

UCH-FC
Biotecnología
G 216
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE



Universidad de Chile-Facultad de Ciencias-Escuela de pregrado

AISLAMIENTO DEL COMPLEJO DE PRE-INTEGRACION DEL
VIRUS DE LA LEUCEMIA MURINA

Seminario de título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Francisco Javier García de Gracia

Directora del seminario de título:

Dra. Mónica Acevedo Acevedo

Co-Director:

Oscar Leon Decap

Patrocinante:

Dr. Marcelo Baeza

Marzo de 2015

Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

FRANCISCO JAVIER GARCÍA DE GRACIA

“AISLAMIENTO DEL COMPLEJO DE PRE-INTEGRACION DEL VIRUS DE LA LEUCEMIA MURINA”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dra. Mónica Acevedo Acevedo
Director Seminario de Título

Dr. Oscar León Decap
Co-Director Seminario de Título



Dr. Marcelo Baeza Cancino
Prof. Patrocinante del Seminario

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Daniela Sauma Mahaluf
Presidenta

Dra. Nicole Tischler
Evaluadora

Santiago de Chile, junio de 2016

Biografía

Francisco Javier García de Gracia nació un 6 de septiembre de 1988 en Santiago, Chile. Criado junto a su hermano Florencio por sus padres Florencio y Monserrat, los cuatro han vivido siempre en Santiago y son muy cercanos al resto de la familia. Francisco estudió su enseñanza básica en el Instituto Zambrano ubicado en la comuna de Estación Central, la enseñanza media la cursó en el Liceo Juan Bosco de Salesianos de Alameda en Santiago Centro.



Terminado el cuarto medio entró al Programa de Bachillerato de la Universidad de Chile, para posteriormente ingresar a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la misma universidad. Una vez finalizada la licenciatura comenzó con el trabajo de tesis que fue postergado debido a que ingresó al Doctorado en Ciencias, con mención microbiología de la Universidad de Chile-Universidad de Santiago de Chile, grado que se encuentra cursando actualmente.

A mis padres

y hermano

Agradecimientos

Deseo agradecer a mis padres Monserrat de Gracia Sepúlveda y Florencio García Correa y a mi hermano Florencio García de Gracia por su apoyo incondicional en cada una de las etapas de mi vida, a mi familia por estar siempre presentes y ser tan unidos en todas las circunstancias. A mis amigos del colegio, bachillerato, carrera, laboratorios y doctorado por apoyarme, hacerme reír y acompañarme en este largo proceso.

Quiero agradecer a la mis compañeros del laboratorio que me recibieron el año 2011, a Manuela, Deborah y Manuel, al personal técnico del laboratorio, Rosita y Mane y a todos los que se integraron en los años posteriores, Johanna, Jorge y a los profesores Oscar León y principalmente a Mónica Acevedo por su apoyo, comprensión y paciencia.

Finalmente, quiero agradecer a todos los que hicieron esto posible y que me presionaron de una u otra forma para terminar esta etapa de mi carrera.

Índice

Índice de Tablas	vii
Índice de Figuras.....	vii
Índice de abreviaturas	viii
Resumen.....	xi
Abstract.....	xiii
Introducción	1
Virus de la Leucemia Murina.....	1
Ciclo replicativo:	2
Complejo de pre-integración.....	5
Terapias Génicas	9
Hipótesis.....	12
Objetivos	12
Materiales:	13
Materiales y reactivos:	13
Métodos:.....	14
Cultivos Celular y vectores	14
Producción, Concentración y titulación del pseudotipo de Mo-MLV	14
Infecciones	17
Lisis celular	18
PCR en tiempo real (RT-PCR).....	19
Preparación de columnas AminoLink® Plus Immobilization Kit y purificación de muestras.....	20
Purificación de PICs.....	20
Resultados.....	23
Generación de virus.....	23
Titulación y eficiencia del método de concentración.....	23
Formación del PIC	26
Purificación de PIC	30
Discusión	33

Conclusiones.....	40
Referencias.....	40

Índice de Tablas

Tabla I: Comparación de títulos virales	27
---	----

Índice de Figuras

Figura 1 :Estructura viral y genoma pro-viral	3
Figura 2 : <i>Ciclo replicativo</i>	6
Figura 3: Elementos genéticos de vectores.....	10
Figura 4: Vectores utilizados en la generación del pseudotipo de Mo-MLV	16
Figura 5: <i>infeccion de células</i>	24
Figura 6: <i>Titulación viral</i>	25
Figura 7: <i>Validación del método de $2^{\Delta\Delta Ct}$ de cuantificación relativa</i>	29
Figura 8: <i>Cinética del PIC en el citoplasma celular</i>	31
Figura 9: <i>Precipitación de PIC</i>	32
Figura 10: <i>Preparación de columnas</i>	34
Figura 11: <i>Concentración de ADNv</i>	35

Índice de abreviaturas

ADN: Acido desoxirribonucleico

ADNdh: ADN de doble hebra

ADNv: ADN viral

ARN: Acido ribonucleico

ARNsh: ARN de simple hebra

ARNv: ARN viral

Att: sitio de acoplamiento

BET: Bromodominio y extraterminal

CA: Capside

CAT-1: Transportador de aminoácidos catiónicos 1

Ct: Cicle Threshold

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EDTA: Ácido Etildiaminotetraacético

env: Envoltura

gag: Gen-specific antigen

GFP: Green fluorecent protein

hpt: horas post-transducción

INI: Integrase Interactor

LMO2: Lim Domain only 2.

LTR: *Long terminal repeat*

LEDGF/p75: *lens epithelium-derived growth factor/transcription co-activator p75*

MA: Matriz

MH: mitochondrial

MLV: *Murine leukemia virus*

Mo-MLV: *Moloney Murine leukemia virus*

MOI: Multiplicity of infection

NC: Nucleocapside

PBS: phosphate-buffered saline.

PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PIC: *Pre-integration complex*

pol: polimerasa

RTC: *Reverse Transcription Complex*

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VSV: Virus de la estomatitis vesicular

VSV-G: Glicoproteina del VSV.

Resumen

El virus de la leucemia murina es un Gammaretrovirus, que infecta a las especies murinas y puede generar cáncer. Sus glicoproteínas de superficie reconocen al transportador de aminoácidos catiónicos presente en la superficie celular, luego al penetrar al interior de las células y su genoma de ARN de hebra simple positiva es retrotranscrito a ADN de doble hebra. El complejo nucleoproteico formado por el ADN genómico viral y proteínas virales y celulares es denominado complejo de pre-integración. Debido a la ausencia de interacciones del complejo con factores de importación nuclear y a la presencia de una capsida proteica altamente estable, este complejo debe aguardar hasta el desensamblaje de la membrana nuclear para aproximarse al genoma celular y catalizar la integración. Una vez integrado el genoma viral comienza la expresión de los genes virales que producen las proteínas necesarias para la formación de nuevas partículas virales, la cual se ensambla en la membrana citoplasmática y una vez en el exterior el virus madura por la actividad de la proteasa viral.

A diferencia de otros retrovirus, como el virus de la inmunodeficiencia humana que codifican proteínas accesorias, el virus de la leucemia murina solo codifica proteínas estructurales, por esta razón este virus se agrupa dentro de los retrovirus "simples" y se convirtió en un modelo de estudio de la familia Retroviridae. Debido a su simpleza y capacidad integrativa ha sido utilizado en la generación de vectores virales con el objetivo de utilizarlos en terapia génica.

Durante el ciclo replicativo el complejo de pre-integración es el encargado de la integración del ADN viral en el genoma celular incluida la elección del sitio de integración, sin embargo aún no se ha dilucidado su composición ni estequiometría. Las proteínas virales que componen el complejo son: la integrasa, capsida y transcriptasa reversa.

El objetivo de este trabajo es el aislamiento del complejo de pre-integración para la posterior identificación de las proteínas celulares que lo componen.

En una primera etapa se construyó un pseudotipo del virus Moloney de la leucemia murina con la glicoproteínas de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular, lo que permitió desarrollar un sistema de estudio de la replicación en células humanas. Luego procedimos a caracterizar la formación del complejo en el citoplasma, para esto se transdujeron células 293T y se lisaron a diferentes horas post-transducción y mediante PCR en tiempo real se cuantificó el ADN viral. Con esto se determinó que a las 16 horas post transducción es posible recuperar la mayor cantidad de complejo. Finalmente se aisló el complejo mediante sedimentación en solución a baja fuerza iónica y columnas de afinidad, con lo que se obtuvieron tres elusión con complejo de pre-integración

Abstract

The Murine Leukemia Virus is a Gammaretrovirus that infect murine species and can produce cancer. Their surface glycoproteins interact with a cationic aminoacids transporter of the cellular surface, then penetrate to the cytoplasm and the viral single strand RNA is retrotranscribed to double strand DNA. The nucleoprotein complex composed by the viral DNA, viral and cellular proteins is denominated pre-integration complex. Because this complex can not interact with nuclear import factors and the presence of a stable viral capsid the nuclear membrane must break out to allow the integration of the viral DNA to the cellular genome. After the integration, began the gene expression and the synthesis of the proteins necessities for the formations of new viral particles, who assembly in the cytoplasmic membrane and maturate outside of the cells for the activity of the viral protease.

Unlike other virus, like Human Immunodeficiency Virus, the Murine Leukemia Virus do not encode accessory proteins, for that is denominate a "simple" retrovirus and is a good model to study the family Retroviridae. Due to this and their integrative capability had been used to generate viral vectors for gene therapy.

In the replicative cycle the pre-integration complex allows the integration of the viral DNA in the cellular genome including the site selection, however his fully composition and stoichiometry is still unknow.

The aim of this work is the isolation of the pre-integration complex for the subsequent identification of the cellular protein.

First, we constructed a pseudotype of the virus with the glycoproteins of the envelope of the vesicular stomatitis virus, with this we develop a model to study the replication in human cells line. Then we proceed to characterize the formation of the complex in the cytoplasm, for this we transduct 293T cell line and then we lysis at different time post-transduction and we quantify the vDNA using real time PCR. Our result indicates that at 16 hours post transduction is possible to recuperate the mayor quantity of the complex. Finally, the complex was isolated using sedimentation with low ionic strength solutions and affinity column and we got three elutions with the complex.

Introducción

Virus de la Leucemia Murina (Mo-MLV)

El virus de la leucemia murina (MLV), pertenece a la familia de los retrovirus, subfamilia de los ortoretrovirus y genero de los Gammaretrovirus, siendo uno de los más simples. El virus es pleomórfico, con un diámetro aproximado entre 100-120 nm. La envoltura está compuesta por una bicapa lipídica proveniente de la célula productora de virus, por su cara externa se encuentran las glicoproteínas virales y por la interna la proteína de la matriz. En el interior de la partícula viral encontramos la capsida donde se encuentra el genoma viral asociado a la nucleocapsida y las proteínas con función catalítica, como la transcriptasa reversa, integrasa y proteasa (Figura 1A). El genoma viral consiste en una secuencia ARN de hebra simple de polaridad positiva que expresa tres genes: *gag*, *pol* y *env* (Rein, A. 2011), los cuales codifican para las poliproteínas Gag, Pol y Env, respectivamente.

