

## Tesis de Posgrado

# Targeting celular utilizando retrovirus recombinantes : Un estudio "fundamental" y un modelo "aplicado" (O...de como usar el mal para hacer el bien)

Bachrach, Estanislao

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Bachrach, Estanislao. (2001). Targeting celular utilizando retrovirus recombinantes : Un estudio "fundamental" y un modelo "aplicado" (O...de como usar el mal para hacer el bien). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3378\\_Bachrach.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3378_Bachrach.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Bachrach, Estanislao. "Targeting celular utilizando retrovirus recombinantes : Un estudio "fundamental" y un modelo "aplicado" (O...de como usar el mal para hacer el bien)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3378\\_Bachrach.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3378_Bachrach.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Título:

**TARGETING CELULAR UTILIZANDO  
RETROVIRUS RECOMBINANTES:**

**Un estudio «fundamental» y un modelo «aplicado»  
(O... de como usar el mal para hacer el bien)**

**Autor: Estanislao Bachrach**

**Director: Dr. Marc Piechaczyk**

**Co-Director : Dr. Eduardo Cánepa**

Lugar de trabajo :

**Laboratorio “ Retrovirus Recombinantes y Oncogenes ”**

**Instituto de Genética Molecular de Montpellier**

**Universidad de Montpellier II – CNRS - Montpellier (France)**

(10/1997 – 9/2001)

- 2001 -

## **TARGETING CELULAR UTILIZANDO RETROVIRUS RECOMBINANTES :**

**Un estudio «fundamental» y un modelo «aplicado»  
(O... de como usar el mal para hacer el bien)**

### **Resumen**

La entrada de los retrovirus a la célula es mediada por interacciones específicas entre la glicoproteína retroviral Env y moléculas de superficie celular expresadas en la membrana. A la hora actual, muy pocos datos concernientes a la cuantificación de este proceso son disponibles. En una primera serie de experimentos, utilizando un sistema de expresión inductible, hemos expresado diferentes cantidades de Env en la superficie de vectores retrovirales derivados del Virus Moloney de la Leucemia Murina (MoMLV) y de vectores lentivirales derivados de HIV-I. Estos vectores han sido utilizados para determinar su capacidad de infección. Los resultados muestran que pocas moléculas Env son suficientes para infectar una célula. Sin embargo, incrementando la densidad de Env se acelera claramente el proceso de infección. Además, a bajas concentraciones de Env expresadas en la superficie viral los datos sugieren que estas moléculas podrían actuar en forma cooperativa. Estas observaciones tienen importantes consecuencias con respecto a la mejor comprensión del proceso natural de infección retroviral, pero también a la hora de diseñar vectores retrovirales aplicados a la transferencia de genes o terapia génica.

Por otro lado, con la idea de poner a punto un sistema de *targeting* celular *in vivo*, hemos diseñado un vector retroviral competente para la replicación que permite infectar la mayoría de las células del bazo de ratones Swiss recién nacidos, durante la primera semana de infección. Estos vectores serán utilizados próximamente para una primera serie de experiencias de *targeting*. Estos resultados confirman un modelo de transducción eficaz de células del bazo de ratón en una ventana de tiempo determinada. No pudiendo todavía aplicar estos vectores en clínica, resultan al menos interesantes para análisis de diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas en modelos animales, como así también el estudio del desarrollo y la evaluación de diferentes moléculas que puedan interferir con este proceso.

### **Palabras claves**

Retrovirus - Vectores Retrovirales – *Envelope* – Infección - *Targeting* Celular –  
Terapia Génica – Sistemas Inducibles – Animales Transgénicos - Oncogénesis

## Publicaciones

### Concernientes a este manuscrito:

**E Bachrach**, M Marin, M Pelegrin, G Karavanas and M Piechaczyk

Efficient cell infection by Moloney Murine Leukemia Virus-derived particles requires minimal amounts of envelope glycoprotein

Journal of Virology, September 2000, p. 8480-8486, Vol. 74, No 18

**E. Bachrach**, M. Pelegrin, M. Piechaczyk, FS. Pedersen and M. Duch

Efficient gene transfer into spleen cells of newborn mice by a replication-competent retroviral vector

(June 2001 – submitted Human Gene Therapy )

**E. Bachrach**, M. Duch M., Pelegrin, FS. Pedersen and M. Piechaczyk

In vivo infection of mice by replication-competent MLV-based retroviral vectors

In Virus Vectors for Gene Therapy : Methods and Protocols . Methods in Molecular Medicine series. Ed John Walker Humana Press, Inc. August 2001- in press-

**E. Bachrach**, M. Pelegrin, M. Duch, FS Pedersen and M. Piechaczyk

Induction of tumors in the mouse by ras-expressing retroviruses competent for replication

(June 2001 – under written)

**E Bachrach**, H. Dreja, M Pelegrin, C. Melting, P. Corbeau and M Piechaczyk

Cell infection and LTR activatio by HIV-I-derived vectors expressing different amounts of M-tropic envelope glycoprotein

(June 2001 – under written)

### No concernientes a este manuscrito :

M Pelegrin, D Noël, M Marin, **E Bachrach**, R Saller, B Salmons and M Piechaczyk

In vivo production of therapeutic antibodies by engineered cells for immunotherapy of cancer and viral diseases.

(1998) Gene Ther. Molec. Biol. 3 1-9

M Marin, M Pelegrin-Zurilla, **E Bachrach**, D Noël, F Brockly and M Piechaczyk  
Antiviral activity of an intracellularly-expressed single-chain antibody fragment directed  
against the MuLV capsid protein

Human Gene Therapy 2000 11, p.389-401

M. Pelegrin , **E. Bachrach** and M. Piechaczyk

Engineered antibodies in gene therapy

In Therapeutic Antibody Technology, Ed Zenon Steplewski and Thomas Kieber-Emmons

Marcel Dekker, Inc., New York , August 2000

A. Oates, **E. Bachrach**, S.Villard, C. Granier, T. Chardes, JC. Mani, M. Piechaczyk and M.  
Pelegrin

Neutralization of CasBrE Murine Retrovirus by Binding of the 667 Monoclonal Antibodies to  
the Envelope Glycoprotein Receptor Binding Surface

(June 2001 – under written)

G. Karavanas, M. Marin, **E. Bachrach**, FL. Cosset and M. Piechaczyk

Fusion activity of an anti-MHC class I miniantibody-ecotropic MoMLV envelope  
glycoprotein chimera on human and mouse cells

(June 2001 – under written)

## Indice

<b>Resumen – Palabras Claves</b>	<b>1</b>
<b>Publicaciones</b>	<b>2-3</b>
<b>Indice</b>	<b>4-5</b>
<b>Objetivos</b>	<b>6</b>
<b>Organización del manuscrito</b>	<b>7-8</b>
<b>Introducción general</b>	<b>9-12</b>
<b>A- Estudio Bibliográfico</b>	<b>13-54</b>
<b>Retrovirus</b>	<b>13-36</b>
1.1- Clasificación	13-14
1.2- Estructura y composición	15
1.3- Genoma retroviral	16-18
1.4- Ciclo Retroviral	18-21
1.5- Proteínas	22-24
1.6- La glicoproteína Env	25-31
1.7- Proteínas accesorias	31-32
1.8- Tropicismo	33-36
<b>2- Los Vectores Retrovirales</b>	<b>37-44</b>
2.1- Construcción de vectores retrovirales	37-38
2.2- Producción de vectores MLVs	38-40
2.3- Líneas de empaquetaje	41
2.4- Construcción y producción de vectores HIV-I	42-43
2.5- Aplicaciones clínicas: Límites de los vectores retrovirales	44-45
<b>3- Los Vectores Retrovirales y el Targeting Celular</b>	<b>46-54</b>
3.1- Aplicaciones potenciales del Targeting Celular	47
3.2- Estrategias	48-54
<b>B- Materiales y Métodos</b>	<b>55-66</b>
1- Plásmidos, vectores de expresión y plásmidos provirales	55-57
2- Líneas celulares	57-58
3- Transfecciones	58
4- Análisis de Facs e <i>immunoblots</i> contra Env gp70 o Env gp120	59
5- Títulos virales	60-61
6- Citometría de flujo	61-62
7- Viremia	62-63
8- Infección retroviral de ratones	63
9- PCR	63
10-Estrategia para clonar la glicoproteína Env de ASLV-A gp85	64-66

<b>C– Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de infección</b>	<b>67-94</b>
<b>Introducción</b>	67-69
<b>Resultados</b>	70-77
Capacidad de infección de viriones que expresan diferentes cantidades de Env MLV <i>amphotropic</i> en transfecciones transitorias	70-71
Capacidad de infección de viriones que expresan diferentes cantidades de Env MLV <i>amphotropic</i> y <i>ecotropic</i> en transfecciones estables	71-72
Capacidad de infección de viriones que expresan diferentes cantidades de Env MLV <i>amphotropic</i> y <i>ecotropic</i> en varios tipos celulares	73
Cinética de la infección utilizando retrovirus que expresan diferentes cantidades de Env MLV <i>amphotropic</i> y <i>ecotropic</i>	73
Capacidad de infección de vectores lentivirales derivados de HIV-I que expresan diferentes cantidades de glicoproteína Env AD8 gp120 en su superficie	74-76
Activación diferencial del LTR de HIV-I entre partículas lentivirales derivadas de HIV-I que expresan diferentes cantidades de glicoproteína Env AD8 gp120 en su superficie	76
Inhibición de la infección de vectores lentivirales derivados HIV-I por la gp120 Env soluble	77
<b>Discusión y Conclusión</b>	78-81
<b>Figuras (parte C)</b>	82-94
<b>D- Targeting celular in vivo</b>	<b>95-115</b>
<b>Introducción</b>	95-96
<b>Resultados</b>	97-103
Diseño y construcción de un vector EGFP competente para la replicación	97
Transducción de EGFP in vivo utilizando AkvU3-EGFP	98-99
Infección de células T, B y NK del bazo utilizando AkvU3-EGFP	99
Viremia en ratones infectados con el maxivirus AkvU3-EGFP	100
Análisis de PCR en células del bazo infectadas con AkvU3-EGFP	100-101
Construcción y validación del vector AkvU3-v-Ha-Ras	101-102
Pseudotyping de AkvU3-EGFP y de AkvU3-v-Ha-Ras con la glicoproteína Env de ASLV-A	102-103
Construcción y validación de un vector de expresión de tv-a T específico	103
<b>Discusión y Conclusión</b>	104-106
<b>Figuras (parte D)</b>	107-115
<b>Bibliografía</b>	<b>116-131</b>

## Objetivos

Mis objetivos de tesis son principalmente dos :

Por un lado, estudiar la influencia que tiene la abundancia de glicoproteínas Env expresadas en la superficie retroviral sobre la capacidad de infección. Este parámetro no solo es importante para mejor comprender uno de los aspectos de la infección retroviral sino que también lo es potencialmente para las aplicaciones en *targeting* celular en un contexto de transferencia de genes y/o terapia génica a la hora de diseñar vectores retrovirales. Este trabajo será primero validado utilizando vectores retrovirales derivados del oncoretrovirus de tipo C MLV (Murine Leukemia Virus) y dos de sus Envs naturales, Env *ecotropic* (que solo infecta células murinas) y Env *amphotropic* (que infecta células de diferentes especies, como el hombre).

Luego, la idea es de llevar a cabo las mismas experiencias pero con vectores lentivirales derivados de HIV-1 y su Env de tropismo M, glicoproteína implicada en los primeros estadios de la infección de HIV-1 en el hombre. En efecto, conocer cuantas moléculas de Env necesita HIV-1 para infectar eficazmente una célula debería contribuir a la hora de utilizar anticuerpos neutralizantes para bloquear la infección. Además los vectores lentivirales son cada vez más utilizados en transferencia de genes con motivos clínicos.

Por otra parte, desarrollar un sistema de *targeting* celular en el ratón que pueda ser utilizado para optimizar las estrategias de *delivery* de cantidades importantes de vectores recombinantes *in vivo*, lo cual es necesario en la mayoría de los protocolos de terapia génica. Al mismo tiempo, se trata de desarrollar un sistema de *targeting* oncogénico, por el cual vectores retrovirales expresando un oncogén inducirán la aparición de un tumor de manera tejida específica. Esto permitiría, en un contexto más fundamental, de estudiar la oncogénesis en diferentes tejidos, por distintos oncogenes o combinación de oncogenes, durante diferentes edades del ratón.



## Organización del manuscrito de tesis

Este manuscrito se divide en cuatro partes :

A- La primera consiste en un **Estudio Bibliográfico** donde se desarrollan los 2 principales temas concernientes a mi tesis, es decir, los vectores retrovirales y el *targeting* celular utilizando vectores retrovirales. Además de una introducción sobre los retrovirus, siendo estos la base de todo mi trabajo. Durante mi tesis he trabajado principalmente con los vectores retrovirales derivados de MLV y de HIV-I, por consecuencia este manuscrito trata sólo estas dos familias de retrovirus. En el caso de los MLVs, he descrito más en detalle el MLV de la cepa Moloney (MoMLV) dado que constituye el prototipo de los oncoretrovirus murinos de tipo C.

B- La segunda describe los **Materiales y Métodos** utilizados en las experiencias teniendo en cuenta, si se trata de los resultados presentados en la parte C o en la parte D.

C - La tercera parte se trata de los resultados obtenidos en un primer estudio fundamental durante mi trabajo de tesis : **Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de infección**. Aquí se compara la capacidad de infección de partículas retrovirales derivadas de MLV y de HIV-I con la densidad de glicoproteínas Env en la superficie retroviral. Este trabajo ha sido realizado *in vitro* con vectores no competentes para la replicación y he utilizado las glicoproteínas Env gp70 de MoMLV *amphotropic* (que posee un tropismo por células murinas y por otras especies, como el hombre) y *ecotropic* (que solo infecta células murinas) y la glicoproteína Env AD8 gp120 de HIV-I que posee un tropismo M, es decir, que infecta principalmente macrófagos y monocitos utilizando el receptor CD4 y el coreceptor CCR5. En lo que respecta a HIV-I, la colaboración con el equipo del Dr. Pierre Corbeau, en el Instituto de Genética Humana de Montpellier, fue fundamental para concretar lo producido.

D- La cuarta y última parte se trata también de otra serie de resultados, **Targeting celular *in vivo***, y aborda, como su título lo explicita, el estudio del *targeting* celular *in vivo* utilizando retrovirus recombinantes. Más precisamente nos interesamos en la puesta a punto de un primer modelo de oncogénesis utilizando el *targeting* celular. Estas experiencias fueron conducidas primero *in vitro* para corroborar y probar nuestros instrumentos y estrategias de trabajo y luego *in vivo* en ratones. Principalmente he utilizado vectores competentes para la

replicación derivados de Akv MLV, otro de los oncoretrovirus de tipo C y la glicoproteína Env del ASLV-A (*Avian Sarcoma Leukemia Virus type-A*) que reconoce de manera específica un receptor celular en la superficie de diferentes células de ave, como el pollo. Este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración estrecha con los grupos del Dr. Finn Skou Pedersen en Aarhus, Dinamarca y del Dr. Claude Bagnis en el Instituto Paoli Calmette en Marseille, Francia.

## **Introducción General**

### **1- La terapia génica**

La terapia génica puede ser definida como la transferencia de un nuevo material genético a las células de un individuo, con el objetivo de conferirle un beneficio terapéutico [1, 2].

Las ventajas de esta nueva tecnología sobre la farmacología convencional son varias: (1) trata o elimina las causas de la enfermedad, mientras que la mayoría de las drogas elimina los síntomas; (2) puede ser tejido-específica permitiendo de esta manera una acción localizada, y un efecto biológico mas sutil; (3) la acción terapéutica puede ser sostenida en el tiempo.

La primera transferencia de un gen (*gen marker*) en el hombre fue realizada en 1990 [3] y la primera tentativa de corregir un déficit genético fue hace ya 10 años [4]. Actualmente, es una de las áreas de investigación médica que se desarrolla más rápidamente y promete en un futuro la posibilidad de curar una gran variedad de enfermedades y trastornos como el cáncer, infecciones virales severas como el SIDA, deficiencias genéticas (mucoviscidosis, hemofilia B), trastornos cardiovasculares, isquemias, enfermedades neuronales degenerativas (Parkinson, Alzheimer), enfermedades autoinmunes (artritis reumatoidea), etc., para las cuales hoy en día no existe un tratamiento o tratamiento satisfactorio [5-8].

