Sf9. Lo que implicaría un mayor potencial para incrementar los rendimientos de cápsides de VAA en el SCI-BV si se incrementa la producción de gVAA.

10. Productos Generados.

10.1 Artículos Arbitrados.

Gallo-Ramírez, L.E., O.T. Ramírez, and L.A. Palomares, *Intracellular localization of adeno-associated viral proteins expressed in insect cells*. *Biotechnol Prog*, 2011. **27**(2): p. 483-93.

Gallo-Ramírez, L.E., O.T. Ramírez, and L.A. Palomares, *Adeno-associated viral vector genomes replication during baculovirus infection limits DNA-containing capsid production in insect cells*. En preparación, 2012.

10.2 Presentaciones en Congresos Nacionales e Internacionales.

1. Gallo-Ramírez, L.E., O.T. Ramírez y L.A. Palomares. Presentación Oral. "Cuantificación de ADN viral en infecciones de células de insecto para la producción de vectores de virus adeno-asociado tipo 2". XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco, Guerrero. 2009.

2. Gallo-Ramírez, L.E., O.T. Ramírez y L.A. Palomares. Presentación en Poster. "Intracellular localization of adeno-associated viral proteins expressed in insect cells". Cell Culture Engineering XII. Banff, Canadá. 2010.

3. Gallo-Ramírez, L.E., O.T. Ramírez y L.A. Palomares. Presentación en Poster. "AAV recombinant genome replication in insect cells during baculovirus infection". EMBO Advanced Symposium of Viral Vectors in Gene Therapy. Kuopio, Finlandia. 2010.

4. Gallo-Ramírez, L.E., O.T. Ramírez y L.A. Palomares. Presentación Oral. "Producción de virus adeno-asociado en células de insecto". XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Juriquilla, Querétaro. 2011.

5. Gallo-Ramírez L.E. Ponencia. "El sistema de células de insecto-baculovirus como plataforma de producción de vectores de Virus Adeno-asociado para terapia génica". V Espacio de Innovación Biotecnológica. Universidad Autónoma de Querétaro. 2012.

6. Gallo-Ramírez L.E. O.T. Ramírez y L.A. Palomares *. Diseño de estrategias para la producción de vectores de virus adenoasociado en células de insecto. V Simposio Latinoamericano de Tecnología de Cultivos Celulares. Santa Fe, Argentina. 2012.

11. Bibliografía.

1. *Gene Therapy Trials Worldwide*. June 2011 [cited 2011; Available from: <http://www.abedia.com/wiley/index.html>].
2. *Cancer Therapy China*. 2011; Available from: http://www.cancertherapychina.com/index.php?option=com_content&view=article&id=84&Itemid=23.
3. Flemming, A., *Regulatory watch: Pioneering gene therapy on brink of approval*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(9): p. 664.
4. Merten, O.W., C. Geny-Fiamma, and A.M. Douar, *Current issues in adeno-associated viral vector production*. *Gene Ther*, 2005. **12 Suppl 1**: p. S51-61.
5. Patil, S.D., D.G. Rhodes, and D.J. Burgess, *DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review*. *Aaps Journal*, 2005. **7**(1): p. E61-E77.
6. Zaiss, A.K. and D.A. Muruve, *Immune responses to adeno-associated virus vectors*. *Curr Gene Ther*, 2005. **5**(3): p. 323-31.
7. Mandel, R.J., et al., *Recombinant adeno-associated viral vectors as therapeutic agents to treat neurological disorders*. *Mol Ther*, 2006. **13**(3): p. 463-83.
8. Duan, D., et al., *Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue*. *J Virol*, 1998. **72**(11): p. 8568-77.
9. Grimm, D. and M.A. Kay, *From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy*. *Current Gene Therapy*, 2003. **3**(4): p. 281-304.
10. Daya, S. and K.I. Berns, *Gene therapy using adeno-associated virus vectors*. *Clin Microbiol Rev*, 2008. **21**(4): p. 583-93.
11. Wang, Z., et al., *Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart*. *Nature Biotechnology*, 2005. **23**(3): p. 321-328.
12. Qing, K., et al., *Role of tyrosine phosphorylation of a cellular protein in adeno-associated virus 2-mediated transgene expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(20): p. 10879-84.
13. Fisher, K.J., et al., *Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis*. *J Virol*, 1996. **70**(1): p. 520-32.
14. Ferrari, F.K., et al., *Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors*. *J Virol*, 1996. **70**(5): p. 3227-34.
15. Qing, K., et al., *Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular FKBP52 protein in transgene expression*. *J Virol*, 2001. **75**(19): p. 8968-76.
16. Chirmule, N., et al., *Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans*. *Gene Ther*, 1999. **6**(9): p. 1574-83.
17. Berns, K.I., *Parvoviridae*, in *Fields Virology*, D.M.H. Knipe, Peter M., Editor. 2007, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.
18. Kotin, R.M., et al., *Site-specific integration by adeno-associated virus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(6): p. 2211-5.
19. Xie, Q., et al., *The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(16): p. 10405-10.
20. O'Donnell, J., K.A. Taylor, and M.S. Chapman, *Adeno-associated virus-2 and its primary cellular receptor--Cryo-EM structure of a heparin complex*. *Virology*, 2009. **385**(2): p. 434-43.

21. Timpe, J., et al., *Mechanisms of adeno-associated virus genome encapsidation*. *Curr Gene Ther*, 2005. **5**(3): p. 273-84.
22. Chiorini, J.A., et al., *The roles of AAV Rep proteins in gene expression and targeted integration*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996. **218**: p. 25-33.
23. Chiorini, J.A., et al., *Biologically active Rep proteins of adeno-associated virus type 2 produced as fusion proteins in Escherichia coli*. *J Virol*, 1994. **68**(2): p. 797-804.
24. Chiorini, J.A., et al., *Sequence requirements for stable binding and function of Rep68 on the adeno-associated virus type 2 inverted terminal repeats*. *J Virol*, 1994. **68**(11): p. 7448-57.
25. Chiorini, J.A., et al., *Determination of adeno-associated virus Rep68 and Rep78 binding sites by random sequence oligonucleotide selection*. *J Virol*, 1995. **69**(11): p. 7334-8.
26. Brister, J.R. and N. Muzyczka, *Rep-mediated nicking of the adeno-associated virus origin requires two biochemical activities, DNA helicase activity and transesterification*. *J Virol*, 1999. **73**(11): p. 9325-36.
27. Hong, G., P. Ward, and K.I. Berns, *In vitro replication of adeno-associated virus DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(10): p. 4673-7.
28. Ward, P., et al., *Adeno-associated virus DNA replication in vitro: activation by a maltose binding protein/Rep 68 fusion protein*. *J Virol*, 1994. **68**(9): p. 6029-37.
29. Burgess A., R.D.R., Perez Z.N., Kotin R.M. and Dyda F., *The nuclease domain of adeno-associated virus Rep coordinates replication initiation using two distinct DNA recognition interfaces*. *Molecular Cell.*, 2004. **13**: p. 403 - 414.
30. Goncalves, M.A., *Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector*. *Virol J*, 2005. **2**: p. 43.
31. Rose, J.A., et al., *Structural proteins of adenovirus-associated viruses*. *J Virol*, 1971. **8**(5): p. 766-70.
32. Murray, S., et al., *Characterization of the capsid protein glycosylation of adeno-associated virus type 2 by high-resolution mass spectrometry*. *J Virol*, 2006. **80**(12): p. 6171-6.
33. Trempe J. P. and Carter B. J., *Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein*. *Journal of Virology.*, 1988. **62**(9): p. 3356.
34. Laughlin, C.A., H. Westphal, and B.J. Carter, *Spliced adenovirus-associated virus RNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(11): p. 5567-71.
35. Sonntag, F., K. Schmidt, and J.A. Kleinschmidt, *A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(22): p. 10220-5.
36. Steinbach, S., et al., *Assembly of adeno-associated virus type 2 capsids in vitro*. *J Gen Virol*, 1997. **78 (Pt 6)**: p. 1453-62.
37. Hunter L. A. and Samulski R. J., *Colocalization of adeno-associated virus Rep and Cap proteins in the nuclei of infected cells*. *Journal of Virology.*, 1992. **66**(1): p. 317-324.
38. Wistuba A., K.A., Weger S., Grimm D. and Kleinschmidt J. A., *Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly*. *Journal of Virology.*, 1997. **71**(2): p. 1341-1352.
39. Bevington, J.M., et al., *Adeno-associated virus interactions with B23/Nucleophosmin: identification of sub-nucleolar virion regions*. *Virology*, 2007. **357**(1): p. 102-13.
40. Qiu, J. and K.E. Brown, *A 110-kDa nuclear shuttle protein, nucleolin, specifically binds to adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid*. *Virology*, 1999. **257**(2): p. 373-82.
41. Warrington K. H., G.O.S., Harrison J. K., Opie S. R., Zolotukhin S. and Muzyczka N., *Adeno-associated virus type 2 VP2 capsid protein is nonessential and can tolerate large peptide insertions at its N terminus*. *Journal of Virology.*, 2004. **78**(12): p. 6595.
42. Ruffing M., Z.H.a.K.J.A., *Assembly of virus-like particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells*. *Journal of Virology.*, 1992. **66**(12): p. 6922-6930.

43. Hoque, M., et al., *Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation*. J Virol, 1999. **73**(9): p. 7912-5.
44. Girod A., W.C.E., Zádori Z., Ried M., Leike K., Tijssen P., Kleinschmidt J.A. and Hallek M., *The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity*. Journal of General Virology., 2002. **83**: p. 973-978.
45. Urabe, M., C. Ding, and R.M. Kotin, *Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(16): p. 1935-43.
46. Gallo-Ramírez, L.E., *Estudio de la producción de vectores de virus adeno-asociado tipo 2 en el sistema de células de insecto-baculovirus*, in *Molecular Medicine and Bioprocess*. 2007, UNAM: Cuernavaca, Morelos.
47. Redemann B. E., M.E.a.C.B.J., *Adeno-associated virus Rep protein synthesis during productive infection*. Journal of Virology., 1989. **63**(2): p. 873-882.
48. Wistuba A., W.S., Kern A. and Kleinschmidt J. A., *Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins*. Journal of Virology., 1995. **69**(9): p. 5311-5319.
49. Dubielzig R., K.J.A., Weger S., Kern A. and Kleinschmidt J.A., *Adeno-associated virus type 2 protein interactions: formation of pre-encapsidation complexes*. Journal of Virology., 1999. **73**(11): p. 8989.
50. Wu, J., M.D. Davis, and R.A. Owens, *Factors affecting the terminal resolution site endonuclease, helicase, and ATPase activities of adeno-associated virus type 2 Rep proteins*. J Virol, 1999. **73**(10): p. 8235-44.
51. Smith, R.H. and R.M. Kotin, *The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 4874-81.
52. Collaco, R.F., et al., *A biochemical characterization of the adeno-associated virus Rep40 helicase*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(36): p. 34011-7.
53. Owens, R.A., et al., *Identification of a DNA-binding domain in the amino terminus of adeno-associated virus Rep proteins*. J Virol, 1993. **67**(2): p. 997-1005.
54. Smith, R.H. and R.M. Kotin, *An adeno-associated virus (AAV) initiator protein, Rep78, catalyzes the cleavage and ligation of single-stranded AAV ori DNA*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3122-9.
55. Smith, R.H., A.J. Spano, and R.M. Kotin, *The Rep78 gene product of adeno-associated virus (AAV) self-associates to form a hexameric complex in the presence of AAV ori sequences*. J Virol, 1997. **71**(6): p. 4461-71.
56. Li, Z., et al., *Characterization of the adenoassociated virus Rep protein complex formed on the viral origin of DNA replication*. Virology, 2003. **313**(2): p. 364-76.
57. Dignam, S.S., et al., *Coupled ATP and DNA binding of adeno-associated virus Rep40 helicase*. Biochemistry, 2007. **46**(2): p. 568-76.
58. Ni, T.H., et al., *In vitro replication of adeno-associated virus DNA*. J Virol, 1994. **68**(2): p. 1128-38.
59. Tratschin, J.D., I.L. Miller, and B.J. Carter, *Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function*. J Virol, 1984. **51**(3): p. 611-9.
60. King, J.A., et al., *DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids*. EMBO J, 2001. **20**(12): p. 3282-91.
61. Ward, P., et al., *Role of the adenovirus DNA-binding protein in in vitro adeno-associated virus DNA replication*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 420-7.
62. Stracker, T.H., et al., *The Rep protein of adeno-associated virus type 2 interacts with single-stranded DNA-binding proteins that enhance viral replication*. J Virol, 2004. **78**(1): p. 441-53.

63. Bleker, S., F. Sonntag, and J.A. Kleinschmidt, *Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity*. J Virol, 2005. **79**(4): p. 2528-40.
64. Bleker, S., M. Pawlita, and J.A. Kleinschmidt, *Impact of capsid conformation and Rep-capsid interactions on adeno-associated virus type 2 genome packaging*. J Virol, 2006. **80**(2): p. 810-20.
65. Dong, J.Y., P.D. Fan, and R.A. Frizzell, *Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus*. Hum Gene Ther, 1996. **7**(17): p. 2101-12.
66. Aucoin, M.G., J.A. Mena, and A.A. Kamen, *Bioprocessing of baculovirus vectors: a review*. Curr Gene Ther, 2010. **10**(3): p. 174-86.
67. Palomares L. A. , E.-M.S., Ramírez O.T., *Principles and applications of the insect-cell-baculovirus expresion vector system.*, in *Cell culture technology for pharmaceutical and cellular applications.*, H.W.S. Ozturk S., Editor. 2005, CRC Press: New York. p. 627-692.
68. Ikonomou, L., et al., *Supernatant proteolytic activities of High-Five insect cells grown in serum-free culture*. Biotechnology Letters, 2002. **24**(12): p. 965-969.
69. Rohrmann, G.F., *The AcMNPV genome: Gene content, conservation and function*, in *Baculovirus Molecular Biology*. 2011, National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD).
70. Rohrmann, G.F., *Introduction to the baculoviruses, their taxonomy, and evolution*, in *Baculovirus Molecular Biology*. 2011, National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD).
71. Friesen, P.D., *Insect Viruses*, in *Fields Virology*, D.M.H. Knipe, Peter M., Editor. 2007, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 707-736.
72. *Baculovirus biopesticides*. 2011 [cited 2008; Available from: <http://web.aibn.uq.edu.au/cssb/Projects/Baculo.html>].
73. Rohrmann, G.F., *The baculovirus replication cycle: Effects on cells and insects*, in *Baculovirus Molecular Biology*. 2011, National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD).
74. Nagamine, T., Y. Kawasaki, and S. Matsumoto, *Induction of a subnuclear structure by the simultaneous expression of baculovirus proteins, IE1, LEF3, and P143 in the presence of hr*. Virology, 2006. **352**(2): p. 400-7.
75. Rohrmann, G.F., *Early events in infection: Virus transcription*, in *Baculovirus Molecular Biology*. 2011, National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD).
76. Rohrmann, G.F., *DNA replication and genome processing*, in *Baculovirus Molecular Biology*. 2011, National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD).
77. Nagamine, T., et al., *Nuclear marginalization of host cell chromatin associated with expansion of two discrete virus-induced subnuclear compartments during baculovirus infection*. J Virol, 2008. **82**(13): p. 6409-18.
78. Kawasaki, Y., S. Matsumoto, and T. Nagamine, *Analysis of baculovirus IE1 in living cells: dynamics and spatial relationships to viral structural proteins*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 12): p. 3575-83.
79. Williams G.V., F.P., *Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection*, in *The Baculoviruses*, L.K. Miller, Editor. 1997, Plenum: New York. p. 61-107.
80. Rohrmann, G.F., *Baculovirus late transcription*, in *aculovirus Molecular Biology*. 2011, National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD).
81. Palomares, L.A., S. Lopez, and O.T. Ramirez, *Strategies for manipulating the relative concentration of recombinant rotavirus structural proteins during simultaneous production by insect cells*. Biotechnol Bioeng, 2002. **78**(6): p. 635-44.
82. Mena, J.A., O.T. Ramirez, and L.A. Palomares, *Population kinetics during simultaneous infection of insect cells with two different recombinant baculoviruses for the production of rotavirus-like particles*. BMC Biotechnol, 2007. **7**: p. 39.
83. Wong, K.T.K., et al., *Low multiplicity infection of insect cells with a recombinant baculovirus: The cell yield concept*. Biotechnology and Bioengineering, 1996. **49**(6): p. 659-666.

84. Kamen, A.A., et al., *On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996. **50**(1): p. 36-48.
85. Bedard, C., et al., *Maximization of Recombinant Protein Yield in the Insect-Cell Baculovirus System by One-Time Addition of Nutrients to High-Density Batch Cultures*. *Cytotechnology*, 1994. **15**(1-3): p. 129-138.
86. Palomares, L.A., S. Lopez, and O.T. Ramirez, *Utilization of oxygen uptake rate to assess the role of glucose and glutamine in the metabolism of infected insect cell cultures*. *Biochemical Engineering Journal*, 2004. **19**(1): p. 87-93.
87. Elias, C.B., et al., *Enhanced growth of Sf-9 cells to a maximum density of 5.2×10^7 cells per mL and production of beta-galactosidase at high cell density by fed batch culture*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000. **68**(4): p. 381-388.
88. Maranga, L., T.F. Brazao, and M.J.T. Carrondo, *Virus-like particle production at low multiplicities of infection with the baculovirus insect cell system*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003. **84**(2): p. 245-253.
89. Drittanti, L., et al., *Optimised helper virus-free production of high-quality adeno-associated virus vectors*. *Journal of Gene Medicine*, 2001. **3**(1): p. 59-71.
90. Durocher, Y., et al., *Scalable serum-free production of recombinant adeno-associated virus type 2 by transfection of 293 suspension cells*. *Journal of Virological Methods*, 2007. **144**(1-2): p. 32-40.
91. Meghrous, J., et al., *Production of recombinant adeno-associated viral vectors using a baculovirus/insect cell suspension culture system: from shake flasks to a 20-L bioreactor*. *Biotechnol Prog*, 2005. **21**(1): p. 154-60.
92. Urabe, M., et al., *Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells*. *J Virol*, 2006. **80**(4): p. 1874-85.
93. Kohlbrenner, E., et al., *Successful production of pseudotyped rAAV vectors using a modified baculovirus expression system*. *Mol Ther*, 2005. **12**(6): p. 1217-25.
94. Aucoin, M.G., M. Perrier, and A.A. Kamen, *Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: optimization of baculovirus concentration ratios*. *Biotechnol Bioeng*, 2006. **95**(6): p. 1081-92.
95. Aucoin, M.G., M. Perrier, and A.A. Kamen, *Improving AAV vector yield in insect cells by modulating the temperature after infection*. *Biotechnol Bioeng*, 2007. **97**(6): p. 1501-9.
96. Negrete, A., G. Esteban, and R.M. Kotin, *Process optimization of large-scale production of recombinant adeno-associated vectors using dielectric spectroscopy*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007. **76**(4): p. 761-72.
97. Negrete, A. and R.M. Kotin, *Production of recombinant adeno-associated vectors using two bioreactor configurations at different scales*. *J Virol Methods*, 2007. **145**(2): p. 155-61.
98. Negrete, A. and R.M. Kotin, *Large-scale production of recombinant adeno-associated viral vectors*. *Methods Mol Biol*, 2008. **433**: p. 79-96.
99. Smith, R.H., J.R. Levy, and R.M. Kotin, *A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells*. *Mol Ther*, 2009. **17**(11): p. 1888-96.
100. Chahal, P.S., M.G. Aucoin, and A. Kamen, *Primary recovery and chromatographic purification of adeno-associated virus type 2 produced by baculovirus/insect cell system*. *J Virol Methods*, 2007. **139**(1): p. 61-70.
101. Toublanc, E., et al., *Identification of a replication-defective herpes simplex virus for recombinant adeno-associated virus type 2 (rAAV2) particle assembly using stable producer cell lines*. *Journal of Gene Medicine*, 2004. **6**(5): p. 555-564.