El gen *gag* codifica para las proteínas de la estructura interna del virus, que a diferencia de otros virus pertenecientes a la subfamilia de los ortoretrovirus que poseen a la matriz (MA), la capsida (CA) y la nucleocapsida (NC), el *gag* de MLV codifica además una proteína denominada p12, ubicada entre MA y CA (Rein, A. y col. 1986). Otra diferencia que presenta MLV es que en algunas ocasiones se aprecia una forma alternativa de Gag llamada "glyco-Gag". Dicha proteína difiere en el extremo N-terminal, ya que su traducción es iniciada por un codón CUG localizado 264 bases río arriba del codón de

iniciación “tradicional” (Prats, A. y col. 1989). Por otro lado los productos de la escisión de la poliproteína codificada por el gen *pol* incluyen a las enzimas proteasa (PR), transcriptasa inversa (RT) e integrasa (IN). Finalmente el gen *env* codifica las proteínas de la envoltura denominadas gp70^{SU} y p15E^{SU} (Figura 1B)(Rein, A. y col 1986).

En los extremos del genoma pro-viral podemos encontrar regiones no codificantes denominadas “Long Terminal Repeat” (LTR) los cuales se sub-dividen en U3, R y U5. A continuación de la región U5 del 5'LTR, rio arriba del codón de inicio de *gag/pol*, se encuentran las secuencias del sitio de unión de partidores, donador de splicing mayor y la señal de empaquetamiento (ψ) (Figura 1B). Al final de *pol* y *env* encontramos el sitio aceptor de splicing y la señal “polypurine tract”, respectivamente. Otros sitios que se observan en el genoma pro-viral son el acoplamiento de la integrasa (*att*), señal de encapsulación y de poliadenilación (5' y 3' respectivamente) (Figura 1B). La composición y características del genoma del virus fueron revisados en Maetzig y col. 2011.

Ciclo replicativo

El ciclo replicativo del MLV (Figura 2) está dividido en dos fases denominadas temprana y tardía. La fase temprana comienza con la unión entre la glicoproteína de la superficie del virus, (a través de su dominio de unión al receptor), al transportador de aminoácidos catiónicos (CAT-1) de las células blanco (Albritton, L. y col 1989; Kim, J. y col. 1991), esta interacción con el receptor permite una serie de cambios conformacionales en la glicoproteína viral incluyendo la reducción de puentes disulfuros,

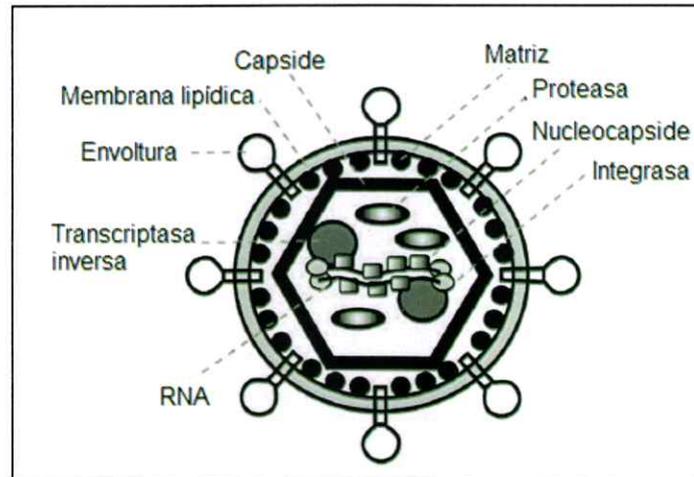
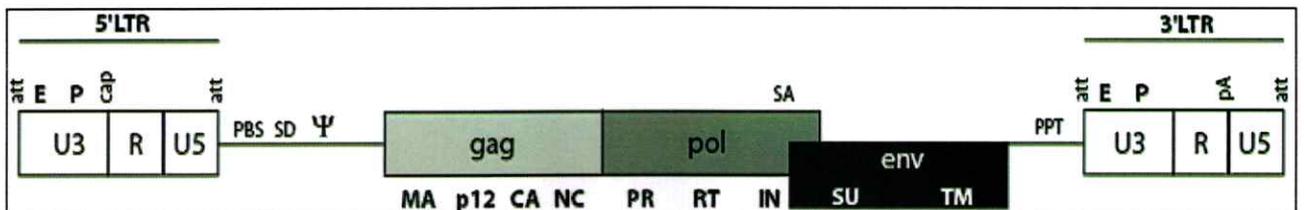
A**B**

Figura 1 :Estructura viral y genoma pro-viral. **A**, Estructura de Mo-MLV con las proteínas que lo componen (cápside, matriz, proteasa, nucleocápside, integrasa, transcriptasa inversa, proteína de la envoltura) membrana lipídica de envoltura y genoma de ARN. **B**, Genoma pro-viral. Se observan los extremos terminales repetidos largos (LTR) conformados por las regiones U3, R y U5. En estos se encuentran el sitio de acoplamiento (att), sitio de “capping” en el extremo 5’ (cap), además del promotor (P), potenciador (E) y la señal de poliadenilación (pA) en el 3’LTR. Luego en las zonas no traducibles se observan los sitios de unión de cebadores (*PBS*), donador de empalme (*SD*) y señal de empaquetamiento (Ψ) y el tracto de polipurina (ppt). Encontramos a los genes de las poliproteínas *gag* (Ma, matriz; p12; CA, capside; NC, nucleocápside), *pol* (PR, proteasa; RT, transcriptasa inversa; IN, integrasa), *env* (glicoproteína de la superficie; *SU*, superficie; *TM*, transmembrana) y el sitio aceptor de empalme (*SA*) (Modificadas de Maetzig y col. 2011).

lo que desencadena la exposición del péptido de fusión de la proteína a la superficie del virus para su posterior inserción en la membrana celular y posterior fusión de membranas. La fusión de membranas permite la entrada de la cápside viral, las proteínas estructurales y el genoma viral al citoplasma celular (Rein, A. 2011). Luego, en el citoplasma se forma el complejo de transcripción inversa (RTC, del inglés *reverse transcription complex*), cuya función consiste en la transcripción del ARN de simple hebra de polaridad positiva a un ADN de doble hebra por la acción de la enzima transcriptasa inversa. El RTC está conformado por proteínas virales como la capsida, nucleocapsida, p12, integrasa, transcriptasa inversa y proteínas celulares (Fassati & Goff 1999; Risco y col. 1995).

Una vez obtenido el ADN viral (ADNv) el RTC se denomina complejo de pre-integración (PIC, del inglés *pre-integration complex*), el cual permite la integración del genoma viral en el ADN celular y al igual que el RTC está conformado tanto por proteínas virales como celulares (Bowerman, B. y col 1989). Existe evidencia que indica que el movimiento del PIC desde el citoplasma al núcleo es a través de microtubulos (Kim, W. y col, 1998; McDonald, D. y col 2002; Ploubidou & Way, 2001). Debido a la presencia de la cápside y a la falta de elementos de importación nuclear, el PIC de MLV no es capaz de entrar al núcleo, por lo tanto el PIC no puede aproximarse al genoma celular hasta que la célula comience a dividirse y a desarticular la membrana nuclear (Roe, T. y col 1993). Una vez que el PIC está en contacto con el genoma la integrasa retroviral promueve la integración.

A continuación, la fase tardía comienza con la transcripción del genoma viral por la acción del promotor ubicado en la región U3 del 5'LTR. El ARN viral (ARNv) es

exportado al citoplasma, traducido y las proteínas virales solubles, se dirigen hacia la membrana celular. Las proteínas que interaccionan con la membrana son modificadas post-traduccionalmente permitiéndoles anclarse a estas, en particular la poliproteína gag/pol, sufre miristación en un sitio de la matriz (Rein y col., 1986; Schultzt & Rein 1989). En el caso de las proteínas de la envolturas estas requieren modificaciones del tipo palmotilación para interactuar con la membrana (Li y col., 2002). La partícula viral se ensambla, se encapsula y ocurre la gemación de la nueva partícula viral desde la membrana celular, se ha descrito que este proceso ocurre en balsas lipídicas enriquecidas en colesterol (Li y col., 2002; Beer y col., 2005). Una vez afuera comienza la etapa de maduración mediada por la acción de la proteasa retroviral (Figura 2).

Complejo de pre-integración

Como ya se mencionó anteriormente el PIC juega un rol clave en la fase temprana de la infección viral, es el complejo encargado en el transporte del ADNv (recientemente retrotranscrito) al genoma celular y favorecer su integración. Si bien la integrasa cataliza esta reacción (Hindmarsh y Leis 1999) existen otros factores celulares que también participan. El virus codifica pocas proteínas, por lo tanto es incapaz de realizar por si solo todas las funciones que necesita durante la infección, por consiguiente utiliza proteínas celulares que permiten su progresión a través del ciclo replicativo. Entre las funciones que son complementadas encontramos la protección contra degradación y autointegración, direccionamiento y entrada al núcleo.

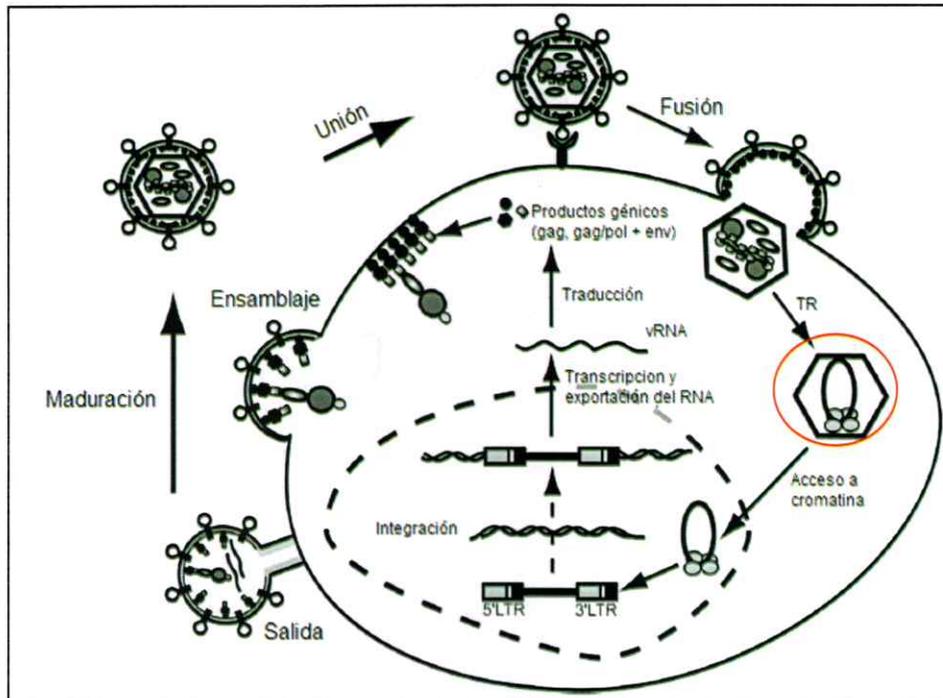


Figura 2 : Ciclo replicativo del Virus de la Leucemia Murina. La partícula viral reconoce los receptores de membrana celular, luego se produce la fusión de ambas membranas y la entrada de las proteínas virales y el genoma al citoplasma. En el citoplasma el genoma de ARN de simple hebra es retrotranscrito a ADN de doble hebra, se forma el complejo de pre-integración (señalado con círculo rojo) el cual durante la división celular entra al núcleo e integra el genoma viral. Posteriormente comienza la producción de proteínas virales, ensamblaje de la nueva partícula a nivel de membrana plasmática, salida y maduración (Modificado de Maetzig y col., 2011).