Debido a la gran variedad de trastornos posibles a ser tratados por la terapia génica, existe un amplio rango de estrategias que están siendo investigadas en el mundo entero por diferentes laboratorios. Los criterios tenidos en cuenta por estas estrategias pueden ser clasificados en distintos grupos de una manera mas o menos arbitraria:

- según el **sistema de transferencia** del gen terapéutico : Existen tres categorías: Los vectores virales, los vectores no virales y los métodos físicos. Numerosos virus han sido adaptados como vectores : los retrovirus (oncoretrovirus, lentivirus), los adenovirus, los adenovirus asociados (AAV), los virus herpéticos, y los poxvirus. Los métodos no virales se basan, en general, en la inyección del ADN desnudo o en complejos de lípidos catiónicos o polímeros policatiónicos. El método físico más utilizado es la electroporación.

- según el **modo de administración** del gen terapéutico : La mayoría de los protocolos en curso o siendo evaluados utilizan una estrategia denominada *ex vivo*, es decir que extraen células del paciente, las cuales son modificadas genéticamente y luego reimplantadas de manera autóloga en el mismo paciente. Por otra parte, el sistema *in vivo*, es decir, la inyección directa de vectores en el paciente, podría constituir una estrategia ideal en terapia génica, dado a su simple concepto y a que presentaría varias ventajas, como la reducción de los costos financieros y los efectos secundarios de los trasplantes. Esta estrategia es aún poco utilizada, pero varios grupos trabajan para optimizarla.

- según el **tipo celular o el gen terapéutico** que debe ser transferido : Es claro que en la mayoría de los casos se buscará expresar un gen terapéutico en las células que sufren una patología. En otros, se buscará transferir un gen en células que actuarán como « fábricas de producción » de proteínas terapéuticas, que actuarán luego, por ejemplo, sobre un órgano o tejido a distancia (una hormona) o neutralizando un virus en la vía sistémica (un anticuerpo). Un otro caso importante es el de la destrucción de células cancerosas mediante la transferencia de un gen tóxico a estas últimas.

- según el **efecto buscado**: Siguiendo el razonamiento del punto anterior, en ciertas situaciones se buscará la muerte de las células genéticamente modificadas (y eventualmente de sus células vecinas), como las células cancerosas o ciertas células infectadas por diferentes virus. En otras, se deberá preservar las células genéticamente modificadas, por ejemplo si se quiere corregir una carencia genética o si se quiere obtener durante largos períodos de tiempo una producción sistémica de una proteína « medicamento ».

- según el **tiempo de expresión del transgén** : Por último, según el efecto deseado, la expresión del transgén podrá ser transitoria, por ejemplo algunas horas o algunos días es suficiente para eliminar células tumorales. En estos casos el uso de vectores adenovirales o sintéticos es apropiado. Contrariamente, si se debe corregir un déficit genético o si se trata de un tratamiento antiviral, solo la expresión durante largos períodos de tiempo es eficaz. Para este último caso los retrovirus recombinantes son actualmente los vectores más apropiados.

Actualmente, los mejores resultados en transferencia de genes se obtienen con los vectores virales. 75% de los protocolos clínicos utilizan los vectores retrovirales, luego la lipofección y los adenovirus. Es preciso destacar que se debe continuar a mejorar todo los tipos de vectores ya que es necesario una diversidad, dado que cada uno presenta su combinación de ventajas e inconvenientes como la capacidad de encapsidación, de integración del transgén en el genoma celular, la eficiencia de la transferencia del transgén en diferentes tipos celulares, del título viral, de la inmunogenicidad, de la producción a gran escala, etc. En conclusión, a una enfermedad puede corresponderle uno o varios tipos de vectores, aumentando de esta manera la posibilidad de una solución terapéutica.

## **2- La tecnología de los retrovirus recombinantes**

Los vectores retrovirales son los más utilizados en transferencia de genes y en terapia génica. Su característica principal es la de permitir la integración estable del transgén en el genoma celular. Es por eso que son fundamentales en protocolos que precisen una expresión durante largos períodos de tiempo del gen terapéutico. Además, pueden ser producidos a relativamente altos títulos infecciosos sin generar retrovirus competentes para la replicación, ser resistentes al complemento humano (propiedad indispensable para una aplicación *in vivo*), sin olvidar que poseen un tropismo muy variado.

Los primeros vectores virales utilizados en transferencia de genes fueron derivados de un grupo de retrovirus que infectan al ratón, los MLV –*Murine Leukemia Virus* -. Hoy en día siguen siendo los más utilizados. Una de las limitaciones de los vectores MLV es que sólo pueden integrarse en el genoma de las células infectadas cuando estas últimas se encuentran en fase de proliferación. Sin embargo, recientemente se han desarrollado vectores derivados de lentivirus como HIV –*Human Immunodeficiency Virus* -, que pueden integrarse de manera eficaz, permitiendo la transferencia estable del transgén en células que no se dividen, salvo excepciones (linfocitos T quiescentes, ciertos hepatocitos), incluso *in vivo* [9, 10].

Los vectores retrovirales son retrovirus modificados, en los cuales los genes requeridos para la replicación (*gag*, *pol* y *env*) son remplazados por él o los genes de interés (transgén). La información genética retenida en la estructura de los vectores debe incluir: (1) Los LTR (*Long Terminal Repeats*) necesarios para la expresión del genoma viral (pueden ser usados también para la transcripción del transgén) y la integración del provirus en el genoma de las células infectadas; (2) la señal de la transcripción inversa en el genoma viral; y (3) la señal de encapsidación ( $\psi$ ) del genoma retroviral que permitirá la entrada del ARN genómico (que contiene el transgén) en las nuevas partículas retrovirales formadas en líneas celulares llamadas de empaquetaje que sirven como «fábrica» de vectores retrovirales [11].

Durante mi trabajo de tesis nos hemos propuesto a estudiar, por un lado, la relación entre la capacidad de infección y la densidad de la glicoproteína Env en la superficie de partículas retrovirales MLV y HIV. Esta última, es la responsable del tropismo viral, es decir, del reconocimiento específico del receptor celular que permite la entrada a la célula. Este tema ha sido abordado desde un punto de vista fundamental para mejor comprender una de las etapas tempranas de la infección retroviral, pero los resultados aquí presentes tiene además una implicación importante a la hora de producir y de mejorar los vectores retrovirales en un contexto de terapia génica. Por otro lado, en una segunda parte, desde un punto de vista más aplicado, hemos desarrollado y puesto a punto un sistema para lograr un *targeting* celular específico *in vivo* utilizando retrovirus recombinantes, es decir para redirigir la infección retroviral hacia un tipo celular determinado. Más precisamente nos interesamos en la puesta a punto de un primer modelo de oncogénesis utilizando el *targeting* celular.

La terapia génica es vivida como un sueño por los investigadores, los médicos y los pacientes, pero también por industriales y grandes grupos económicos...

Bienvenidos a la dura realidad científica.

**A**

**ESTUDIO  
BIBLIOGRAFICO**

## 1- LOS RETROVIRUS

Este capítulo está consagrado principalmente a la descripción de los oncoretrovirus MLVs, más precisamente al Virus de la Leucemia Murina Moloney (MoMLV) y al Virus de la Inmunodeficiencia Humana de tipo 1 (HIV-I) [12, 13].

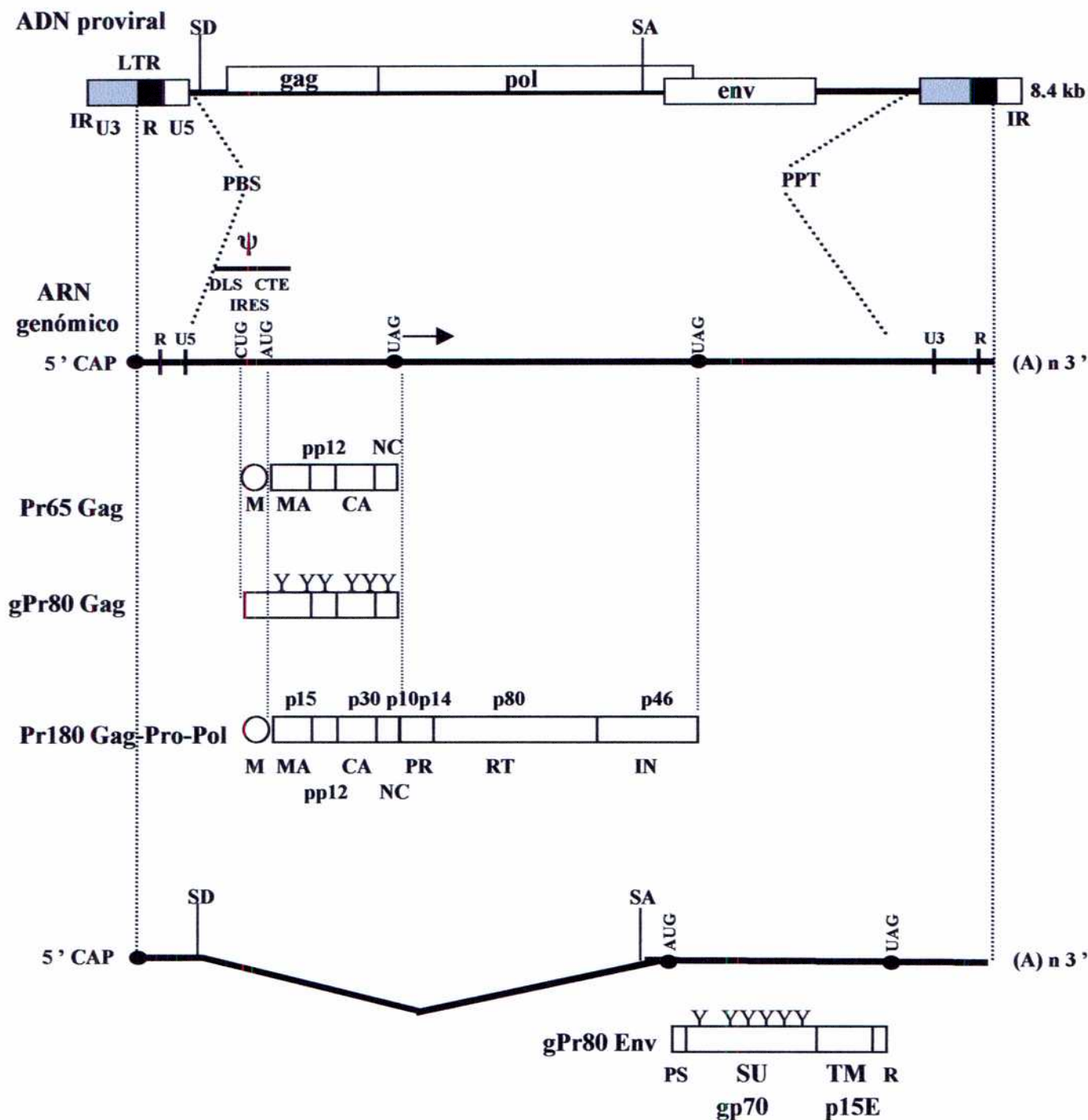
### 1.1 - Clasificación

Los retrovirus forman parte de una gran familia de virus de ARN, con envoltura y caracterizados por su estructura viral y su forma de replicación. Su nombre proviene de la estrategia de replicación de su genoma en las células huésped. Esta última consiste en la conversión a partir de una molécula de ARN en ADN lineal y doble cadena, gracias a una polimerasa codificada por el propio retrovirus.

Existen varias formas de clasificar los retrovirus. Una de ellas, divididos en dos grupos, es según la organización y complejidad de su genoma, los retrovirus de **genoma simple** y los de **genoma complejo**. Todos los retrovirus poseen al menos tres dominios mayores que codifican para las proteínas virales : Gag, Pol y Env (Figura 1). Los retrovirus de genoma complejo poseen, además, varias regiones que codifican para diferentes proteínas reguladoras, traducidas por ARNs mensajeros provenientes de un *splicing* diferencial (Figura 2).

Otra forma de clasificar los retrovirus es según criterios evolutivos, utilizando sobretodo la secuencia del gen *pol*. De allí derivan siete géneros de donde se destacan tres grandes grupos : los **oncoretrovirus**, los **lentivirus** y los **spumavirus** [14] [15].





**Figura 1 : Representación esquemática del genoma del virus MoMLV y sus poliproteínas**

(A)<sub>n</sub> : poly(A)

AUG : codón de la iniciación de la traducción

CTE : *Constitutive Transport Element*

DLS : *Dimer Linkage Structure*

IRES : *Internal Ribosome Entry Site*

LTR : *Long Terminal Repeat*

PPT : *Poly-Purine Track*

PBS : *Primer Binding Site*

SA : sitio aceptor de *splicing*

SD : sitio dador de *splicing*

ψ : secuencia de encapsidación

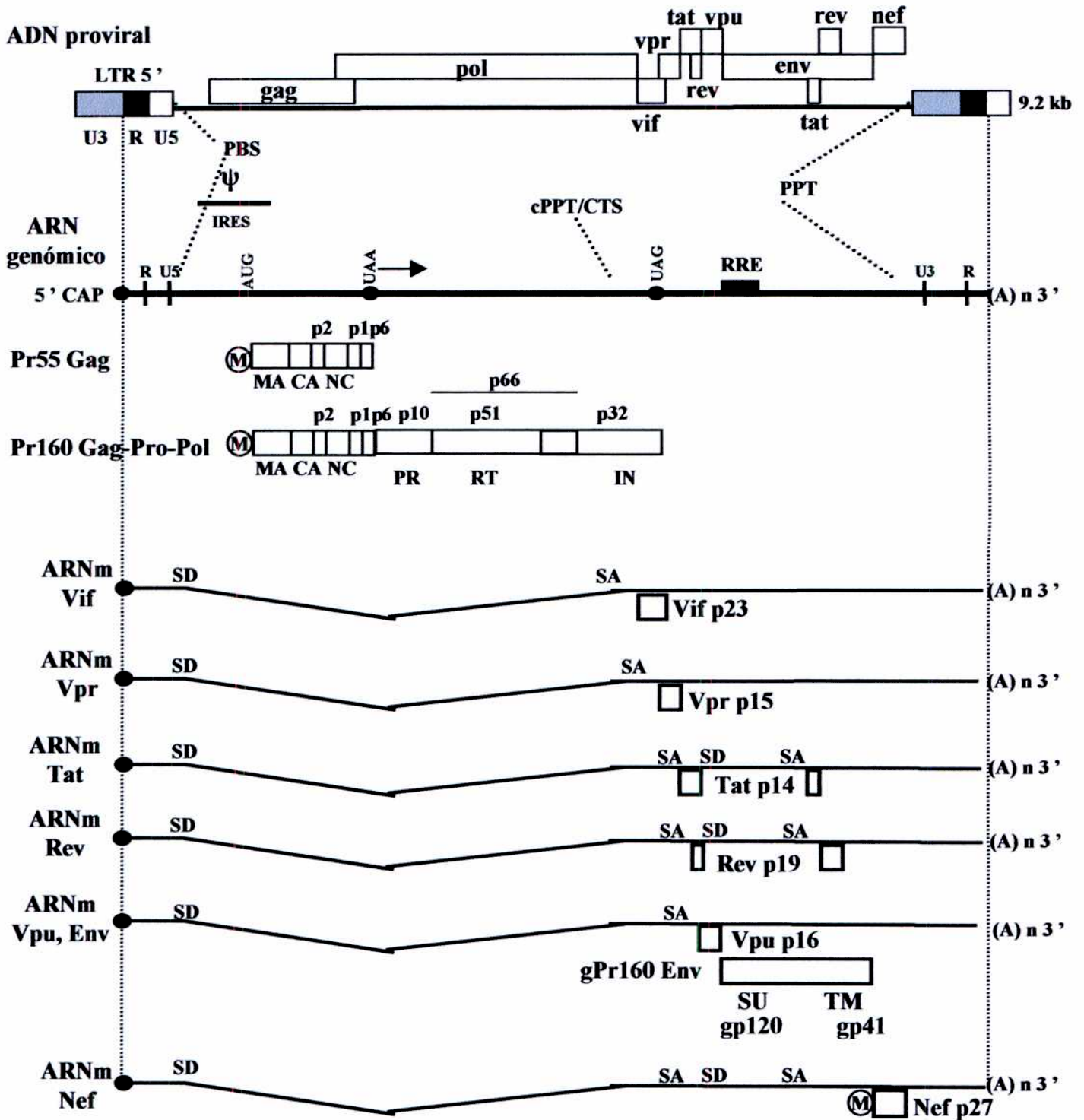
Y : n-glicosilaciones

**Los oncoretrovirus.** Este grupo contiene cinco de los siete géneros y reagrupa los retrovirus que poseen un potencial oncogénico. Se encuentran en una gran variedad de clases de vertebrados y cada género está caracterizado por diversos retrovirus. En la tabla siguiente se encuentran los géneros con un ejemplo representativo.