102. Dong, X., et al., *PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W660-4.
103. Pearson, W., *LALIGN*
104. Palomares, L.A., J.C. Pedroza, and O.T. Ramirez, *Cell size as a tool to predict the production of recombinant protein by the insect-cell baculovirus expression system*. Biotechnology Letters, 2001. **23**(5): p. 359-364.
105. O'Reilly D.R., M.L.K., Luckow V. A., *Baculovirus Expression Vectors: a Laboratory Manual*. 1994, New York: Oxford University Press, Inc. 347.
106. Hoque, M., et al., *Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation*. Journal of Virology, 1999. **73**(9): p. 7912-5.
107. Gallo-Ramírez, L.E., O.T. Ramirez, and L.A. Palomares, *Intracellular localization of adeno-associated viral proteins expressed in insect cells*. Biotechnol Prog, 2011. **27**(2): p. 483-93.
108. Nash, K., et al., *Identification of cellular proteins that interact with the adeno-associated virus rep protein*. J Virol, 2009. **83**(1): p. 454-69.
109. Kool, M., et al., *Detection and analysis of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties*. Virology, 1991. **183**(2): p. 739-46.
110. Shen, C.F., J. Meghrou, and A. Kamen, *Quantitation of baculovirus particles by flow cytometry*. J Virol Methods, 2002. **105**(2): p. 321-30.
111. Rosinski, M., S. Reid, and L.K. Nielsen, *Kinetics of baculovirus replication and release using real-time quantitative polymerase chain reaction*. Biotechnol Bioeng, 2002. **77**(4): p. 476-80.
112. Glauser, D.L., et al., *Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by adeno-associated virus rep proteins depends on their combined DNA-binding and ATPase/helicase activities*. J Virol, 2010. **84**(8): p. 3808-24.
113. Timpe, J.M., K.C. Verrill, and J.P. Trempe, *Effects of adeno-associated virus on adenovirus replication and gene expression during coinfection*. J Virol, 2006. **80**(16): p. 7807-15.

12. Apéndices.

Intracellular Localization of Adeno-Associated Viral Proteins Expressed in Insect Cells

Lilí E. Gallo-Ramírez, Octavio T. Ramírez, and Laura A. Palomares

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal. 510-3, Cuernavaca Morelos CP. 62250, México

DOI 10.1002/btpr.565

Published online March 18, 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

*Production of vectors derived from adeno-associated virus (AAVv) in insect cells represents a feasible option for large-scale applications. However, transducing particles yields obtained in this system are low compared with total capsid yields, suggesting the presence of genome encapsidation bottlenecks. Three components are required for AAVv production: viral capsid proteins (VP), the recombinant AAV genome, and Rep proteins for AAV genome replication and encapsidation. Little is known about the interaction between the three components in insect cells, which have intracellular conditions different to those in mammalian cells. In this work, the localization of AAV proteins in insect cells was assessed for the first time with the purpose of finding potential limiting factors. Unassembled VP were located either in the cytoplasm or in the nucleus. Their transport into the nucleus was dependent on protein concentration. Empty capsids were located in defined subnuclear compartments. Rep proteins expressed individually were efficiently translocated into the nucleus. Their intranuclear distribution was not uniform and differed from VP distribution. While Rep52 distribution and expression levels were not affected by AAV genomes or VP, Rep78 distribution and stability changed during coexpression. Expression of all AAV components modified capsid intranuclear distribution, and assembled VP were found in vesicles located in the nuclear periphery. Such vesicles were related to baculovirus infection, highlighting its role in AAVv production in insect cells. The results obtained in this work suggest that the intracellular distribution of AAV proteins allows their interaction and does not limit vector production in insect cells. © 2011 American Institute of Chemical Engineers *Biotechnol. Prog.*, 27: 483–493, 2011*

Keywords: adeno-associated virus, insect cells, Rep proteins, structural viral proteins, vectors for gene delivery, capsids, gene therapy

Introduction

Vectors derived from adeno-associated virus (AAVv) have emerged as an attractive option for the transduction of cells of the central nervous system,¹ muscle,² and for the treatment of a wide variety of disorders. Traditional platforms for AAVv production are based on mammalian cell cultures but, in recent years, production using the insect cell-baculovirus expression vector system (IC-BEVS) has been developed.^{3–5} AAVv are produced by infecting insect cell cultures with either three or two recombinant baculoviruses that express the AAV structural proteins (VP1, VP2, and VP3), two nonstructural proteins (Rep78 and Rep52, involved in DNA replication and packaging, respectively), and the recombinant vector genome, which contains the transgene flanked by the inverted terminal repeats (ITRs) of AAV. Production of AAVv in the IC-BEVS has several advantages over traditional production in mammalian cells, such as lower production costs, higher productivity, easy scalability, and absence of potentially pathogenic agents.^{6,7} This recombinant system also provides the possibility of easily

manipulating the ratio of the different components of the vector by modifying the multiplicity of infection (MOI) of each recombinant baculovirus,⁸ which determines the yield of AAVv transducing particles.^{9–11} Despite all these advantages, it has been observed that the total particle to transducing particle ratio obtained in insect cells are 100-fold higher than those obtained by transfection of mammalian cells,¹² suggesting that AAV genome replication and/or packaging limit the production of transducing particles in insect cells. Limitations of the vector assembly process will occur when one (or more) of the AAV components mentioned previously are not available in each cell. For this reason, the coexpression of all components of the vector in each cell has been presented as the most important issue to overcome in the IC-BEVS when infecting with multiple baculoviruses. Nevertheless, interactions between the vector components due to their intracellular distribution have also been proposed as a possible limiting factor.¹⁰

While AAVv production in mammalian cells has been extensively studied,^{13–18} little is known about the localization and interaction of the different elements required for genome replication, capsid assembly, and genome packaging in insect cells. Wild AAV replication is a temporally regulated process that starts with the transcription of Rep78/68, required for DNA amplification. The last step is transcription of

Correspondence concerning this article should be addressed to L. A. Palomares at laura@ibt.unam.mx.

mRNA codifying for viral capsid proteins (VP).¹⁸ When capsid assembly starts, high amounts of Rep proteins and genome copies are already available for genome packaging.^{14,15,18} In mammalian cells, coinfecting with native AAV and adenovirus, VP, and Rep proteins colocalize in the nucleus,^{13,15,17} and AAV capsids assemble in the nucleolus.^{15,17} In insect cells, where the intracellular environment and protein production rates differ from those in mammalian cells, it is still unknown if intracellular AAV protein compartmentalization, protein concentration ratio, and temporal coincidence of expression are equivalent to what occurs in mammalian cells. In addition, the presence of the baculovirus vector further affects the intracellular environment in insect cells as it induces important changes in their nuclei, such as subcompartmentalization.^{19–22} Changes in the spatial and temporal interactions among the different components of the vector can affect AAVv production and determine process yield. Changes that impact capsid assembly and genome packaging can result from the use of elements not present in native AAV or mammalian systems, such as insect promoters, or from the baculovirus infection cycle. To date, little is known about AAVv production in the IC-BEVS, and potential bottlenecks have not been identified. In this work, the localization of AAV structural and Rep proteins during their expression in insect cells was determined. This information is important for increasing the understanding of the AAVv production process in the IC-BEVS, and for identifying potential limiting steps, with the aim of increasing productivity to satisfy the increasing demand of transducing particles for clinical trials.

Materials and Methods

Recombinant baculoviruses

Table 1 lists the recombinant baculoviruses used in this work. Two recombinant baculoviruses were constructed for the individual expression of the nonstructural proteins Rep78 and Rep52. The plasmid pFBDSL³ (kindly provided by Kotin, NIH) was used to obtain the individual expression cassettes of each protein with its respective promoter by digestion with restriction enzymes. Cassettes were inserted into the pFastBac-1 plasmid previously treated with restriction enzymes to excise the *polh* promoter region. On these constructions, Rep52 is under control of *polh*, a very strong and late baculovirus promoter, and Rep78 is under control of *ΔIE1*, a weak and early baculovirus promoter modified by Urabe et al.³ to reduce expression levels. A third baculovirus was constructed by inserting the Rep52 expression cassette into the plasmid pFBGR³ (also kindly provided by Kotin, NIH), which contains the recombinant genome of AAV. The expression cassette of Rep52 was introduced separately from the vector genome construction. The Bac-to-Bac system (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used to generate the recombinant baculoviruses. Viral stock titers were determined as described previously.²³

Cell culture and expression of recombinant proteins

High Five[®] insect cells were cultured in 250-mL shake flasks with 50 mL of SF-900 II medium (Invitrogen) at 27°C and 114 rpm. Cultures at 1×10^6 cell/mL were infected at a MOI of 5 pfu/cell to individually express each Rep or VPs. Coinfections at the same MOI of each baculovirus were performed to simultaneously express each Rep with the VPs. Additionally, each Rep was expressed in presence of the

Table 1. Recombinant Baculoviruses Used in This Study

Baculovirus	Coding Gene	Promoter
bacCap*	VP [†]	<i>polh</i>
bacGFP*	EGFP flanked by AAV-2 ITR	<i>polh</i> and cytomegalovirus
bacRep78	Rep78	<i>ΔIE1</i> [‡]
bacRep52	Rep52	<i>Polh</i>
bacGFP-Rep52	EGFP flanked by AAV-2 ITR and Rep52	EGFP: <i>polh</i> , cytomegalovirus Rep52: <i>polh</i>

*Kindly provided by R.M. Kotin, NIH.³ [†]A single open reading frame coding for VP1, VP2, and VP3 of AAV-2. [‡]Described in Ref. 3.

recombinant genome carrying the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene. Finally, cultures were infected with bacCap, bacGFP-Rep52, and bacRep78 to coexpress all the AAVv elements and evaluate the localization of full capsids and Rep proteins. Samples were taken from 24 to 96 h post-infection every 24 h.

Immunofluorescence microscopy

Cells were treated as described previously.²⁴ Briefly, they were seeded on a poly-L-lysine-coated glass slide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), washed with 1 mL of phosphate buffer saline (PBS), fixed with PBS-formaldehyde 4% for 15 min, and washed again twice. Cells were permeabilized with 0.2% sodium deoxycholate and 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS during 15 min, and washed twice with PBS. Primary monoclonal antibodies were diluted 1:100 in PBS-BSA 0.2% and incubated with cells for 1 h. Two mouse monoclonal antibodies were used to detect VP: A20, which recognizes a structural epitope present only in assembled VP^{15,25}; and B1, which recognizes a linear epitope in the C-terminal common to all VP proteins (a.a. 726–733²⁵) but not accessible for antibody recognition when VP proteins are assembled into capsids. Additionally, a rabbit polyclonal serum was used to detect assembled and unassembled VP during coexpression with Rep proteins. Rep protein was detected with the monoclonal antibody 76.3.²⁵ All antibodies were acquired from PROGEN Biotechnik GmbH (Heidelberg, Germany). Cells were washed twice before incubation for 1 h with the secondary antibody, a goat-anti mouse coupled to Alexa Fluor 568 (Invitrogen), or a goat-anti rabbit coupled to Alexa Fluor 488 (Invitrogen) diluted 1:100 in PBS-BSA 0.2%. Cells were washed twice and the Slow-Fade[®] Gold solution with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen) was added for nuclei staining. Samples were observed using an ApoTome microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). All images were captured using the same exposure times.

Electron microscopy

Twenty-five percent glutaraldehyde (GTA, 110 μL) in 0.1-mM phosphate buffer pH 7.5 were added to 1 mL of culture containing 1×10^6 cells. After 15 min of incubation, cells were centrifuged, and the supernatant was discarded. Cells were fixed for 15 min at room temperature with 2.5% GTA and 4% paraformaldehyde and washed with phosphate buffer 0.1 mM and with distilled water. Samples were then incubated in darkness with osmium tetroxide 1% for 1 h, and then washed as described below. Cells were gradually dehydrated by successive 10 min incubations in ethanol solutions at 70, 80, and 90% for 10 min and two incubations in

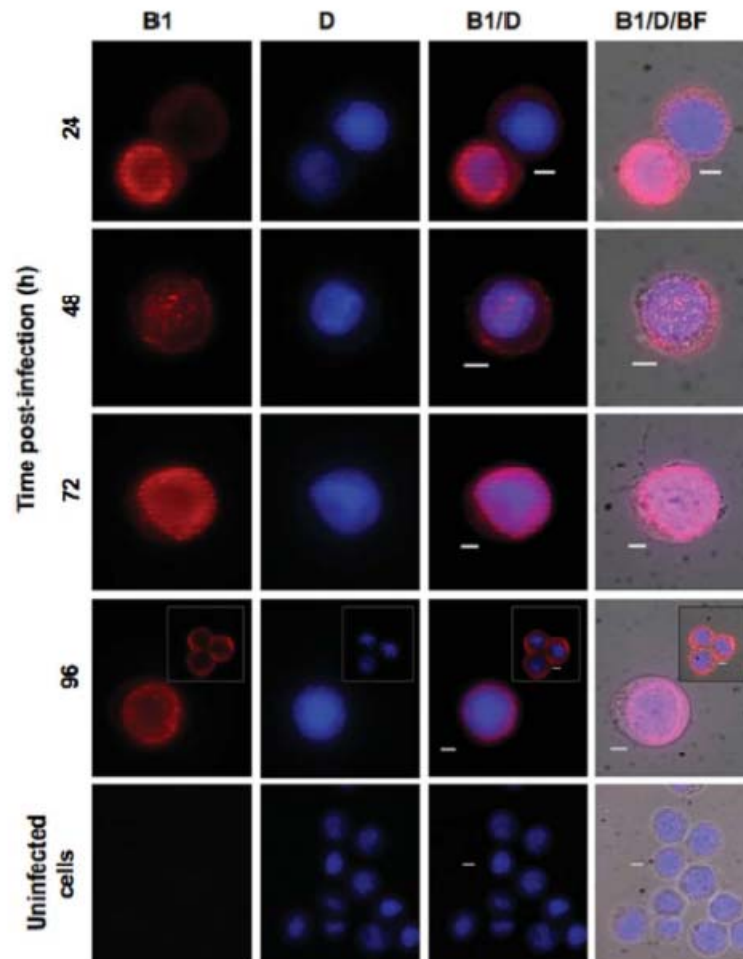


Figure 1. Immunofluorescence of High Five cells infected with bacCap at different times post infection (63 \times).

Detection of unassembled VP was performed using the MAbs B1 and an anti-mouse IgG antibody coupled to Alexa Fluor 568. DAPI was used for nucleus staining (D). B1/D: overlapping of Alexa Fluor and DAPI channels. B1/D/BF: overlapping of Alexa Fluor, DAPI and bright field channels. Uninfected cells were used as negative control. Bars in panels represent 6.5 μ m.

ethanol 100%. Samples were embedded in a 1:1 mixture of propylene oxide and EPON 812 resin (Shell Corporation).²⁶ The resin was cured over night and subsequently subjected to polymerization by incubation at the following conditions: 35°C/2 h, 50°C/24 h and 70°C/over night. Thin layers of embedded cells were stained in 2.5% (w/v) uranyl acetate and viewed in a Zeiss EM900 (Göttingen, Germany) electron microscope operated at 80 kV.

Results

Immunolocalization of AAV structural proteins expressed individually

The three AAV structural proteins share the same amino acid sequence but differ from each other in the length of their N-terminus, being VP1 the longest and VP3 the shortest one. AAV capsids are formed by 60 monomers of VP1, VP2, and VP3 in a 1:1:10 ratio, respectively.^{27,28} It has been demonstrated that AAV capsid assembly in mammalian cells requires the translocation of the three proteins into the nu-

cleus, but AAV structural protein translocation and distribution into the nucleus of insect cells, which have different intracellular conditions than mammalian cells, has not been studied. Two antibodies with different epitopes, A20 and B1, were used to localize the accumulation sites of assembled and unassembled VP, respectively. Representative micrographs of immunolocalization studies with B1 in insect cells expressing VP are shown in Figure 1. B1 did not react with uninfected insect cells, as can be seen in the negative control. Unassembled VP concentration increased with time postinfection (hour postinfection; hpi). In cells with low fluorescence intensity (e.g., 24 hpi), unassembled VP accumulated mostly in the cytoplasm, whereas, as concentration increased, unassembled VP were also observed in the nucleus in dense accumulates (Figure 1, 48 and 72 hpi), suggesting that the intracellular distribution of unassembled VP depends on its concentration. At 96 hpi, most of the cells contained VP in their nuclei, although a few cells with VP in cytoplasm were also detected (see insert in Figure 1). The localization of assembled VP, detected by the A20 MAb, is shown in Figure 2. Assembled VP was detected exclusively in the nuclei, where it

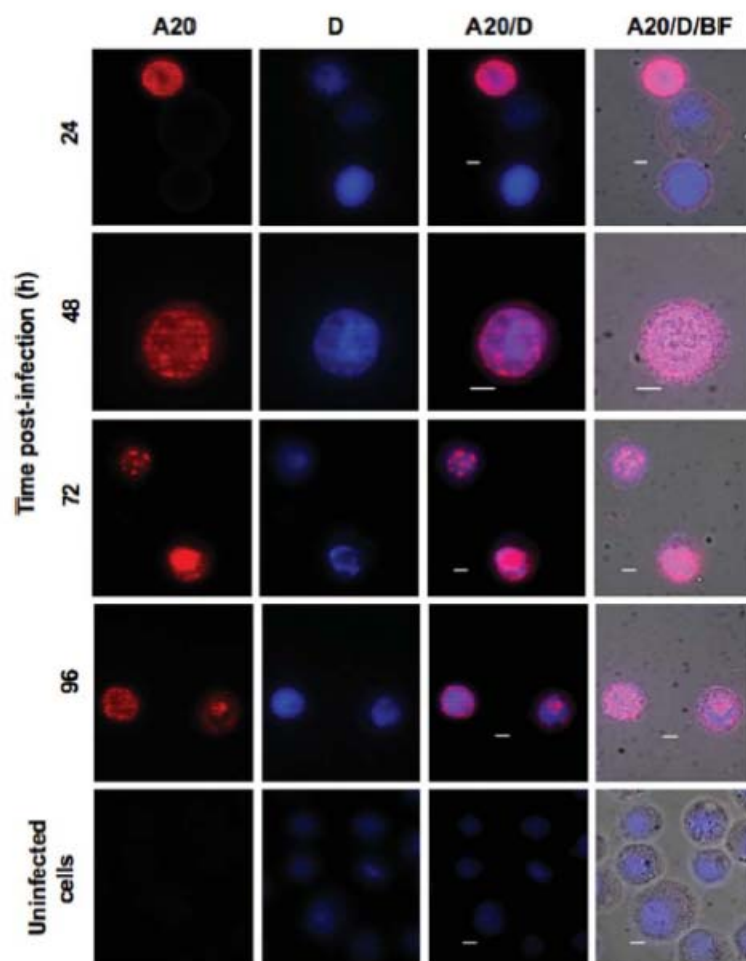


Figure 2. Immunofluorescence of High Five cells infected with bacCap at different times post infection (63 \times).