Se ha propuesto que proteínas celulares favorecerían la integración en determinados sitios del genoma, ya que si bien es ampliamente aceptado que la integración es más probable en zonas transcripcionalmente activas, que son de cromatina abiertas, se ha encontrado que cada retrovirus posee diferentes sitios predilectos de integración, por lo tanto la accesibilidad no sería el único factor que influye en la ubicación final del ADNv integrado (Bushmann y col., 2005). Hoy se conocen algunas de las proteínas que forman parte del complejo de otro retrovirus, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

En el PIC de VIH se han encontrado las proteínas del grupo de alta movilidad, cuya función estaría relacionada con la unión covalente del ADNv con el genoma celular (Farnet & Bushman, 1997); el factor barrera de auto-integración, el cual es un polipéptido de 89 aminoácidos que es el responsable de evitar la autointegración del genoma viral (M. S. Lee & Craigie, 1998); la proteína Ku80, cuya función es reparar rupturas en el ADN, durante la infección es requerida para la circularización del ADNv luego de la retrotranscripción y en su ausencia la infección genera citotoxicidad (Li y col., 2001); la proteínas de localización nuclear Importina $\alpha 3$, que participaría en la entrada del PIC al núcleo (Ao y col., 2010). La proteína *Integrase Interactor 1*, la primera proteína demostrada en interactuar con la integrasa (Kalpana, G. y col 1994), además, la entrada del virus desencadena su salida del núcleo y colocaliza con el PIC (Turelli y col., 2001). Sin embargo aún no se conoce con certeza su función en las etapas tempranas de infección. Aunque se ha propuesto que al interactuar con la integrasa, esta última se estabiliza en una conformación más compacta disminuyendo la flexibilidad de los dominios, de esta manera se previenen las interacciones no específicas con otras proteínas

y la autointegración (Maillot y col., 2013). Por último el *lens epithelium-derived growth factor/transcription co-activator p75* (LEDGF/p75), un componente fundamental del PIC del VIH, ya que se ha demostrado su importancia en la localización del PIC en el núcleo (Maertens y col., 2003; Llano, y col., 2004; Llano y col., 2006; Shun y col., 2007), su acción protectora frente a la degradación proteosomal (Llano, Delgado, y col. 2004) y lo más importante, es que estaría implicada en la elección del sitio de integración (Ciuffi y col. 2005).

En el caso de MLV se han realizado estudios de doble híbrido de interacción de integrasa con proteínas murinas y los resultados revelaron interacciones con factores de remodelación de cromatina, reparación de ADN y activadores transcripcionales (Studamire & Goff, 2008). A nivel de PIC se identificó a las proteínas BAF (Suzuki & Craigie, 2002) y Ku80 (Li y col. 2001). Por otro lado se ha demostrado que la proteína LEDGF/p75 no está presente y no interactúa con MLV, solo se ha visto su interacción con complejos de pre-integración de lentivirus (Busschots, K., y col., 2005; Llano y col. 2006).

Recientemente se ha descubierto que las proteínas pertenecientes a la familia de dominio bromo- y extraterminal (BET) no solo unen específicamente la integrasa de los gammaretrovirus, a través de su dominio extraterminal, sino que su sobreexpresión dirige el PIC al núcleo y aumenta la integración (Gupta y col. 2013). Se demostró que estas proteínas son las encargadas de dirigir la integración del ADNv (De Rijck y col. 2013; Sharma y col. 2013), cumpliendo el rol que tiene LEDGF/p75 en los lentivirus. Incluso

la eliminación de la interacción de la integrasa con la proteínas BET, ha permitido redireccionar los sitios de integración en el genoma celular (El Ashkar y col. 2014).

Terapias génicas

Desde la década de los '80 los retrovirus se han utilizado como un método de transferencia de genes con potenciales usos en terapia génica debido a que son capaces de integrar su genoma en el cromosoma de las células infectadas (Hwang & Gilboa, 1984; Wei, C y col. 1981). Desde entonces se han generado diferentes vectores virales basándose en los distintos miembros de la familia *Retroviridae*, entre estos el virus de la leucemia murina (Gilboa, E. y col 1982; Tabin, C. 1982). El vector viral es básicamente una partícula viral no replicativa capaz de proveer un gen de interés a un tipo celular específico, por el cual tiene tropismo debido a sus glicoproteínas de superficie. Su generación es posible utilizando tres vectores (Figura 3). Los primeros dos vectores codifican las proteínas estructurales para la producción de la partícula viral, es decir, uno codifica las poliproteínas Gag/Pol y el otro para las proteínas de la envoltura y el tercero mantiene la señal de empaquetamiento (ψ), el PBS y LTR (Maetzig, T. y col, 2011).

Hace algunos años se procedió a utilizar en humanos un vector viral basado en MLV, los pacientes eran menores de edad que sufrían una inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X, sin embargo el 25% de los pacientes desarrollaron leucemia (Salima Hacein-Bey-Abina y col. 2003). Se determinó que la leucemia se debió a la integración del gen de interés en regiones cercanas al locus *LMO-2* lo que indujo su

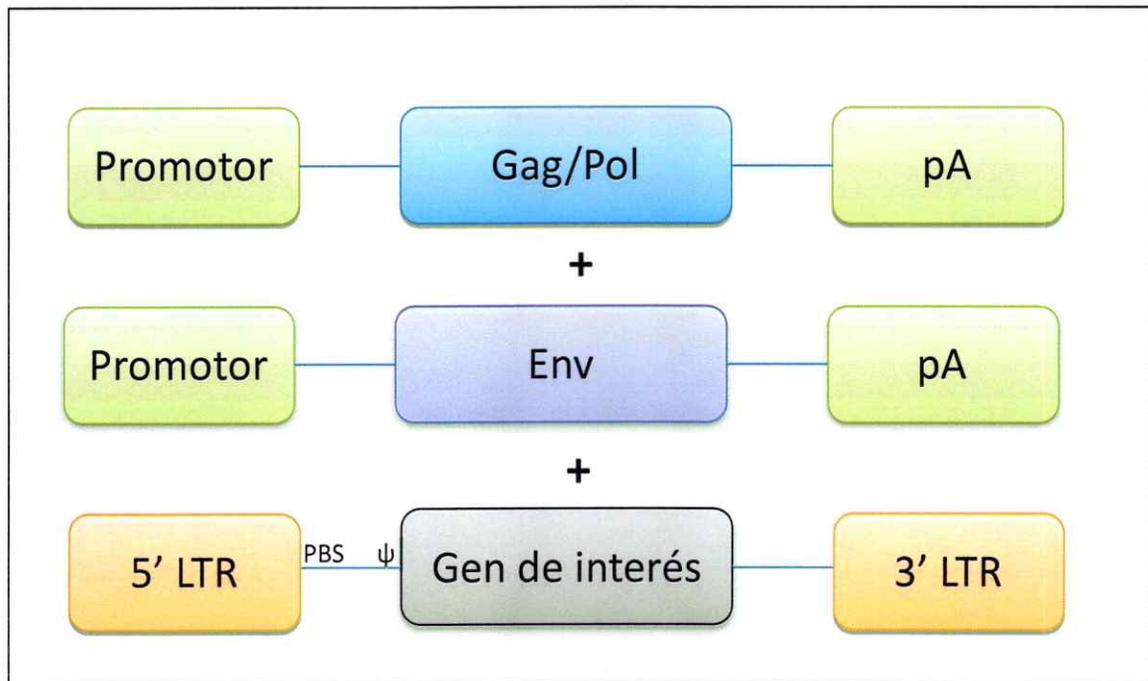


Figura 3: Elementos genéticos de vectores. El primero elemento, sintetiza las poliproteínas Gag y Pol, el segundo codifica Env y el tercer vector posee el gen de interés rodeado por los LTR y las señales PBS y

ψ.

expresión, la proliferación celular y con esto el cáncer (S Haccin-Bey-Abina y col. 2003; Salima Haccin-Bey-Abina y col. 2003).

Por esta razón es necesaria la búsqueda de los factores celulares relevantes en la selección del sitio de integración. En esta oportunidad nos centraremos en las proteínas celulares que forman parte del PIC debido a que se ha descrito en otros virus que son sus componentes, particularmente proteínas celulares, los que dirigen al genoma a integrarse en ciertos sitios del genoma (Maertens y col. 2003) y si bien se encontró que las proteínas BET cumplen esta función en MLV, aún hay procesos que no han sido dilucidados. De esta manera la identificación de las proteínas celulares que forman parte de este complejo nos permitirá conocer los factores que participan en la integración, permitiendo optimizar esta etapa y disminuyendo los riesgos asociados al tratamiento.

En este trabajo se construyó un pseudotipo del virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV) que posee la glicoproteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (de ahora en adelante Mo-MLV-VSV-G) y es capaz de infectar e integrar su genoma viral en líneas células humanas. Se caracterizó su ciclo replicativo midiendo la formación del PIC en el tiempo, determinando el momento de mayor concentración en el citoplasma para luego proceder con su aislamiento.

Hipótesis

Es posible aislar el complejo de pre-integración desde células transducidas con un pseudotipo del virus de la leucemia murina de moloney para la posterior identificación de sus componentes proteicos.

Objetivos

Objetivo general:

-Obtener el complejo de pre-integración de un pseudotipo Mo-MLV.

Objetivos específicos:

-Desarrollar un pseudotipo de Mo-MLV que contenga la proteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular y que sea capaz de transducir la línea celular humana, 293T.

-Determinar la cinética de formación del PIC en el citoplasma celular, mediante PCR cuantitativo del ADNv.

-Aislar los PIC mediante sedimentación en solución a baja fuerza iónica e inmunoprecipitación utilizando columnas de afinidad con anticuerpo anti-capside.

Materiales:

Materiales y reactivos:

Los componentes del medio celular como el *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), HEPES, penicilina y estreptavidina, aminoácidos no esenciales (Glicina, L-Alanina, L-Asparagina, L- Acido Aspartico, L-Acido Glutámico, L-Prolina, L-Serina) L-glutamina y el suero fetal bovino se obtuvieron de *HyClone*. De *US biological* se obtuvo el EDTA, sal dihidrato disodico y HEPES. El anticuerpo que reconoce a la proteína capsida se obtuvo de *GenScript*, los inhibidores de proteasa de *Roche*, la glicina y el Tris Base se obtuvieron de *Calbiochem*. De *Thermo Scientific* se compró el *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* y el *AminoLink® Plus Immobilization Kit*. Los partidores fueron comprados a *IDT*. De *Qiagen* utilizamos la RNasa A y el Plasmid Midi kits, de BD son el extracto de levadura, la triptona, el agar y facs flow, de Invitrogen utilizamos el *PureLink™ Quick PCR Purification Kit* y de *Ambion* la DNasa Turbo. Otro kit utilizado fue el *ProFection® Mammalian Transfection System-Calcium Phosphate* que provenía de Promega.