Género	Ejemplo
<i>Avian sarcoma and leukosis viral group</i>	<i>Rous sarcoma virus</i>
<i>Mammalian B-type viral group</i>	<i>Mouse mammary tumor virus</i>
<i>Murine leukemia-related viral group</i>	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
<i>Human T-cell leukemia- bovine leukemia viral group</i>	<i>Human T-cell leukemia virus</i>
<i>D-type viral group</i>	<i>Mason-Pfizer monkey virus</i>

**Los lentivirus.** Estos retrovirus de genoma complejo se encuentran en diferentes clases de mamíferos (BIV en bovinos, FIV en felinos, EIAV en equinos, SIV en monos y HIV-I y HIV-II en humanos). Su característica es la de provocar una enfermedad o síndrome luego de la eliminación de células y ciertos tejidos del huésped. El más conocido es el Virus de la Inmunodeficiencia Humana de tipo I, agente causante del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en el hombre [16] [17, 18].

Mucho menos se conoce sobre **los spumavirus**. No parecen ser el origen de ninguna enfermedad conocida. Son de genoma complejo y el prototipo es el *Human Foamy Virus* (HFV).



**Figura 2 : Representación esquemática del genoma del virus HIV-I y sus productos de transcripción y traducción**

cPPT/CTS : *central-Poly-Purine Track / Central Termination Structure Poly-Purine Track*  
 SA : sitio aceptor de *splicing*  
 SD : sitio dador de *splicing*  
 $\psi$  : secuencia de encapsidación  
 RRE : *Rev Response Element*

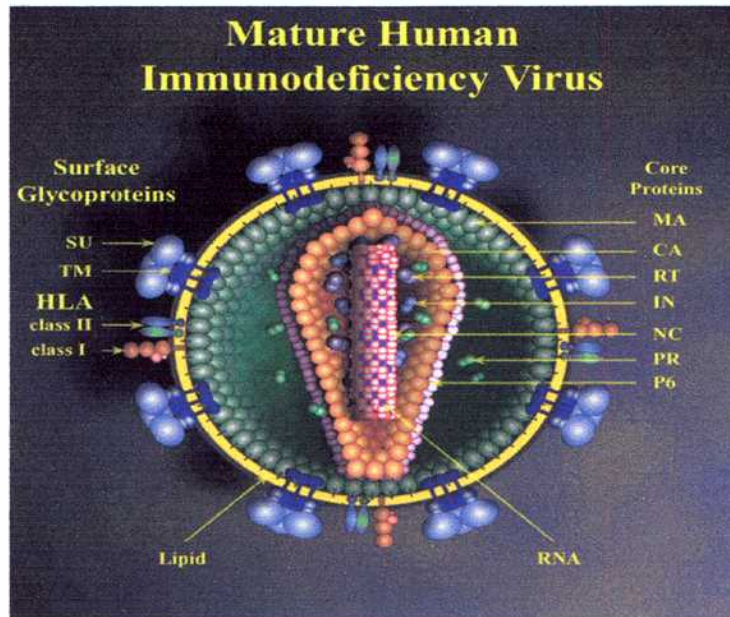
## 1.2 - Estructura y composición de la partícula retroviral

Las partículas retrovirales MLV y HIV-I son esféricas y tienen un diámetro de entre 80 y 110 nm (Figura 3, [www.virology.net](http://www.virology.net)). Están constituidas de un *core* viral (nucleocápside) que protege el ARN genómico, recubierto de una membrana de bicapa lipídica donde se encuentran ancladas las glicoproteínas Env. Los viriones MLV maduros presentan un *core* central y denso de forma esférica o icosaédrica (morfología de tipo C) y los HIV maduros un *core* en forma de cono (Figura 3C).

Las partículas retrovirales están compuestas de 65% de proteínas, 35% de lípidos y entre 1 y 2% de ARN. Dos tercios de este último corresponden al ARN genómico y el resto se trata de ARNs de transferencia y pequeños ARNs celulares.

Entorno al ARN genómico se encuentran todas las proteínas codificadas por el retrovirus: las proteínas de estructura MA (matriz), CA (cápside), NC (nucleocápside) y gpEnv (glicoproteína de envoltura o Env), y las proteínas enzimáticas PR (proteasa), RT (transcriptasa inversa), IN (integrasa) (Figura 3A). Su membrana fosfolipídica proviene de la membrana plasmática de la célula infectada, enriquecida en colesterol y en esfingolípidos. La proteína MA se encuentra entre la glicoproteína Env y la nucleocápside. La proteína CA forma el *core* retroviral. Dentro del *core*, la NC se une fuertemente al ARN viral, acercando las dos moléculas de ARN genómico. Las glicoproteínas Env son expresadas en la superficie del virión en forma de trímeros o tetrámeros. Los viriones HIV contienen además la proteína accesoria Vpr y la proteína p6.

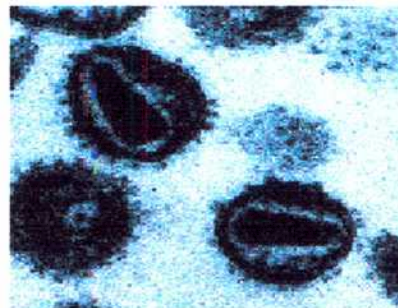
**A**



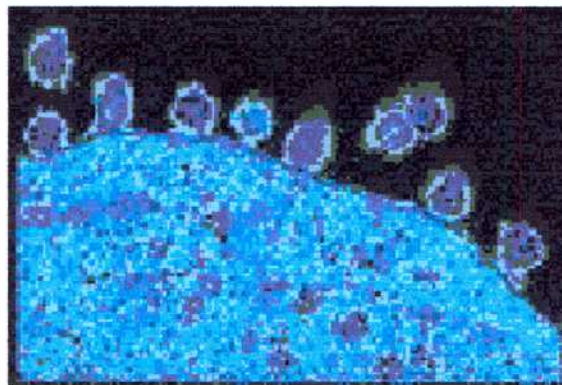
**B**



**C**



**D**



**Figura 3 :**

- A - Representación esquemática de una partícula retroviral madura de HIV-I**
- B - Microscopia electrónica de una partícula retroviral inmadura de HIV-I**
- C - Microscopia electrónica de una partícula retroviral madura de HIV-I**
- D - Microscopia electrónica: partículas retrovirales HIV-I saliendo de la célula**

### 1.3 - Genoma Retroviral

El genoma viral de los retrovirus varia entre 7 y 12 Kb y está compuesto de dos moléculas de ARN simple cadena con polaridad positiva [13, 15]. Estas últimas se unen por puentes hidrógenos en la extremidad 5'. Además, en esta extremidad se encuentra un ARNt (lys para MLV y pro para HIV-1) que sirve de *primer* para la síntesis de la primera cadena de ADN viral durante la transcripción inversa.

El ARN genómico de todos los retrovirus contiene los tres genes *gag*, *pol* y *env* que codifican para todas las proteínas de estructura y enzimáticas, es decir, que actúan en *trans* durante el transcurso del ciclo viral (Figura 1 y 2). Los productos de estos genes, bien que son específicos a cada retrovirus, poseen características comunes.

El gen *gag* codifica para las proteínas de estructura de la partícula viral. En el caso de MoMLV se trata de MA, CA, NC y la proteína pp12. En el caso de HIV-1, *gag* no codifica para pp12 pero sí lo hace para otras proteínas: p2, p1 y p6. El conjunto de estas proteínas se obtiene luego del clivaje proteolítico del precursor Gag (PrGag).

El gen *pol* contiene la información genética para las enzimas virales: PR, RT e IN.

El gen *env* codifica para el precursor de la glicoproteína Env, constituida de una subunidad SU (de superficie) y una subunidad TM (transmembranaria).

Existen igualmente numerosas secuencias no codificantes en el ARN genómico retroviral que son indispensables para el éxito del ciclo replicativo, actuando en *cis* (Figura 1 y 2).

En la extremidad 5' se encuentran: la región « *leader* » que contiene la región R, la región U5, la secuencia PBS (*Primer Binding Site*), el sitio dador de *splicing* (SD), la región E/DL, una secuencia IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) y una secuencia CTE (*Constitutive Transport Element*).

La **región R** permite el primer salto replicativo durante la transcripción inversa y contiene la señal de poliadenilación AAUAAA, que es silenciosa en posición 5' del genoma viral.

La **región U5** sirve de matriz para el comienzo de la transcripción inversa y posee en su extremidad 3' una secuencia repetida **IR**, que constituye, junto a la secuencia IR presente en la región U3, el sitio de integración del provirus al ADN celular .

La **secuencia PBS** permite, gracias a su unión al ARNt, el comienzo de la transcripción inversa.

El sitio dador de *splicing* (**SD**), en asociación con el sitio aceptor de *splicing* (**SA**), presente en la región 3' del gen *pol*, permiten la generación de los ARNm que codifican para la glicoproteína Env.

La región **E/DL** contiene : la secuencia DLS (*Dimer Linkage Structure*) que permite la dimerización de los dos ARNs virales ; la señal de encapsidación E o  $\psi$  necesaria para el empaquetaje de los ARNs virales en los viriones.

La secuencia **IRES** permite la traducción del ARNm independientemente del *Cap*.

La secuencia **CTE**, identificada en ciertos retrovirus, por ejemplo, en la secuencia « Leader » de MoMLV [19] permite, luego de su interacción con ciertos factores celulares, la exportación nuclear de los ARNs virales que no han sido sometidos al *splicing*.

**La extremidad 3'** del genoma viral contiene igualmente secuencias que actúan en *cis* : el sitio aceptor de *splicing* (**SA**) ; la secuencia **PTT** (*Poly-Purine Track*) que permite el inicio de una cadena de ADN(+) durante la transcripción inversa ; y la **región U3**. Esta última contiene las secuencias que controlan la expresión del provirus (secuencias *enhancers* que responden a numerosos activadores celulares de la transcripción y secuencias promotoras como CAAT y TATA *box*)(Figura 4). Además, U3 contiene en su región 5' la segunda secuencia IR que permite la integración del genoma proviral al genoma celular.

Durante el ciclo viral el genoma de ARN viral es transformado en doble cadena lineal de ADN, la cual posee en sus extremidades secuencias repetidas llamadas LTR (*Long Terminal Repeat*). Estas últimas están constituidas por tres regiones : U3, R y U5. El sitio de iniciación de la transcripción del ADN proviral se encuentra en el primer nucleótido de la región R del LTR 5' y la secuencia poly(A) de terminación de la transcripción se encuentra en la región R del LTR 3'.

Los oncoretrovirus de genoma simple (MLVs) contienen sólo estas informaciones, en cambio los lentivirus de genoma complejo contienen secuencias suplementarias que codifican para proteínas reguladoras del ciclo viral, como Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev y Nef en el caso de HIV-I. Además, el genoma de HIV-I posee secuencias nucleotídicas suplementarias las cuales interactúan con ciertas proteínas virales (Figura 2) : la secuencia **TAR** (*Trans-Activation Response element*) que interactúa con la proteína Tat, activando la transcripción del ADN proviral integrado en el ADN celular ; la secuencia **RRE** (*Rev Response Element*) que se encuentra sobre el gen *env* y donde la proteína Rev se une para permitir la exportación hacia el citoplasma de ciertos ARNm virales ; y finalmente la secuencia **cPPT/CTS** (*central Poly-PurineTrack / Central Termination Sequence*), localizada en 3' de *pol*. Constituye un segundo lugar de inicio de la síntesis de ADN (+) durante la transcripción inversa. Además, al final de este proceso, permite la formación de una estructura de ADN *triplex* , llamada *central DNA Flap*, que se encuentra implicada en la replicación viral y en la importación nuclear del complejo de preintegración del virus HIV-I.

#### **1.4 - Ciclo Retroviral**

El ciclo de replicación de un retrovirus puede ser dividido en 8 etapas (Figura 5) : 1) la entrada del retrovirus a la célula, 2) la transcripción inversa, 3) la importación al núcleo, 4) la integración del ADN proviral al ADN del genoma de la célula huésped, 5) la transcripción del provirus, 6) la síntesis de las proteínas retrovirales, 7) la formación y salida de la célula de las nuevas partículas, 8) la maduración de las partículas virales [15].

**1) La entrada a la célula** : Antes de reconocer una o varias (el caso de HIV-I) moléculas en la superficie celular (receptores) *via* la subunidad SU de la glicoproteína Env (gpEnv), los retrovirus se adsorben de manera inespecífica a la membrana plasmática. Luego, la interacción específica Env-receptor provoca un cambio conformacional de la gpEnv que conduce a la aparición y participación del péptido fusión, que se encuentra en la región N-terminal de la subunidad TM, permitiendo la fusión de las membranas viral y celular.



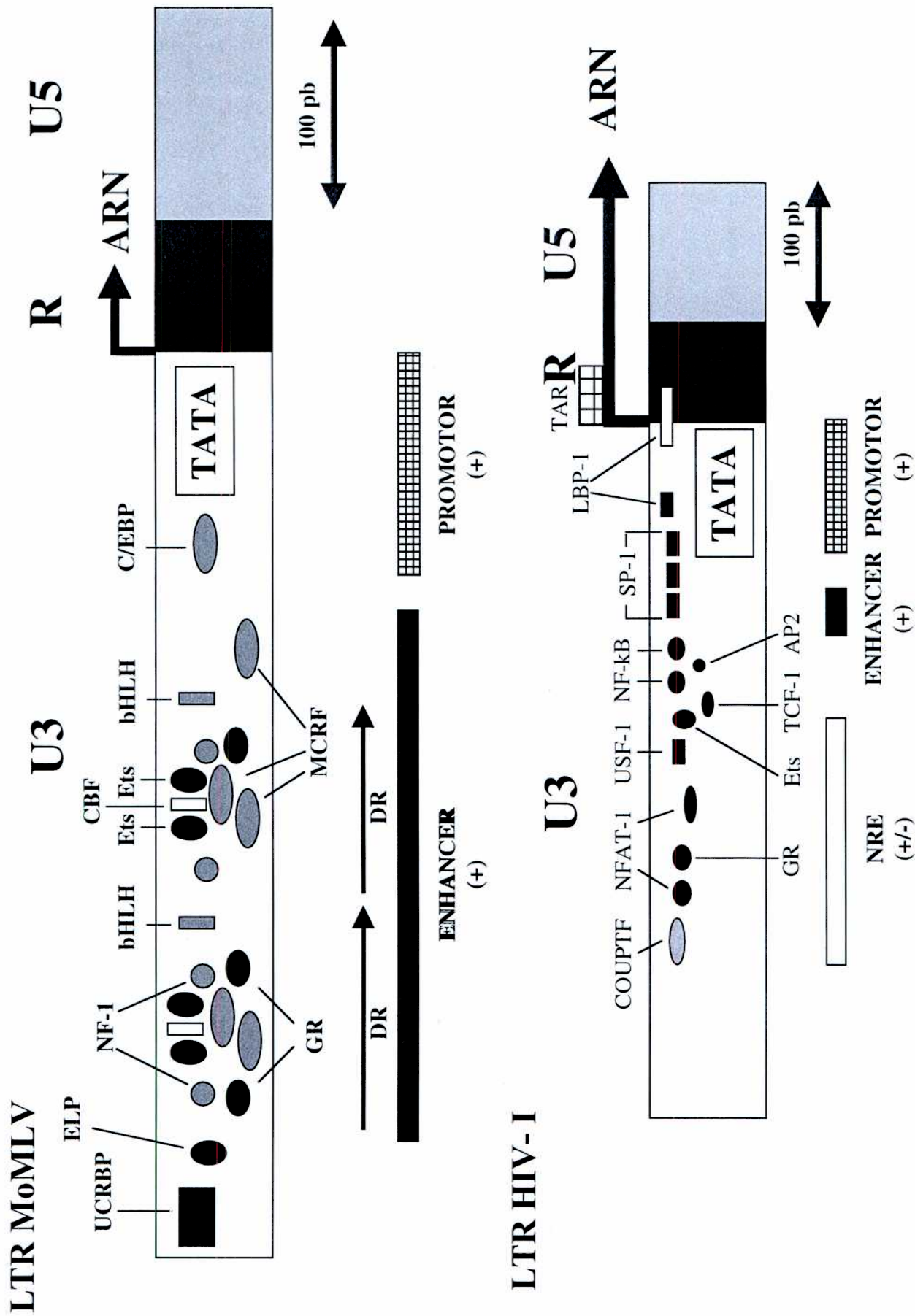


Figura 4 : Organización del LTR de los virus MoMLV y HIV-1

Dos vías de entrada han sido identificadas para los virus con envoltura : i) la fusión a pH neutro (vía independiente del pH), característica de la mayoría de los retrovirus mamíferos de tipo C, como los MLVs y de los HIV-I ; ii) la fusión a pH ácido (vía dependiente del pH), característica de los ortomixovirus como Influenza (virus de la gripe) o VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*). En este último caso es el descenso del pH en los endosomas (pH 5 aproximadamente) que gatilla la fusión entre las dos membranas. En ambos casos la nucleocápside se encuentra en el citoplasma.