Capsid detection was performed using the MAb A20 and an anti-mouse IgG antibody coupled to Alexa Fluor 568. DAPI was used for nucleus staining (D). A20/D: overlapping of Alexa Fluor and DAPI channels. A20/D/BF: overlapping of Alexa Fluor, DAPI and bright field channels. Uninfected cells were used as negative control. Bars in panels represent 6.5 μ m.

formed well-defined clusters, indicating that the site of assembly of VP is the nuclei of insect cells and that empty capsids remain there until the end of the culture. No difference was observed in assembled VP localization at different times post-infection and a higher number of cells with assembled VP were observed as time progressed (data not shown).

Immunolocalization of Rep proteins expressed individually

AAV produces four nonstructural proteins that are involved in DNA replication (Rep68 and Rep78) and packaging (Rep40 and Rep52) but not in capsid assembly.²⁸ The monoclonal antibody (76.3) used recognizes all Rep proteins of AAV-2.^{14,15} No signal was observed in uninfected insect cells, indicating that antibody recognition was highly specific (Figure 3). Rep52 was detected exclusively in the nucleus at all times (Figure 3, only 24 and 48 hpi are shown). The protein was distributed throughout the nucleus, but at 24 hpi, its concentration was higher in the nuclear periphery. From 48 hpi, small clusters with high protein concentration were observed throughout the nucleus. Rep52 concentration did not decrease at the different times analyzed (72 and 96 hpi not shown).

Rep78 also had an exclusive nuclear localization (Figure 3). In contrast with the distribution of Rep52 at 24 hpi, cells expressing Rep78 presented zones of higher fluorescence in the center of the nucleus than in the nuclear periphery. At 48 hpi, the distribution of Rep78 in the nucleus changed notoriously, as it formed small clusters of protein accumulation, with an apparent decrease in the total nuclear Rep78 concentration. A similar distribution was observed up to 96 hpi (image not shown). Neither Rep52 nor Rep78 accumulated in clusters similar to those observed for VP proteins. In most cells, Rep78 apparent concentration was lower than Rep52 concentration, as estimated from fluorescence intensities. The comparison is valid, as the MAb 76.3 binds the same epitope in both proteins. These results confirm that Rep proteins translocate efficiently into the insect cell nucleus when expressed independently.

Immunolocalization of Rep proteins coexpressed with structural proteins

Rep proteins have been detected forming complexes with empty capsids during AAVv production in mammalian cells,¹⁴ denoting that a direct interaction between structural and

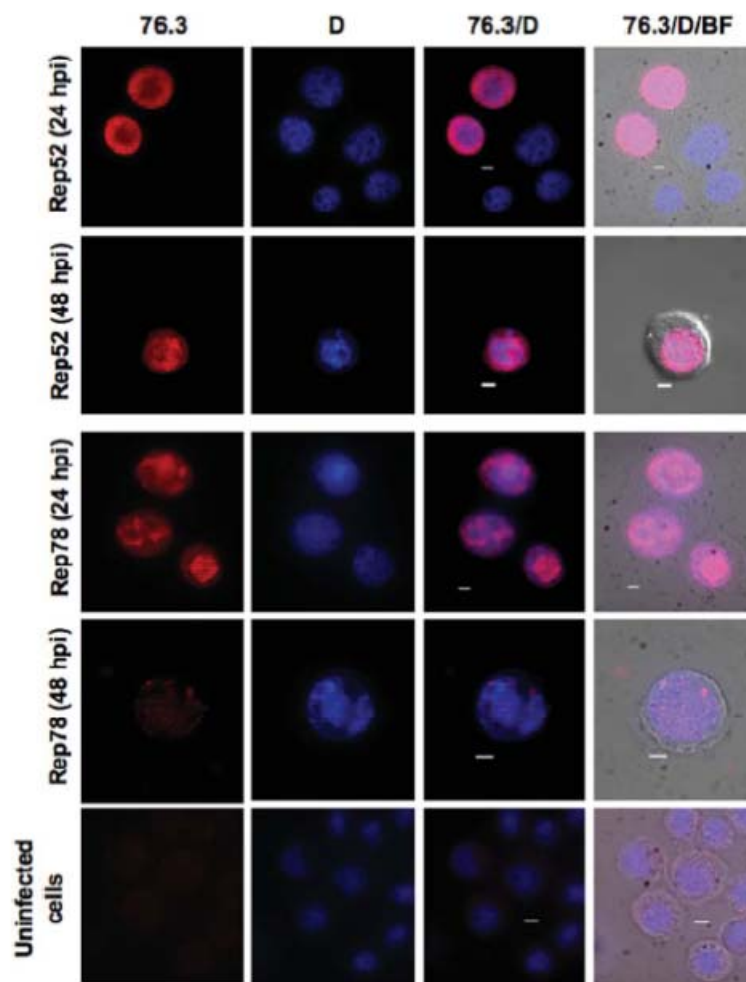


Figure 3. Immunofluorescence of High Five cells in individual infections with either bacRep78 or bacRep52 (63 \times).

Protein detection was performed using the MAb 76.3 and a anti-mouse IgG antibody coupled to Alexa Fluor 568. DAPI was used for nucleus staining (D). 76.3/D: overlapping of Alexa Fluor and DAPI channels. 76.3/D/BF: overlapping of Alexa Fluor, DAPI and bright field channels. Uninfected cells were used as negative control. Bars in panels represent 6.5 μ m.

nonstructural AAV proteins in the absence of viral genomes exists. It was necessary to determine if VP expression and accumulation into the nucleus change the intracellular localization of each Rep in insect cells, to understand protein interactions during complete vector assembly in the IC-BEVS. Figure 4 shows that coexpression of Rep52 with VP did not change the Rep52 intracellular distribution observed during individual infections. As observed during individual expression, Rep78 concentration was lower than that of Rep52 (Figure 4). Interestingly, Rep78 distributed in small clusters of high density from 24 hpi, and its concentration at late times postinfection was higher than during individual infection.

A polyclonal rabbit serum was used to detect both assembled and unassembled VP during coinfections. This polyclonal serum had been previously tested in cultures expressing solely VPs, and at 96 hpi, it was possible to observe intranuclear aggregates similar to those observed using the monoclonal antibodies B1 and A20 (images not shown), indicating that capsid assembly sites can be visible by using the polyclonal antiserum during coinfections. Nevertheless, in cells coexpressing VP and Rep proteins, the compact and highly dense aggregates previously observed dur-

ing individual expression (Figures 1 and 2) were not detected in most cells, even when VP remained mainly in the nucleus. These results show that Rep and VP colocalized in the nucleus of insect cells (Figure 4), and while their coexpression did not modify Rep52 distribution, compared with that observed during individual expression, the distribution of assembled capsids and Rep78 at early times of infection changed.

Immunolocalization of Rep proteins expressed in the presence of the AAV recombinant genome

Rep78 and Rep52 interact directly with the AAV genome during its replication and packaging.²⁹⁻³³ The AAV ITRs contain a specific Rep binding site³⁴ that possibly affects Rep78 localization. To observe whether the presence of AAV genomes changed Rep cellular distribution across time, both Reps were individually expressed in the presence of the AAV recombinant genome. The presence of the AAV genome in cells was confirmed by expression of the reporter gene EGFP. Representative micrographs of the immunolocalization studies are shown in Figure 5. EGFP concentration increased with time and accumulated homogeneously

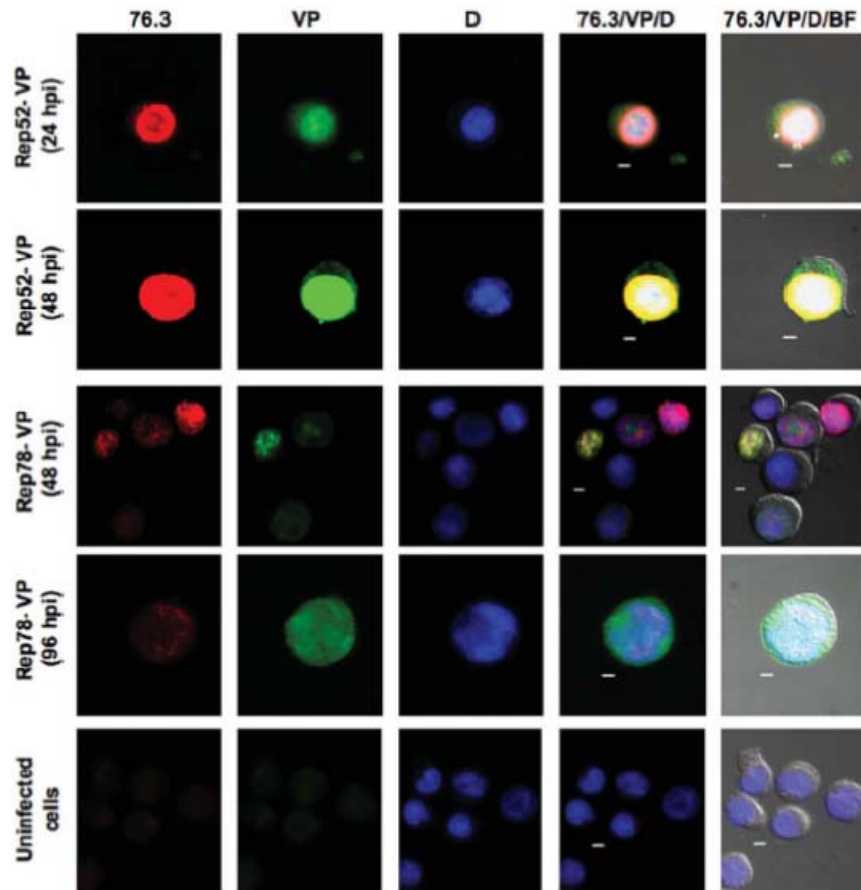


Figure 4. Immunofluorescence of High Five cells in coinfections with bacCap and either bacRep78 or bacRep52 (40 \times).

Rep protein detection was performed as in individual infections, using the MAb 76.3 and an anti-mouse IgG antibody coupled to Alexa Fluor 568. VP were detected using a rabbit polyclonal serum (VP) and an anti-rabbit IgG antibody coupled to Alexa Fluor 488. DAPI was used for nuclei staining. 76.3/VP/D: overlapping of Alexa Fluor 568, 488 and DAPI channels. 76.3/VP/D/BF: overlapping of Alexa Fluor 568, 488, DAPI and bright field channels. A negative control was performed using uninfected cells. Bars in panels represent 6.5 μ m.

throughout the cell, except at 96 hpi, when the reporter protein was located outside the nucleus forming fibrous structures. At early times postinfection, the presence of the AAV genome did not alter Rep52 distribution. However, at 96 hpi, Rep52 accumulated in the nuclear periphery and a considerable reduction in its concentration was observed in presence of the AAV genome. Rep52 exclusion from nuclei at 96 hpi is possibly provoked by EGFP accumulation in this organelle.

Rep78 coexpressed with the AAV genome formed discrete accumulation zones in the nucleus at an earlier time than in single infections. In contrast to its individual expression and similar to its coexpression with VP, Rep78 concentration did not decrease with time in the presence of the AAV genome. Moreover, its distribution was not confined to the nuclear periphery, as was observed for Rep52. EGFP expressed with Rep78 had a heterogeneous distribution at 96 hpi but different to that observed during coexpression with Rep52.

Immunolocalization of AAV capsids during coexpression of all AAVv elements

To compare full and empty capsid distribution, a multiple coinfection expressing all AAVv elements was performed.

Assembled capsids were detected with the A20 antibody and EGFP expression confirmed infection with bacGFP-Rep52. Representative micrographs of cells at 48 hpi are shown in Figure 6. In contrast to empty capsids (Figure 2), capsids assembled in presence of the recombinant genome and at least one Rep formed smaller clusters located mostly in the nuclear periphery, and in lower concentration in the cytoplasm of some cells. Rep proteins were distributed throughout the nucleus (data not shown). To determine if AAVv were localized in the nucleolus, as previously reported for mammalian cells, a monoclonal antibody detecting human nucleolin was tested. However, the antibody did not specifically bind to insect cells (data not shown).

Localization of AAV capsids by electron microscopy

Immunofluorescence showed that empty capsids obtained when only VP were expressed accumulated in well-defined compartments in the nuclear central region, while when the other AAV components were coexpressed, capsids accumulated in smaller clusters in the nuclear periphery. Previous studies reported that AAV capsids assemble in the nucleolus of mammalian cells.^{15–17} To determine whether capsid clusters observed in insect cells are related to this organelle, the

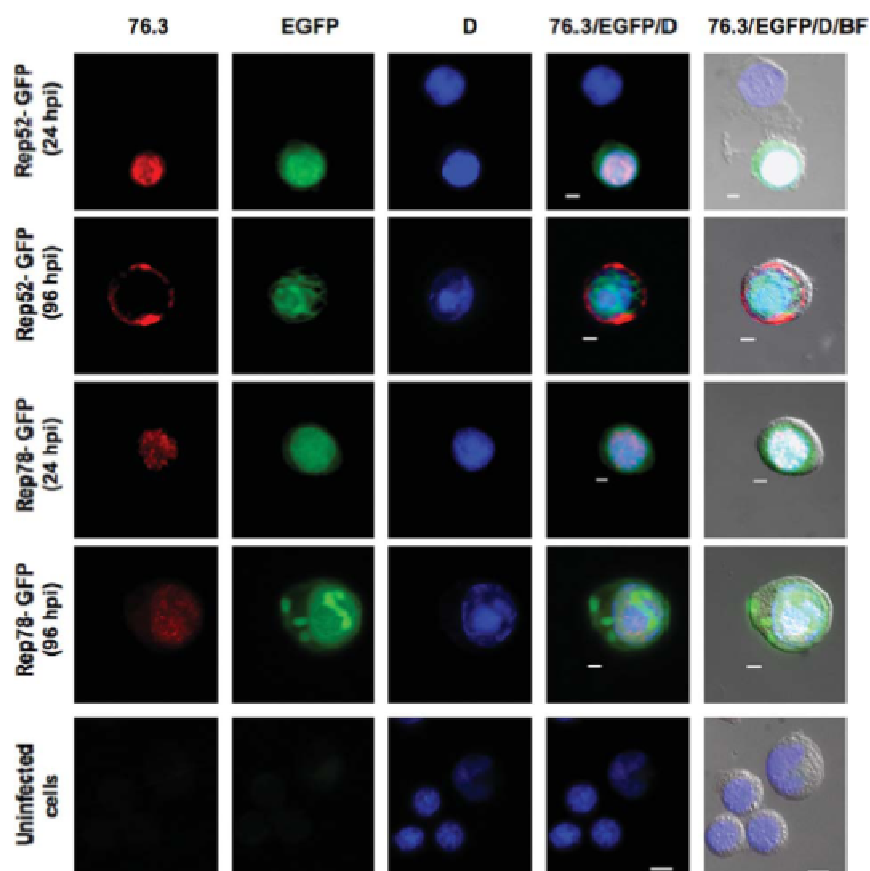


Figure 5. Immunofluorescence of High Five cells infected with bacGFP-Rep52 or coinfecting with bacRep78 and bacGFP (40 \times).

Rep protein detection was performed as in individual infections. EGFP fluorescence was used to confirm the presence of AAV genomes. DAPI was used for nuclei staining. 76.3/EGFP/D: overlapping of Alexa Fluor 568, EGFP and DAPI channels. 76.3/EGFP/D/BF: overlapping of Alexa Fluor 568, EGFP, DAPI and bright field channels. A negative control was performed using uninfected cells. Bars in panels represent 6.5 μ m.

nuclear structure of cells coinfecting with bacCap, bacRep78, and bacGFP-Rep52 at 48 hpi was observed by transmission electron microscopy. Representative micrographs are shown in Figure 7. Infected cells had nuclear morphological changes similar to those previously described for baculovirus-infected insect cells.^{6,19,20,22,35} Heterochromatin was marginalized to the nuclear periphery, and the virogenic stroma developed in the central region of the nucleus, where a high number of unenveloped baculoviruses were located (Figure 7A), but no AAV capsids were observed in this region. Fibrillar structures were detected mostly in the zone surrounding the virogenic stroma (Figure 7B), a region named the ring zone.²⁰ Nuclear vesicles were also observed, being more abundant in the ring zone of cells that contained enveloped baculoviruses (Figure 7B). Nucleolar bodies (nb) were visible and had a granular aspect. Nevertheless, AAV capsids were not localized in these organelles, but in vesicles located in the ring zone of cells expressing all AAV components (Figure 7B–D). Some AAV capsids were filled by the stain, indicating that they do not contain the AAV genome (Figure 7D).

Discussion

The production of AAV vectors is a complex process that requires the interaction of AAV capsids, Rep proteins, and

the AAV recombinant genome. Thus, it is necessary that all components colocalize for genome packaging. AAV replication has been widely characterized in mammalian cells.^{13–18} Nevertheless, the insect cell provides a different environment for AAVv assembly. In addition, baculovirus infection induces important morphological changes in the cell,^{20,21,22,35} which could affect AAVv production. Despite increasing interest in AAVv production in the IC-BEVS, no information about adeno-associated viral proteins distribution had been reported. In this work, the localization of the various AAVv components, individually or simultaneously expressed in insect cells, was determined at different times.

When VP were solely expressed, it was observed that their synthesis and transport to the nucleus were not simultaneous, as unassembled VP accumulated in the cytoplasm. VP were transported into the nucleus as time progressed, and their concentration increased (data not shown). This probably occurs because VP3, the most abundant protein in the AAV capsid, lacks a nuclear transport signal and thus requires the presence of VP1 or VP2 to be cotranslocated to the nucleus.³⁶ VP3 is the most abundant protein on infection of insect cells with bacCap,³ and it is probable that a minimum concentration of VP1 and VP2 in the cytoplasm is required before they can transport VP3 into the nucleus. Once VP transport into the nucleus started, the process was very efficient, as a high

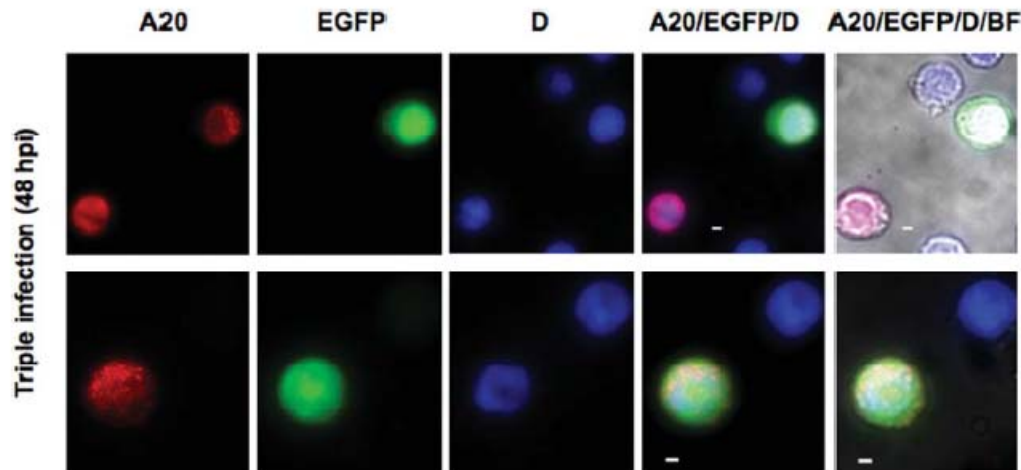


Figure 6. Immunofluorescence of High Five cells coinfecting with bacCap, bacRep78 and bacGFP-Rep52 (40 \times).