Métodos:

Cultivos celular y vectores

La línea celular 293T fue mantenida a 37°C con CO₂ al 5% en medio DMEM pH 7,2 suplementado con Hepes 2,38 g/L, penicilina a 10.000 Unidades/ml, estreptomycin a 10.000 µg/ml, aminoácidos esenciales (Glicina, L-Alanina, L-Asparagina, L- Acido Aspartico, L-Acido Glutámico, L-Prolina, L-Serina), L-glutamina 2mM, suero fetal bovino (inactivado) al 10%. Los vectores utilizados en la producción del Mo-MLV-VSV-G fueron el pVSV-G, que codifica la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular; pTG5349, que expresa las poliproteínas Gag y Pol de MLV y pRETROQ, que codifica la secuencia de la proteína fluorescente verde (GFP, en inglés) flanqueada por los dos LTR de Mo-MLV (Figura 4).

Producción, concentración y titulación del pseudotipo de Mo-MLV

La producción de Mo-MLV se realizó mediante la transfección transitoria de la línea celular 293T con fosfato de calcio utilizando el kit *ProFection® Mammalian Transfection System-Calcium Phosphate* (Promega), siguiendo el protocolo del fabricante. Las cantidades de los vectores utilizados fueron las siguientes: 4 µg de pVSV-G; 9,2 µg de pTG5349 y 12 µg de pRETROQ. A las 16 horas post-transfección (hpt) se cambió el medio de cultivo por medio fresco. Posteriormente, a las 48 hpt, se recuperó el virus centrifugando el medio a 1.750 x g por 5 minutos a 4°C y se recuperó el

sobrenadante, 10 ml. Para la concentración del virus se utilizó el método de Kohno, T. y col. (2002) con algunas modificaciones. Se utilizó el BufferPEG (40% polietilenglicol 10.000 [PEG 10.000], 0,9% NaCl), el cual se mezcló con el medio que contiene el virus en una proporción 1:1 y se incubó por 16 horas a 4°C.

Finalizada la incubación se procedió a centrifugar la mezcla durante 20 minutos a 7.500 x g a 4°C eliminando el sobrenadante con células y se resuspendió el pellet con virus en 1 ml de medio de cultivo. Finalmente la solución que contiene el virus se trató con DNasa (Promega), debido a la presencia de vector en el medio lo que afecta la cuantificación mediante PCR cuantitativo (PCRc), a una concentración final de 50U/ml por 1 hora a 37°C y luego se almacenó el virus a -80°C hasta el momento de la infección.

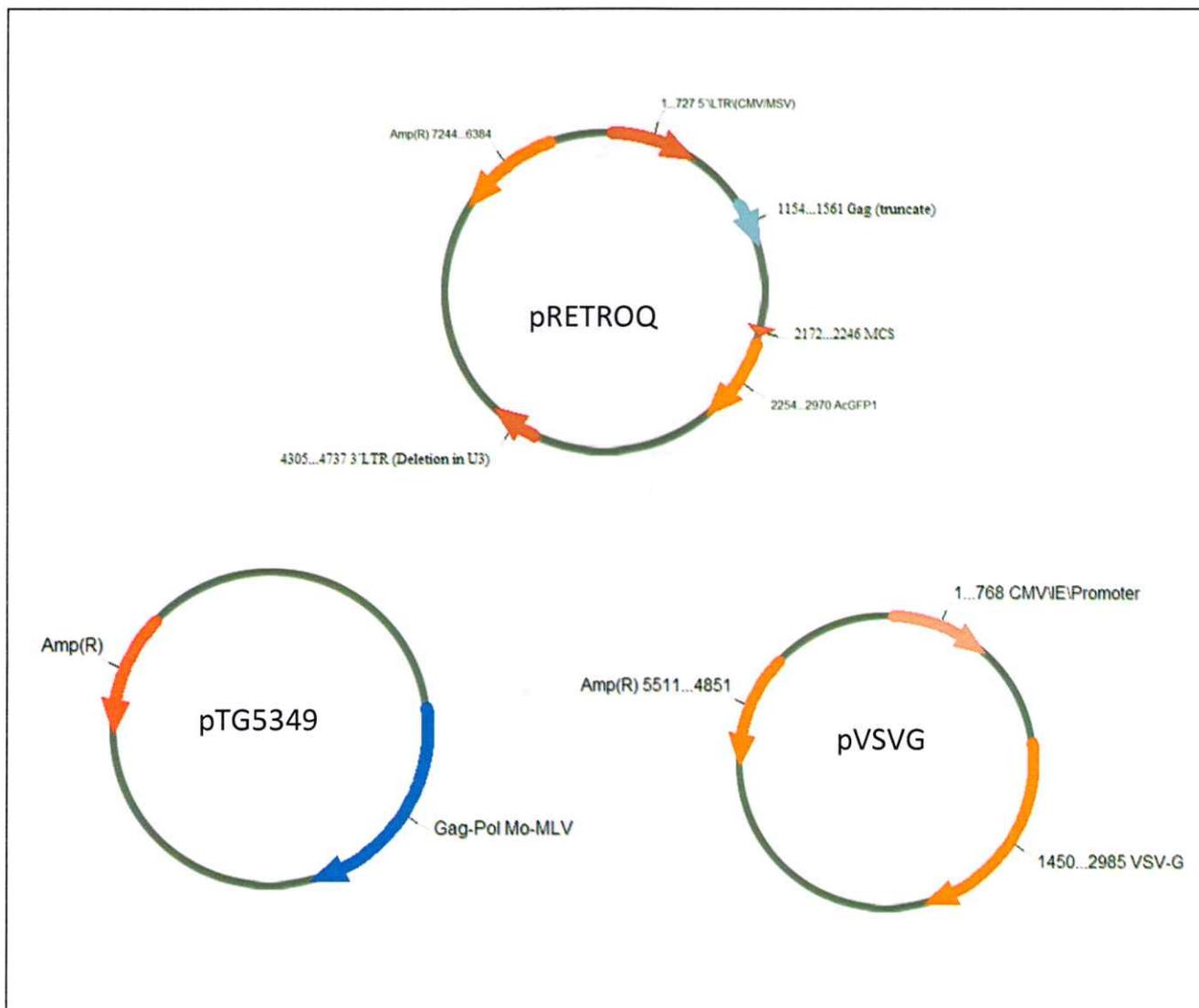


Figura 4: Vectores utilizados en la generación del pseudotipo de Mo-MLV. Estos son el vector pRETROQ-AcGFP1-N1 que codifica a GFP rodeado por los LTR, pTG5349 que codifica las poliproteínas Gag y Pol y por último pVSVG que codifica para la glicoproteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular.

El número de partículas infectivas (título) se determinó infectando células 293T con diluciones seriadas de Mo-MLV-VSV-G y posteriormente se visualizó la presencia de GFP mediante citometría de flujo. A las 72 horas post transducción (hpt) se lavaron las células con 500 µl de PBS, se soltaron incubando a 37°C con 100 µl de tripsina y finalmente se resuspendieron en un volumen total de 500 µl de PBS. Luego las células desprendidas de la placa se traspasaron a un tubo de microcentrifuga y se sedimentaron a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C, para ser resuspendidas en 100 µl de solución de fijación (formaldehído 2% en PBS), se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 900 µl de PBS y centrifugó a 11.000 x g por 1 minuto, el pellet se lavó con 500 µl de PBS, y centrifugó a 11.000 x g por 1 minuto. Finalmente, las células se resuspendieron en 300 µl de la solución *Facs Flow* (BD Bioscience) y se traspasaron a tubos de poliestireno de 5ml (BD Falcon) para ser analizadas mediante citometría de flujo con el filtro F1 530/30 nm (BD FACSCalibur). Se analizaron 10.000 eventos/células.

Para conocer la concentración del virus (expresada en unidades transducidas /mililitro [UT/ml]) se utilizó la fórmula: $\text{Título} = [(F \times Cn) / V] \times FD$ donde; F = frecuencia de células GFP positivas (GFP⁺), Cn = cantidad de células en el momento de la infección, V = volumen del inoculo con virus, FD = factor de dilución (modificado de Tiscornia, Singer, and Verma 2006).

Infecciones

Células 293T entre un 70 y 80% de confluencia fueron infectadas con Mo-MLV-VSV-G en presencia de polibreno a 8µg/ml. El volumen de los pocillos o placas se

completó con medio de cultivo celular. En la titulación la infección se realizó en placas de 24 pocillos, la cinética en placas de 12 pocillos y la purificación del PIC en botellas de 150cm².

Lisis celular

Las células fueron lisadas utilizando un metodo basado en el protocolo de Engelman A. y col. 2009, en condiciones no denaturantes. En la determinación de la formación del PIC la lisis se realizó a las 4, 6, 10, 14, 16, 18, 22 hpt y en la purificación de PIC a las 16 hpt, recuperándose solo el citoplasma en ambas ocasiones. Primero se lavaron las células con PBS e incubaron con PBS-EDTA 10 mM pH 8 por 5 minutos a 37°C (0,3 ml y 1,5 ml de PBS-EDTA en la cinética y purificación de PIC, respectivamente), las células se recuperaron en un tubo de microcentrifuga y se centrifugaron a 250 x g por 10 minutos a 4°C. El pellet se lavó una vez con 1 ml de Buffer I (20 mM Hepes pH 7,6, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂) y se centrifugó a 250 x g por 10 minutos a 4°C. Luego las células se resuspendieron en 1 ml Buffer II (20 mM Hepes pH 7,6, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM de DTT, 0,025% de digitonina e inhibidores de proteasas) e incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se recuperó el sobrenadante con el citoplasma mediante centrifugación (1.500 x g por 4 minutos a 4°C), eliminándose el pellet con células no lisadas y núcleos. El citoplasma se centrifugó a 19.000 x g por 1 minuto a 4°C, el nuevo sobrenadante se transfirió a otro tubo y la muestra se incubó con RNasa A, a una concentración final de 20 µg/ml, por 30 minutos. Finalizada la incubación las muestras se almacenaron a -20°C.

PCR cuantitativo (PCRc)

Las fracciones citoplasmáticas para el análisis de la formación del PIC fueron concentrados mediante evaporación con el *SpeedVac® Plus (Savant)* hasta obtener un volumen 10 veces menor al inicial (100µl volumen final) y se purificó el ADNv utilizando el *PureLink™ Quick PCR Purification Kit (Invitrogen)*, siguiendo el protocolo del fabricante. La reacción de PCRc contiene 1X del Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 300nM de partidores, 2µl de muestra. Para detectar la transcripción reversa tardía (LRT) se utilizaron los partidores 1211-1229 pRETROQ (5'-ATC GCT CAC AAC CAG TCG G-3') y 1346-1325 pRETROQ (5'-TGA TCT TAA CCT GGG TGA TGA G-3'). En la normalización se utilizaron los partidores MH 533 (5'-ACC CAC TCC CTC TTA GCC AAT ATT -3') y MH 534(5'-GTA GGG CTA GGC CCA CCG-3') que amplifican la sub-unidad 4L del NADH deshidrogenasa ubicado en el genoma mitocondrial. El PCRc se realizó en el equipo *Rotor Gene 6000 (Corbett Research)*, los parámetros utilizados en el programa son una denaturación inicial por 10 minutos a 95°C, seguido por 50 ciclos que comienzan con una denaturación a 95°C por 20 segundos, hibridación a 55°C por 20 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos y una pequeña fase a 77°C por 5 segundos. Se realizaron dos capturas de datos, al final de la extensión y al final de la fase a 77°C, la medición se realizó en ambas fases debido a que en algunas ocasiones se observaba un peak de fluorescencia entre 72° y 77°C producido por la

presencia de dímeros de partidores lo que variaba el valor de fluorescencia total y al realizar la medición a 77°C se elimina dicha variación.