**2) La transcripción inversa :** Es la reacción enzimática que permite la conversión del ARN viral en ADN proviral. En general comienza en las primeras fases de la infección pero puede debutar en la partícula viral (transcripción inversa endógena). La síntesis de ADN es iniciada por la transcriptasa inversa (RT) a partir del ARNt unido a la secuencia PBS del ARN genómico viral (Figura 5), luego continúa gracias a los « saltos » intra e intercadena de la RT formando el ADN proviral simple cadena flanqueado por las secuencias repetidas LTR. La segunda cadena de ADN (cadena +) es iniciada a partir de la secuencia PPT gracias a un *primer* de ARN resultante de la actividad Rnase H de la RT. La tasa de error de la RT *in vitro* y en condiciones fisiológicas es de  $10^{-4} - 10^{-5}$  errores por base incorporada, es decir, alrededor de un error por genoma viral por ciclo replicativo.

**3) La importación del ADN proviral al núcleo :** El nuevo ADN doble cadena y lineal es transportado al núcleo por un complejo de preintegración (CPI). El CPI contiene el ADN lineal y las proteínas RT, NC, IN, MA. Los CPI de los retrovirus de tipo C contienen además la proteína CA [20] , y HIV-I no tiene CA pero posee la proteína p6 y la proteína accesoria Vpr. Esta distinta composición entre los oncoretrovirus y los lentivirus otorga la diferencia en cuanto a la capacidad de estos últimos, de infectar células no proliferativas. Los CPI de los lentivirus pueden pasar a través de ciertos poros de la membrana nuclear, en cuanto a los oncoretrovirus necesitan de la dislocación de esta última, es decir, la entrada de la célula en mitosis.

**4) Integración del ADN viral en el genoma de la célula huésped :** la integración es un proceso preciso mediado por la integrasa (IN) que necesita de las secuencias LTR afin de que las secuencias IR sean accesibles y funcionales. El ADN es clivado por la integrasa en dos nucleótidos en ambas extremidades y este ADN sirve como precursor del ADN viral integrado. Este es un fenómeno de recombinación no homologa con el ADN de la célula huésped, y aparentemente no parece realizarse en secuencias nucleotídicas conservadas pero si en regiones de cromatina « favorables ».

**5) La transcripción del provirus :** es la ARN polimerasa II celular que transcribe el ADN proviral en un solo ARNm. La transcripción comienza en el primer nucleótido de la región R del LTR 5' y se termina luego del reconocimiento de la secuencia de poliadenilación AAUAAA de la región R del LTR 3'. El ARNm completo es denominado ARN genómico. Los ARNs genómicos retrovirales son sometidos a los mismos eventos que los ARNms celulares : adición de un Cap en 5' y de una cola de poly(A) en 3' . Poseen tres funciones : i) codifican para las proteínas Gag y Pol, ii) son sometidos al *splicing* para dar los ARNs subgenómicos que codifican para Env y para las proteínas accesorias en el caso de los lentivirus, iii) son encapsidados en las nuevas partículas virales. Todos los ARNs subgenómicos presentan el mismo primer y último exon no codificante (R-U5 de la LTR 5' y U3-R del LTR 3', respectivamente).

En el caso de HIV-I, el nivel basal de la transcripción del provirus es aumentado gracias a la acción de la proteína transactivadora de la transcripción Tat. La transcripción de los retrovirus puede ser estimulada igualmente por factores de transcripción celulares que posean sitios de acción en los LTR (Figura 4) [21].

**6) La síntesis de las proteínas virales :** para la traducción, los retrovirus utilizan la maquinaria traduccional de la célula. En el caso de HIV-1, además de la maquinaria de exportación extranuclear celular, la proteína Rev interviene llevando hacia el citoplasma los ARNm que no han sufrido *splicing*. El ARN genómico que codifica para los precursores Gag y Gag-Pro-Pol y los ARNm que codifican para las proteínas accesorias de los lentivirus son traducidos por ribosomas libres en el citoplasma. Los ARNm subgenómicos que codifican para el precursor de la gpEnv son traducidos por ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplasmático. Las proteínas virales pueden sufrir modificaciones co- y posttraduccionales : glicosilación, clivajes proteolíticos, miristilación.

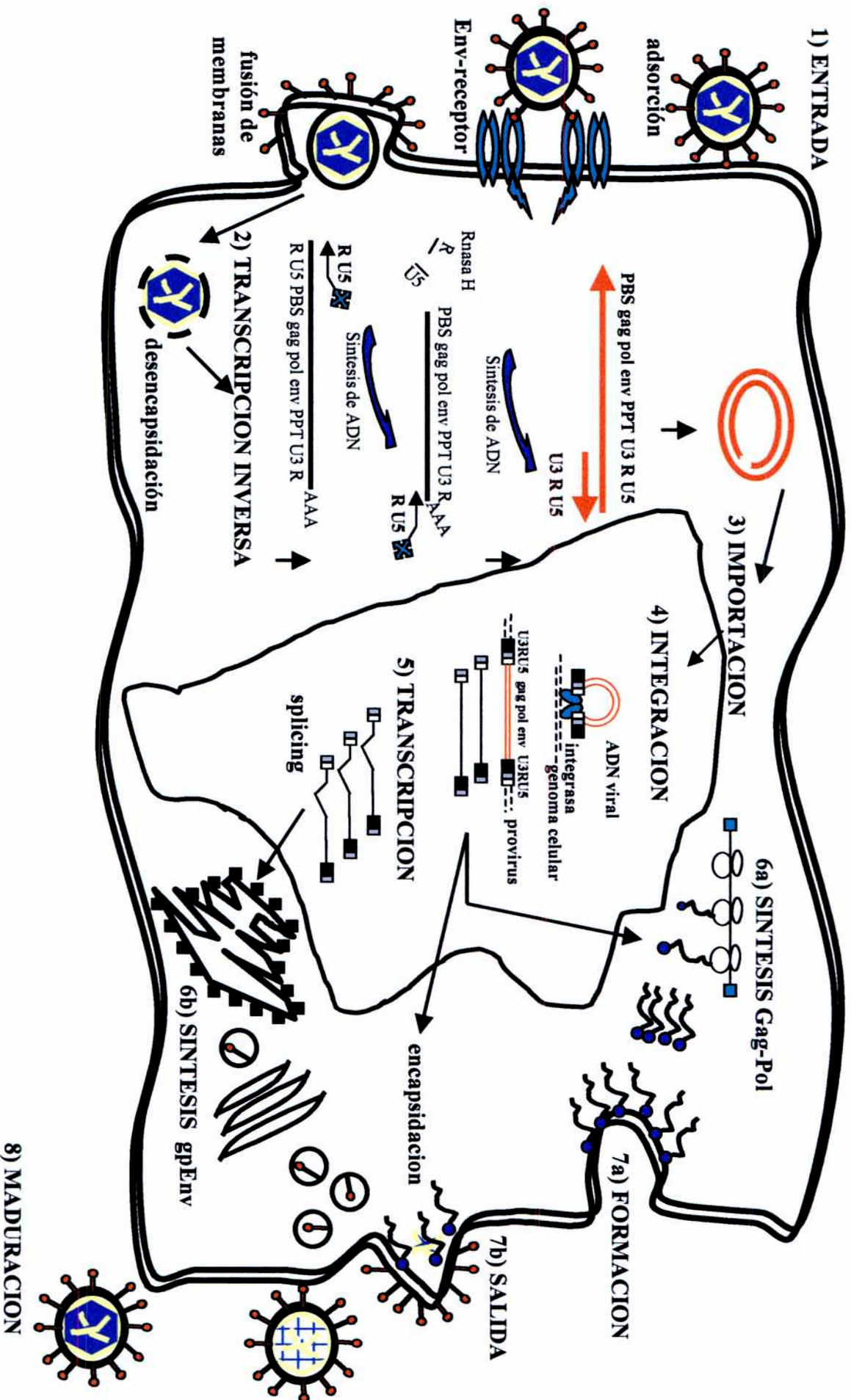


Figura 5 : Ciclo retroviral de MLV

**7) Formación y salida de las nuevas partículas virales :** los precursores proteicos Gag y Gag-Pro-Pol, las glicoproteínas Env expresadas en la superficie celular, los ARN genómicos y los ARNt celulares, homólogos a la secuencia PBS de los ARN genómicos, interactúan en la membrana plasmática para formar las nuevas partículas virales. La formación de las partículas sobre la membrana plasmática es característica de los retrovirus de tipo C y de los lentivirus. Ciertas proteínas celulares pueden ser incorporadas en las nuevas partículas y en el caso de HIV-1, Vpr es incorporada también.

El proceso preciso de formación y salida de las nuevas partículas virales no es todavía bien comprendido, a pesar de los muchos trabajos publicados. Se sabe que este proceso es dependiente del precursor Gag. En efecto, la interacción entre los PrGag es suficiente para permitir la salida de partículas no infecciosas, mismo en ausencia de otras proteínas virales y del ARN viral [15].

**8) La maduración :** La maduración es primordial para obtener partículas infecciosas [22]. Esta consiste en un cambio estructural en el *core* de la partícula viral que se hace más compacto (observado en microscopía electrónica). La proteasa viral tiene un rol central clivando los precursores Gag y Gag-Pro-Pol, como así también en los MLVs, la glicoproteína Env en la región R, generando así las proteínas virales biológicamente funcionales. La maduración concierne también los dímeros de ARN, que se van a estabilizar en presencia de la NC, que además acelera la interacción con los ARNt.

Las nuevas partículas virales que han salido de la célula y madurado podrán realizar un nuevo ciclo infeccioso.

## 1.5 - Proteínas

Las proteínas codificadas por el genoma viral serán descritas brevemente. La glicoproteína Env (gpEnv), más precisamente la de MLV, será descrita más en detalle debido a su rol fundamental en la entrada de los retrovirus en las células y a su potencial utilización en la puesta a punto de estrategias concernientes al *targeting* celular utilizando vectores retrovirales, tema fundamental de esta tesis.

### 1.5.1- Las proteínas Gag y Gag-Pro-Pol

La mayoría de las proteínas estructurales y enzimáticas de los retrovirus poseen propiedades análogas. Las proteínas derivadas de gag (MA, CA, NC, y pp12 para MoMLV, o p2, p1 y p6 para HIV-I) son las proteínas de estructura. La organización, en el PrGag y en el virión, de las proteínas Gag mayores (MA, CA y NC) es bien conservada entre los retrovirus. [13].

**La proteína Gag** es la sola proteína viral indispensable para el ensamblaje y la liberación de las partículas virales. El hecho de que la poliproteína Gag-Pro-Pol sea incapaz de formar viriones en ausencia de Gag continua sin delucidarse. Gag participa al ensamblaje desde la membrana celular y existen varias hipótesis de como el PrGag viaja hasta allí : gracias a la intervención de chaperoninas celulares ; por interacción con proteínas del citoesqueleto, la intervención específica de una proteína celular que reconocería el dominio de unión a la membrana de Gag.

A la hora actual han sido identificados tres dominios del PrGag importantes para el ensamblaje, la multimerización, la incorporación de gpEnv y la salida al medio extracelular de las nuevas partículas retrovirales : Los dominios M, I y L [23]. **El dominio M** dirige específicamente la poliproteína Gag hacia la membrana plasmática y permite su anclaje (*binding*) en esta última. Se sitúa en la región MA. Deleciones en el dominio M impiden su interacción con la membrana y la salida de las partículas virales. A pesar de esto, existen ciertos mutantes M de HIV-I que no pueden anclarse en la membrana, sin embargo las partículas son correctamente formadas y salen sin problema de la célula. Este dominio, además, ha sido implicado en la incorporación de gpEnv de HIV-I . **El dominio I** permite la interacción Gag-Gag, las cuales son fundamentales para la formación de nuevas partículas

virales HIV-I [24]. Se sitúa en la extremidad N-terminal de NC. El **dominio L** (*late*) interviene en la salida de las nuevas partículas de la célula. Son pequeños y se sitúan en el PrGag según el retrovirus. En MoMLV se localiza en la región pp12 de la proteína Gag [25] y en HIV-I en la extremo N-terminal de la proteína p6 [26]. L interviene en la separación de los viriones de la célula. En efecto, en ausencia de L las partículas se acumulan en la superficie celular. Además p6 de HIV-I parece estar implicado en el tamaño de la partícula de HIV-I [27].

### 1.5.2- Maduración de Gag y Gag-Pro-Pol

La maduración de los precursores Gag y Gag-Pro-Pol permite la individualización de proteínas virales. Es la proteasa que va a actuar del extremo N-terminal del precursor PrGag hacia el C-terminal, generando las proteína de matriz MA, de la cápside CA, de la nucleocápside NC y pp12 en MoMLV o p2, p1 y p6 en HIV-I, y finalmente la proteasa PR, la transcriptasa inversa RT y la integrasa IN (Figura 1 y 2).

**La proteína de matriz MA**, p15 en MoMLV y p17 en HIV-I corresponde al dominio N-terminal del PrGag. Participa en el anclaje del PrGag a la membrana plasmática y permite la incorporación específica de gpEnv 120 de HIV-I. Queda anclada en la membrana del virión.

**La proteína de la cápside CA**, p30 en MoMLV y p24 en HIV-I, participa en el contexto del PrGag a la formación de los viriones y al control del tamaño de estos. Luego de la maduración de la partícula fuera de la célula es la que forma el *core* del virión, protegiendo el complejo ribonucleoproteico. En HIV-I permite la incorporación de la ciclofilina A (CyPA), que interviene en las etapas precoces de la infección de HIV-I [28]. Se la encuentra en el complejo de preintegración (CPI) de los MLVs, pero no en los de HIV-I.

**La proteína de la nucleocápside NC**, p10 en MoMLV y p7 en HIV-I, es una pequeña proteína básica formando dos dedos de zinc que interactúa con los ácidos nucleicos. De esta manera, es la responsable de la encapsidación específica de los ARN genómicos virales luego del reconocimiento de la secuencia  $\psi$ , como así también de la multimerización del PrGag. Interviene además en la compactación y dimerización del ARN y en las etapas precoces de la infección, estabilizando el nuevo ADN sintetizado luego de la transcripción inversa [29]

La función de **pp12** en MoMLV y de **p2, p1 y p6** en HIV-I no es bien conocida. Las regiones p2, p1 y p6 han sido implicadas en la cinética de clivaje del PrGag en HIV-I por la proteasa y en la morfología del virión [23]. p6 permite la incorporación de Vpr.

**La proteasa PR**, p14 en MoMLV y p10 en HIV-I, interviene en la formación de las nuevas partículas virales, clivando los precursores proteicos. No es conocido su mecanismo de activación. Reconoce secuencias hidrofóbicas que poseen algunos residuos conservados y es próxima a la familia de las proteasas aspárticas.

**Las proteínas Pol** reagrupan a la transcriptasa inversa RT (p80 en MoMLV y p66/51 en HIV-I), y la integrasa IN (p46 en MoMLV y p32 en HIV-I). **RT** es la enzima implicada en la transcripción inversa, es decir en la replicación del ARN viral en ADN lineal, gracias a su actividad de ADN polimerasa dependiente de ARN y del ADN, y de su actividad ribonucleasa (Rnasa H). **IN** cataliza la reacción de integración del ADN proviral en el genoma de las células infectadas. De esta manera permite que el material genético viral se mantenga de manera estable en la células en división, protegido de la degradación y transcripto en nuevas copias. IN forma dímeros. En HIV-I esta asociada a la importación nuclear del CPI en las células no proliferativas.