Assembled capsids were detected with the A20 MAb and an anti-mouse IgG antibody coupled to Alexa Fluor 568. EGFP fluorescence confirmed coinfection with bacGFP-Rep52. DAPI was used for nuclei staining. A20/EGFP/D: overlapping of Alexa Fluor 568, EGFP and DAPI channels. A20/EGFP/D/BF: overlapping of Alexa Fluor 568, EGFP, DAPI and bright field channels. Bars in panels represent 6.5 μ m.

intensity of VP fluorescence in the nuclear periphery and inside the nucleus was observed, compared to fluorescence in the cytoplasm. Unassembled VP accumulated in the nucleus in compact sites that were similar to the accumulation sites of assembled VP. This suggests that assembly occurs specifically in such sites and that it requires a high VP concentration. Most assembled viral capsids remained compartmentalized even when viability decreased. This correlates with previous reports that indicate that assembled AAV capsids remain mainly in the cellular fraction of infected cultures after culture viability decreases,^{9,10,37,38} indicating that rupture of the cytoplasmic membrane is not sufficient for vector release.

Capsids assembled in the presence of all AAVv elements formed small clusters in the nuclear periphery, instead of the larger clusters observed in the central region of the nucleus during individual expression of VP. The difference in capsid distribution was probably provoked by the presence of Rep proteins, which have been reported to induce capsid release from the nucleolus of mammalian cells to the nucleoplasm or even the cytoplasm.¹⁵ The mechanism by which Rep proteins induce capsid release in mammalian cells is not well understood, but it is possibly related to their capacity to interact with a wide variety of cellular proteins, such as those involved in DNA replication, transcription, splicing, transport, and protein degradation, among others.^{16,17,39} It is possible that these interactions also occur in insect cells.

Electron microscopy of cells coexpressing all AAVv components showed that the sites of capsid accumulation were vesicles in the cell nucleus. Interestingly, VAAV particles were not observed in the nucleolus of insect cells, in contrast to what has been reported for mammalian cells.^{13,15,16,17} The virogenic stroma is the region where baculovirus nucleocapsids assemble in infected insect cells,^{20,35} and it was possible that proteins involved in baculovirus capsid assembly could also participate in AAV capsid formation in this region. However, no AAV particles were found in the virogenic stroma. The vesicles where AAV capsids accumulated were located in the ring zone, the place where occluded baculoviruses tend to accumulate at very late phases of infection.^{20,35} The results obtained here highlight the role of baculovirus infection during the production of AAVv and

suggest a more complex process than previously proposed.⁴⁰ Interestingly, some AAV capsids appeared to be full, suggesting two scenarios for vector conformation in insect cells: (1) that all AAV components interacted before assembled capsids enter the vesicles; or (2) that vesicles are the site of capsid assembly and that compartmentalization did not impede capsid interaction with Rep proteins and genomes. Nevertheless, based on these results and the fact that the nucleolus is usually found associated to the virogenic stroma,²⁰ we cannot dismiss the role of nucleolar components during VP assembly in insect cells, as occurs during assembly of several human viruses in mammalian cells.⁴¹

Production of Rep78 and Rep52 was successfully performed with the baculoviruses constructed in this work. It had been previously shown that their production using individual baculoviruses ensures stable expression levels after several rounds of viral stock amplification.⁴² Production of both Rep proteins differed in terms of temporality and expression levels due to the promoters used to express each protein (Table 1). *$\Delta iE1$* , used for Rep78 expression, is a weak promoter active in the early phase of baculovirus infection (6 hpi). In contrast, the strong promoter *polh*, used for Rep52 expression, is active in the very late phase of baculovirus infection (from 18–24 hpi).³⁵ Early expression of Rep78 is desirable during the baculovirus DNA replication phase to drive AAV genome rescue and independent replication.^{3,40} Rep proteins were not observed in the cytoplasm when expressed individually, which indicates that their transport into the nucleus occurred shortly after protein synthesis and did not depend on protein concentration in the cytoplasm, as occurred for VP transportation. Nuclear transport of both Reps is driven by the same nuclear transport signal contained in their C-terminal region.³³ Therefore, their transport to the nucleus follows a similar path. It must be considered that expression of Rep78 also results in the production of very low concentrations of Rep52, as a result of an alternative transcription initiation site.⁴² This low concentration of Rep52 is not expected to affect the Rep78 localization assays presented here.

While assembled capsids concentrated in defined subnuclear compartments when expressed individually, Rep52 and Rep78 were distributed throughout the nucleus and formed

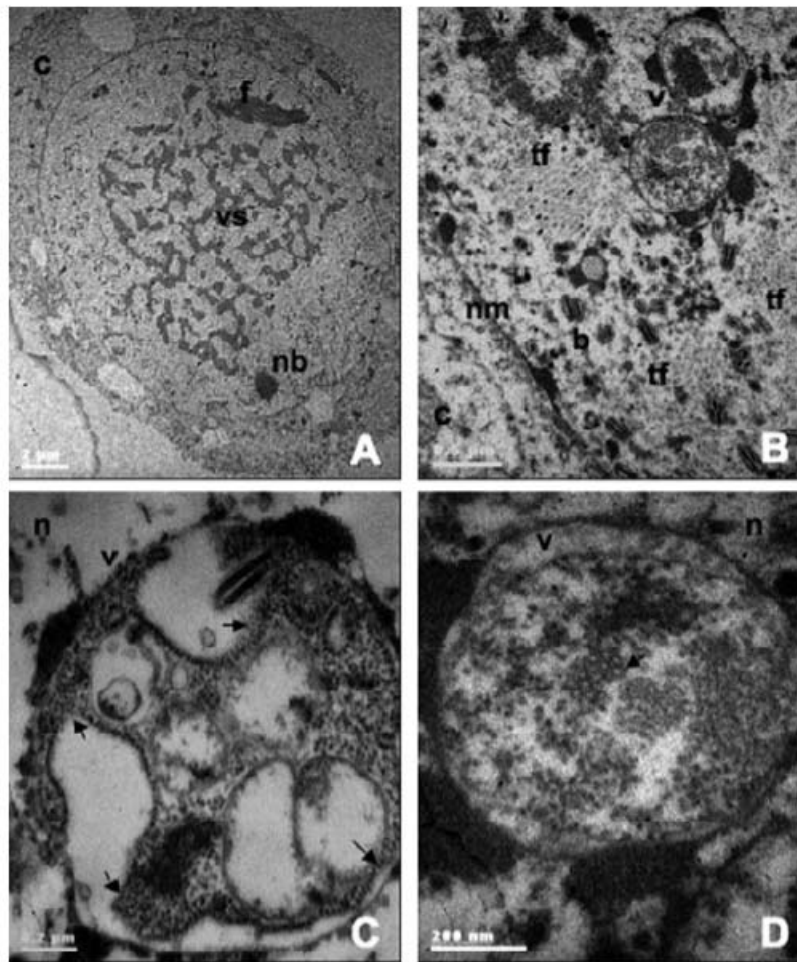


Figure 7. Electron microscopy of High Five cells coinfecting with bacCap, bacRep78 and bacGFP-Rep52 after 48 hpi.

(A) Infected cell. (B) Nuclear periphery region of a infected cell. (C and D) Vesicles containing AAV capsids, b, baculovirus; c, cytoplasm; f, fibrillar structures; n, nucleoplasm; nb, nucleolar body; nm, nuclear membrane; ff, transversal view of fibrillar structures; v, vesicles containing AAV capsids; vs, baculovirogenic stroma; arrows, AAV capsids.

small protein clusters as time progressed. After 24 hpi, protein clusters were more frequent for Rep78, which has the capacity of forming hexamers. In contrast, Rep52 cannot interact with itself, because it lacks 224 amino acids of its N-terminus that are necessary for oligomerization.⁴³ In most cells, the fluorescent signal obtained from Rep78 was weaker than that obtained for Rep52, which can be explained by the strength of the promoters that control their expression. The decrease in Rep78 concentration as time progressed may be a consequence of its early expression, which can result in its degradation at late phases of infection, when other baculovirus proteins are expressed. As expected, the viral genome changed Rep78 distribution by inducing its accumulation in specific zones from early times postinfection. Rep78 was more stable at late times postinfection when it was coexpressed with the viral genome, as also observed on coexpression with VP. That Rep78 was stabilized when it was coexpressed with both components (VP and the viral genome) indicate that it interacted with both, as required for the encapsidation of AAV genomes in capsids. Therefore, it can be expected that Rep78 interaction was not a limiting step when AAVv were produced in insect cells. The discrete

accumulation zones of Rep78 observed in the presence of the recombinant AAV genome suggest that AAV DNA induces Rep78 accumulation in the genome replication sites. The virogenic stroma has been proposed as the place where baculovirus DNA replicates.²¹ Accordingly, Rep78 must colocalize in this region to perform AAV genome rescue from baculovirus DNA and allow its replication. Such an interaction between Rep78 and DNA could be responsible for the higher concentration of Rep78 at 96 hpi compared with that observed in absence of the recombinant genome, probably by reducing protein degradation, which could favor the AAVv production process. Rep78 interactions with AAV DNA also prevented its exclusion from the nucleus at high concentration of EGFP. In contrast, AAV DNA did not affect Rep52 concentration or distribution in comparison with individual expression. Rep52 lacks the DNA binding domain present in the amino terminus of Rep78 involved in DNA binding and nicking,⁴⁴ and although it can bind DNA, its binding is not specific. Changes observed in Rep52 localization at late times post infection could be due to the displacement of the protein as a result of EGFP accumulation in the nucleus. Nonetheless, it is not expected that such a

displacement of Rep52 from the nucleus affects AAV yields, as it occurs at times later than those usually employed for vector harvest. Two factors that could reduce vector yields are the high metabolic burden imposed by the reporter gene and that the high EGFP accumulation in the nucleus impedes the efficient transport of AAV proteins.

The results obtained in this work suggest that the intracellular distribution of AAV proteins in insect cells did not limit vector assembly. Other factors, such as the ratio between the AAV components, may reduce yields and need to be further studied.

Acknowledgments

The authors thank Robert Kotin (NIH) for kindly providing several plasmids, Ana Ruth Pastor Flores, Vanessa Hernández and Guadalupe Zavala for technical assistance, and Ramón González García-Conde (UAEM), Christopher Wood and the Electron Microscopy Unit at IBT-UNAM for microscopy facilities. This work was funded by PAPIIT-UNAM IN223805, IN224409 and IN223210, and SEP-CONACyT 46225-Z and 2008-01-101847. Gallo-Ramírez acknowledges support from CONACyT during her graduate studies (scholarship 169462).

Literature Cited

- Mendel RJ, Manfredsson FP, Foust KD, Rising A, Reimsnider S, Nash K, Burger C. Recombinant adeno-associated viral vectors as therapeutic agents to treat neurological disorders. *Mol Ther.* 2006;13:463–483.
- Wang Z, Zhu T, Qiao Ch, Zhou L, Wang B, Zhang J, Chen Ch, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol.* 2005;23:321–328.
- Urabe M, Ding CH, Kotin RM. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type-2 vectors. *Hum Gene Ther.* 2002;13:1935–1943.
- Urabe M, Nakakura T, Xin K, Obara Y, Mizukami H, Kume A, Kotin RM, Ozawa K. Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol.* 2006;80:1874–1885.
- Smith RH, Levy JR, Kotin RM. A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one step affinity purification yields high-titer AAV stocks from insect cells. *Mol Ther.* 2009;17:1888–1896.
- Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT. Principles and applications of the insect-cell-baculovirus expression vector system. In: Ozturk S, Hu WS, editors. *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Applications*. New York: CRC Press; 2005:627–692.
- Aucoin MG, Mena JA, Kamen AA. Bioprocessing of baculovirus vectors: a review. *Curr Gene Ther.* 2010;10:174–186.
- Palomares LA, López S, Ramírez OT. Strategies for manipulating the relative concentration of recombinant rotavirus structural proteins during simultaneous production by insect cells. *Biotechnol Bioeng.* 2002;78:635–644.
- Meghrouh J, Aucoin MG, Jacob D, Chahal PS, Arcand N, Kamen AA. Production of recombinant adeno-associated viral vectors using a baculovirus/insect cell suspension culture system: from shake flasks to a 20-L bioreactor. *Biotechnol Prog.* 2005;21:154–160.
- Aucoin MG, Perrier M, Kamen AA. Production of Adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: optimization of baculovirus concentration ratios. *Biotechnol Bioeng.* 2006;95:1081–1092.
- Negrete A, Yang LC, Mendez AF, Levy JR, Kotin RM. Economized large-scale production of high yield of rAAV for gene therapy applications exploiting baculovirus expression system. *J Gene Med.* 2007;9:938–948.
- Aucoin MG, Perrier M, Kamen AA. Critical assessment of current adeno-associated viral vector production and quantification methods. *Biotech Adv.* 2007;26:73–88.
- Hunter LA, Samulski RJ. Colocalization of adeno-associated virus Rep and Cap proteins in the nuclei of infected cells. *J Virol.* 1992;66:317–324.
- Wisnuba A, Weger S, Kern A, Kleinschmidt JA. Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins. *J Virol.* 1995;69:5311–5319.
- Wisnuba A, Kern A, Weger S, Grimm D, Kleinschmidt JA. Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol.* 1997;71:1341–1352.
- Qiu J, Brown KE. A 110-KDa nuclear shuttle protein, nucleolin, specifically binds to adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsids. *Virology.* 1999;257:373–382.
- Bevington JM, Needham PG, Verrill KC, Collaco RF, Basur V, Trempe JP. Adeno-associated virus interactions with B23/Nucleophosmin: identification of sub-nucleolar virion regions. *Virology.* 2007;357:102–113.
- Mouw MB, Pintel DJ. Adeno-associated virus RNAs appear in a temporal order and their splicing is stimulated during coinfection with adenovirus. *J Virol.* 2000;74:9878–9888.
- Beniya H, Braunagel SC, Summers MD. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: subcellular localization and protein trafficking of BV/ODV-E26 to intranuclear membranes and viral envelopes. *Virology.* 1998;240:64–75.
- Williams GV, Faulkner P. Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection. In: Miller LK, editor. *The Baculoviruses*; New York: Plenum; 1997:61–107.
- Nagamine T, Kawasaki Y, Matsumoto S. Induction of a subnuclear structure by the simultaneous expression of baculovirus proteins, IE1, LEF3 and P143 in the presence of the hr. *Virology.* 2006;352:400–407.
- Nagamine T, Kawasaki Y, Abe A, Matsumoto S. Nuclear marginalization of the host cell chromatin associated with expansion of two discrete virus-induced subnuclear compartments during baculovirus infection. *J Virol.* 2008;82:6409–6418.
- Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques.* 2003;34:260–263.
- Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *J Biotechnol.* 2006;122:443–452.
- Wobus CE, Hugle-Dorr B, Girod A, Petersen G, Hallek M, Kleinschmidt JA. Monoclonal antibodies against the Adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsid domains involved in AAV-2-cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. *J Virol.* 2000;74:9281–9293.
- Luft JH. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;9:409–414.
- Rose JA, Maziel JV, Inman JK, Shatkin AJ. Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J Virol.* 1971;8:766–770.
- Berns KI. Parvoviridae: the viruses and their replication. 3rd ed. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996:2173–2189.
- Hölscher C, Kleinschmidt JA, Bürkle A. High level-expression of adeno-associated virus Rep78 or Rep68 protein is sufficient for infectious particle formation by a rep-negative AAV mutant. *J Virol.* 1995;69:6880–6885.
- Smith RH, Kotin RM. The rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3' to 5' polarity. *J Virol.* 1998;72:4874–4881.
- King JA, Dubielzig R, Grim D, Kleinschmidt JA. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO.* 2001;20:3282–3291.
- Burgess A, Ronning DR, Perez ZN, Kotin RM, Dyda F. The nuclease domain of adeno-associated virus Rep coordinates replication initiation using two distinct DNA recognition interfaces. *Mol Cell.* 2004;13:403–414.

33. Smith RH, Kotin RM. An adeno-associated virus (AAV) initiator protein, Rep78, catalyzes the cleavage and ligation of single-stranded AAV *ori* DNA. *J Virol.* 2000;74:3122–3129.
34. Chiorini JA, Yang L, Safer B, Kotin RM. Determination of adeno-associated virus rep68 and rep78 binding sites by random sequence oligonucleotide selection. *J Virol.* 1995;69:7334–7338.
35. Rohman GF. *Baculovirus Molecular Biology*. Bethesda, MD: National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2008.
36. Hoque M, Ishizu K, Matsumoto A, Han SI, Arisaka F, Takayama K, Suzuki, K, Kato K, Kanda T, Watanabe H, Handa H. Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation. *J Virol.* 1999;73:7912–7915.
37. Gallo-Ramírez, LE. Estudio de la producción de vectores de virus adeno-asociado tipo 2 en el sistema de células de insecto-baculovirus (Spanish). MSc Thesis. Mexico:UNAM;2007.
38. Chahal PS, Aucoin MG, Kamen AA. Primary recovery and chromatographic purification of adeno-associated virus type 2 produced by baculovirus/insect cell system. *J Virol Methods.* 2007;139:61–70.
39. Nash K, Chen W, Salganik M, Muzyczka N. Identification of cellular proteins that interact with the adeno-associated virus Rep protein. *J Virol.* 2009;83:454–469.
40. Aucoin MG, Perrier M, Kamen AA. Improving AAV vector yield in insect cells by modulating the temperature after infection. *Biotechnol Bioeng.* 2007;97:1501–1509.
41. Greco A. Involvement of the nucleolus in replication of human viruses. *Rev Med Virol.* 2009;19:201–214.
42. Kohlbrenner E, Aslanidi G, Nash K, ShklyaeV S, Campell-Thompson M, Byrne BJ, Snyder RO, Muzyczka N, Warrington KH, Zolotukhin S. Successful production of pseudotyped rAAV vectors using a modified baculovirus expression system. *Mol Ther.* 2005;12:1217–1225.
43. Smith RH, Spano AJ, Kotin RM. The Rep78 gen product of adeno-associated virus (AAV) self-associates to form a hexameric complex in the presence of AAV *ori* sequences. *J Virol.* 1997;71:4461–4471.
44. Owens RA, Weitzman MD, Kyöstiö SR, Carter BJ. Identification of a DNA-binding domain in the amino terminus of adeno-associated virus Rep proteins. *J Virol.* 1993;67:997–1005.

Manuscript received Aug. 3, 2010, and revision received Nov. 16, 2010.