En el caso de la precipitación del PIC y las eluciones desde la columna de *Aminolink*® se separaron alícuotas de 100 µl (excepto del sobrenadante de la precipitación del cual se tomaron 200 µl debido a que se encuentra diluida la muestra) y se procedió a purificar utilizando el *PureLink*™ *Quick PCR Purification Kit*.

Purificación de PICs

Los PIC se sedimentaron disminuyendo la fuerza iónica de la solución, para ello 1ml de lisado citoplasmático (en Buffer II) se diluyó en 1ml de la solución Buffer III (20 mM Hepes pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 1 mM de DTT e inhibidores de proteasas), con el objetivo de reducir la concentración de KCl de 150 mM a 75 mM. Dicha mezcla se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 8.000 x g por 10 minutos. El pellet, con el PIC, se resuspendió en la mitad del volumen inicial. La muestra se dializó en PBS pH 7,2 a 4°C primero por dos horas, al término de las cuales se cambió el PBS y dializó durante toda la noche y se procedió a purificar el PIC utilizando las columnas *AminoLink*® *Plus Immobilization Kit*.

Preparación de columnas de inmuno purificación y aislamiento de complejo

Se unieron covalentemente 3,7 mg de anticuerpos policlonales que reconocen a la capsida viral de Mo-MLV a las columnas siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific Inc, 2009). El anticuerpo disuelto en el Buffer de Acoplamiento I (0,1 M citrato de sodio, 0,05 M carbonato de sodio, pH 10,0) se agregó a la columna previamente lavada con el mismo Buffer de acoplamiento y se incubó a temperatura ambiente por 4 horas. Luego se recuperó la solución con los anticuerpos que no se unieron y la columna se lavó 2 veces con Buffer de acoplamiento II (0,1 M fosfato, 0,15 M cloruro de sodio, pH 7,2), se procedió a disolver 40 µl de la solución stock de cianoborohidruro de sodio (5M) en 2ml Buffer de acoplamiento II e incubó por 4 horas. Posteriormente se remueve la solución y se lavó dos veces con Buffer de Neutralización (1 M Tris-HCL, 0,05% NaN₃, pH 7,4) y luego se disolvieron 40 µl de la solución de cianoborohidruro de sodio (5M) en 2 ml de Buffer de Neutralización y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se removió de la columna la mezcla de cianoborohidruro de sodio con Buffer de Neutralización y se lavó 2 veces la columna con 2 ml de Buffer de lavado (1 M cloruro de sodio, 0,05 % NaN₃). Para almacenar la columna se agregó Buffer de acoplamiento II + 0,05% de azida de sodio y se mantiene a 4°C.

Para la purificación del PIC se utilizó el flujo por gravedad. En primer lugar se equilibró la columna a temperatura ambiente por algunos minutos, se removió el Buffer en el cual se mantiene la columna y se equilibró con 6 ml de PBS pH 7,2. La muestra conteniendo el PIC se depositó en la columna, se agregaron 200 µl de PBS pH 7,2 se

colocaron las tapas superior e inferior y se incubó por 30 minutos con agitación a temperatura ambiente. Luego se agregó 1 ml de PBS para recuperar la muestra y a continuación se lavó la columna con 2 ml de PBS (el lavado se repitió 2 veces). Finalmente el PIC se eluyó con 2 ml de solución de elución (0,1 M de glicina pH 2,5) en tubos de microcentrifuga que contenían 25 µl de solución de neutralización (1 M Tris-HCl pH 8,5). Se obtuvieron 9 fracciones de aproximadamente 0,5 ml. La presencia de los PIC se determinó mediante cuantificación del ADNv utilizando PCRc.

Resultados

Generación del vector viral

Con el objetivo de generar el pseudotipo de Mo-MLV se procedió a transfectar células 293T con los vectores pRETROQ, pVSV-G y pTG5349. El vector viral se recuperó en el sobrenadante del medio de cultivo y se concentró utilizando el BufferPEG. La infectividad del vector viral concentrado se determinó mediante la infección con 8 μ L del vector viral (con polibreno a 8 μ g/ml) en células 293T (Figura 5). La presencia de GFP requiere la transcripción del genoma viral integrado en el genoma celular, utilizando citometría de flujo se midió la cantidad de células que presentan fluorescencia verde (Figura 5) y se obtuvo que el 17,96% del total de las células transducidas presenta fluorescencia (mientras que el control sin transducir muestra un 0,02% de autofluorescencia).

Titulación y eficiencia del método de concentración

Para la titulación viral se transducieron células 293T con diluciones seriadas del vector viral y a las 72 horas post-transducción se analizó la presencia de GFP utilizando citometría de flujo (Figura 6). Se infectó con 2, 4 u 8 μ l de virus utilizando polibreno y las células se cosecharon y fijaron 72 horas post-infección. Se observó que el número de células fluorescentes se correlaciona con la cantidad de virus utilizado en la infección (Figura 6E).

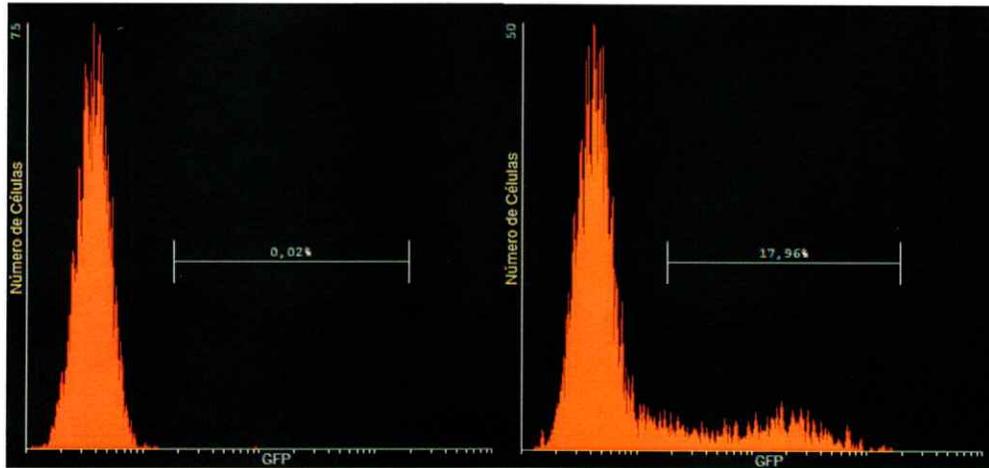


Figura 5: Transduccion de células. Células 293T fueron analizadas mediante citometria de flujo luego ser transducidas con el vector viral. Se analiza la presencia de GFP, gen reportero presente en el minigenoma del vector, en celulas no transducidas(A) y transducidas (B) con 8ul del vector viral concentrado.

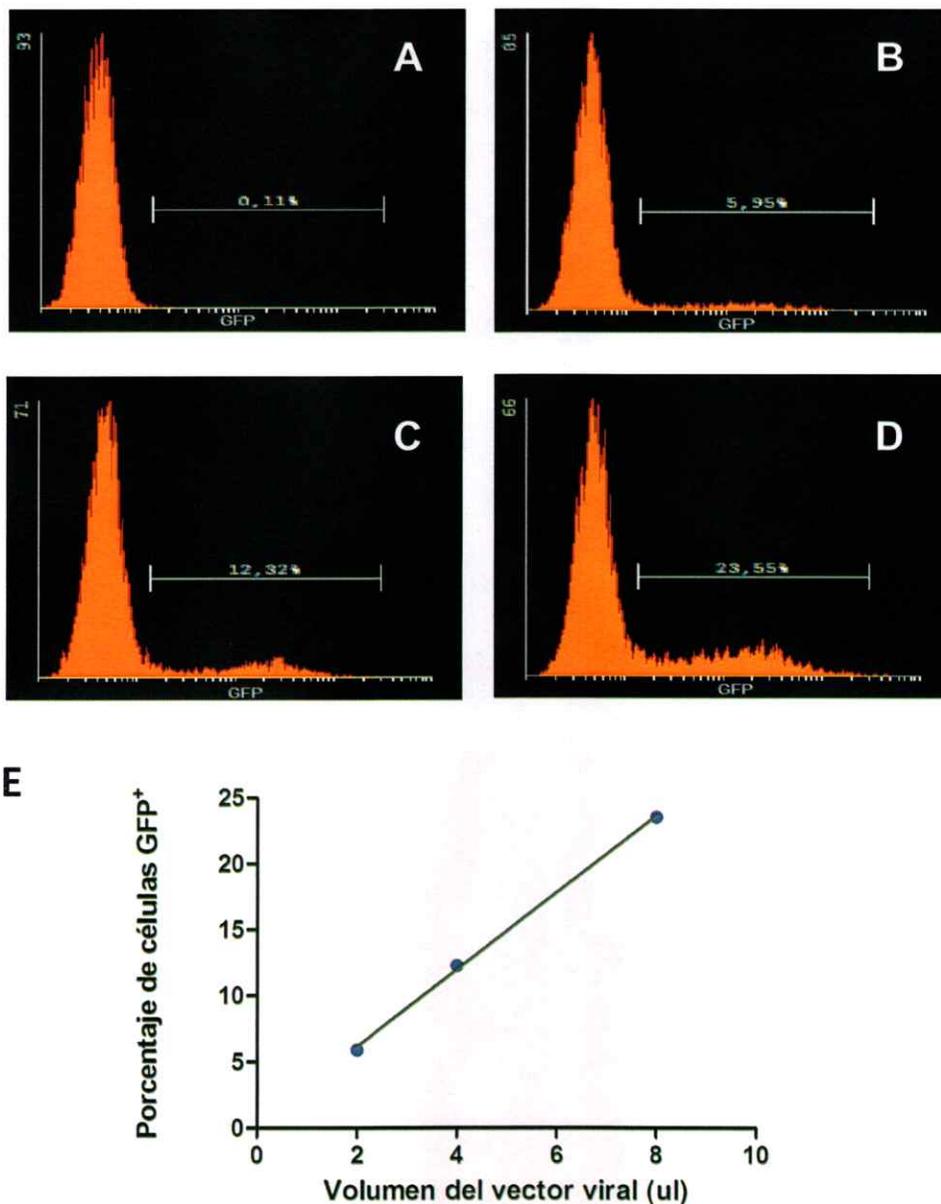


Figura 6: Titulación del vector viral. Células 293T fueron transducidas con diferentes volúmenes de vector viral concentrado. La presencia del gen reportero se analizó 72 hrs post-transducción. A, células no infectadas. B-D, células infectadas con 2 ul, 4ul y 8 ul del vector viral, respectivamente. En cada caso la barra indica el porcentaje de células que expresan el gen reportero sobre el total de células analizadas (10.000). E, gráfico de correlación entre la cantidad de células GFP⁺ y de vector viral ($R^2 = 0,99$).