## 1.6 – La glicoproteína Env

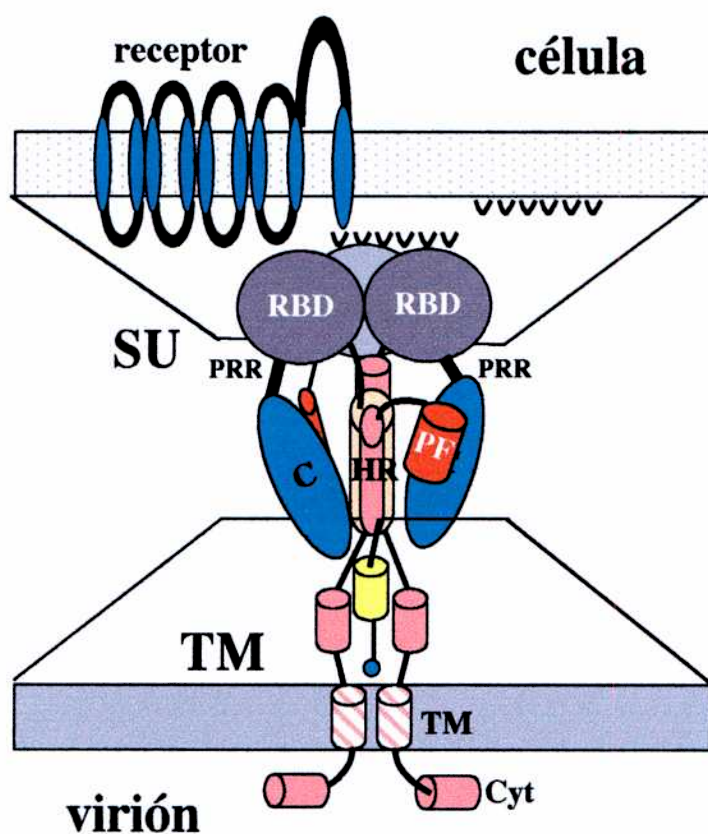
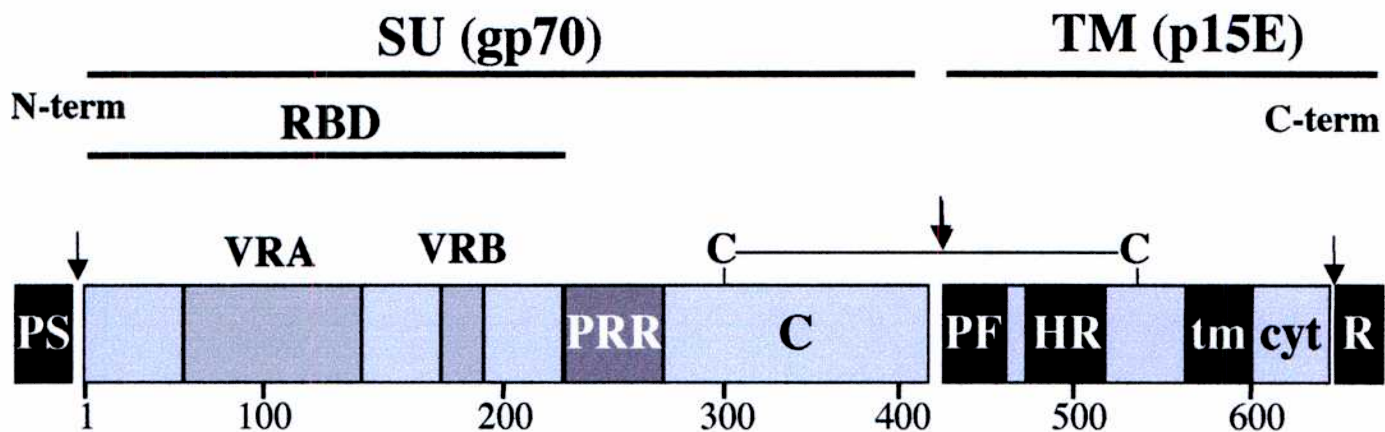
### 1.6.1- Estructura y síntesis

**La glicoproteína Env** (gpEnv) es un oligoheterodímero constituido por una subunidad de superficie extracelular (SU, gp70 en los MLVs y gp120 en HIV-I) unida a una subunidad transmembranaria (TM, p15E en los MLVs, y gp41 en HIV-I) que permite el anclado del complejo gpEnv en la membrana viral (Figura 6).

La gpEnv es sintetizada en forma de precursor proteico (Pr80 en MoMLV y Pr160 en HIV-I) a partir de un ARNm que ha sufrido un evento de *splicing*, este precursor viaja a la luz del retículo endoplasmático (RE) gracias a un péptido señal. Una vez en el RE, la proteína sufre diferentes modificaciones co- y posttraduccionales fundamentales para la adquisición de su estructura tridimensional funcional. Estas modificaciones son : el clivaje del péptido señal, N-glicosilaciones, la formación de puentes disulfuro, el repliegue (*fold*ing) del monómero Env gracias a la interacción de chaperoninas, y finalmente su oligomerización. La gpEnv de MoMLV posee 8 sitios de glicosilación en la región SU y la de HIV-I 30 sitios repartidos en toda la proteína [30]. El rol de las glicosilaciones no es bien conocido, pero ciertos trabajos le atribuyen una importancia en la buena conformación y el transporte de PrEnvs a la membrana plasmática [31-33]. Otros, muestran que no tienen efecto en la función biológica de las gpEnvs de MLV y de HIV-I [34, 35].

Por intermedio de la TM, los precursores polipeptídicos forman trímeros que son transportados del RE al aparato de Golgi. Esta es una etapa limitante en el transporte hacia la membrana. De la misma manera, una vez oligomerizados, los PrEnv pueden interactuar con sus receptores (sintetizados en la célula), limitando de esta forma su transporte eficaz. En HIV-I, la proteína Vpu interactúa con el dominio citoplasmático de CD4 (receptor de HIV-I) degradándolo, permitiendo así a los PrEnvs oligomerizados de llegar a la membrana y ser incorporados en los nuevos viriones [36]. No se ha encontrado ningún mecanismo de este tipo en otros retrovirus. Se sugiere entonces que la gpEnv debe ser expresada en exceso en comparación a su receptor, para asegurar su correcta llegada a la membrana.

El PrEnv es clivado en el Golgi por una proteasa celular que reconoce secuencias consenso dibásicas entre las subunidades TM y SU. Luego de esto, TM/SU se asocian por puentes disulfuro lábiles, que podrían estar implicados en el proceso de fusión de membranas [37]. El clivaje de TM/SU ha sido demostrado como primordial para la incorporación eficaz de



**Figura 6 : Estructura de la glicoproteína Env de los MLVs**

- PS : péptido señal
- VRA y VRB : regiones hipervariables
- PRR : *Proline Rich Region*
- PF : péptido fusión
- HR : *Heptad Repeat*
- tm : región transmembrana de la TM
- cyt : región citoplásmatica de la TM
- R : péptido R (p2R)

la gpEnv en las partículas virales, pero también para la adquisición del poder de fusión de la gpEnv [38-40]. Una vez maduros y oligomerizados, los TM/SU viajan a la membrana plasmática por la vía de secreción donde son incorporados en las partículas virales salientes. La gpEnv no parece estar implicada en la correcta salida de las nuevas partículas virales de la célula, ya que es posible obtener partículas virales « peladas » (*bald*), es decir, sin gpEnvs en su superficie. Estas partículas no son infecciosas.

### **1.6.2 - Incorporación**

El mecanismo de incorporación de las gpEnvs en las partículas en formación no es bien conocido. Sin embargo dos mecanismos son propuestos : el modelo de incorporación activa y el de incorporación pasiva [23].

**El modelo de incorporación activa** ha sido propuesto para la incorporación de la gpEnv de HIV-I. Se basa en la interacción directa y específica entre la cola citoplasmática de la TM de la gpEnv y la región del PrGag que interactúa con la membrana plasmática (es decir la proteína MA), permitiendo la incorporación específica de las gpEnvs en las partículas virales. En efecto, las deleciones [41], y/o mutaciones [42, 43] en la MA de HIV-I bloquean la incorporación de gpEnvs en los viriones. Además, análisis bioquímicos han demostrado una interacción directa entre MA y el dominio citoplasmático de gpEnv de HIV-I [44]. Por otra parte, los viriones con mutaciones puntuales de la proteína MA de MoMLV no presentan un déficit de incorporación.

**El modelo de incorporación pasiva** parece ser característico de la mayoría de los MLVs y en ciertos casos de HIV-I. Se basa en la hipótesis de que interacciones entre las proteínas submembranarias y las proteínas expresadas en la membrana impedirían el movimiento de estas últimas a través de la superficie celular. Como las gpEnvs no interactúan con proteínas submembranarias, estas podrían llegar a los sitios de salida de las nuevas partículas. Esta teoría se ve reforzada gracias a la posibilidad de « pseudotipar » (producir un retrovirus con la gpEnv de un otro retrovirus o virus) los MLVs con diversas proteínas heterólogas como la proteína G de VSV [45], la gpEnv de GALV [46], de RSV [47], de SFV [48], del virus de Influenza, de paramyxovirus SV5 [49], de HTLV-I [50], del EBOLA [51] y de HIV-I luego de modificaciones en el dominio citoplasmático [52, 53].

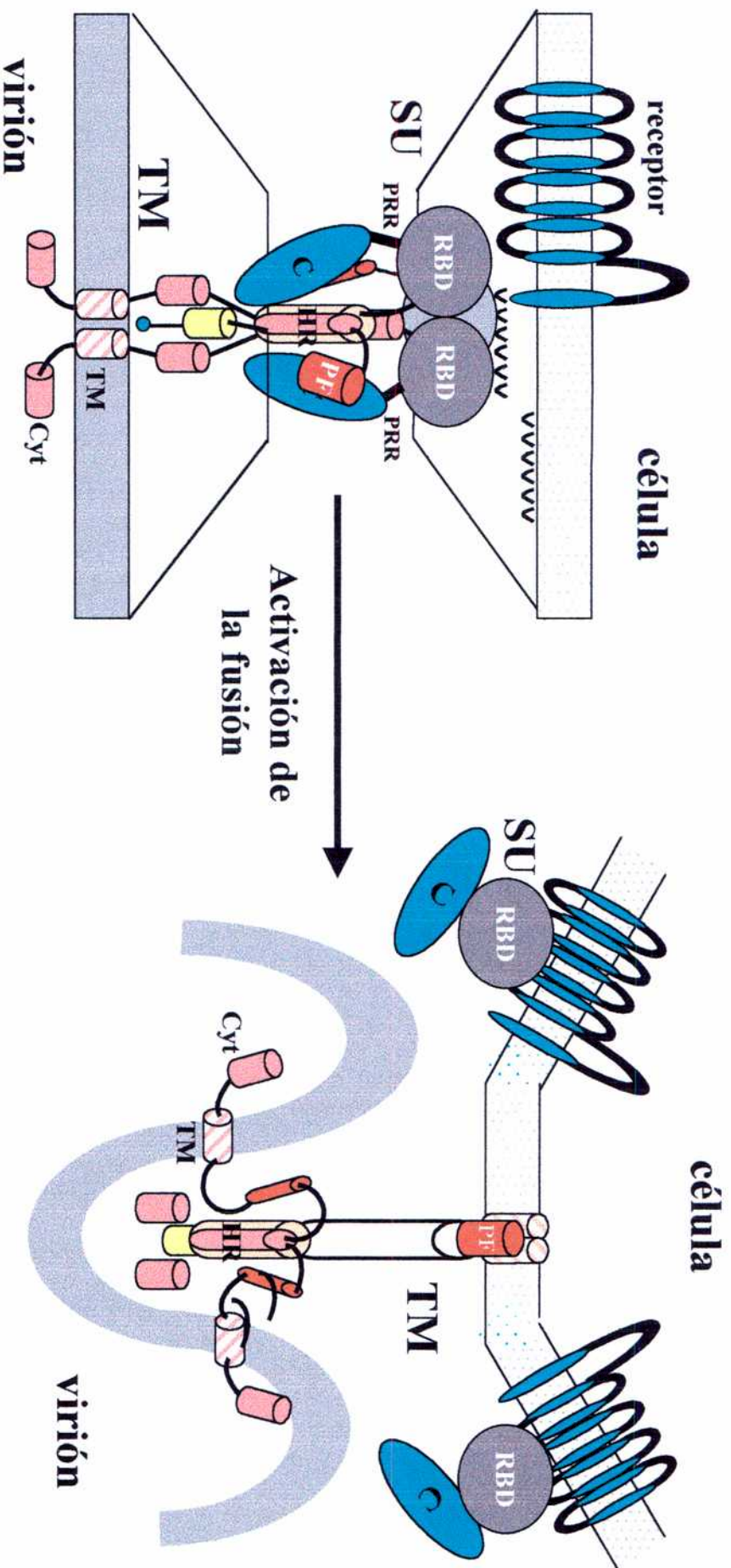
Independientemente de la vía de incorporación (activa o pasiva), pareciera existir sitios específicos de « salida » denominados microdominios *rafts*, que presentan una composición proteica y lipídica particular.

### **1.6.3 - Maduración**

Una vez incorporada en las partículas virales, la gpEnv es capaz de reconocer su receptor en la célula *target*. Pero una maduración es todavía esencial en las gpEnvs de los retrovirus de mamíferos de tipo C para adquirir un poder de fusión. Esta consiste, en el momento de la salida de la célula o ya en las partículas libres, en el clivaje de 16 aminoácidos del extremo C-terminal de la TM (péptido R, p2R en MoMLV) [54], por intermedio de la proteasa viral (Figura 6). Una vez maduro, el complejo gpEnv, presente bajo la forma de homotrímero, es capaz de reconocer su receptor específico y de gatillar la fusión entre las dos membranas (Figura 7). No se conoce como el péptido R regula el poder de fusión, pero es claro que su presencia inhibe la fusión de las gpEnvs de los MLVs, por consecuencia su infecciosidad [55, 56]. No se ha puesto en evidencia una maduración de este tipo en el dominio TM de la gpEnv de HIV-I.

### **1.6.4 - Rol de la glicoproteína Env en la entrada a la célula**

La glicoproteína Env es fundamental para el éxito de la infección; fija la partícula viral a la célula, permite la fusión de las membranas viral y celular, liberando así la cápside en el citoplasma. A continuación se detallan los dominios funcionales de la gpEnv de los MLVs debido a su utilización en las estrategias de *targeting* celular implicadas directamente en esta tesis.



**Figura 7 : Mecanismo de entrada de los retrovirus MLV's a la célula**

Los retrovirus entran en la célula en dos etapas: 1) Unión a los receptores en la superficie celular. El dominio de unión al receptor (RBD) de la subunidad SU se une al receptor. Esto produce una señal de activación de la maquinaria de fusión de la TM de la gpEnv; 2) Fusión de las membranas viral y celular. La activación de la TM se traduce por una reorganización que expone el péptido fusión (PF) que se inserta en la membrana celular.

#### 1.6.4.1- La glicoproteína Env de MLV

**Dominio de unión al receptor :** Los dominios de unión al receptor viral en la superficie celular han sido localizados en la región N-terminal de la SU. Esta contiene las regiones hipervariables VRA, VRB y PRR (*proline rich* región) (Figura 6). Esta región es capaz de plegarse de manera autónoma y de reconocer su receptor [57-59]. Experiencias realizadas con quimeras de la subunidad SU demuestran que en el caso de los retrovirus MLVs *amphotropic* y *ecotropic* (ver 1.8-Tropismo) la región que contiene VRA y VRB (RBD, *Receptor Binding Domain*) es suficiente y eficaz para el reconocimiento del receptor, pero en los virus MLVs *polytropic*, *xenotropic* y 10A1, ciertas secuencias suplementarias localizadas en PRR son necesarias para una eficaz interacción con los receptores.

En el caso de los MLVs *amphotropic* y *ecotropic*, el tropismo ha sido atribuido a la región hipervariable VRA y VRB [57, 60-63]. Además, la mutación de residuos críticos en este dominio afecta la unión al receptor sin afectar la incorporación de las gpEnv en la partículas [64-67]. VRA y VRB difieren en su secuencia y tamaño entre los diferentes grupos de MLVs. VRA posee un rol predominante en la elección del receptor y VRB estaría implicado en la estabilización de la interacción Env-receptor [60]. VRA y VRB están íntimamente asociados. Esto sugiere que una alteración significativa entre la distancia que los separa o en las secuencias de uno o de otro, no sería bien tolerado por el resto de la gpEnv. Esto ha sido confirmado por distintas experiencias queriendo modificar la gpEnv para redirigir el tropismo hacia otra célula [68]. Es por esto que conocer la estructura tridimensional de gpEnv es una ventaja para construir nuevas gpEnv quimeras en un contexto de *targeting* celular (ver 3- Los Vectores Retrovirales y el *Targeting* Celular).