Adeno-associated viral vector genomes replication during baculovirus infection limits DNA-containing capsid production in insect cells

Lilí E. Gallo-Ramírez, Octavio T. Ramírez and Laura A. Palomares*

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional
Autónoma de México, Apdo. Postal. 510-3, Cuernavaca Morelos CP. 62250, México.

* Corresponding author. E-mail: laura@ibt.unam.mx. Fax. +52 777 3138811

Abbreviations:

AAVv (adeno-associated viral vectors), hpi (hours post infection), MOI (multiplicity of infection), ITRs (inverted terminal repeats), qPCR (quantitative real time PCR), Cq (quantification cycle), NTC (not template control), NEG (template negative control), AAVg (adeno-associated viral genomes), Bacg (baculovirus genomes), pfu (plaque-forming units), hpi (hours post-infection), IC-BEVS (insect cell-baculovirus expression vector system), AcMNPV (Autographa californica mono-nucleopolyhedrovirus), ssDBP (single strand DNA binding protein).

Keywords: Adeno-associated virus, baculovirus, insect cells, Rep78, AAV recombinant genomes, viral DNA replication kinetics, quantitative real time PCR.

Abstract.

The insect cell-baculovirus system has become a very promising platform for Adeno-associated viral vector (AAVv) production at large scale. Process improvements have allowed reaching active AAVv specific yields comparable to those obtained in mammalian cells. Nevertheless, AAV capsid yields are 10-fold higher in insect cells than in mammalian cells, suggesting that AAV DNA containing particle production in the first system is being limited by genome replication and/or packaging. Viral genome production during baculovirus infection was studied in this work to characterize AAV DNA replication and determine possible limitations in such process. It was found that no loss of AAV genomes (AAVg) occurs in the absence of Rep78 during baculovirus replication, and that AAV genome concentration increases 10-fold when Rep78 is present. The maximal AAVg concentration reached was $5.47 \pm 1.1 \times 10^{11}$ AAVg/ 10^6 cells, which may represent a limitation to increase AAV containing particle yields as reported capsid yields have the same magnitud. No effect of the MOI of the baculovirus containing the Rep78 gene (bacRep78) on either the maximal AAVg concentration reached or AAVg rescue from baculovirus DNA was observed. However, higher Rep78 concentration increased the stability of monomeric AAVg at late times of infection. Additionally, it was seen that Rep78 degradation decreased in presence of AAVg. Our results indicate that the presence of Rep78 stimulates not only AAV DNA replication but also baculovirus DNA production starting at early times of infection. Data generated in this work will allow implementing infection and baculovirus design strategies to increase AAVg replication in insect cells.

1. Introduction.

Adeno-associated viral vectors (AAVv) have become especially important for gene therapy treatments because of their ability to transfect a wide range of cell types (reviewed in: [1]), including non-dividing cells, and inducing a low cellular immune response (reviewed in: [2]). The challenge of vector design improvement to ensure proper gene expression levels has gone along with the technological challenge of increasing production yields and vector quality in order to satisfy clinical trial requirements. Despite important improvements of vector production in mammalian cell cultures [3-8], production in mammalian cells is still limited by scalability, costs and safety issues [9-10]

The insect cell-baculovirus expression vector system (IC-BEVS) has proven to reach AAVv transducing particle specific yields comparable to those obtained in mammalian cells at low production costs and with scalability advantages [11-14]. Importantly, AAVv volumetric yields have been increased 10-fold by performing high density cultures without affecting specific yields [12]. AAVv production improvement has been mainly directed to scale up and infection strategies; although recent efforts have also focused on simplifying vector production by reducing the number of recombinant baculoviruses required [15]. AAVv production in the IC-BEVS is performed by infecting insect cells with recombinant baculoviruses expressing the AAV structural proteins VP1, VP2 and VP3, the non-structural proteins Rep78 and Rep52 (involved in DNA replication and packaging, respectively) and the recombinant vector genome flanked by the inverted terminal repeats (ITRs) of AAV [15-18].

The IC-BEVS usually allows higher protein expression levels than those obtained in mammalian cells (reviewed in: [10]). Around 10-fold higher specific yields of AAV capsids are obtained in the IC-BEVS in comparison with mammalian cells (reviewed in: [19]). As a result, total viral particles (VP) versus DNA resistant particles (DRP) ratios observed in insect cells, 60 VP/DRP [20], are near 17-fold higher than those in mammalian cells [6, 21]. In addition, it has been shown that, among all AAV components, Rep levels have the strongest impact on biologically active AAV particle yields [22]. These observations suggest that capsid production either exceeds the AAV genome (AAVg) replication and/or packaging capacity, resulting in limitations during vector assembly. Nevertheless, no studies had been performed to characterize AAVg replication or packaging in insect cells. AAVg production in insect cells requires its excision from the baculovirus genome (Bacg) through Rep78, to allow independent AAVg replication. During AAVg independent replication, monomeric genomes, dimers or larger concatamers of AAV DNA are produced [23-24], but only the first ones can be packaged into viral capsids. Resolving multimeric to

monomeric genomes requires Rep78 endonuclease activity. Therefore, Rep78 concentration should affect the ratio between these replicative forms. In this work, AAVg replication kinetics following baculovirus infection were followed to determine whether viral DNA replication limits AAVv yields, as well as to determine the effect of Rep78 concentration on AAVg production and stability of monomeric replication forms.

2. Materials and Methods.

2.1 Recombinant baculoviruses.

BacGFP and bacCap were kindly provided by R. M. Kotin, NIH [16]. BacGFP-Rep52, bacRep52 and bacRep78 were described previously [25]. BacGFP and bacGFP-Rep52 (passage 2) contain the recombinant genome of AAV. BacRep78 and bacRep52 (passage 3) were used to express the non-structural proteins Rep78 and Rep52, respectively. Meanwhile, bacCap was used to express AAV-2 structural proteins VP1, VP2 and VP3. Viral stock titers of bacGFP and bacGFP-Rep52 were determined using the Reed-Muench fifty percent endpoint method [26] by evaluating EGFP fluorescence. BacRep78, bacRep52 and bacCap were tittered using a MTT- cell viability assay [27].

2.2 Cell culture and replication of recombinant AAV genomes kinetics.

High Five® insect cells were cultured in 250 mL shake flasks with 60 mL of SF900 II medium (Invitrogen Co, Carlsbad, CA) at 27°C and 114 rpm. Infection with recombinant baculoviruses was performed at a cellular concentration of 1×10^6 cell/mL. All cultures were performed by duplicate. Samples were taken every 24 h from 0 to 120 hours postinfection (hpi), or until culture viability reached 30%. Additionally, samples were taken at 6 or 7 hpi. Cell concentration was measured using a hemacytometer, and viability was evaluated using trypan blue dye exclusion.

2.2 Viral DNA extraction.

0.5 mL or 0.75 mL of culture were used to evaluate viral DNA content in absence and presence of Rep78, respectively. Samples were centrifuged for 15 min at 630xg, and supernatants were separated from pellets. Both fractions were stored at -80°C until DNA extraction. Pellets were processed with the

DNeasy® Blood and Tissue Kit (QIAGEN), following the spin-column purification protocol of total DNA from animal tissues. Treatment with RNase A was performed. DNA was eluted from columns using 300 or 150 µL of Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 and stored at -20°C until analysis. Supernatant fractions were processed with the Easy-DNA™ Kit (Invitrogen Co, Carlsbad, CA) following the isolation of baculovirus DNA protocol. Baculovirus DNA was resuspended either in 20 or 100 µL of Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 and stored at -20°C until analysis.

2.3 DNA absolute quantification by qPCR.

DNA quality and concentration were evaluated using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and gel electrophoresis. When required, samples were diluted using nucleases-free water (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to reach a DNA concentration of 20-60 ng/µL before quantitative real time PCR (qPCR) analysis. Samples from bacGFP-Rep52 infection kinetics were analyzed using a real-time thermocycler Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science). The real-time thermocycler Stratagene MX3005P (Agilent Technologies, La Jolla CA) was used to analyze samples from bacGFP and bacRep78 co-infection kinetics. The *egfp* and *p35* genes were used to quantify AAVg and baculovirus genome (Bacg) copy number, respectively. Additionally, the *rep52* gene was used to determine the baculovirus genome copy number that contained the *rep52/78* gene. Primers used in qPCR are listed in table 1. DNA standard curves for absolute quantification were obtained using serial dilutions of pFBGR [16], TOPO-p35 and pFBRep52 plasmids. 20 µL of qPCR reactions were prepared using the Sybr® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and adding specific primers at final concentrations of 10 µM, and 1 µL of DNA sample. Reactions were performed as follows: 1 denaturing cycle (95°C x 10 min); 40 amplification cycles (95°C x 15 sec, 60°C x 30 sec, 72°C x 30 sec); 1 melting cycle (55-95°C, 1°C / 5sec). TOPO-p35 was constructed by cloning a PCR product of the AcMNPV p35 gene into the plasmid pCR®8/GW/Topo® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Primers used to generate the p35 PCR product are listed in table 1. pFBRep52 was constructed by cloning the full expression cassette of Rep52 contained in the plasmid pBDLSR [16] into pFastBac-1 (Invitrogen Co, Carlsbad, CA).

2.4 Evaluation of AAV recombinant genome rescue by Southern Blot hybridization.

DNA was run into 1% agarose gels with TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) stained with ethidium bromide. DNA was transferred to nitrocellulose Hybond membranes (GE Healthcare) by diffusion with NaOH 0.4 N for 12h. Membranes were then washed with SSC 3X buffer until pH neutralization, and pre-hybridized at 42°C for 6 h with the following mixture: 2500µL formamide, 1250µL SSC 20X (NaCl 3M, sodium citrate 300mM, pH 7.0), 250µL Denhardt's 100X solution, 20µL EDTA 0.25 M pH 8.0, 50µL Tris 1M pH 7.5, 50µL SDS 10%, 755µL H₂O and 125µL previously denatured calf thymus DNA. Hybridization was performed at 42°C for 12h with a previously denatured radioactive labeled probe specific for the egfp gene. Then, the radioactive probe was removed and membranes were washed as follows: 10 mL SSC 2X, 0.1% SDS at room temperature for 30 min; 10 mL SSC 0.1X, 0.1% SDS at 50°C for 30 min (twice), and 10 mL SSC 0.1X, 0.1% SDS at room temperature for 10 min. Radioactive labeled membranes were exposed in darkness to radiographic films (Kodak Company, Rochester, NY). Densitometry analysis of radiographic films was performed using the Molecular Image ChemiDoc™ XRS+ imaging system and the Image Lab 2.0.1 software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; USA). The DNA probe was synthesized by PCR, using the primers described in table 1, and purified using the QIAquick® PCR purification Kit (QIAGEN). Probe labeling with [α -32P]dCTP (Perking Elmer/Metrix) was performed using 200 ng of DNA and the RediPrime™ II DNA labeling system (Amersham Plc; Buckinghamshire, UK).

2.5 Rep78 expression analysis.

Rep78 expression was evaluated in pellet fractions obtained from 1 mL of infected cultures. Protein was extracted as described previously [28]. Briefly, cells were resuspended in 100 µL of lysis buffer (Tris 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, and Benzonase® 5U/million cell). Cells were disrupted by three freeze-thaw cycles and incubated 30 min at room temperature. Cells were centrifuged 15 min at 630xg, and the supernatant was collected and stored at -20°C. Rep78 was detected by Western blot using the monoclonal antibody 259.5 (Progen Biotechnik, Germany). Relative protein concentration was determined by densitometric analysis as described above.

3. Results.

3.1 qPCR standard curve development and data analysis.

Standard curves were performed using purified super-coiled plasmids. The plasmid molecule number was calculated considering DNA concentration and plasmid molecular weight obtained with the Oligonucleotide Properties Calculator software [29]. Table 2 lists the linear standard curve parameters obtained. Standard curves used for gene copy number calculation met the requirements of linearity and efficiency. Data obtained with the MX3005P instrument were processed using the MxPro-Mx3005P v4.10 software, using the adaptive baseline correction and moving average (3 amplification and dissociation averaging points) algorithm enhancements. Quantification cycle (Cq) values for viral DNA negative amplification controls were obtained using DNA extracted from non-infected cultures. Likewise, DNA extracts from cultures individually infected with bacRep78 or bacGFP were used as negative amplification controls for *egfp* or *rep52/rep78* gene copy number determination, respectively.

3.2 AAVv genome replication kinetics in absence of Rep78.

The recombinant genome of AAV is flanked by two inverted terminal repeats (ITRs) essential for the replication and packaging processes. During replication of bacGFP and bacGFP-Rep52, the AAV genomes replicate with baculovirus genomes. In this system, AAVg excision and independent replication from baculovirus DNA is expected when Rep78 is expressed. Nevertheless, previous reports show that AAVg can be excised and lost from the baculovirus DNA in absence of Rep78 during bacGFP viral stock amplification [17], probably by homologue recombination events. In order to determine the impact of AAVg “spontaneous” excision on genome production kinetics, viral DNA replication in absence of Rep78 was evaluated. Cell cultures were infected with bacGFP-Rep52 at multiplicities of infection (MOI) of 0.1, 1, 5 and 10 pfu/cell. Bacg were quantified using the p35 gene, which is contained in a single copy within the AcMNPV genome. AAVg were quantified using the *egfp* gene, contained within the recombinant AAV genome. Table 3 shows baculovirus genome and AAV genome copy number in the pellet culture fraction just after infection (0 hpi) for all the MOIs evaluated. The initial Bacg and AAVg copy numbers were proportional to the MOI employed. At all MOIs, the initial average ratio of Bacg contained in the pellet fraction per each pfu added to the culture was 11.8 ± 3.3 Bacg/pfu, while the initial average ratio

of AAVg per pfu added to the culture was 7.48 ± 1.23 AAVg/pfu. The initial average Bacg/AAVg ratio in pellet fraction was 1.66 ± 0.30 and remained constant until 96 hpi at MOIs of 0.1, 1 and 10 pfu/cell.

Bacg and AAVg replication profiles across time obtained by quantifying p35 and egfp genes, respectively, are shown in figure 1. In pellet fraction (figure 1A and 1B), maximum average concentrations of $7.14 \pm 1.18 \times 10^{10}$ Bacg copies/ 10^6 cell and $3.59 \pm 1.37 \times 10^{10}$ AAVg copies/ 10^6 cell were obtained independently of the MOI used. These concentrations were reached at 48 hpi at MOI of 0.1 pfu/cell and at 24 hpi at higher MOIs. Maximum genome concentrations remained almost constant until 72 hpi, and decreased around 15-30% at 96 or 120 hpi for all MOIs. Accumulation of Bacg and AAVg in supernatant fractions was also evaluated in order to determine whether the lack of increase of intracellular viral genomes was due to release of viral progeny to the culture supernatant (figure 1C and D). It was observed that maximum viral DNA concentrations in supernatants were reached at 96 hpi at MOIs of 0.1 and 1 pfu/cell, and at 72 hpi in cultures infected with 5 and 10 pfu/cell. Genome concentrations in supernatants represent the 30% of the maximum obtained in the pellet fraction at all MOIs, except at 10 pfu/cell, where maximal concentration in supernatant represents the 15% of that in pellet fractions. The increase of the concentration of viral genomes in supernatants correlates with the decrease in the pellet fraction. However, the increase in viral genome concentrations occurred at different times after infection. The initial average Bacg/AAVg ratio in supernatant fraction was 0.71 ± 0.25 , while Bacg/AAVg at 96 hpi was 0.99 ± 0.16 for all MOIs.

As absolute concentration values for Bacg and AAVg were slightly different, replication rates were calculated in order to compare concentration changes independently of their absolute values using equation 1. μ represents the replication rate (h⁻¹) of the evaluated gene, τ_0 and τ_1 represent initial and final time of evaluation, respectively. Viral gene concentration is represented by Vg.

$$Vg_1 = Vg_0 * e^{\mu(\tau_1 - \tau_0)} \quad (\text{equation 1})$$

In the period from 0 to 7 hpi there was no difference between the replication rates of p35, egfp and rep52 genes (μ_{p35} , μ_{egfp} and μ_{rep} , respectively) for the MOIs tested (figure 2A). No differences were observed between μ_{p35} and μ_{egfp} for each MOI tested from 7 to 24 hpi (figure 2B). In this period, μ_{rep} was

10% lower than μ_{p35} and μ_{egfp} at an MOI of 0.1 pfu/cell, although no difference was observed at other MOIs.

3.3 AAVg replication kinetics in presence of Rep78.

The non-structural proteins Rep78 or Rep68 are required for AAVg replication in vivo and in vitro [30-32]. To replicate AAVg in the IC-BEVS, Rep78 must first release the AAVg contained in the baculovirus genome to allow AAVg independent replication. Rep78 is also required to resolve the multiple replicative forms or concatamers generated during independent AAVg replication in order to produce monomeric AAVg suitable for packaging. Accordingly, it can be expected that Rep78 concentration will affect the efficiency of AAVg rescue from baculovirus DNA and the resolution of multimeric replicative forms. Therefore, we studied rescue and resolution of AAVg multimeric forms during replication in insect cells to generate useful information about possible limitations and manipulate the availability of free monomeric AAVg in this system. For this purpose, insect cell cultures were co-infected with bacGFP and bacRep78. The MOI of bacGFP was 1 pfu/mL in all cultures; while MOIs of 0.1, 1, and 5 pfu/cell of bacRep78 were tested. Additionally, cultures infected individually with bacGFP and bacRep78 at 1 pfu/cell were single infection controls.

Once again, *p35* and *egfp* were used to quantify Bacg and AAVg copy number, respectively. Bacg replication profiles in pellet fractions (figure 3A) were similar to those obtained when infecting with bacGFP-Rep52. The Bacg/pfu average ratio in pellet fractions at 0 hpi was similar to that observed in bacGFP-Rep52 infected cultures. Bacg maximum concentration was $9.09 \pm 2.57 \times 10^{10}$ copies/106cell and remained constant from 24 to 91 hpi. At 6hpi, an increase of 1 log in the Bacg concentration was observed only in cultures infected with bacRep78 at MOIs ≥ 1 ufp/cell. Maximum AAVg concentrations in the presence or absence Rep78 were $5.47 \pm 1.10 \times 10^{11}$ AAVg copies/106cell and $5.04 \pm 0.83 \times 10^{10}$ AAVg copies/10⁶cell, respectively (figure 3B). The expression of Rep78 increased AAVg concentration 10-fold in comparison with cultures only infected with bacGFP.

As expected, AAVg initial concentration was the same in all cultures because the MOI of bacGFP was kept constant. In all cultures, the initial average ratio of AAVg in the pellet fraction per pfu of bacGFP added to the culture was 8.6 ± 1.8 , similar to the one obtained with the baculovirus bacGFP-Rep52. The AAVg/Bacg ratio was calculated in cultures infected only with bacGFP in order to evaluate the AAVg spontaneous loss in this viral stock. At 0 hpi the AAVg/Bacg ratio was 1.35 ± 0.53 , and remained

practically constant until 120 hpi. The *rep78* gene copy number was also measured to quantify baculovirus genomes derived only from bacRep78. The *rep78* gene copy number in the pellet at 0 hpi was proportional to the MOI of bacRep78 employed (figure 3C). An initial average ratio of 9.6 ± 2.4 *rep78* gene copy number per each pfu of bacRep78 added to the culture was obtained. As observed for *p35* (figure 3A), the *rep78* gene copy number increased one log from 0 to 6 hpi when infecting at MOIs ≥ 1 pfu/cell of bacRep78. *rep78* gene copy number in the cell pellet reached a maximum concentration of $5.62 \pm 1.73 \times 10^{10}$ copies/ 10^6 cell in cultures infected at 0.1 pfu/cell, and $1.40 \pm 0.55 \times 10^{11}$ copies/ 10^6 cell in cultures infected at MOIs of 1 and 5 pfu/cell. A lower amount of *rep78* genomes could result in lower expression levels of this protein as observed by Western blot (figure 6).