Se comparó el título viral de una misma muestra antes y después de realizar la concentración con BufferPEG (Métodos) encontrando que la concentración aumentó cerca de 10 veces (Tabla I), recuperándose por lo tanto entre un 70-80% de las partículas infectivas en el proceso de concentración.

Formación del PIC

La formación del PIC en las células transducidas se analizó mediante PCRc. El producto amplificado corresponde a la región conservada de Gag procedente del vector pRETROQ (con partidores 1211-1229 pRETROQ y 1346-1325 pRETROQ). Se utilizó como calibrador una muestra no infectada y normalizada con el gen mitocondrial de la sub-unidad 4L del NADH deshidrogenasa. En el análisis se utilizó el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen objetivo}} - Ct_{\text{gen referencia}}$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{gen objetivo}} - \Delta Ct_{\text{gen referencia}})_{\text{muestra}} - (\Delta Ct_{\text{gen objetivo}} - \Delta Ct_{\text{gen referencia}})_{\text{calibrador}}$$

La cantidad relativa de la muestra con respecto al calibrador y normalizada con el gen de referencia es igual a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001; "User Bulletin # 2 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System SUBJECT: Relative Quantitation of Gene Expression," 2001).

Tabla I: Comparación de títulos virales

MoMLV-VSV-G	Virus sin concentrar (UT/ml)	Virus Concentrado (UT/ml)
1	1.480.000	11.078.417
2	1.590.383	13.110.333

Comparacion de la titulacion del vector viral obtenido directamente del sobrenadante celulas

y luego de ser concentrado utilizando BufferPEG.

Para validar el análisis debemos cerciorarnos de que las eficiencias de amplificación de ambos partidores (gen objetivo y de referencia) sean aproximadamente iguales. Dicha condición se cumple si el valor de ΔCt ($Ct_{\text{gen objetivo}} - Ct_{\text{gen referencia}}$) de las muestras se mantiene constante en una dilución seriada de la misma, debido a que los partidores que poseen la misma eficiencia disminuyen su valor de Ct en igual magnitud. Si las amplificaciones tienen la misma eficiencia se verá reflejado en la pendiente del gráfico ΔCt v/s Log de la concentración de ADN (Figura 7), ya que al mantenerse constante el valor de ΔCt la pendiente debe ser cercana a cero. Con partidores que presentan eficiencias similares se obtienen pendiente menores a 0,1 (Livak & Schmittgen, 2001; "User Bulletin # 2 ABI P RISM 7700 Sequence Detection System SUBJECT : Relative Quantitation of Gene Expression," 2001). En nuestro experimento la pendiente obtenida es igual a 0,073, por lo tanto cumple la condición (de ser menor a 0,1) y el método de cuantificación es válido.

Una vez validado el método se procedió a cuantificar el ADNv en el citoplasma de las células transducidas con el vector viral Mo-MLV-VSV-G. El ensayo se realizó utilizando una $MOI \geq 2$, las células fueron lisadas a las 4, 6, 10, 14, 16, 18 y 22 hpt, se recuperó el citoplasma, se extrajo el ADNv del PIC con el PureLink™ Quick PCR Purification Kit y se procedió con la cuantificación. Como se muestra en la Figura 8 se obtuvo que a las 16 hpt se encuentra la mayor cantidad de ADNv citoplasmico (por lo tanto de PIC), indicando que en ese momento debemos proceder con los experimentos de aislamiento del complejo.

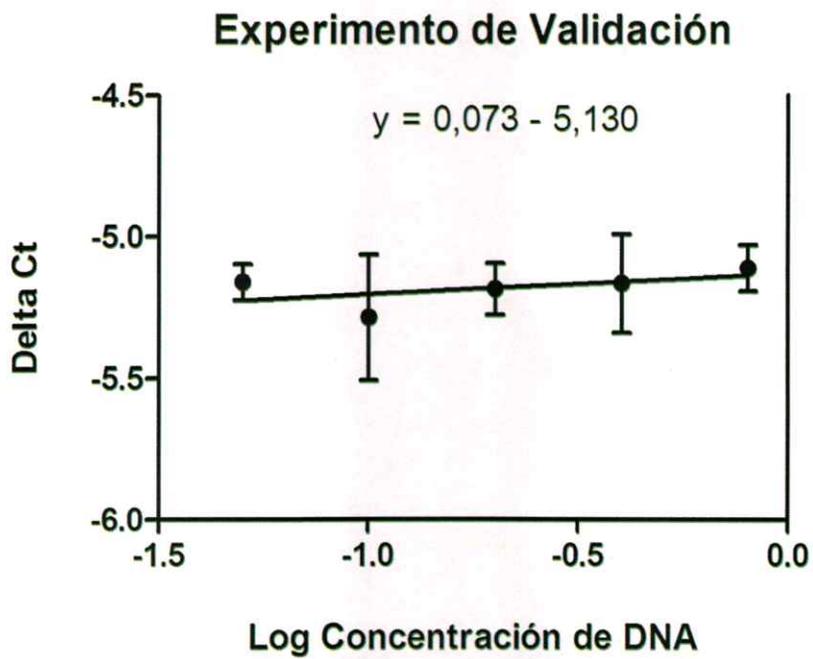


Figura 7: Validación del método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de cuantificación relativa. Diluciones seriadas de la muestra fueron amplificadas con los partidores complementarios a Gag de pRETROQ o contra NADH y se graficó su valor de ΔCt v/s Log de la concentración de ADN.

Purificación de PIC

Células 293T se infectaron con Mo-MLV-VSV-G a una MOI de 1, luego a las 16 hpt se lisaron las células y se procedió a precipitar los PIC utilizando una solución de baja fuerza iónica. Con este procedimiento los PIC se esperan encontrar en el *pellet* y el resto de las proteínas en el sobrenadante. Mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida, primero se se analizaron los lisados antes de ser precipitados (*Input*) y se observa que estos contienen una gran cantidad de proteínas (Figura 9A), tanto los carriles con muestras infectadas como los con muestras no infectadas (carriles 1 y 2). Si analizamos las muestras después de precipitar vemos que en el sobrenadante aun se observa una gran cantidad de proteínas (carriles 3 y 4), en cambio, el número de proteínas del *pellet* disminuyó considerablemente (carriles 5 y 6). Al analizar el ADNv mediante PCRc se obtuvo que la concentración de PIC en el *Input* y en el precipitado, no varía en la misma medida que el número de proteínas totales (Figura 9B).

A pesar de que fue posible purificar el PIC se perdió una importante cantidad del complejo por la metodología utilizada, ya que entre el *pellet* y el sobrenadante se recuperó solo la mitad del ADNv presente en la muestra (Figura 9C). Por lo tanto, si bien fue posible eliminar proteínas del lisado, también se perdió gran parte del complejo.

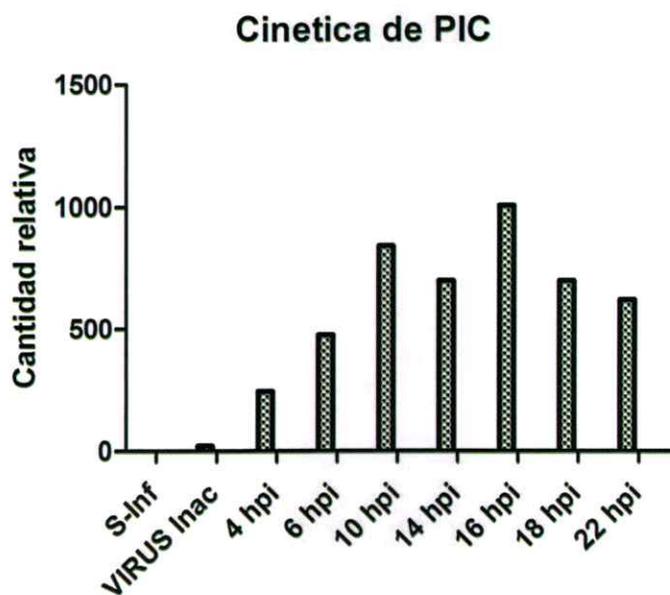
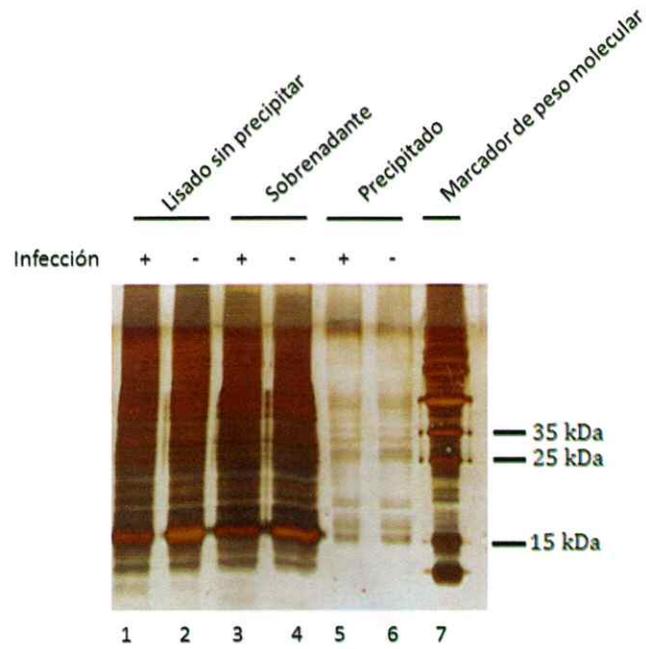


Figura 8: Formación del PIC en el citoplasma celular. Cuantificación de ADNv extraído de células 293T transducidas con el pseudotipo de Mo-MLV, lisadas a diferentes horas post-transducción. La cuantificación del PIC se realizó mediante RT-PCR utilizando el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Valores de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Se observa que a las 16 hpi se encuentra la mayor cantidad de complejo.

A



Precipitación de PIC

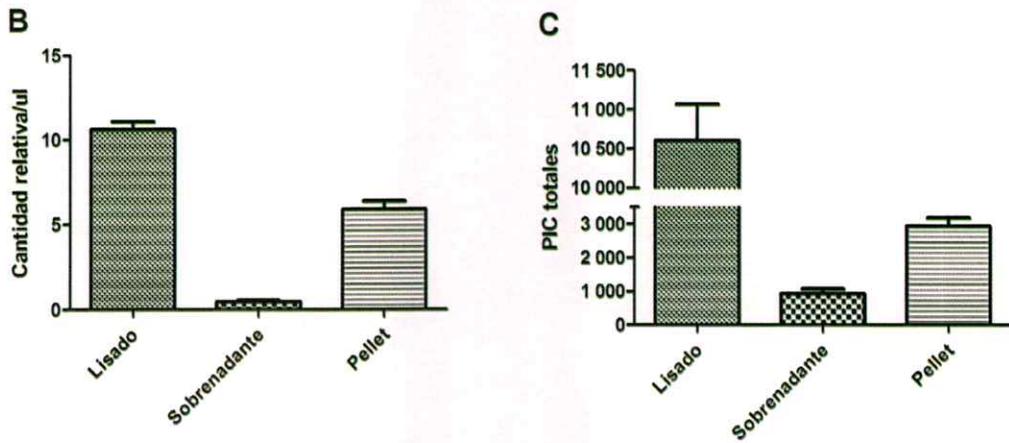


Figura 9: Precipitación de PIC. A, Lisado de células infectadas, no infectadas (carril 1 y 2, respectivamente) sobrenadante obtenido luego de la precipitación (carril 3 y 4) y precipitado (carril 5 y 6). B y C Concentración del PIC por microlitro de muestra y PIC totales por muestra, respectivamente.