**Dominios implicados en la fusión : La subunidad SU :** La interacción de RBD con el receptor viral provoca cambios conformacionales en el complejo Env, que permite la « aparición » del péptido fusión situado en el extremo N-terminal de la TM, y que conduce a la fusión de las dos membranas viral y celular. Los detalles moleculares de la fusión no son bien conocidos, mismo si se han identificados varias regiones localizadas a lo largo de la gpEnv que participan en este proceso.

En el **extremo N-terminal de la SU** de los MLVs se encuentra un péptido conservado, centrado en una histidina, implicado en eventos de *post-binding* [64, 69, 70]. La delección o mutación de esta histidina impide la fusión, sin modificar el reconocimiento y la unión al

receptor viral. La infecciosidad de estos virus mutantes puede ser restablecida si al momento de la infección se agregan fragmentos solubles de la SU *wild type*.

**La región rica en prolina, PRR**, se encuentra entre el RBD y el dominio C-terminal de la SU. Es crítica para la estructura y la función de la gpEnv [65, 71]. Mutaciones o deleciones en esta región desestabilizan la interacción entre TM y SU, favoreciendo el *shedding* (presencia de SU soluble en el sobrenadante viral) de esta última, lo cual se traduce en una pobre eficiencia de infección.

**El dominio C-terminal de la SU** interactúa con la TM mediante interacciones frágiles (Figura 6) [37]. Se ha demostrado la existencia de un puente disulfuro lábil entre la secuencia conservada CWLC del dominio C-terminal y la región CX<sub>6</sub>CC del ectodominio de la TM en la gpEnv de los MLVs [37, 72]. Este puente disulfuro es primordial para el *folding* correcto y el transporte de la gpEnv a la membrana plasmática. La secuencia conservada CWLC parece ser un sitio activo reconocido por enzimas celulares implicadas en las reacciones de intercambio de grupos disulfuro [37].

**Dominios implicados en la fusión : La subunidad TM** : se divide en tres regiones : el dominio extraviral (ectodominio), el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático.

**Dominio extraviral (ectodominio)** : contiene en su extremo N-terminal el péptido fusión responsable del comienzo del proceso de fusión [73, 74]. Del hecho que este péptido posea varias analogías con el péptido de fusión de la gpEnv del virus de Influenza (hemaglutinina, HA), se ha propuesto que el proceso de fusión entre membranas de los MLVs debe ser parecido al de HA [75]. El modelo es el siguiente : bajo la forma no activa, el péptido fusión se encuentra « escondido » en la estructura tridimensional de la HA. Luego de la unión con el receptor viral, la proteína gpEnv sufre cambios conformacionales que exponen al péptido fusión, pudiendo penetrar en la membrana plasmática para permitir la fusión de las dos membranas [76, 77]. Trabajos recientes sobre las proteínas de fusión de diferentes virus (MLV, HIV, SIV, HTLV, Ebola, etc.) revelan además que se producen rearrreglos importantes en la región del ectodominio próxima a la membrana viral.

**Dominio transmembrana** : permite el anclaje de gpEnv a la membrana viral. La sustitución de ciertos residuos (Pro617) en esta región de la gpEnv de MoMLV reduce el poder de fusión, por ende, la eficiencia de infección [78]. Este dominio permite la transmisión de señales hacia el ectodominio de la TM , luego de la « activación » de la gpEnv cuando es clivado el péptido R, durante la etapa de maduración.

**Dominio citoplasmático :** en los MLVs contiene determinantes que controlan la fusión. El más caracterizado es el péptido R (o p2E de 16 aminoácidos) situado en el extremo C-terminal de la subunidad TM. Su clivado permite a la partícula viral ser competente para la fusión y la infección [55, 56, 79]. Luego del clivado se produciría una reorganización del dominio transmembrana y del ectodominio de la TM : una estructura de « profusión » [80].

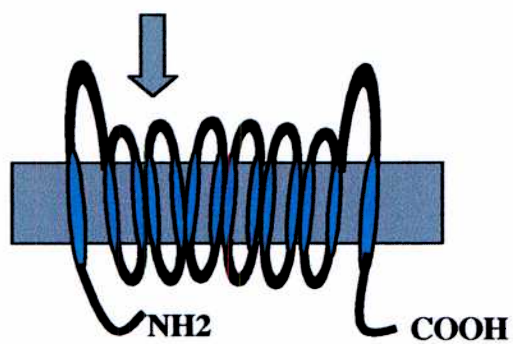
#### **1.6.4.2- La glicoproteína Env de HIV-I**

Para HIV-I, la biosíntesis, la estructura y la función de las subunidades TM y SU son similares a las de los MLVs [13]. HIV-I entra en la célula gracias a un mecanismo de dos etapas, pero contrariamente a los MLVs [81], HIV-I necesita de dos moléculas receptoras (un receptor y un coreceptor) en la superficie de la célula (Figura 8). Existe una gran variabilidad de secuencias entre las subunidades SU entre los diferentes aislados de HIV-I, todos reconociendo CD4 como receptor. Esto sugiere que una región conservada de la SU debe permitir la interacción con CD4 y que una región variable daría el tropismo de la partícula viral luego del reconocimiento de un coreceptor específico. En efecto, HIV-I interactúa con la molécula CD4 por intermedio de regiones conservadas C3 y C4 de la SU [82-84]. Esta interacción es indispensable ya que permite rearrreglos conformacionales en la SU que expone de esta manera la región hipervariable V3, implicada en el reconocimiento del coreceptor [85-87]. La unión de la SU en dos etapas gatilla, como en los MLVs, una cascada de señales en la gpEnv, que finaliza con la activación del proceso de fusión entre las membranas viral y celular.

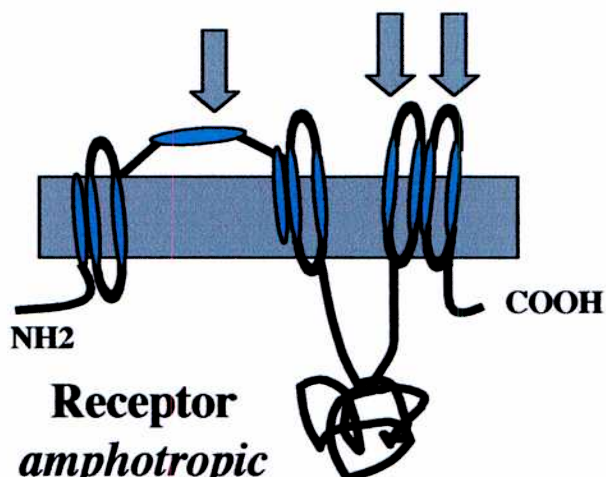
#### **1.6.5 - Rol de la célula en la entrada de los retrovirus**

La activación de gpEnv es primordial, pero no suficiente para llevar a cabo el proceso de fusión entre membranas. Numerosos trabajos sugieren la participación activa de la célula en las etapas precoces de la entrada del virus por intermedio de los receptores virales. Las homologías estructurales y fisiológicas que existen entre los receptores y entre las diferentes gpEnvs de los retrovirus mamíferos de tipo C permiten proponer para estos retrovirus, un mecanismo común de activación de la fusión y de la entrada del virus a la célula.

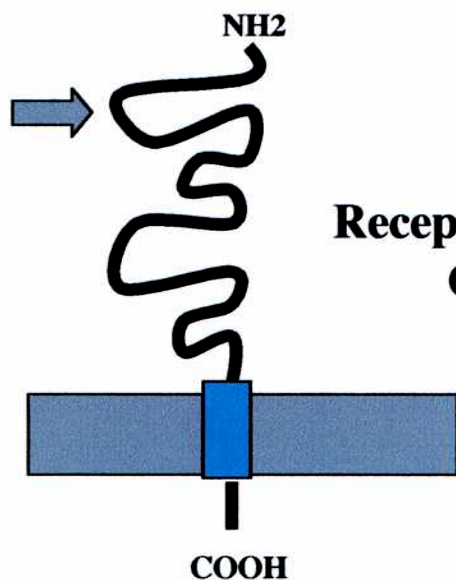




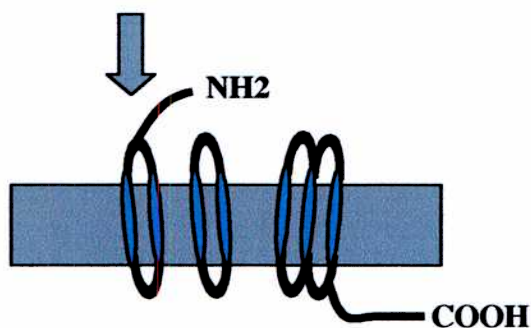
**Receptor  
*ecotropic*  
MCAT-1**



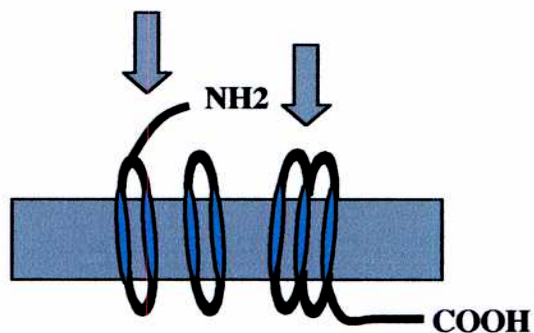
**Receptor  
*amphotropic*  
Pit1/Pit2**



**Receptor HIV-I  
CD4**



**Coreceptor HIV-I  
CCR5**



**Coreceptor HIV-I  
CXCR4**

**Figura 8 : Receptores y coreceptores retrovirales**

Existe cierta heterogeneidad en los receptores virales MLVs expresados en la superficie celular, y solo una pequeña fracción de estos son funcionales [58, 88]. Esto sugiere que un mecanismo de reagrupamiento de receptores podría llevarse a cabo para permitir una cooperación entre estos y lograr la infección [89]. Estudios recientes muestran que una reorganización del citoesqueleto de actina y de microtúbulos, con los cuales los receptores interactúan, existe luego de la unión del virus a su receptor y este evento podría participar en la entrada de virus MLVs *ecotropic* y *amphotropic* estimulando la agregación de los receptores, la internalización, y el transporte de los virus unidos a los receptores [90, 91]. Además, la entrada de los retrovirus en las células depende de la densidad de superficie de receptores retrovirales, que varía con el estado fisiológico de la célula, y con el medio extracelular.

### 1.7 - Proteínas accesorias

Las proteínas accesorias son expresadas por todos los lentivirus, a veces con ciertas diferencias [13, 92, 93]. Salvo Tat y Rev, las proteínas accesorias (Nef, Vif, Vpr, Vpu) no parecen ser primordiales para la replicación viral en la mayoría de los sistemas de cultivos celulares. Sin embargo, su alto grado de conservación indica que deben cumplir un rol crucial *in vivo*. Varios trabajos demuestran su interacción con la célula huésped.

**Tat** (*transactivator*), es una proteína de 14 kDa en HIV-I y es el transactivador mayor de la transcripción del provirus a partir del LTR. Activa el complejo de transcripción de la ARN pol II a nivel de la iniciación, de la elongación y durante la progresión de la transcripción. Se fija a la secuencia TAR localizada en la región R del LTR. En su ausencia no se detecta la replicación viral.

**Rev**, de 19 kDa en HIV-I interviene luego de la transcripción del provirus, asegurando el transporte del ARNm viral (ARN genómico) y de los ARNm que han sufrido un evento de *splicing* (Vif, Vpu-Env, Vpr) del núcleo hacia el citoplasma. Para realizar esto, Rev se une a la secuencia RRE localizada en el gen *env* [94, 95]. Rev parece, además, estabilizar estos transcritos. Una tercera función atribuida a Rev es la de aumentar la asociación de los polisomas a nivel de los ARNm conteniendo la secuencia RRE, favoreciendo así la traducción. Estudios de mutagénesis demuestran que Rev es fundamental para la replicación viral.

**Vif** (*virión infectivity factor*), proteína básica de 23 kDa en HIV-I se encuentra asociada a la poliproteína Gag. Su síntesis depende de la presencia de Rev y actúa en los ciclos tardíos de la infección. Su presencia permite aumentar entre 50 a 100 veces la infecciosidad del virus y este efecto depende de la célula productora del virus y no de su célula *target*. Además, es indispensable en las células llamadas no permisivas (macrófagos, linfocitos periféricos...) para permitir la replicación de HIV-I.

**Vpr** (*viral protein r*), otra proteína básica de 15 kDa en HIV-I. Su síntesis depende también de Rev. Se encuentra en los viriones gracias a su interacción con la proteína p6 del PrGag. Interviene en la fase precoz de la infección y se acumula en el núcleo. Está implicada en la importación al núcleo por el complejo CPI en las células no proliferativas. Detiene las células en G2/M e induce la apoptosis [93].

**Vpu** (*viral protein u*), proteína fosforilada de 16 kDa en HIV-I. Se sintetiza tarde en el ciclo viral. Se asocia sobretodo a las membranas internas de la célula bajo forma de oligómeros. Se le atribuyen dos funciones : degrada la molécula CD4 en el RE facilitando la maduración y el transporte de la gpEnv de HIV-I hacia la membrana plasmática y facilita la movilidad del PrGag.

**Nef**, de 27 kDa en HIV-I es predominante en el citoplasma. Se asocia a la membrana plasmática y es incorporada en los viriones. Actúa al menos en tres dominios :i) induce la regulación negativa de la molécula CD4 y de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) [96], ii) afecta las vías de señalización de los linfocitos T [97] y iii) aumenta la infecciosidad viral participando a la formación de los viriones [93, 96]

## 1.8 – Tropismo

### 1.8.1 - Los MLVs

Los oncoretrovirus murinos utilizan para entrar en las células diferentes moléculas de superficie celular de estructura muy parecida. En algunos casos, la función natural del receptor puede ser perturbada por la interacción con la partícula viral.

Los MLVs han sido separados en grupos según el receptor celular utilizado, determinado luego de llevar a cabo experiencias de interferencia. Estas últimas se tratan de la observación de que la infección de una célula por un oncoretrovirus puede impedir la reinfección por un otro oncoretrovirus. Si esto sucede, entonces estos dos retrovirus se los clasifica en el mismo grupo, salvo excepciones. Bien que existen fenómenos de interferencia cruzada o no recíproca que sugieren cierta ambigüedad, los oncoretrovirus murinos pueden ser clasificados en 6 grupos según su tropismo [98].

- **los virus *ecotropic* (MLV-E)**, son virus exógenos. Sólo infectan células murinas y de pequeños roedores. Se incluye en este grupo la cepa Moloney (MoMLV), Friend (F-MLV) y Rauscher (R-MLV). Estos reconocen un transportador de aminoácidos catiónicos independientes de sodio (mCAT-1) en la superficie celular [99, 100]. MCAT-1 es una molécula de 67 kDa que atraviesa 14 veces la membrana. Su función de transportador puede disociarse de su función como receptor viral [98, 101]. Sólo aquellas moléculas mCAT-1 que son poco o no glicosiladas se unen eficazmente a las partículas *ecotropics* (Figura 8).

- **los virus *amphotropic* (MLV-A)**, son virus exógenos. Son capaces de infectar, a la vez, células murinas y no murinas, como las células humanas. Incluyen a la cepa 4070A. Reconocen un transportador de iones de fosfato inorgánico, Pit-2, dependiente de sodio y que se expresa de manera ubiquitaria [102, 103]. Pit-2 atraviesa 10 veces la membrana plasmática (Figura 8). El bucle 2 de Pit-2 une la región VRB de los virus *amphotropic* y los bucles 4 y 5 unen VRA [81, 104]. La unión de la partícula a Pit-2 afecta su función de transportador.

- **los virus de la cepa 10A1**, derivan de una recombinación entre los virus *amphotropic* y un gen *env* endógeno, y pueden utilizar Pit-2. Además pueden también reconocer Pit-1, que es un transportador de iones de fosfato inorgánico dependiente de sodio que tiene un 62% de homología con Pit-2 [105, 106] (Figura 8).

-los virus *xenotropic* (MLV-X), son virus endógenos que infectan sólo células no murinas. La molécula XPR que atravesaría entre 7 y 8 veces la membrana ha sido identificada como el receptor de estos retrovirus [78, 107]. Pero no se excluye que otras moléculas puedan servir de receptores.

- los virus *polytropic* (MCF-MLV, *mink cell focus-forming virus*) son retrovirus endógenos. Afectan las células murinas y de otras especies. Proviene de una recombinación entre los MLV-E y de elementos *env* endógenos presentes en el genoma murino y aparentado con los *env xenotropic*. XPR ha sido identificada como el receptor en las células humanas [78, 107].