Replication rates of AAVg, Bacg and *rep78* were also calculated (figure 4). In the period from 0 to 6 hpi, μ_{p35} and μ_{egfp} observed in cultures infected only with bacGFP were equal to those of bacGFP-Rep52 infected cultures (figure 2A). In cultures infected only with bacRep78, μ_{rep78} was equal to μ_{p35} . Nevertheless, μ_{p35} was 6-fold higher than in cultures infected only with bacGFP or bacGFP-Rep52. In the same time period co-infecting at 0.1 pfu/cell of bacRep78, μ_{p35} was the same than in cultures infected only with bacGFP, but μ_{rep78} was 4-fold higher than μ_{p35} . In cultures co-infected with bacRep78 at 1 or 5 pfu/cell, μ_{rep78} value was similar to the one observed when infecting only with bacRep78, but μ_{p35} was 25-35% lower than in cultures infected only with bacRep78. μ_{p35} represents the average replication rate of baculovirus DNA both from bacRep78 and bacGFP. Despite the fact that Rep78 seems to increase Bacg replication rate, the differences in μ_{rep78} and μ_{p35} observed in co-infected cultures can be explained by the fact when employing low MOIs baculovirus infection is not synchronous. For this reason, cells infected only with bacGFP will have a lower μ_{p35} than those co-infected with bacRep78. No significant difference between the μ_{egfp} of cultures infected individually with bacGFP and co-infected with bacRep78 was found.

In the period from 6 to 24 hpi, μ_{p35} and μ_{egfp} in cultures only infected with bacGFP were equal, but 10% lower than those observed in cultures infected with bacGFP-Rep52 during the same time period. In cultures infected only with bacRep78, μ_{p35} and μ_{rep78} were equal, but μ_{p35} was 25% lower than that in cultures infected only with bacGFP. In co-infected cultures, μ_{p35} was equal to μ_{rep78} at each MOI of bacRep78 tested. In cultures co-infected at 0.1 pfu/cell of bacRep78, μ_{p35} was equal to that obtained during infection with only bacGFP. μ_{p35} decreased 20% and 30% when co-infecting at 1 and 5 pfu/cell of bacRep78, respectively. μ_{p35} in cultures co-infected at the highest MOI of bacRep78 and cultures infected independently with bacRep78 were the same. As expected, μ_{egfp} in all co-infected cultures was

higher than in cultures infected only with bacGFP. Compared to cultures infected only with bacGFP, μ_{egfp} increased 25% when co-infecting with bacRep78 at 0.1 pfu/cell, and 35% when co-infecting with 1 or 5 pfu/cell of bacRep78.

Bacg, AAVg and *rep78* gene copy numbers in supernatant fractions were 10-fold lower than those observed when infecting with bacGFP-Rep52 (figure 3 D, E, F). In co-infected cultures, maximum AAVg concentration in supernatant was 10-fold higher than Bacg, probably due to their release after cell viability decreased. Initial Bacg and *rep78* gene copy numbers in the supernatant decreased around 70-90% after 6 hpi in all cultures infected with bacRep78. Meanwhile, AAVg decreased 60-80% in all bacGFP-bacRep78 co-infected cultures in the same period. Nevertheless, in cultures infected only with bacGFP, Bacg concentration decreased 10% and AAVg concentration remained constant in this same period.

3.4 AAVg rescue from baculovirus genome.

Using qPCR it was possible to observe that AAVg concentration increased 10-fold in cultures expressing Rep78 and that the highest AAVg concentration in all co-infected cultures was the same. Nevertheless, qPCR quantifies both monomeric and concatameric AAVg. As monomeric AAVg is required for packaging, the ratio between monomeric, concatameric and not released AAVg was determined by Southern blot from 24 to 120 hpi (figure 5). A DNA probe specific for the *egfp* gene was used. In cultures co-infected with 0.1 pfu/cell of bacRep78, the baculovirus-released AAVg fraction at 24 hpi was close to 60%, decreased to 40% at 48 hpi and remained constant until 120 hpi (figure 5A). From 24 to 48 hpi in cultures co-infected with 1 or 5 pfu/cell of bacRep78, the baculovirus-released AAVg fraction was 65 and 70%, respectively, and decreased to 55% at 72 hpi. The baculovirus-released AAVg fraction remained constant from 72 to 120 hpi in cultures co-infected at 5 pfu/cell of bacRep78, and decreased to 45% in cultures co-infected with 1 pfu/cell of bacRep78 in the same time period. At 24 hpi, near 50% of AAVg were in monomeric form in all co-infected cultures (figure 5B). In cultures co-infected at 0.1 pfu/cell of bacRep78, monomeric AAVg decreased to 20% after 48 hpi and to 10% at the end of the culture. In cultures co-infected with 1 pfu/cell of bacRep78, a linear decrease in monomeric AAVg was observed between 24 and 91 hpi, when the monomeric AAVg fraction reached 25%. Monomeric AAVg fraction in cultures co-infected with 5 pfu/cell of BacRep78 decreased to 30% at 72 hpi, remaining almost constant until 120 hpi. These results show that despite that the MOI of bacRep78 did not affect the maximum

AAVg concentration, it affected AAVg release from the baculovirus genome and monomeric AAVg stability across time.

3.5 Rep78 relative concentration in presence and absence of AAVg.

AAVg rescue from the baculovirus DNA and production of monomeric replicative forms depend on the presence of Rep78. Rep78 concentration in co-infected cultures was evaluated to determine whether it affected AAVg rescue and resolution of monomeric replicative forms. Rep78 could only be detected at 24 to 72 hpi, in pellet extracts (figure 6). The highest Rep78 relative concentration was obtained at 24 hpi in the absence of AAVg. Meanwhile, in AAVg producing cultures the lowest Rep78 concentration was reached when co-infecting with 0.1 pfu/cell of bacRep78. At 48 hpi, Rep78 relative concentration decreased 85% in cultures that did not contain AAVg. Meanwhile, in cultures that contained AAVg, Rep78 concentration decreased around 60-70%. Rep78 concentration was slightly higher in cultures co-infected with 1 and 5 pfu/cell of bacRep78 than in individually infected or co-infected at 0.1 pfu/cell cultures. Rep78 concentration in co-infected cultures with 0.1 and 5 pfu/cell remained practically constant until 72 hpi. At 72 hpi, no Rep78 was detected in individually infected cultures, and an increase in its relative concentration was observed in co-infected cultures at 1 pfu/cell. These results show that co-infection at MOIs of 1 pfu/cell of bacRep78 or higher produced the highest Rep78 concentrations. Even though the highest initial protein concentration was reached in individually infected cultures, Rep78 was more stable across time when co-infecting with bacGFP.

3.6 AAVv genome replication kinetics in quadruple infections.

Quadruple infections were performed to evaluate AAVg production when expressing all AAV components (structural viral proteins, AAVg, Rep78 and Rep52). Cultures were co-infected using 1 pfu/cell of bacCap, bacGFP and bacRep78 each, and 0, 0.1, 1 or 5 pfu/cell of bacRep52. An additional culture was co-infected with 1 pfu/cell of bacCap, bacGFP and bacRep52 each, and 5 pfu/cell bacRep78. Bacg and AAVg replication profiles (figure 7A and B) were similar to those previously observed when co-infecting only with bacGFP and bacRep78. The Bacg maximum concentration reached was near 2×10^{11} Bacg / 10^6 cell and remained constant from 24 to 96 hpi. After 6hpi, an increase of one log in Bacg concentration was observed in all cultures (figure 7A). AAVg concentration in pellet reached $6-7 \times 10^{11}$

AAVg/10⁶cell in all cultures, except when infecting with 5 ufp/cell of bacRep78, where AAVg concentration was near 1x10¹² copies/10⁶cell (figure 7B). Replication rates of AAVg, Bacg and the *rep78* gene were also evaluated (figures 7C and D). In the period from 0 to 6 hpi (figure 7C), in all cultures μ_{p35} and μ_{egfp} were equal to those previously observed when co-infecting with BacGFP and BacRep78 using an overall MOI of 6 pfu/cell. Nevertheless, μ_{rep78} decreased near 50% in comparison with double infected cultures, suggesting a higher competition for the replication machinery between the 4 different baculovirus genomes present in the culture. In the time period from 6 to 24 hpi (figure 7D), μ_{p35} and μ_{rep78} were equal to those observed in double infection using 5 pfu/cell of bacRep78, but around 40% lower than μ_{p35} of cultures infected at 0.1 pfu/cell of bacRep78 and the average μ_{max} reported by Rosinski et al. [33]. Meanwhile, μ_{egfp} decreased 20-30% in comparison to double-infected cultures. The decrease observed in Bacg replication rate in the period from 6 to 24 hpi suggests that quadruple infection increases the burden in the replication process, and that replication machinery and precursors become saturated or depleted, respectively, earlier than in double infection at the MOIs tested.

4. Discussion.

AAVv production in the IC-BEVS has proven to result in specific yields of DNA containing particles (DRP) of 10⁴ DRP/cell, similar to those commonly obtained using mammalian cells [11, 16-18, 20]. Nevertheless, AAVv specific production using mammalian cells has been increased as far as 105 DRP/cell by implementing different plasmid transfection or viral infection strategies [3, 5, 34-36]. The IC-BEVS has shown a higher capacity to produce AAV capsids in comparison to mammalian cells (reviewed in: [19]), but this capacity has been reflected only in a higher VP/DRP ratio. Additionally, DRP yields have not increased even when employing high MOIs of bacRep or bacGFP to produce Rep proteins and AAVg, respectively [22]. This suggests that AAVg replication in the IC-BEVS has reached its maximum, and that availability of monomeric AAVg might be limiting the packaging process. Nevertheless, no information about AAVg release from baculovirus, AAVg independent replication or monomeric AAVg stability had been previously reported. For this reason, the aim of this work was to characterize AAVg replication in insect cells in order to identify bottlenecks during genome replication and propose strategies to increase monomeric AAVg production. qPCR has been shown to be a robust tool to accurately quantify baculovirus [33, 37] and AAV [38] particles. To achieve this, *egfp* gene contained in the recombinant AAV genome was used to quantify AAV genome (AAVg) copy number. Otherwise, the p35 gene, codifying for

the baculovirus anti-apoptotic protein P35, was used to quantify baculovirus genome (Bacg) copy number. It has been shown that *p35* remains in baculovirus defective particles produced in bioreactors [39]. For this reason, *p35* gene can be used to evaluate baculovirus replication and to quantify total baculovirus DNA containing particles released to the culture supernatant, as well as to evaluate the quality of viral stocks used in recombinant protein production by discriminating between total viral particles and viral particles containing the recombinant protein gene.

In the IC-BEVS, AAVg replicates when baculovirus DNA does. Its rescue from the baculovirus DNA is expected only when Rep78 is expressed. Nevertheless, it has been previously reported that AAVg are lost from the baculovirus DNA in absence of Rep78 [17]. In this work, AAVg replication kinetics in absence of Rep78 were first studied in order to evaluate the impact of spontaneous AAVg excision on viral DNA replication using the viral stock passage 2 of bacGFP-Rep52. When quantifying baculovirus DNA it was found that viral DNA content in the cell pellet fraction at 0 hpi was proportional to the MOI employed (figure 1A and B), indicating that baculovirus attachment to the cell surface was not limited by cell receptors at the MOIs employed. Meanwhile, viral DNA in the supernatant fraction was 10-fold lower at the same time (figure 1C and D). It has been previously reported that almost 90% of added baculovirus remains in the supernatant fraction after 30 minutes post-infection [40], while in this work a different behavior was observed. The average Bacg/pfu ratio observed in the pellet fraction, 11.8 ± 3.3 gBac/pfu, correlates with the range of values of DNA-containing particles per pfu observed for baculovirus stocks in previous reports [41-42]. This indicates that there are no receptor-limiting conditions for baculovirus attachment when infecting with 100 DNA-containing particles per cell. Nevertheless, it does not explain such a high virus binding to cells at low times of infection considering that this process is limited by diffusion. Also, in this study it was observed that, from 72 to 96 hpi, baculovirus DNA content in the cell pellet fraction reached a maximum that remained constant until the end of the culture, and that this phenomenon was not associated to virus release to the culture supernatant, but to the offset of the replication process. Maximum Bacg concentration detected in the supernatant fraction represented 15-30% of the quantity retained in the pellet fraction, confirming that baculovirus DNA is produced in a higher quantity of what becomes packaged and buds from cells, as previously observed [33, 43]. Baculovirus DNA replication, transcription and packaging seem to be simultaneous-coordinated mechanisms. During viral DNA replication, multiple-branched genomes are produced, allowing some DNA strands to serve as template for DNA transcription, while others become packaged into capsids. It has been proposed that baculovirus DNA excess is related to the replication mechanism itself and the need to provide a high copy number of viral genomes to express late and very

late genes involved in capsid and occlusion-body formation, which would not be easily accessible for transcription if most of the genomes are packaged as soon as they are synthesized (reviewed in:[44]). The high content of intracellular baculovirus DNA may also contribute to the hyper-expression of very late viral genes and recombinant proteins. The high Bacg copy number retained in the cell pellet might explain the fact that it is still possible to obtain high yields of AAV particles containing DNA by expressing Rep78 under control of the very late promoter p10 [15, 45]. In such conditions, AAV independent replication, if occurs, could only happen at the end of the late phase. During the very late phase of infection Rep78 would rescue AAVg from unpackaged Bacg retained into the cell.

When evaluating AAVg content to determine whether spontaneous genome loss occurred, the Bacg/AAVg average ratio in the cell pellet fraction at 0 hpi (1.66 ± 0.33) showed that Bacg content was slightly higher than AAVg content. Nevertheless, this ratio remained constant until 96 hpi, denoting that no significant loss of AAVg occurred when baculovirus DNA replicated. The Bacg/AAVg average ratio in the supernatant fraction at 0 and 6 hpi was near 1 and remained constant until 96 hpi for all MOIs tested, indicating that the baculovirus progeny released to the culture supernatant contained the same AAVg copy number per Bacg as the viral stock used to infect cells. These results showed that there was no loss of AAVg in the absence of Rep78 during bacGFP-Rep52 (passage 2) DNA replication. More evidence about the joint replication of Bacg and AAVg was obtained when comparing the replication rates (μ) of the *p35*, *egfp* and *rep52* genes (figure 2). At all MOIs employed, no difference among the evaluated replication rates genes was found either at 0 to 7 hpi or from 7 to 24 hpi, indicating that when baculovirus DNA replicates, AAVg and the *rep52* gene replicate simultaneously as they are contained in the same DNA molecule and showing that there is no loss of AAVg during bacGFP-Rep52 (passage 2) DNA replication in absence of Rep78. Nevertheless, AAVg loss in stocks from higher passage number should be still studied to determine baculovirus stability. It must be highlighted that replication rates observed from 7 to 24 hpi, when infecting at 5 and 10 pfu/cell, were 25-35% lower than those obtained when infecting at the lowest MOIs tested, even when all MOIs reached the same maximum viral DNA concentration. This implies that maximum viral DNA concentration at the highest MOIs tested was reached earlier than 24 hpi, probably between 18-20 hpi as occurs when infecting the same cellular concentration at 20 pfu/cell [33]. μ_{p35} observed from 7 to 24 hpi when infecting with 0.1 and 1 pfu/cell of bacGFP-Rep52 were similar to the average viral μ_{max} previously obtained by Rosinski et al. [33]. As mentioned before, a maximum intracellular concentration of 7×10^{10} Bacg copies/ 10^6 cell was reached at

all MOIs tested, value that correlates with previous reports [33]. The fact that MOI does not affect the maximum gBac copy number but the time at which this maximum is reached suggests that DNA production is limited by DNA replication precursors. The end of viral DNA replication has been clearly related to the onset of budded-virus release [33], but no cellular limitations on DNA production have been yet determined. Results obtained from bacGFP-Rep52 individual infections corroborate previous results about intracellular viral DNA production and budded-baculovirus release [33, 43].

Viral DNA replication was also evaluated when expressing Rep78. When AAVg replicates, the ITRs form a hairpin that acts as primer for DNA elongation generating an intra-molecular duplex. To resolve this duplex Rep78/68 nick into the ITR region and generate a double-strand DNA chain that can repeat the replication process [46]. When the intra-molecular duplex is not nicked, replication can also continue to generate DNA concatamers that cannot be packaged into AAV capsids. Rep78/68 have DNA binding activity [47], ATP-dependent helicase activity [48-49], and ATP-dependent endonuclease activity that allow them to perform concatamer resolution and rescue [49]. Both proteins bind to the AAV genome on a specific motif located in the A-A' region of the ITR [48], and nick DNA in the terminal resolution site (trs) located in the D-D' arm of the ITR [50-51]). When producing AAVv in insect cells, Rep78 must first release AAVg from baculovirus DNA by nicking in the trs to allow AAVg independent replication. After this, during AAVg independent replication, Rep78 resolves multiple replicative forms generated in order to produce monomeric AAVg suitable for packaging. Accordingly, the effect of Rep78 concentration on AAVg rescue and resolution of multimeric replicative forms was evaluated in this work.

Maximum Bacg concentration in all bacRep78 infected cultures was equal to the one observed when infecting only with bacGFP-Rep52. A 10-fold increase in Bacg concentration was observed after 6 hpi in all bacRep78 infected cultures but not in bacGFP individually infected cultures. Such an increase was not expected at that early time after infection as it has been shown that baculovirus DNA replication starts around 5-6 hpi [52]. Analysis of the viral DNA in supernatant fractions revealed a reduction of 70-90% in Bacg concentration after 6 hpi, probably as a result of baculovirus uptake by cells. Nevertheless, the amount of Bacg absorbed from the supernatant only represents 10% of the initial Bacg concentration in pellet fraction. Thus, baculovirus absorption could not explain such an increase in Bacg concentration in cellular pellet fractions. As this phenomenon was not observed in cultures individually infected with bacGFP-Rep52 or bacGFP stocks, it might be possible that Rep78 expression is promoting baculovirus DNA replication. Previous reports have shown that Rep78 affects replication of other viruses, such as

herpesvirus (HSV) [53] or adenovirus (Ad) [54] by interacting directly with their viral DNA. Then, direct interaction between Rep78 and baculovirus DNA is also possible. It has also been reported that Rep78 interacts with a wide variety of cellular and viral proteins involved in DNA replication and transcription [55-58], including DNA binding proteins of Ad and HSV [57]. Therefore, Rep78 could be interacting with insect cell proteins involved in DNA replication or even with baculovirus proteins that form the replication scaffold at the virogenic stroma. It was previously shown that Rep78 accumulates mainly in the central zone of the nucleus of insect cells, the site where virogenic stroma locates and baculovirus DNA replication takes place [25]. This suggests that Rep78 could be interacting with some of the proteins involved in the nuclear sub-compartmentalization necessary to support viral DNA replication [59], inducing an increase in baculovirus DNA replication rate at early times post-infection.