Cálculos realizados mediante PCRc con los vectores que amplifican el LRT

Desde la solución enriquecida en complejos se procedió a aislar el PIC utilizando las columnas de afinidad de *Aminolink*® las cuales consisten en perlas de agarosa activadas con grupos aldehídos, capaces de unir covalentemente a los grupos amina de los ligandos (Figura 10). Se acopló el anticuerpo anti-capside a las columnas utilizando el procedimiento recomendado por el fabricante (Thermo Fisher Scientific Inc, 2009), detallado en Métodos. Se incubó el lisado celular con las columnas y posteriormente los complejos de pre-integración se eluyeron con solución de elución recuperandose fracciones de 0,5 ml, se purificó el ADNv y se realizó PCRc con el objetivo de identificar la(s) fracción(es) en la cual(es) se encuentra(n) el PIC. La concentración medida como copias de ADNv por microlitro de elución se presenta en la Figura 11. Se observó que los complejos eluyeron en las fracciones 1, 2 y 7. De esta manera se logró aislar el PIC en tres fracciones.

Discusión

En la presente tesis se construyó un pseudotipo del virus Mo-MLV que es capaz de infectar líneas celulares humanas y producir la proteína GFP en las células infectadas. Se caracterizó la formación del PIC y se determinó que a las 16 hpt es posible encontrar la mayor cantidad de complejo. Con esta información se procedió a la aislación del PIC mediante técnicas de sedimentación y columnas de afinidad comerciales.

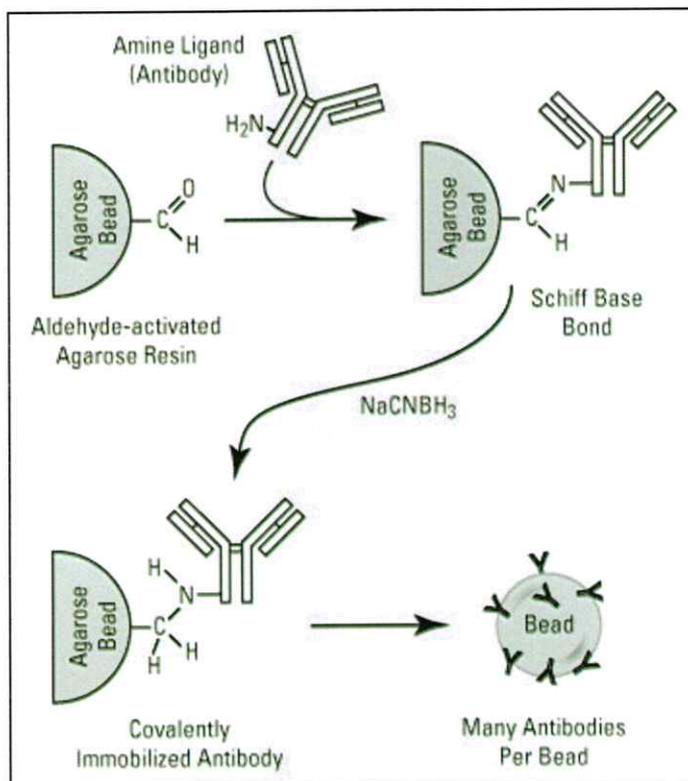


Figura 10: Preparacion de columnas. En el esquema se presentan la union de anticuerpos por medio de grupos amina a las perlas de agarosa de la columna Aminolink® (Imagen obtenida de <http://www.piercenet.com/>).

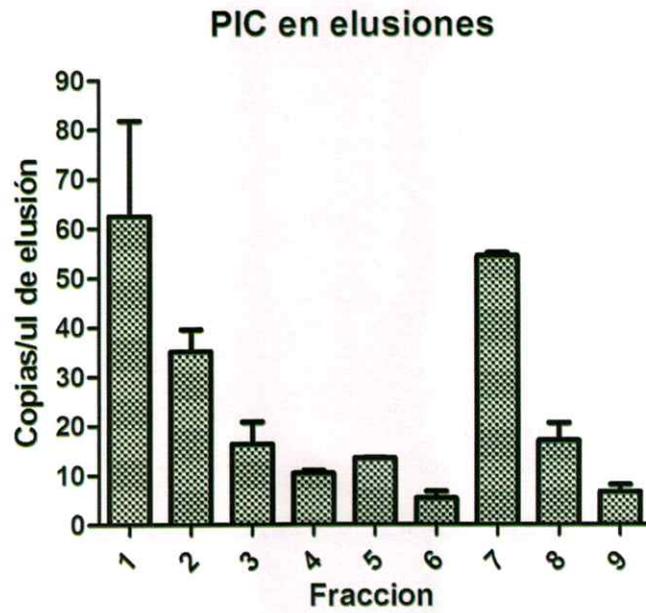


Figura 11: Concentración de ADNv. Cuantificación de ADNv mediante RT-PCR de las fracciones eluidas desde las columnas Aminolink®. Las fracciones 1,2 y 7 son las que presentan mayor cantidad del complejo.

En la literatura se han descrito diferentes técnicas que han permitido aislar el PIC e identificar factores celulares relevantes para la infección, sin embargo estas metodologías se centran en la purificación del complejo y luego en su complementación con lisados celulares y con esto encontrar factores específicos que permiten recuperar la función analizada (Lee and Craigie 1994; Li y col. 1998; Suzuki and Craigie 2002), sin embargo no ha sido posible dilucidar la composición completa del PIC de MLV. En el presente trabajo utilizamos una estrategia diferente, ya que nos centramos en la purificación del complejo utilizando como blanco de la inmunoprecipitación la proteína capsida, un componente descrito del complejo y así recuperar la mayor cantidad de proteínas celulares posibles para su posterior identificación mediante espectrometría de masas.

En esta oportunidad no utilizamos concentración viral mediante ultracentrifugación, sino que se utilizó PEG, logrando recuperar eficientemente entre el 70-80% de las partículas virales.

Se utilizaron dos métodos de manera complementaria para eliminar proteínas celulares que no estuviesen formando parte del PIC y a la vez aumentar la concentración del complejo en la muestra. El primero de ellos, consistente en la sedimentación de complejos, método que ha sido utilizado en trabajos anteriores, que nos permitió eliminar una gran cantidad de proteínas del lisado celular y recuperar una proporción importante del PIC. En este sentido, otros métodos descritos dependientes de ultracentrifugación, permiten la purificación de los complejos separándolos del resto de las proteínas por tamaño, pero requiere el manejo de los equipos necesarios y la estandarización de las

condiciones óptimas de la purificación. En comparación con estos, la precipitación solo requiere diluir la solución con el lisado citoplasmático y una centrifugación a baja velocidad, permitiendo la obtención de complejos proteicos de gran tamaño de manera eficiente.

El segundo método de purificación utilizado, consecutivo a la sedimentación, consiste en la purificación específica del complejo utilizando un anticuerpo que reconozca una proteína que forme parte de este, en esta ocasión utilizamos la proteína cápside del virus. Los anticuerpos fueron enlazados covalentemente a columnas comerciales, este procedimiento permite utilizar una mayor cantidad de anticuerpo aumentando el complejo recuperado. Por otra parte, la concentración de complejo en la muestra es controlada con el volumen de utilizado del buffer de elución. Finalmente, es posible reutilizar las columnas lo que permite purificar acumulativamente muestras de experimentos diferentes con la misma eficiencia. De esta manera la utilización de estos métodos permite aislar los complejos disminuyendo la cantidad de proteínas del lisado celular original. En particular esta metodología nos permitió recuperar tres eluciones con una alta concentración de PIC las cuales pueden ser utilizadas en análisis posteriores de identificación de proteínas. La presencia del complejo en tres fracciones se puede deber a la existencia de complejos con diferentes características o componentes lo que permite su liberación del anticuerpo en diferentes fracciones debido a distintas fuerzas de interacción. Sin embargo, debido a que se observa el complejo en las primeras fracciones puede que al aplicar lavados más estrictos antes de eluir se elimine su presencia en estas fracciones, recordando que lo

analizado es el ADNv puede que sea el ácido nucleico asociado a las perlas de agarosa luego de ser liberado desde complejo desarticulado.

Un posible inconveniente de las técnicas utilizadas es la pérdida de proteínas que componen los complejos, ya que los métodos podrían inducir la disociación de sus componentes débilmente unidos, para solucionar este inconveniente se propone utilizar estrategias de entrecruzamiento que permitan una mayor estabilidad del complejo y de esta manera disminuir la pérdida de sus componentes.

Desafortunadamente debido a la baja concentración de proteínas aisladas no fue posible corroborar la presencia de los componentes proteicos de los PIC mediante geles de poliacrilamida, no fue posible visualizarlas utilizando western blot, pero sería posible identificarlos mediante espectrometría de masas. En este ámbito otro aspecto a evaluar es la cantidad de virus a utilizar y la optimización de las técnicas de aislamiento. Con respecto al primer punto. En la literatura se encuentra una gran variedad de MOIs de virus utilizadas así como de cantidades de células infectadas. La elección de estos parámetros depende de las características de los estudios a realizar, en nuestro caso debido a que se desea purificar un complejo que se encuentra en muy pequeñas cantidades, es necesario utilizar la mayor cantidad de células y partículas virales posible, para obtener cantidades de proteínas detectables por los métodos que se desean emplear. Este punto representa una dificultad para el estudio, ya que la eficiencia de producción de los vectores virales a las concentraciones necesarias es muy baja por lo tanto es difícil alcanzar la MOI necesaria para este tipo de ensayos. Si bien fue muy importante la concentración de los vectores virales y la estandarización de la técnica, aun se requiere utilizar un mejor

método de producción de partículas virales, para así utilizar concentraciones iniciales más altas.

El siguiente aspecto a analizar es la optimización de la técnica de sedimentación, debido a que si bien fue posible eliminar una gran cantidad de proteínas que se encuentran en el lisado, también se perdió la mitad del PIC presente en la muestra, debido posiblemente a que los complejos se desintegran durante la sedimentación, por lo tanto se deberían perfeccionar las condiciones para permitir una mayor recuperación de los complejos sin afectar la eliminación de proteínas del lisado, llegando a un equilibrio entre la recuperación de complejos y purificación de la muestra. En este sentido los pasos claves son el tiempo de incubación luego de la dilución y la velocidad y tiempo de centrifugación.