- Los retrovirus MDEV (*mus dunni endogenous virus*), es un retrovirus endógeno de una cepa de ratón asiático. Pareciera que utiliza un receptor diferente al de los otros retrovirus [108].

La caracterización del complejo gpEnv/receptor para cada oncoretrovirus es fundamental. Según el tropismo de las gpEnvs, podrán ser utilizadas para la generación de vectores para la transferencia de genes. Los complejos gpEnv/receptor de los retrovirus MLVs *ecotropic* y *amphotropic* son los mejores caracterizados. Es por esto que son los más utilizados como vectores y sus gpEnvs son utilizadas para fabricar Envs quimeras con el propósito de redirigir el tropismo (y la infección) de las partículas virales hacia otro tipo celular. De esto se trata las estrategias de *targeting* celular (ver 3- Los Vectores Retrovirales y el *Targeting* Celular).

### 1.8.2 - El virus de la inmunodeficiencia humana

La patogénesis del virus de HIV-I en el hombre es conocida cada vez más y está caracterizada por provocar el SIDA. El HIV-I es un virus reciente, y en el estado actual del estudio en los HERVs (*human endogenous retrovirus*) ninguna secuencia homóloga se ha detectado.

Los retrovirus HIV-I, como así también el HIV-2 y el SIV, reconocen la molécula transmembranaria CD4 como receptor [82, 83], pero necesitan la presencia de una segunda molécula, llamada coreceptor, para que la infección sea posible. Al parecer los coreceptores han sido inicialmente los verdaderos receptores primarios, del hecho de su estructura. La unión a CD4 sería el resultado de una evolución reciente del virus. Ciertos retrovirus son

capaces de entrar en células CD4<sup>+</sup>, pero con una capacidad de infección disminuida. La molécula GalC ha sido propuesta como candidata de receptor en este tipo de células [98].

CD4 (60 kDa) esta constituida por 4 dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (Figura 8) y es expresado en un gran número de células hematopoyéticas, como los linfocitos T, los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas. Esta molécula cumple un rol primordial en la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *via* su receptor T (TCR). HIV-I interactua con el bucle 1 de la CD4.

Numerosos receptores de quimiokinas de tipo CXC o CC (según la cantidad de cisteinas en el extremo N-terminal) son utilizados como coreceptores por los lentivirus [109]. A pesar de la gran diversidad de receptores de quimiokinas disponibles, todas las cepas de HIV-I detectadas en los primeros estadios del SIDA, llamadas de tropismo M o macrofágico (o *no inductoras de syncitya*, NSI), utilizan el receptor CCR5, del cual su ligando natural es el MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$* ), MIP-1 $\beta$  y RANTES. Estas cepas infectan los macrófagos y los linfocitos T entre otras. La importancia de CCR5 en la iniciación del proceso de infección por HIV-I ha sido demostrada luego de la identificación de individuos resistentes a la infección. Estos pacientes no expresan CCR5 en la superficie celular, luego de una deleción de 32 pb en el gen del receptor CCR5 [110]. En un estadio mas tarde de la infección por HIV-I, aparecen las cepas de tropismo T o linfocitario (o *inductoras de syncitya*), asociadas a una progresión acelerada de la enfermedad. Estas cepas son caracterizadas por su poder de replicación en líneas celulares T de laboratorio y en células T primarias. Su coreceptor mayor es el CXCR4, del cual su ligando natural es el factor SDF-1 $\alpha$  (*stroma-derived factor-1 $\alpha$* ). En estos estadios existe además, cepas de tropismo mixto, capaces de replicarse en macrófagos o linfocitos T, utilizando CCR5 o CXCR4.

Los receptores de quimiokinas poseen una masa molecular de alrededor 46 kDa y atraviesan 7 veces la membrana. estan asociados a las proteínas G. CCR5 está asociado constitutivamente con CD4, mientras que la cantidad de CXCR4 asociada con CD4 aumenta con la presencia de gp120. La interacción CD4/CCR5 se realiza entre el segundo bucle de CCR5 y los dos primeros dominios de CD4 [111]. Los sitios donde se fijan las partículas virales se encuentran en general en el extremo N-terminal de los coreceptores (Figura 8).

Los lentivirus tienen un tropismo bien definido, y como con los oncoretrovirus MLVs, es posible modificarlo, generalmente mediante el *pseudotyping* (ver 2- Los Vectores Retrovirales). Estos virus son cada vez más utilizados para generar vectores para la transferencia de genes.

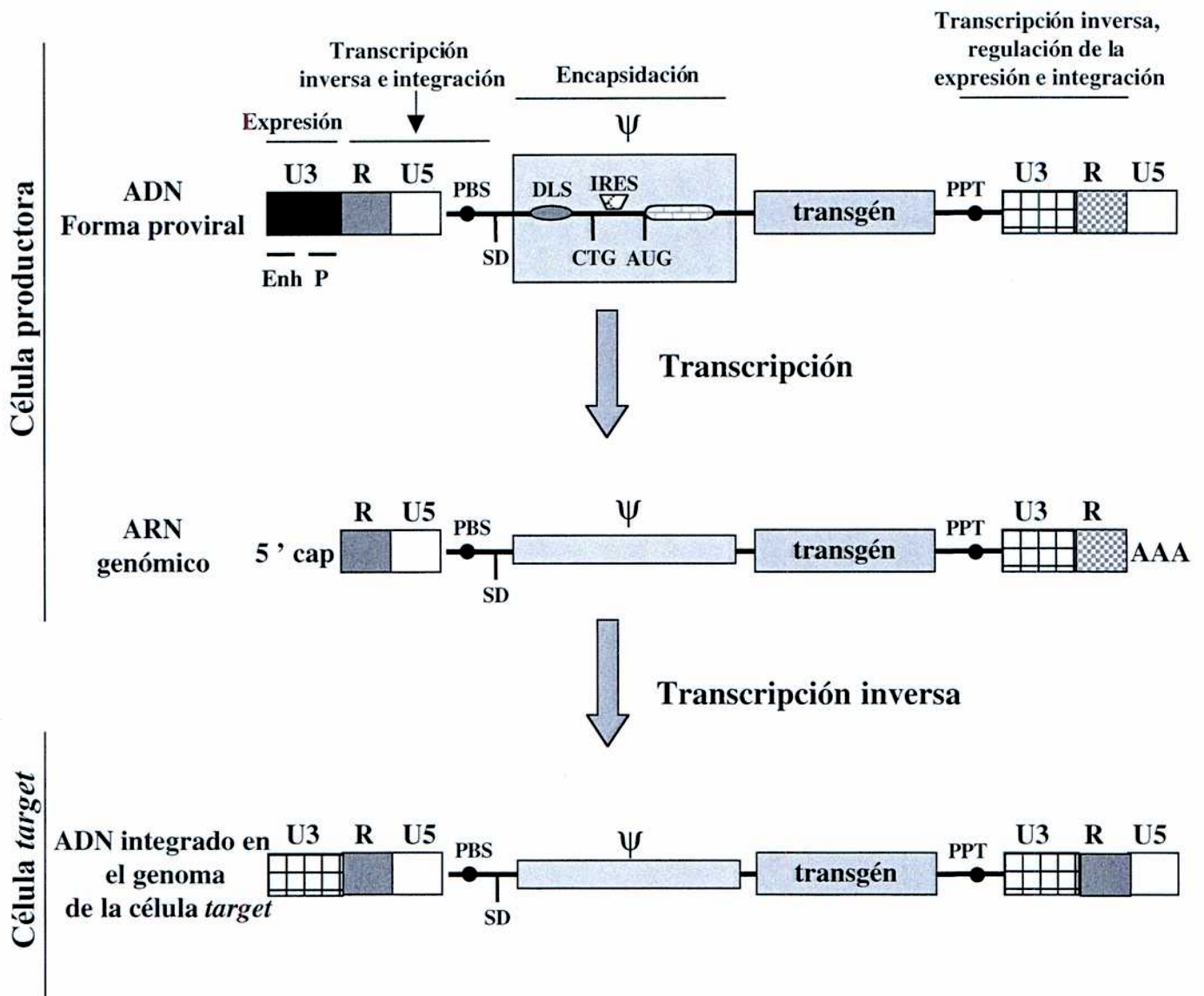


Figura 9: Organización de un vector de transferencia de genes derivado de MoMLV y ciclo replicativo

Enh : *enhancer*; P: secuencias promotoras

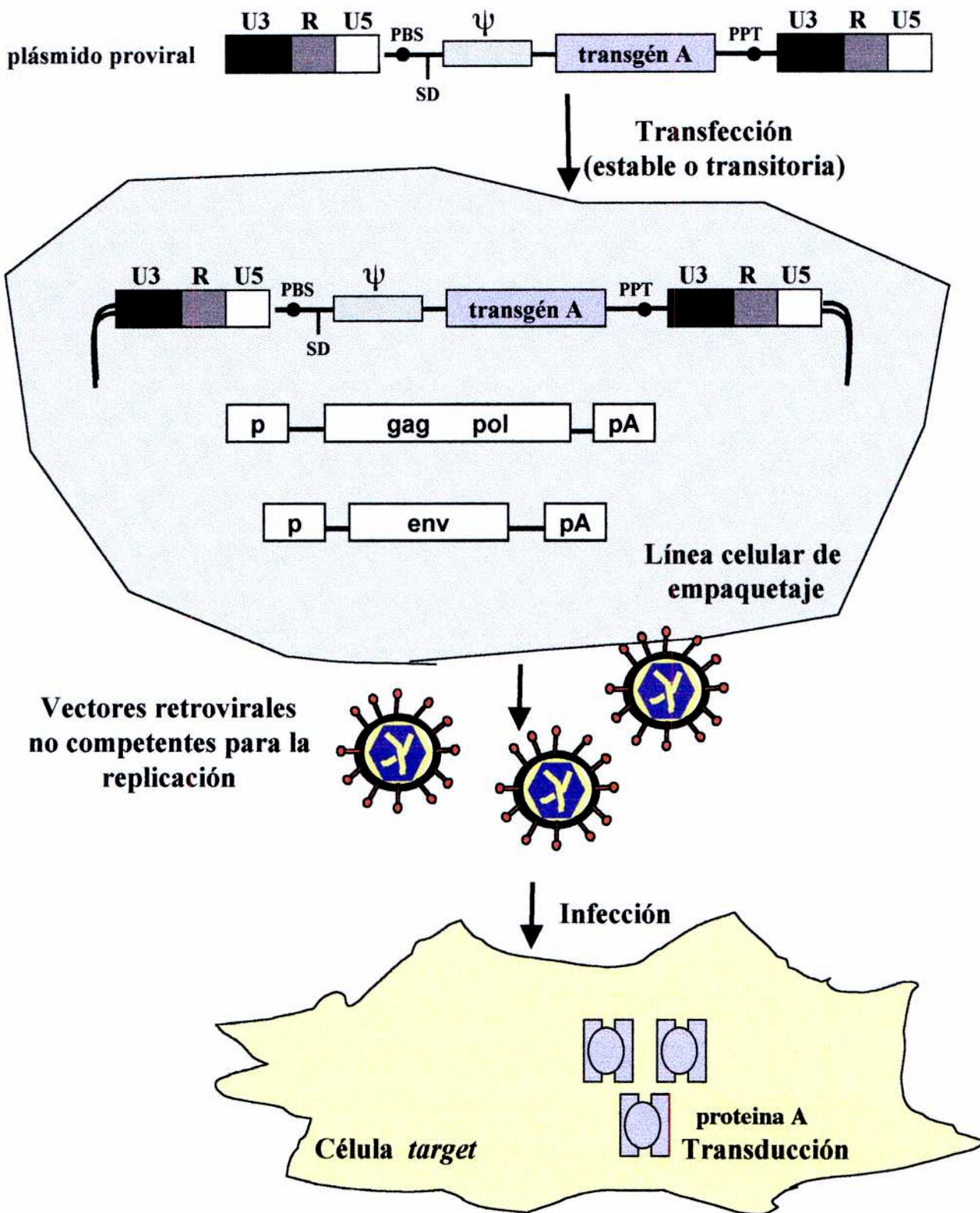


## 2- Los Vectores Retrovirales

Los retrovirus poseen todas las funciones para replicarse en las células animales, integrarse en el genoma de la célula huésped, expresándose gracias a esto, de manera estable durante el transcurso de las divisiones celulares. Estas características, como así también el descubrimiento de los retrovirus que llevan secuencias provenientes de proto-oncogenes celulares (retrovirus oncogénicos), han motivado la utilización de estos virus para el desarrollo de vectores de transferencia de genes. En efecto, los retrovirus oncogénicos sugieren que los retrovirus son capaces de adquirir con el transcurso del tiempo una secuencia celular, sin perder su poder infeccioso. Por consecuencia, es fuertemente probable que acepten otros tipos de secuencias codificantes en su genoma. Numerosos trabajos muestran que es posible suprimir grandes regiones del genoma retroviral. Mientras que estas deleciones dejan al virus no competente para la replicación, el aporte en *trans* mediante un virus auxiliar de las funciones virales indispensables para la replicación permiten de restablecer la propagación del virus « deleteado ». Este principio de aportar en *trans* todas las proteínas virales necesarias y suficientes para la generación de viriones infecciosos constituye la base de la estrategia de producción de vectores virales.

### 2.1- Construcción de vectores retrovirales

Los vectores retrovirales derivan de retrovirus *wild type* luego de la deleción de parte de su genoma viral. Esta deleción hace que el retrovirus sea incapaz de replicarse (defectivo o no competente para la replicación), y a su vez deja lugar para la introducción del transgén, ya que la capacidad de encapsidación de los retrovirus varía entre 8 y 12 kb. Entonces, los vectores retrovirales son partículas virales que vehiculizan un gen de interés (transgén) en lugar de su genoma viral. Solo las funciones virales primordiales para la integración y la expresión estable del transgén en la célula *target* son conservadas. Es decir, que el vector de transferencia corresponde a un ADN proviral donde sólo las secuencias que actúan en *cis* han sido conservadas (Figura 9). Las proteínas de estructura (Gag, Env), las enzimas retrovirales (PR, RT, IN) y las proteínas accesorias en el caso de los lentivirus, son aportadas en *trans* para generar partículas virales infecciosas (Figura 10).



**Figura 10 : Sistema de producción de los vectores retrovirales**

P: promotor, pA: secuencia de poliadenilacion

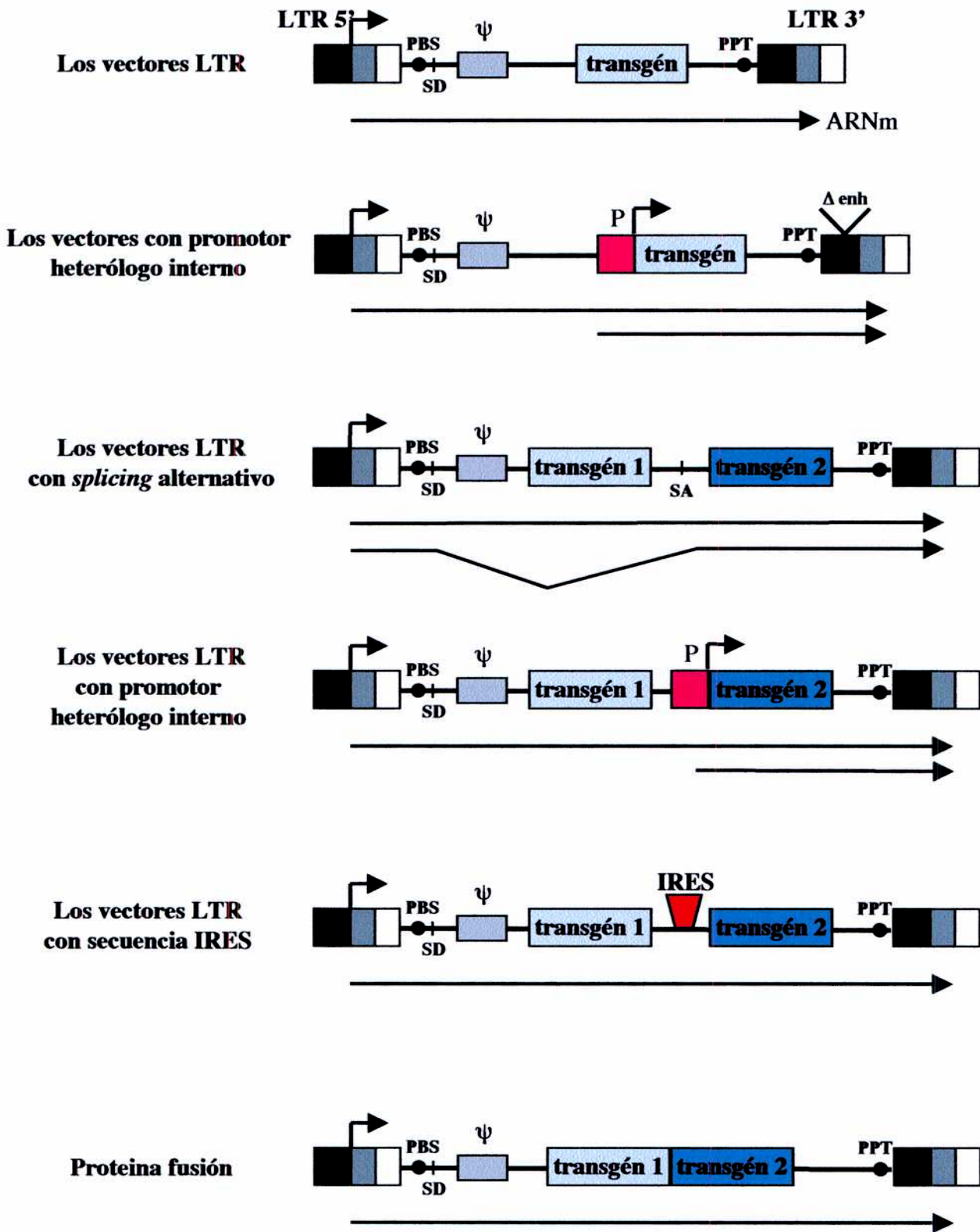
El sistema de transferencia de genes se basa generalmente en una infección « única » : sólo el vector de transferencia (que codifica el transgén) debe ser encapsidado en los viriones para que la célula infectada integre sólo el transgén en su genoma y no las secuencias nucleotídicas que codifican para las funciones aportadas en *trans*. Es debido a esto que las células transducidas (infectadas por un vector viral) expresan el transgén y son incapaces de generar nuevos viriones (Figura 9).