As observed, the maximum AAVg concentration ($5.47 \pm 1.1 \times 10^{11}$ AAVg/ 10^6 cells) was the same in all cultures co-infected with bacRep78, independently of the MOI used. Considering that AAV capsid yields obtained in insect cells are around 7×10^{11} capsids/ 10^6 cells [20], it can be assumed that AAVg replication represents a limitation for DRP production. Similarly, at 24 hpi AAVg rescue from baculovirus DNA and monomeric AAVg production was practically the same in all co-infected cultures. Nevertheless, after this time monomeric AAVg fraction decreased considerably in cultures co-infected with 0.1 pfu/cell of bacRep78, and a more gradually with 1 and 5 pfu/cell of bacRep78. Previous reports have proven that viral DNA replication stops around 20 hpi when employing high MOIs [33]. In this work viral DNA replication after 24 hpi was observed only when infecting at 0.1 pfu/cell. Accordingly, the decrease in baculovirus-released and monomeric AAVg fractions after 24 hpi must be due to degradation of the monomeric AAVg form, and not to an increase of the replication of AAVg integrated into baculovirus DNA. It has been reported that baculovirus ssDNA is degraded by an alkaline nuclease coded by the virus and that it becomes protected from degradation by forming complexes with the ssDBP LEF-3 [60-61]. Therefore, it is possible that AAVg becomes protected because of its direct interaction with Rep78.

Considering a protective effect of Rep78 on AAVg it was necessary to evaluate Rep78 concentration at different MOIs. In bacRep78, Rep78 expression is controlled by an attenuated *iE1* promoter ($\Delta iE1$) [16]. Thus, protein production stops at the end of the late phase of infection. Accordingly, the highest protein concentrations for all MOIs were detected at 24 hpi. After this time, an important reduction in Rep78 concentration was observed in all cultures (figure 6), indicating protein degradation. Nonetheless, Rep78 concentration in cultures co-infected using 0.1 pfu/cell of bacRep78 were always lower than those one of cultures co-infected using higher MOIs of bacRep78, possibly due to the lower amount of

rep78 containing genomes observed at 0.1 pfu/cell, resulting in lower expression levels of this protein. These results suggest that higher Rep78 concentrations promote a higher protection of monomeric AAVg from degradation. Inversely, it was observed that Rep78 was degraded more rapidly in cultures that did not contain AAVg than in cultures containing AAVg. This corroborates previous observations using immuno-fluorescence that showed that Rep78 intracellular concentration decreased more rapidly when expressed in absence of AAV genomes or capsid proteins [25]. Together, these results suggest a mutual-protection relationship between Rep78 and monomeric AAVg. Additionally, it must be highlighted that at 72 hpi, when the maximum concentration of AAV capsids is reached [12, 20, 22], the monomeric AAVg fraction becomes reduced from 50% at 24 hpi, to 30-20%. This possibly leads to deficiencies in the packaging process due to a low availability of monomeric genomes.

The low amounts of *rep78* containing genomes observed in cultures coinfecting with BacGFP and BacRep78 at 0.1 pfu/cell, as well as the differences observed among μ_{p35} , μ_{rep78} and μ_{egfp} , suggested an effect of competition during DNA replication. For this reason, even when Rep78 seemed to increase baculovirus DNA replication, low amounts of *rep78* containing genomes were obtained at the lowest BacRep78 MOI. During DNA synthesis, genomes derived from each baculovirus compete for the replication machinery. DNA replication is an exponential process, thus, the initial amount of each baculovirus genomes will be the main variable affecting individual baculovirus genome replication rates (considering that genome length is practically the same for both recombinant viruses). On the other hand, the presence of baculovirus-released AAVg will add a competitor for the replication machinery and DNA precursors. Length of AAVg used in this work is 2.65 Kbp, 49-fold smaller than baculovirus genome which would lead to expect a much higher AAVg replication rate in comparison with Bacg replication rate. However, as observed in double-infected cultures, during AAVg independent replication μ_{egfp} was 25% higher than that one observed when replicating baculovirus-associated AAVg. Additionally, no differences in maximal Bacg reached and μ_{p35} were observed after AAVg independent replication indicating that, as expected, baculovirus DNA replication is much more favored by replication machinery and thus, AAVg does not represent an important competitor. The 10-fold increase in Bacg concentration after 6hpi observed during double and quadruple infection also denotes that, unlike Bacg, AAVg replication is also limited by a low amount of DNA copies at the beginning of the exponential replication phase.

Considering the information obtained in this work it becomes necessary to develop infection strategies and recombinant baculovirus design strategies directed to impulse AAVg replication and stability in order to increase vector DRP yields. Accordingly, AAVg/Bacg ratio should be increased at the beginning of the replication process in order to impulse AAVg replication. This could be addressed by reducing the number of recombinant baculoviruses required to produce AAVv and by generating new baculoviruses including the AAV genome in concatameric form. Besides, Rep78 production at early times post infection need to be increased and further extended until the very late phase of infection in order to avoid protein concentration decrease and monomeric AAVg degradation across time.

5. Acknowledgments

Authors thank to Dr. Robert M. Kotin (NIH) for kindly providing pFBGR and pFBDSLRS plasmids to construct recombinant baculoviruses. Authors acknowledge María Soledad Moreno León, Ana Ruth Pastor Flores and Vanessa Hernández for technical assistance, and Professors Guadalupe Espin and Edmundo Calva for providing access to facilities for radioactive material handling. Authors acknowledge financial support by PAPIIT-UNAM IN223805 and IN223210, and SEP-CONACyT 46225-Z and 2008-01-101847. Gallo-Ramírez received support from scholarship CONACyT 169462.

6. Bibliography.

1. Grimm, D. and M.A. Kay, From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2003. 3(4): p. 281-304.
2. Zaiss, A.K. and D.A. Muruve, Immune responses to adeno-associated virus vectors. *Curr Gene Ther*, 2005. 5(3): p. 323-31.
3. Xiao, X., J. Li, and R.J. Samulski, Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol*, 1998. 72(3): p. 2224-32.
4. Feudner, E., et al., Optimization of recombinant adeno-associated virus production using an herpes simplex virus amplicon system. *J Virol Methods*, 2001. 96(2): p. 97-105.
5. Zhang, H.G., et al., Recombinant adenovirus expressing adeno-associated virus cap and rep proteins supports production of high-titer recombinant adeno-associated virus. *Gene Ther*, 2001. 8(9): p. 704-12.

6. Toubanc, E., et al., Identification of a replication-defective herpes simplex virus for recombinant adeno-associated virus type 2 (rAAV2) particle assembly using stable producer cell lines. *J Gene Med*, 2004. 6(5): p. 555-64.
7. Park, J.Y., et al., Scalable production of adeno-associated virus type 2 vectors via suspension transfection. *Biotechnol Bioeng*, 2006. 94(3): p. 416-30.
8. Durocher, Y., et al., Scalable serum-free production of recombinant adeno-associated virus type 2 by transfection of 293 suspension cells. *J Virol Methods*, 2007. 144(1-2): p. 32-40.
9. Aucoin, M.G., J.A. Mena, and A.A. Kamen, Bioprocessing of baculovirus vectors: a review. *Curr Gene Ther*, 2010. 10(3): p. 174-86.
10. Palomares L. A. , E.-M.S., Ramírez O.T., Principles and applications of the insect-cell-baculovirus expression vector system., in *Cell culture technology for pharmaceutical and cellular applications.*, H.W.S. Ozturk S., Editor. 2005, CRC Press: New York. p. 627-692.
11. Negrete, A. and R.M. Kotin, Production of recombinant adeno-associated vectors using two bioreactor configurations at different scales. *J Virol Methods*, 2007. 145(2): p. 155-61.
12. Mena, J.A., et al., Improving adeno-associated vector yield in high density insect cell cultures. *J Gene Med*, 2010. 12(2): p. 157-67.
13. Meghrous, J., et al., Production of recombinant adeno-associated viral vectors using a baculovirus/insect cell suspension culture system: from shake flasks to a 20-L bioreactor. *Biotechnol Prog*, 2005. 21(1): p. 154-60.
14. Negrete, A., G. Esteban, and R.M. Kotin, Process optimization of large-scale production of recombinant adeno-associated vectors using dielectric spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007. 76(4): p. 761-72.
15. Smith, R.H., J.R. Levy, and R.M. Kotin, A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. *Mol Ther*, 2009. 17(11): p. 1888-96.
16. Urabe, M., C. Ding, and R.M. Kotin, Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther*, 2002. 13(16): p. 1935-43.
17. Kohlbrenner, E., et al., Successful production of pseudotyped rAAV vectors using a modified baculovirus expression system. *Mol Ther*, 2005. 12(6): p. 1217-25.
18. Urabe, M., et al., Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol*, 2006. 80(4): p. 1874-85.
19. Aucoin, M.G., M. Perrier, and A.A. Kamen, Critical assessment of current adeno-associated viral vector production and quantification methods. *Biotechnol Adv*, 2008. 26(1): p. 73-88.

20. Aucoin, M.G., M. Perrier, and A.A. Kamen, Improving AAV vector yield in insect cells by modulating the temperature after infection. *Biotechnol Bioeng*, 2007. 97(6): p. 1501-9.
21. Drittanti, L., et al., Optimised helper virus-free production of high-quality adeno-associated virus vectors. *J Gene Med*, 2001. 3(1): p. 59-71.
22. Aucoin, M.G., M. Perrier, and A.A. Kamen, Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: optimization of baculovirus concentration ratios. *Biotechnol Bioeng*, 2006. 95(6): p. 1081-92.
23. Duan, D., et al., Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol*, 1998. 72(11): p. 8568-77.
24. Yang, J., et al., Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination. *J Virol*, 1999. 73(11): p. 9468-77.
25. Gallo-Ramírez, L.E., O.T. Ramirez, and L.A. Palomares, Intracellular localization of adeno-associated viral proteins expressed in insect cells. *Biotechnol Prog*, 2011. 27(2): p. 483-93.
26. Reed, L.J. and H. Muench, A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS. *American Journal of Epidemiology*, 1938. 27(3): p. 493-497.
27. Mena, J.A., O.T. Ramirez, and L.A. Palomares, Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques*, 2003. 34(2): p. 260-2, 264.
28. Chahal, P.S., M.G. Aucoin, and A. Kamen, Primary recovery and chromatographic purification of adeno-associated virus type 2 produced by baculovirus/insect cell system. *J Virol Methods*, 2007. 139(1): p. 61-70.
29. Kibbe, W.A., OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(Web Server issue): p. W43-6.
30. Ni, T.H., et al., In vitro replication of adeno-associated virus DNA. *J Virol*, 1994. 68(2): p. 1128-38.
31. Ward, P., et al., Adeno-associated virus DNA replication in vitro: activation by a maltose binding protein/Rep 68 fusion protein. *J Virol*, 1994. 68(9): p. 6029-37.
32. Tratschin, J.D., I.L. Miller, and B.J. Carter, Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J Virol*, 1984. 51(3): p. 611-9.
33. Rosinski, M., S. Reid, and L.K. Nielsen, Kinetics of baculovirus replication and release using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng*, 2002. 77(4): p. 476-80.
34. Gao, G.P., et al., High-titer adeno-associated viral vectors from a Rep/Cap cell line and hybrid shuttle virus. *Hum Gene Ther*, 1998. 9(16): p. 2353-62.

35. Ogasawara, Y., et al., Efficient production of adeno-associated virus vectors using split-type helper plasmids. *Jpn J Cancer Res*, 1999. 90(4): p. 476-83.
36. Qiao, C., et al., A novel gene expression control system and its use in stable, high-titer 293 cell-based adeno-associated virus packaging cell lines. *J Virol*, 2002. 76(24): p. 13015-27.
37. Hitchman, R.B., et al., Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles. *Biotechnol Bioeng*, 2007. 96(4): p. 810-4.
38. Mayginnes, J.P., et al., Quantitation of encapsidated recombinant adeno-associated virus DNA in crude cell lysates and tissue culture medium by quantitative, real-time PCR. *J Virol Methods*, 2006. 137(2): p. 193-204.
39. Kool, M., et al., Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties. *Virology*, 1991. 183(2): p. 739-46.
40. Dee, K.U. and M.L. Shuler, A mathematical model of the trafficking of acid-dependent enveloped viruses: application to the binding, uptake, and nuclear accumulation of baculovirus. *Biotechnol Bioeng*, 1997. 54(5): p. 468-90.
41. Shen, C.F., J. Meghrous, and A. Kamen, Quantitation of baculovirus particles by flow cytometry. *J Virol Methods*, 2002. 105(2): p. 321-30.
42. Jorio, H., R. Tran, and A. Kamen, Stability of serum-free and purified baculovirus stocks under various storage conditions. *Biotechnol Prog*, 2006. 22(1): p. 319-25.
43. Roldao, A., et al., Modeling rotavirus-like particles production in a baculovirus expression vector system: Infection kinetics, baculovirus DNA replication, mRNA synthesis and protein production. *J Biotechnol*, 2007. 128(4): p. 875-94.
44. Rohrmann, G., DNA replication and genome processing in Baculovirus *Molecular Biology*. 2011, National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD).
45. Chen, H., Intron splicing-mediated expression of AAV Rep and Cap genes and production of AAV vectors in insect cells. *Mol Ther*, 2008. 16(5): p. 924-30.
46. Berns, K.I., Parvoviridae, in *Fields Virology*, D.M.H. Knipe, Peter M., Editor. 2007, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 2437-2477.
47. Owens, R.A., et al., Identification of a DNA-binding domain in the amino terminus of adeno-associated virus Rep proteins. *J Virol*, 1993. 67(2): p. 997-1005.
48. Chiorini, J.A., et al., Biologically active Rep proteins of adeno-associated virus type 2 produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *J Virol*, 1994. 68(2): p. 797-804.
49. Im, D.S. and N. Muzyczka, The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell*, 1990. 61(3): p. 447-57.

50. Chiorini, J.A., et al., Determination of adeno-associated virus Rep68 and Rep78 binding sites by random sequence oligonucleotide selection. *J Virol*, 1995. 69(11): p. 7334-8.
51. Chiorini, J.A., et al., Sequence requirements for stable binding and function of Rep68 on the adeno-associated virus type 2 inverted terminal repeats. *J Virol*, 1994. 68(11): p. 7448-57.
52. Tjia, S.T., E.B. Carstens, and W. Doerfler, Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus II. The viral DNA and the kinetics of its replication. *Virology*, 1979. 99(2): p. 399-409.
53. Glauser, D.L., et al., Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by adeno-associated virus rep proteins depends on their combined DNA-binding and ATPase/helicase activities. *J Virol*, 2010. 84(8): p. 3808-24.
54. Timpe, J.M., K.C. Verrill, and J.P. Trempe, Effects of adeno-associated virus on adenovirus replication and gene expression during coinfection. *J Virol*, 2006. 80(16): p. 7807-15.
55. Ward, P., et al., Role of the adenovirus DNA-binding protein in in vitro adeno-associated virus DNA replication. *J Virol*, 1998. 72(1): p. 420-7.
56. Nash, K., et al., Identification of cellular proteins that interact with the adeno-associated virus rep protein. *J Virol*, 2009. 83(1): p. 454-69.
57. Stracker, T.H., et al., The Rep protein of adeno-associated virus type 2 interacts with single-stranded DNA-binding proteins that enhance viral replication. *J Virol*, 2004. 78(1): p. 441-53.
58. Bevington, J.M., et al., Adeno-associated virus interactions with B23/Nucleophosmin: identification of sub-nucleolar virion regions. *Virology*, 2007. 357(1): p. 102-13.
59. Nagamine, T., Y. Kawasaki, and S. Matsumoto, Induction of a subnuclear structure by the simultaneous expression of baculovirus proteins, IE1, LEF3, and P143 in the presence of hr. *Virology*, 2006. 352(2): p. 400-7.
60. Mikhailov, V.S., et al., *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus encodes a DNA-binding protein capable of destabilizing duplex DNA. *J Virol*, 1998. 72(4): p. 3107-16.
61. Mikhailov, V.S., A.L. Vanarsdall, and G.F. Rohrmann, Isolation and characterization of the DNA-binding protein (DBP) of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 2008. 370(2): p. 415-29.

Tables.

Table 1. Primers used in qPCR analysis and cloning.

Primer code	Gene	Sequence	Amplicon size, bp
RT-egfp ^{†a}	<i>egfp</i>	5' GGG CAC AAG CTG GAG TAC A3' 5' ATG TTG TGG CGG ATG TTG AAG 3'	101
RT-p35 [†]	<i>p35</i>	5' TTG ATG GCG AAC AAT TTG AAG AG 3' 5' GTT TTT CGA CGC TTC GTT GTA A 3'	98
RT-Rep [†]	<i>rep52/78</i>	5' ACT CAC GGA CAG AAA GAC TGT TTA G 3' 5' CCA TGA TAT GAT GAA TGT AGC ACA G 3'	100
P35-topo ^b	<i>p35</i>	5' CCG GTA GAA ATC GAC GTG TC 3' 5' TTG CCC CAG CTC GAT TCT G 3'	730

[†]: used in qPCR. ^a: used to generate the DNA probe for Southern blot analysis. ^b: used to generate TOPO-p35 plasmid. All oligonucleotides were synthesized at Instituto de Biotecnología-UNAM Synthesis Unit.

Table 2. Standard curve validation parameters.

Gene	Instrument	Dynamic Range (copies/rx)	Efficiency (%)	m	b	r ²	C _q of NTC	C _q of NEG (Pellet)	C _q of NEG (Sup.)
<i>p35</i>	Rotor-Gene	10 ² -10 ⁸	100	-3.333	35.933	0.998	39.1	27.21	33.25
<i>egfp</i>	Rotor-Gene	10 ² -10 ⁸	96	-3.428	38.640	0.998	37.33	27.93	36.82
<i>rep</i>	Rotor-Gene	10 ² -10 ⁸	92	-3.542	37.300	0.999	35.23	27.68	34.72
<i>p35</i>	MX3005P	1.24x10 ² -10 ⁸	97.5	-3.383	35.71	0.998	35.05	27.29	32.28
<i>egfp</i>	MX3005P	1.13 x 10 ² -10 ⁸	97.8	-3.376	38.66	0.999	37.27	26.43	29.0
<i>rep</i>	MX3005P	1.08 x 10 ² -10 ⁸	97.5	-3.383	36.73	0.996	37.85	27.30	34.31

C_q: quantification cycle. NTC: Not template control. NEG: Template negative amplification control. Sup: Supernatants.

Table 3. Viral DNA yields at 0 hpi of pellet fraction in cultures infected with bacGFP-Rep52.

MOI (pfu/cell)	pfu/mL added	Bacg/mL (p35 copies/mL)	AAVg/mL (egfp copies/mL)	Bacg/AAVg (p35/egfp)
0.1	1 x10 ⁵	(1.12 ± 0.22) x10 ⁶	(5.53 ± 0.83) x10 ⁵	2.03 ± 0.51
1	1 x10 ⁶	(1.26 ± 0.48) x10 ⁷	(6.26 ± 0.67) x10 ⁶	2.01 ± 0.79
5	5 x10 ⁶	(5.17 ± 0.55) x10 ⁷	(4.52 ± 0.54) x10 ⁷	1.14 ± 0.18
10	1 x10 ⁷	(1.30 ± 0.52) x10 ⁸	(8.84 ± 2.34) x10 ⁷	1.48 ± 0.71

Bacg: baculovirus genomes. AAVg: AAV recombinant genomes.