Finalmente, debo destacar que cada uno de los procedimientos expuestos en el seminario de título fue estandarizado en el desarrollo del trabajo, debido a que ninguna técnica había sido utilizada anteriormente en nuestro laboratorio, lo que significó varios inconvenientes en el desarrollo del proyecto. A su vez se probaron diferentes alternativas para cada una de las etapas presentándose aquí la que nos permitió un mejor resultado final. Por lo tanto el trabajo no solo presenta resultados satisfactorios al final del procedimiento, sino que también permitió estandarizar una gran variedad de técnicas que serán utilizadas en futuros proyectos.

Conclusiones

1. Fue posible generar un pseudotido del Mo-MLV capaz de infectar células humanas.
2. Se estandarizo una técnica de concentración viral utilizando polietilenglicol.
3. Se caracterizó la formación del PIC y se determinó que a las 16 hpt se encuentra su mayor cantidad en el citoplasma celular.
4. Analizando los resultados de la elución desde la columna de afinidad podemos afirmar que fue posible purificar el complejo de pre-integración del virus estudiado.

Referencias

- Albritton, L. M., Tseng, L., Scadden, D., & Cunningham, J. M. (1989). A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell*, 57(4), 659–666.
- Ao, Z., Danappa Jayappa, K., Wang, B., Zheng, Y., Kung, S., Rassart, E., ... Yao, X. (2010). Importin alpha3 interacts with HIV-1 integrase and contributes to HIV-1 nuclear import and replication. *Journal of Virology*, 84(17), 8650–63. <http://doi.org/10.1128/JVI.00508-10>
- Beer, C., Pedersen, L., & Wirth, M. (2005). Amphotropic murine leukaemia virus envelope protein is associated with cholesterol-rich microdomains. *Virology Journal*, 2, 36. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-2-36>
- Bowerman, B., Brown, P. O., Bishop, J. M., & Varmus, H. E. (1989). A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes & Development*, 3(4), 469–478. <http://doi.org/10.1101/gad.3.4.469>
- Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., ... Bushman, F. (2005). A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nature Medicine*, 11(12), 1287–9. <http://doi.org/10.1038/nm1329>
- De Rijck, J., de Kogel, C., Demeulemeester, J., Vets, S., El Ashkar, S., Malani, N., ... Debyser, Z. (2013). The BET family of proteins targets moloney murine leukemia virus integration near transcription start sites. *Cell Reports*, 5(4), 886–94.

<http://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.040>

- El Ashkar, S., De Rijck, J., Demeulemeester, J., Vets, S., Madlala, P., Cermakova, K., ... Gijssbers, R. (2014). BET-independent MLV-based Vectors Target Away From Promoters and Regulatory Elements. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 3(July), e179. <http://doi.org/10.1038/mtna.2014.33>
- Farnet, C. M., & Bushman, F. D. (1997). HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell*, 88(4), 483–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9038339>
- Fassati, a, & Goff, S. P. (1999). Characterization of intracellular reverse transcription complexes of Moloney murine leukemia virus. *Journal of Virology*, 73(11), 8919–25. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=112922&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gilboa, E., Kolbe, M., Noonan, K., & Kucherlapati, R. (1982). Construction of a mammalian transducing vector from the genome of Moloney murine leukemia virus. *Journal of Virology*, 44(3), 845–851.
- Gupta, S. S., Maetzig, T., Maertens, G. N., Sharif, A., Rothe, M., Weidner-Glunde, M., ... Schulz, T. F. (2013). Bromo- and extraterminal domain chromatin regulators serve as cofactors for murine leukemia virus integration. *Journal of Virology*, 87(23), 12721–36. <http://doi.org/10.1128/JVI.01942-13>
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., ... Fischer, A. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *The New England Journal of Medicine*, 348, 255–256. <http://doi.org/10.1056/NEJM200301163480314>
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., ... Cavazzana-Calvo, M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science (New York, N.Y.)*, 302(2003), 415–419. <http://doi.org/10.1126/science.1088547>
- Hindmarsh, P., & Leis, J. (1999). Retroviral DNA integration. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 63(4), 836–43, table of contents. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98978&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hwang, L. H., & Gilboa, E. (1984). Expression of genes introduced into cells by retroviral infection is more efficient than that of genes introduced into cells by DNA transfection. *Journal of Virology*, 50(2), 417–424.
- Kalpana GV, Marmon S, Wang W, Crabtree GR, G. S. (1999). Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science*, 266, 2002–2006.
- Kim, J. W., Closs, E. I., Albritton, L. M., & Cunningham, J. M. (1991). Transport of



- cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature*.
<http://doi.org/10.1038/352725a0>
- Kim, W., Tang, Y., Okada, Y., Torrey, T. a, Chattopadhyay, S. K., Pfeleiderer, M., ... Morse, H. C. (1998). Binding of murine leukemia virus Gag polyproteins to KIF4, a microtubule-based motor protein. *Journal of Virology*, 72(8), 6898–901. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109902&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lee, M., & Craigie, R. (1994). Protection of retroviral DNA from autointegration: involvement of a cellular factor. ... *of the National Academy of Sciences*, 91(October), 9823–9827. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/91/21/9823.short>
- Lee, M. S., & Craigie, R. (1998). A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), 1528–33. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19075&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Li, L., Farnet, C. M., Anderson, W. F., & Bushman, F. D. (1998). Modulation of Activity of Moloney Murine Leukemia Virus Preintegration Complexes by Host Factors In Vitro, 72(3), 2125–2131.
- Li, L., Olvera, J. M., Yoder, K. E., Mitchell, R. S., Butler, S. L., Lieber, M., ... Bushman, F. D. (2001). Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *The EMBO Journal*, 20(12), 3272–81. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.12.3272>
- Li, M., Yang, C., Tong, S., Weidmann, a., & Compans, R. W. (2002). Palmitoylation of the Murine Leukemia Virus Envelope Protein Is Critical for Lipid Raft Association and Surface Expression. *Journal of Virology*, 76(23), 11845–11852. <http://doi.org/10.1128/JVI.76.23.11845-11852.2002>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25, 402–408. <http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Llano, M., Delgado, S., Vanegas, M., & Poeschla, E. M. (2004). Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55570–7. <http://doi.org/10.1074/jbc.M408508200>
- Llano, M., Saenz, D., Meehan, A., & Wongthida, P. (2006). An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science*. Retrieved from <http://genesdev.cshlp.org/content/21/14/1767.short>
- Llano, M., Vanegas, M., Fregoso, O., Saenz, D., Chung, S., Peretz, M., & Poeschla, E. M. (2004). LEDGF / p75 Determines Cellular Trafficking of Diverse Lentiviral but Not Murine Oncoretroviral Integrase Proteins and Is a Component of Functional

- Lentiviral Preintegration Complexes, 78(17), 9524–9537.
<http://doi.org/10.1128/JVI.78.17.9524>
- Maertens, G., Cherepanov, P., Pluymers, W., Busschots, K., De Clercq, E., Debysers, Z., & Engelborghs, Y. (2003). LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 33528–39. <http://doi.org/10.1074/jbc.M303594200>
- Maetzig, T., Galla, M., Baum, C., & Schambach, A. (2011). Gammaretroviral vectors: biology, technology and application. *Viruses*, 3(6), 677–713.
<http://doi.org/10.3390/v3060677>
- Maillot, B., Lévy, N., Eiler, S., Crucifix, C., Granger, F., Richert, L., ... Ruff, M. (2013). Structural and functional role of INI1 and LEDGF in the HIV-1 preintegration complex. *PLoS One*, 8(4), e60734.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0060734>
- McDonald, D., Vodicka, M. A., Lucero, G., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., Emerman, M., & Hope, T. J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *Journal of Cell Biology*, 159(3), 441–452.
<http://doi.org/10.1083/jcb.200203150>
- Ploubidou, A., & Way, M. (2001). Viral transport and the cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(1), 97–105. [http://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00180-0](http://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00180-0)
- Prats, A.-C., De Billy, G., Wang, P., & Darlix, J.-L. (1989). CUG initiation codon used for the synthesis of a cell surface antigen coded by the murine leukemia virus. *Journal of Molecular Biology*, 205(2), 363–372. [http://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90347-1](http://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90347-1)
- Rein, A. (2011). Murine leukemia viruses: objects and organisms. *Advances in Virology*, 2011, 403419. <http://doi.org/10.1155/2011/403419>
- Rein, A., McClure, M. R., Rice, N. R., Luftigt, R. B., & Schultz, A. M. (1986). Myristylation site in Pr65gag is essential for virus particle formation by Moloney murine leukemia virus, 83(October), 7246–7250.
- Risco, C., Menéndez-arias, L., Copeland, T. D., Pinto, P., & Oroszlan, S. (1995). Intracellular transport of the murine leukemia virus during acute infection of NIH 3T3 cells : nuclear import of nucleocapsid protein and integrase, 3050, 3039–3050.
- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G., & Brown, P. O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *The EMBO Journal*, 12(5), 2099–2108.
- Schultzt, A. M., & Rein, A. (1989). Unmyristylated Moloney Murine Leukemia Virus Pr659 ' 9 Is Excluded from Virus Assembly and Maturation Events, 63(5), 2370–2373.
- Sharma, A., Larue, R. C., Plumb, M. R., Malani, N., Male, F., Slaughter, A., ... Kvaratskhelia, M. (2013). BET proteins promote efficient murine leukemia virus integration at transcription start sites. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 110(29), 12036–41.
<http://doi.org/10.1073/pnas.1307157110>

- Shun, M. C., Raghavendra, N. K., Vandegraaff, N., Daigle, J. E., Hughes, S., Kellam, P., ... Engelman, A. (2007). LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. *Genes and Development*. <http://doi.org/10.1101/gad.1565107>
- Studamire, B., & Goff, S. P. (2008). Host proteins interacting with the Moloney murine leukemia virus integrase: multiple transcriptional regulators and chromatin binding factors. *Retrovirology*, 5, 48. <http://doi.org/10.1186/1742-4690-5-48>
- Suzuki, Y., & Craigie, R. (2002). Regulatory Mechanisms by Which Barrier-to-Autointegration Factor Blocks Autointegration and Stimulates Intermolecular Integration of Moloney Murine Leukemia Virus Preintegration Complexes Youichi Suzuki and Robert Craigie Regulatory Mechanisms by Which Ba. <http://doi.org/10.1128/JVI.76.23.12376>
- Tabin, C. J., Hoffmann, J. W., Goff, S. P., & Weinberg, R. a. (1982). Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Molecular and Cellular Biology*, 2(4), 426–436. <http://doi.org/10.1128/MCB.2.4.426>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2009). AminoLink ® Immobilization Kit. Rockford, IL.
- Tiscornia, G., Singer, O., & Verma, I. M. (2006). Production and purification of lentiviral vectors. *Nature Protocols*, 1(1), 241–245. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.37>
- Turelli, P., Doucas, V., Craig, E., & Mangeat, B. (2001). Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication. *Molecular Cell*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276501002556>
- User Bulletin # 2 ABI P RISM 7700 Sequence Detection System SUBJECT : Relative Quantitation of Gene Expression. (2001), 1997.
- Wei, C. M., Gibson, M., Spear, P. G., & Scolnick, E. M. (1981). Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology*, 39(3), 935–44. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=171327&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>