

VECTOR PARA TERAPIA GENICA: MANIPULACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE CAPSIDES DEL VIRUS ADENO-ASOCIADO TIPO 2

Ricardo Rojas, Octavio Tonatiuh Ramírez y Laura A. Palomares. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. postal. 510-3. Cuernavaca, Morelos, CP.62250, México. Teléfono: (52) 777 3291863, Fax: (52) 777 3138811. E-mail: ricardor@ibt.unam.mx, laura@ibt.unam.mx

Palabras clave: *Virus adeno-asociado tipo 2, estructura viral, terapia génica.*

Introducción. El virus adeno-asociado (VAA) es uno de los vectores para terapia génica más usados recientemente por su inocuidad, estabilidad y su capacidad de integrarse en sitios específicos en el genoma de la célula sin producir efectos adversos en el hospedero. El mejoramiento de la eficiencia y especificidad de los vectores virales es importante para el éxito de la terapia. La cápside del VAA está compuesta por las tres proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 con una estequiometría 1:1:10 en el virus silvestre. Para un mejor entendimiento de los requerimientos estructurales para la formación de la cápside, partículas pseudo-virales recombinantes (VLP) con diferente composición han sido producidas (1,2,3). Sin embargo, su funcionalidad y capacidad de internalización dentro de la célula no se ha evaluado.

El objetivo de este trabajo fue entender cómo la composición de las cápsides del virus adeno-asociado tipo 2 afecta su capacidad de unión e internalización en células de mamífero.

Metodología. Para producir cápsides con diferente composición de sus proteínas estructurales, se construyeron tres baculovirus recombinantes que expresan cada una de las tres proteínas VP individualmente. Células de insecto (Sf9) fueron infectadas con los tres baculovirus a diferentes multiplicidades de infección (MDI) para obtener cápsides con diferente estequiometría. Para la visualización de la unión e internalización de las partículas virales en las células de mamífero, se construyeron tres baculovirus adicionales donde se fusionó EGFP en el extremo amino terminal de cada VP. En cada infección de las células de insecto se incluyó una de las fusiones y las otras dos proteínas sin fusionar. La capacidad de unión e internalización en la célula se evaluó por citometría de flujo y microscopía confocal.

Resultados y discusión. En contraste con resultados previamente reportados, fue posible obtener fusiones con las tres proteínas estructurales (Figura 1). Cápsides con diferente estequiometría de sus proteínas estructurales fueron producidas mediante la coexpresión de las tres proteínas VP en el sistema de células de insecto baculovirus. Mediante el uso de los baculovirus recombinantes con las fusiones EGFP-VP se logró ensamblar partículas pseudo-virales *in vivo* con una proteína reportera dentro de ellas y del mismo tamaño que las que no contienen EGFP (Figura 2), lo que nos permitió visualizarlas y evaluar su capacidad de internalización dentro de las células de mamífero.

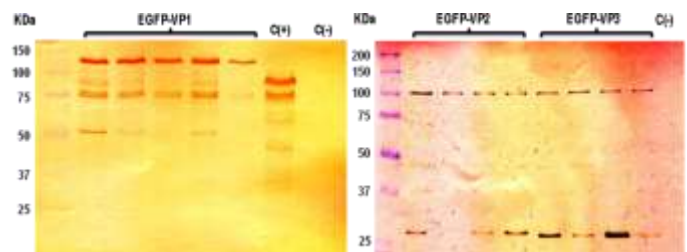


Fig. 1. Western blot de las fusiones EGFP-VPs.

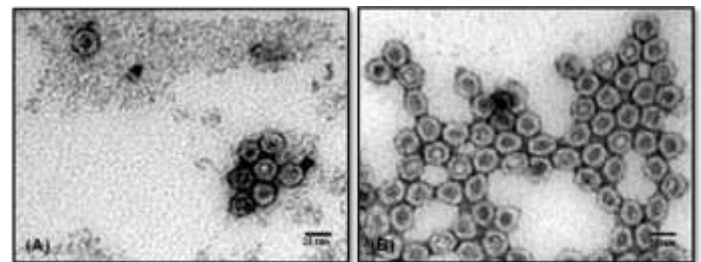


Fig. 2. Cápsides de VAA-2. (A) Sin fusión, (B) Con la fusión EGFP-VP1.

Conclusiones. En este trabajo se logró fusionar EGFP en el extremo N terminal de VP1 y VP3, a diferencia de otros estudios donde se ha reportado que VP3 no tolera la inserción de péptidos en sus extremos. Estos experimentos nos proporcionaron información de los requerimientos estructurales necesarios para el ensamblaje de las cápsides y su unión y la entrada en las células de mamíferos.

Agradecimiento. Dr. Jurgen A. Kleinschmidt (German Cancer Research Center, Heidelberg, Alemania) quien donó los plásmidos que codifican las proteínas VP individuales. Apoyo técnico: R. Pastor, V. Hernandez y G. plasencia. Financiamiento de CONACyT 46225-Z y PAPIIT-UNAM 224409

Bibliografía.

1. Ruffing, M., H. Zentgraf, et al. (1992). "Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells." *J Virol* **66**(12): 6922-30.
2. Lux, K., N. Goerlitz, et al. (2005). "Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking." *J Virol* **79**(18): 11776-87.
3. Hoque, M., N. Shimizu, et al. (1999). "Chimeric virus-like particle formation of adeno-associated virus." *Biochem Biophys Res Commun* **266**(2): 371-6.