Figure captions.

Figure 1. Viral DNA production kinetics in cultures infected with bacGFP-Rep52 in cell pellets (A, B) and culture supernatants (C, D). *p35* and *egfp* genes were used to quantify baculovirus and AAV genomes, respectively.

Figure 2. *p35* (A), *egfp* (B) and *rep52* (C) replication rates in the pellet fraction of cultures infected with bacGFP-Rep52 calculated in periods from 0-7 hpi and 7-24 hpi.

Figure 3. Viral DNA production profile in High Five cell culture infected with bacGFP and bacRep78. A-C: Cell pellets. D-F: Culture supernatants. *p35* and *egfp* genes were used to quantify baculovirus and AAV genomes, respectively. *rep78* gene was used to quantify bacRep78 genomes.

Figure 4. *p35* (A), *egfp* (B) and *rep78* (C) gene replication rates in pellet fractions of cultures infected with bacGFP and/or bacRep78 calculated in periods from 0-6 hpi and at 6-24 hpi.

Figure 5. Baculovirus-released AAV genomes (A) and monomeric AAV genomes fractions (B) in cultures infected with bacGFP and bacRep78.

Figure 6. Rep78 relative concentration in cultures infected with bacGFP and/or bacRep78.

Figure 7. Replication profiles of baculovirus DNA (A), and *p35*, *egfp* and *rep78* gene replication rates (B) in pellet fraction during quadruple infection.

Figures.

Figure 1.

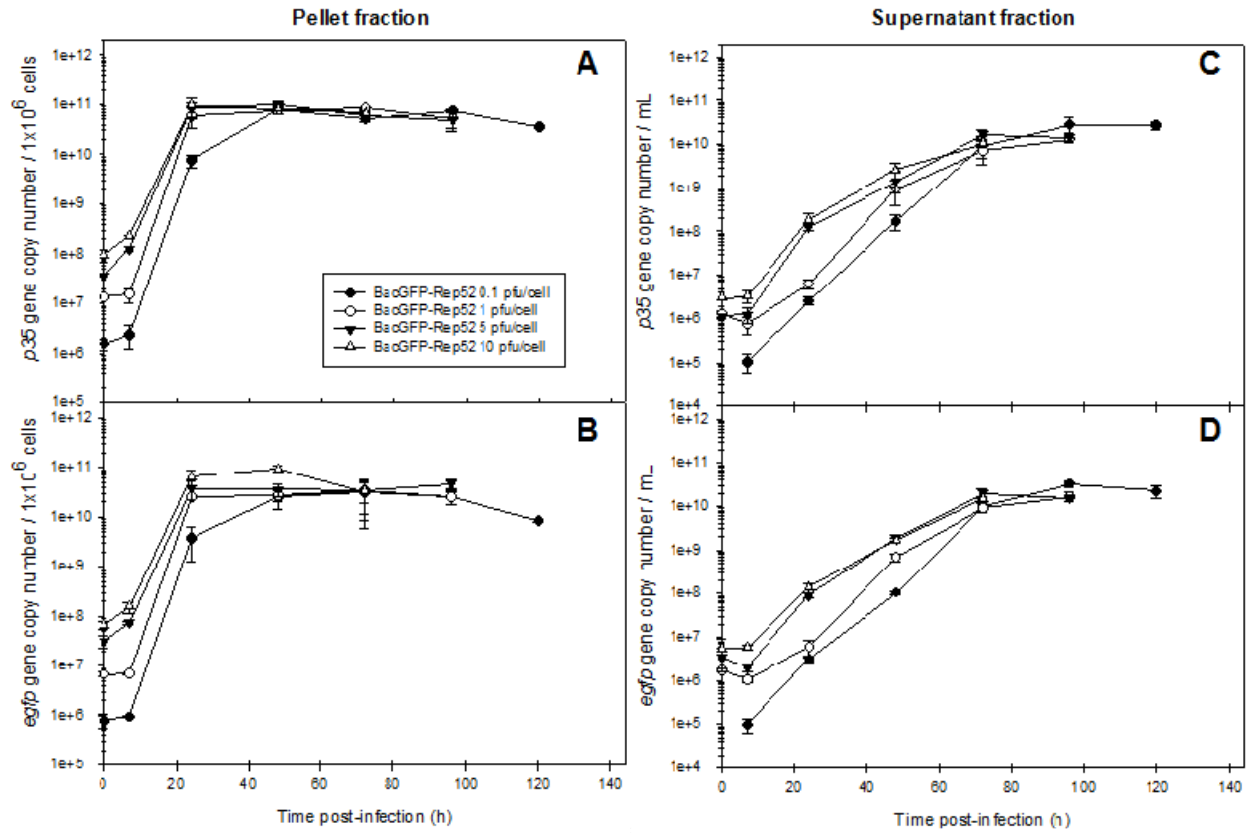


Figure 2.

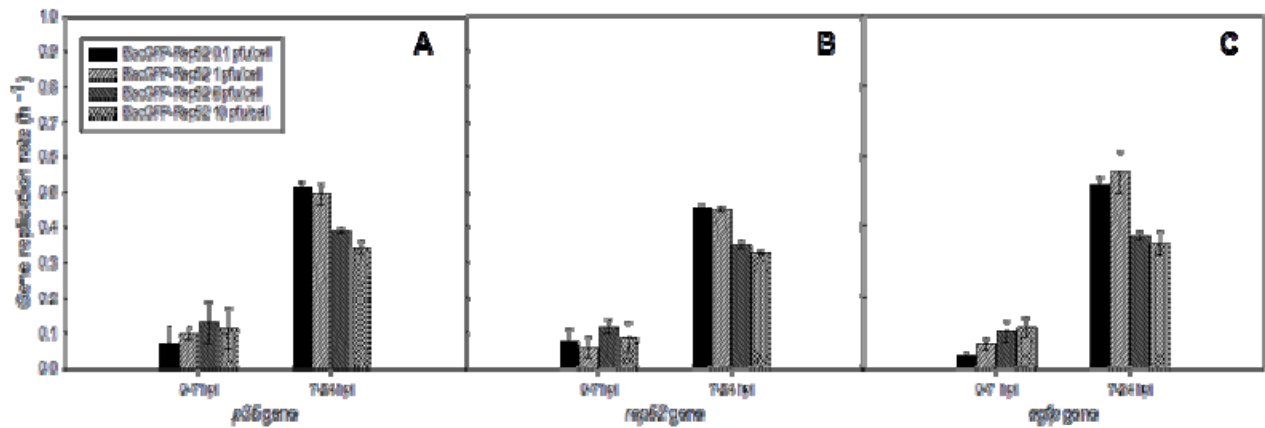


Figure 3.

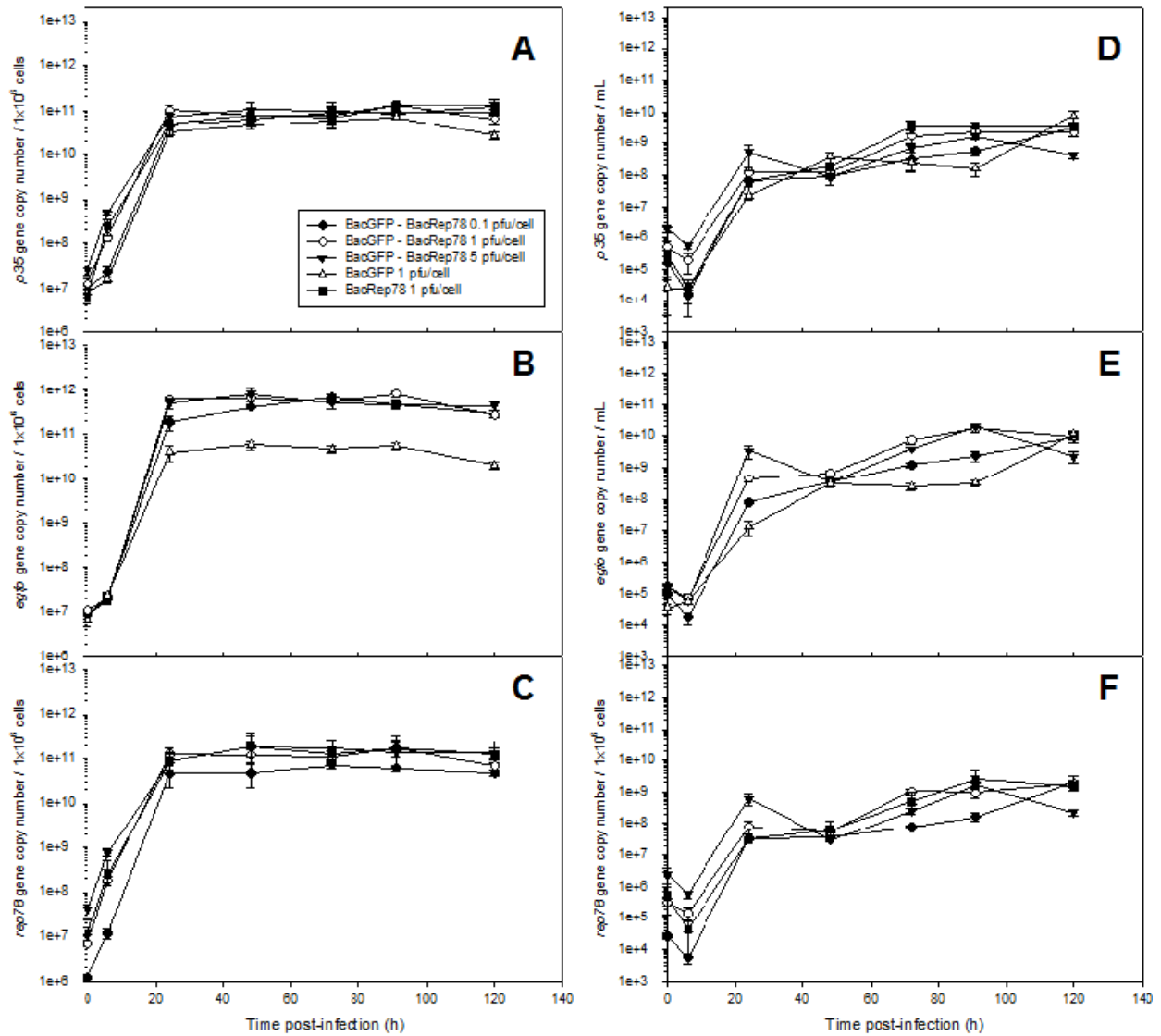


Figure 4.

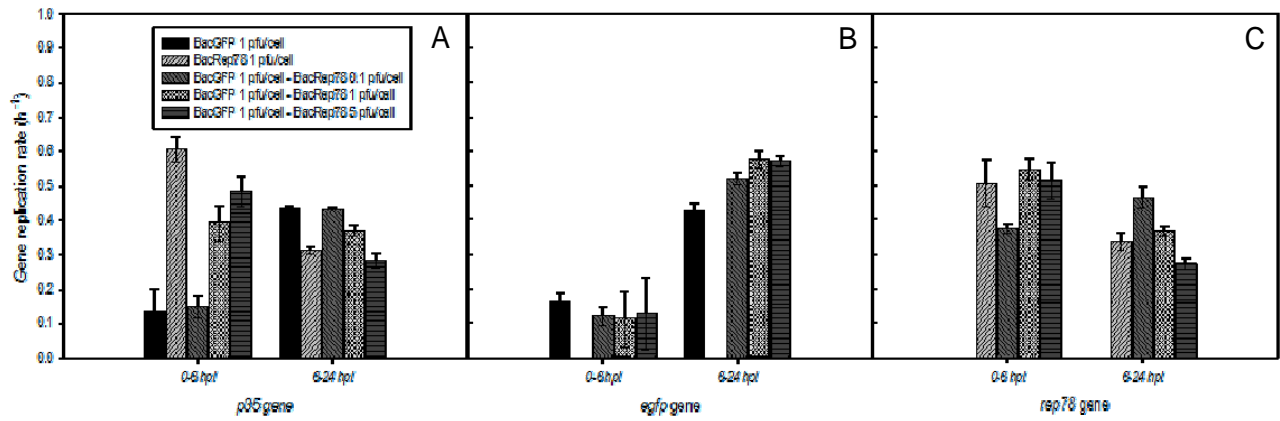


Figure 5.

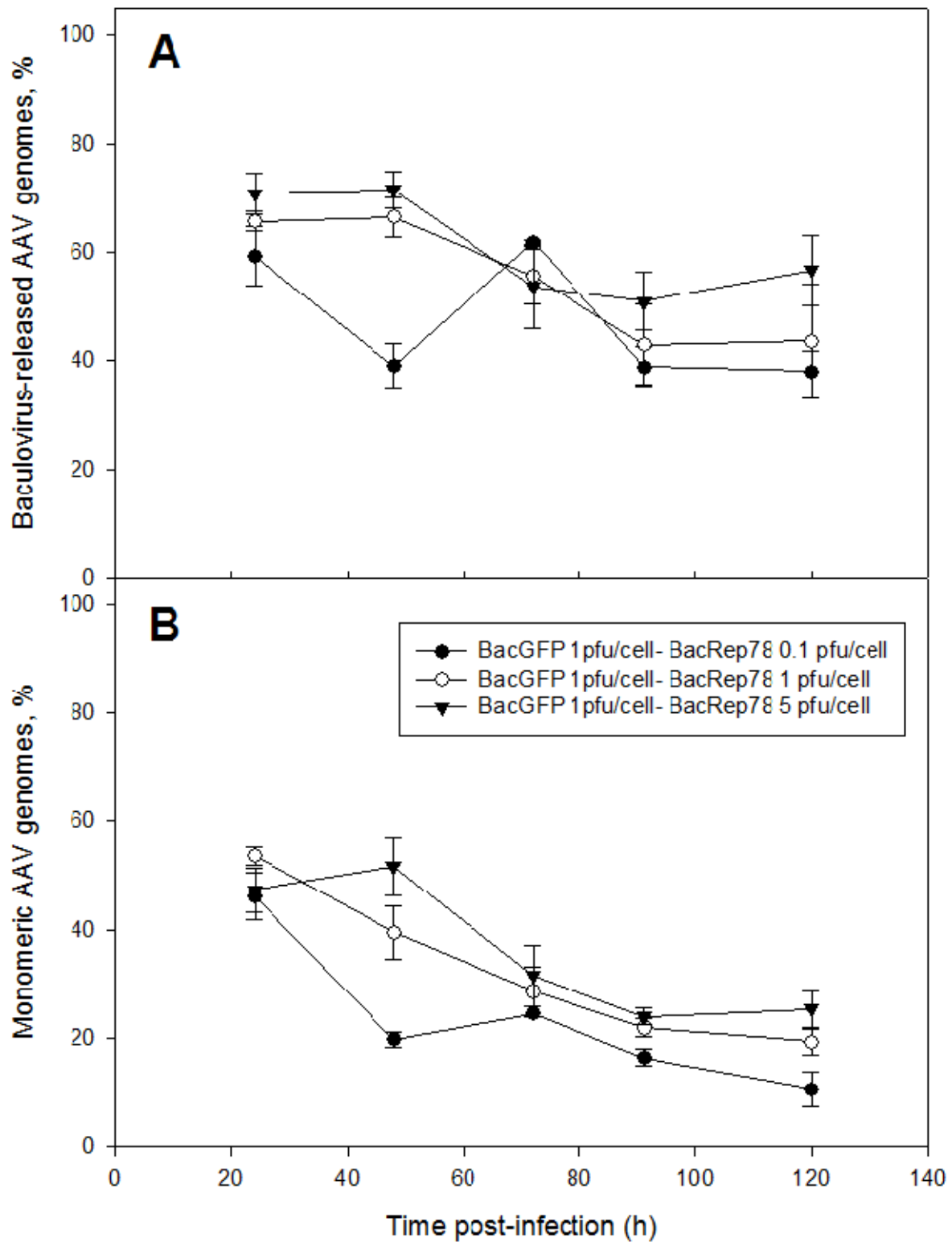


Figure 6.

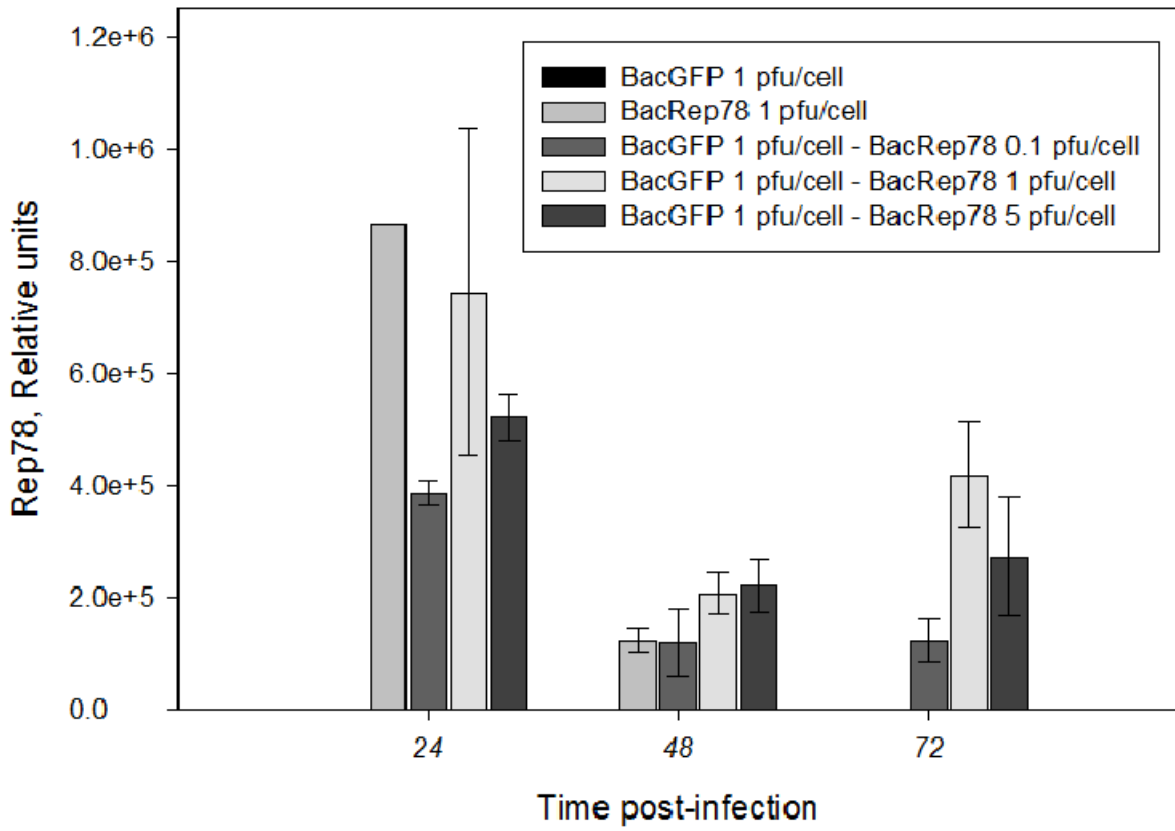


Figure 7.