Existe la posibilidad de recombinación entre la construcción que codifica para las proteínas en *trans* y el vector de transferencia, y/o entre este último y secuencias endógenas, produciendo de esta manera retrovirus competentes para la replicación (RCR). Para evitar o disminuir este riesgo, las funciones aportadas en *trans* están separadas en varios plásmidos. En general los genes *gag-pol* (construcción para la producción de partículas virales), el gen *env* (que codifica para la proteína Env), y los genes que codifican para las proteínas accesorias (en lentivirus) son aportados en diferentes plásmidos, además del plásmido vector retroviral, aumentando de esta manera el número de recombinaciones necesarias para la restitución de un virus *wild type* (Figura 10). En ciertas experiencias la construcción de vectores competentes para la replicación es utilizada en transferencia de genes (ver D- *Targeting* celular *in vivo*)

Finalmente, los vectores retrovirales son producidos en cultivos celulares mediante un sistema de transfección de uno (vector de transferencia) o varios (vector de transferencia, de la proteína Env, de los genes accesorios, de Gag-Pol) plásmidos según la disponibilidad de las líneas celulares de empaquetaje (Figura 10). El transgén y todas las proteínas virales son aportadas bajo la forma de ADN listo para ser transcrito. La generación de los vectores retrovirales es sensiblemente diferente entre los vectores derivados de oncoretrovirus (MLVs) y de lentivirus (HIV-I).

## 2.2- Producción de vectores retrovirales derivados de los MLVs

Para los vectores derivados de los MLVs existen dos categorías de vectores de expresión : los vectores con un solo transgén o con dos o más transgenes (Figura 11) [11]. Independientemente de la gpEnv que dirige el tropismo de los vectores, varios trabajos han sido realizados con el objetivo de encontrar la combinación de secuencias reguladoras más favorable para la expresión del transgén (transgenes) en distintos tipos celulares *target*.



**Figura 11 : Ejemplos de vectores de transferencia de genes derivados de MoMLV**  
 P: promotor; Δ enh: delección de secuencias *enhancers*

A pesar de que existen numerosas combinaciones posibles, las más frecuentes son las siguientes :

Para los vectores de expresión de un transgén derivados de MoMLV :

**Los vectores LTR** han sido los primeros debido a su simple estructura . La región U3 del LTR 5' permite la regulación de la expresión del transgén en las células transducidas (Figura 11). LTR de MoMLV no posee una expresión específica de tejido. Además, en ciertos tipos celulares se observa una baja expresión del transgén [112], y a veces una atenuación de la expresión del mismo con el transcurso del tiempo [112, 113]. Esta inactivación se correlaciona con una metilación en residuos de citosina en elementos reguladores del retrovirus [114, 115].

**Los vectores con promotor heterólogo interno** han sido construidos de manera a disponer de una importante flexibilidad de elección de secuencias promotoras (fuerte actividad constitutiva, promotores tejido-específicos) (Figura 11). Sin embargo, se han detectado fenómenos de interferencia entre los promotores internos y el LTR 5'. Debido a esto se han construido vectores con deleciones en la secuencia U3 del LTR 3', obteniendo de esta manera, luego de la transcripción inversa, LTR 5' no transcripcionales (*selfinactivating vectors*, SIN). Otra ventaja de estos vectores SIN es que se elimina el riesgo de activación accidental de genes celulares por intermedio de la región U3 del provirus. Pero una desventaja de los SIN es que luego de la deleción de la TATA *box* los títulos virales obtenidos son bajos. En efecto, pareciera ser que la región U3 del LTR 3' tiene un rol primordial en la maduración de la extremidad 3' del ARN viral.

Para los vectores de expresión de varios transgenes se describen 4 estrategias :

**Los vectores LTR con *splicing* alternativo**, los dos transgenes se transcriben bajo el control de la LTR 5' (Figura 11). La expresión del segundo transgén se realiza luego de un *splicing* alternativo utilizando los sitios virales dador (SD) y aceptor (SA) de *splicing* del gen *env* del virus *wild type*. La proporción de ARNm del segundo transgén es baja con respecto a la del primero y depende de la eficiencia del *splicing*. Esta eficiencia varía entre los diferentes tipos celulares.

**Los vectores LTR y promotor heterólogo interno.** En este caso los dos transgenes se transcriben bajo el control de dos promotores diferentes. Existe una gran flexibilidad en la elección del promotor y de sus combinaciones : LTR / promotor interno (el más usado), promotor interno 1/ promotor interno 2. Los transgenes pueden estar en la misma orientación (« cabeza a cabeza ») o en sentidos opuestos (« cabeza a cola »). El límite más importante es la interferencia potencial entre los dos promotores.

**Los vectores LTR y la secuencia IRES.** Aquí los transgenes se transcriben bajo el control de un sólo promotor (LTR o promotor heterólogo interno)(Figura 11). La inserción de una secuencia IRES (*internal ribosome entry site*) entre los dos transgenes permite la traducción del segundo transgén, gracias a la entrada de los ribosomas en esta secuencia. La utilización de esta secuencia no asegura una expresión equivalente de los dos transgenes. Esto depende del tipo celular y de la secuencia IRES utilizada. La primera identificada se encuentra en los picornavirus [116, 117]. Al parecer existe una competición entre los factores de transcripción por las dos vías posibles de traducción.

**Las proteínas de fusión.** Aquí los dos transgenes son fusionados en fase lo cual permite una expresión equivalente (Figura 11).

## 2. 3- Líneas de empaquetaje

Los vectores retrovirales derivados de los oncoretrovirus pueden generarse a partir de sistemas de producción transitorios o estables. En un contexto de protocolos clínicos es de interés contar con sistemas estables de producción de vectores. Esto permite de : i) eliminar el riesgo de recombinaciones entre los plásmidos codificantes para las diferentes proteínas aportadas en *trans* y el plásmido vector retroviral, ii) « standarizar » los protocolos de producción de vectores, haciendo que los controles de bioseguridad sean más pertinentes, iii) producir los vectores a grandes escalas para experiencias preclínicas en modelos animales, y estudios clínicos.

Actualmente son disponibles varias líneas de empaquetaje derivadas del retrovirus MoMLV [118-123]. Estas expresan constitutivamente o de manera inductible los genes *gag-pol* de MoMLV y un gen *env* de tropismo variado, según la línea celular (MLV-A, MLV-E, GALV, HA, LCMV, RD114, 10A1, MDEV, SNV, VSV-G, etc.). Según el Env utilizado, cada línea de empaquetaje posee sus ventajas para producir vectores que infectarán más eficazmente diferentes tipos celulares. Por ejemplo GALV para las células hematopoyéticas o linfocitos T. Pero es la glicoproteína G del rabdovirus VSV (*vesicular stomatitis virus*) que posee un mayor tropismo, ya que reconoce un (o más) receptor (no identificado aún) que se expresa de manera ubicuitaria en muchos tipos celulares. Al parecer se trataría de fosfolípidos aniónicos. Además, G posee una estructura estable lo cual permite la ultracentrifugación (concentración) de las partículas virales, obteniendo de esta manera títulos infecciosos elevados [124, 125]. Pero debido a la toxicidad de esta glicoproteína, sólo permite ser expresada en las líneas de empaquetaje de manera transitoria [118, 122].

En general las líneas de empaquetaje generan partículas con títulos virales superiores a  $10^6$  partículas infecciosas por mililitro (p.i/ml), pudiendo alcanzar los  $10^8$  a  $10^9$  luego de aplicar técnicas de concentración de sobrenadantes virales.





## 2.4- Construcción y producción de vectores retrovirales derivados de HIV-I

La estrategia es la misma que para los vectores derivados de los MLVs : formas de ADN proviral codificando para las funciones auxiliares de HIV-I o para el transgén. Durante la corta historia de estos vectores tres generaciones han visto la luz, mejorando progresivamente su eficiencia y su bioseguridad.

**Primera generación**, en este sistema de producción de vectores derivados de HIV-I, las partículas virales eran generadas luego de la expresión de las proteínas Gag, Pol, Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev y Nef a partir de señales transcripcionales heterólogas y « pseudotipadas » con la glicoproteína G de VSV, codificada por un otro plásmido (Figura 12) [126, 127].

**Segunda generación**, sólo los genes *gag*, *pol*, *tat* y *rev* son expresados para la construcción de partículas virales. La ausencia de los genes accesorios no afecta la producción viral y los vectores son más seguros en términos de aplicación clínica. Vif y Vpu no parecen necesarios para la producción de viriones infecciosos a partir de células 293T [19] y Nef, que favorece la infecciosidad de los vectores HIV-I (MLV-A), no tiene ningún efecto sobre los HIV-I (VSV-G). Probablemente esto se deba a la diferencia en cuanto a la manera de entrar de VSV-G, por endocitosis y fusión con los endosomas [10, 19]. Sin embargo Vpr parece ser importante para la transducción eficaz de macrófagos [10].

En la primera y segunda generación de sistemas de producción de vectores derivados de HIV-I, el vector posee las secuencias que interactúan en *cis* y necesarias para la transcripción, encapsidación, transcripción inversa e integración, es decir, la LTR 5' , la secuencia « leader », el SD, alrededor 360 pb de *gag* (conteniendo una parte de la secuencia de encapsidación), una parte del gen *env* conteniendo la secuencia RRE y el SA, un promotor interno, el transgén y la LTR 3' (Figura 12).

**Tercera generación**, aquí los genes *tat* y *rev* han sido « deletados » de la construcción de empaquetaje para hacer el sistema de producción Tat independiente y más seguro (Figura 12) [128]. La expresión del transgén independiente de Tat ha sido posible luego de remplazar la región U3 del LTR 5' del vector por secuencias *enhancer*/promotor de un promotor constitutivo (LTR RSV, hCMV). Estos vectores han demostrado su poder de infección, *in vivo*, en neuronas diferenciadas [128]. La bioseguridad de los vectores Tat independientes ha sido mejorada gracias al aporte de la proteína Rev en un plásmido suplementario o generando *selfinactivating vectors* (SIN), estrategia ya utilizada con los

MLVs (Figura 12). Sólo las secuencias de U3 necesarias y suficientes para la integración (53 nt) y la señal de poliadenilación son conservadas en estos vectores. La eficiencia de estos últimos ha sido demostrada *in vivo* transduciendo las neuronas de la retina [129, 130]. Probablemente los vectores utilizados en terapia génica serán aquellos que sean SIN y Tat independientes al mismo tiempo. Estos últimos han sido ya descritos y demostrado su eficiencia *in vitro* e *in vivo* en fibroblastos, células epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas [128, 131-133].

Por el momento todos los sistemas dependen de la producción de Rev, que exporta el ARN de *gag-pol* y el ARN « vector » hacia el citoplasma para ser encapsidados o traducidos. Pero ya se estudian sistemas Rev independientes. La idea es de remplazar la secuencia RRE (donde se une Rev) por una secuencia de exportación nuclear constitutiva, como por ejemplo la secuencia CTE del virus de mono Mason-Pzifer (M-PMV). El objetivo es de disminuir las homologías con las secuencias del vector. Estos vectores son Rev independientes pero sus títulos infecciosos disminuyen de entre 0.5 y 2 logaritmos con respecto a los Rev dependientes [134, 135].

**La producción de vectores derivados de lentivirus ( HIV-I, SIV) es en general** lograda mediante cotransfecciones transitorias de células 293T, obteniendo títulos infecciosos de  $10^7$  a  $10^9$  p.i./ml según el método de concentración [136, 137]. Se utiliza comunmente para « pseudotipar » los vectores lentivirales la glicoproteína G de VSV o la gpEnv de MLV-A, transcrita bajo el control del promotor heterólogo hCMV. Pero se pueden producir vectores HIV-1 expresando la glicoproteína natural de HIV-I gp120 (ver C- Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de infección) pero obteniendo títulos de 2 a 3 logaritmos menos infecciosos. Una estrategia para producir líneas de empaquetaje estables, sabiendo que VSV-G y ciertas proteínas de HIV-I son tóxicas para la célula, es de hacer expresar *rev* y VSV-G bajo el control de promotores inductibles. Estas líneas producen, al menos durante 7 meses, vectores con títulos de  $10^6$  p.i./ml [138].

## 2.5- Aplicaciones clínicas : Límites de los vectores retrovirales

Los vectores retrovirales han sido desarrollados para la transferencia de genes debido principalmente a tres características mayores : i) su capacidad de encapsidación de alrededor 10 kb ; ii) su integración estable y precisa en el genoma celular ; iii) no expresan ninguna secuencia que codifique para las proteínas virales en las células transducidas, evitando todo reconocimiento y destrucción por los linfocitos T citotóxicos de estas últimas.

Los primeros vectores retrovirales fueron derivados del oncoretrovirus MoMLV. Su incapacidad para infectar células que no se dividen constituye un límite importante para la utilización en transferencia de genes *in vivo*, ya que la mayoría de la células *targets* que presentan un interés terapéutico (neuronas, hepatocitos, miocitos, *stem cells* hematopoyéticas, etc.) no se dividen o lo hacen raramente. Debido a esto, recientemente se han desarrollado vectores derivados de lentivirus HIV-1, HIV-2, SIV, FIV, EIAV, que pueden transducir células diferenciadas o que no se dividen. Actualmente muchas preguntas surgen acerca de la bioseguridad de estos últimos y de la elección del vector lentiviral a utilizar [139, 140]. Las construcciones de empaquetaje derivadas de HIV-1 utilizadas hoy en día, presentan una delección del 60% del genoma viral y son 4 los plásmidos que aportan los diferentes elementos de producción, contra 3 en MLVs, aumentando así el número de recombinaciones necesarias para la reconstitución del virus *wild type*. Otra estrategia utilizada para evitar el riesgo de recombinación es la producción de híbridos como, HIV-1/HIV-2 [141] o SIV/HIV-1 [142]. Estos vectores son eficaces como los no híbridos y el principio es el de encapsidar un vector de transferencia de genes derivado de HIV-1 o HIV-2 en partículas derivadas de SIV o HIV-1. Los vectores lentivirales *selfinactivating* (SIN) ofrecen una garantía más de bioseguridad.

Además de la preocupación de la bioseguridad, otros límites de la tecnología de los vectores retrovirales en la transferencia de genes con propósitos clínicos son : i) sus títulos virales relativamente bajos o modestos ( $10^9$  p.i./ml luego de concentrar contra  $10^{12}$  p.i./ml de las adenovectores) ; ii) a veces los kb disponibles a encapsidar en las partículas retrovirales no son suficientes con respecto al (o a los) transgén (es) que se quiere transferir (8 a 12 kb contra 25 kb en los herpesvectores) ; iii) algunos tejidos no pueden ser infectados por los retrovirus o son refractarios a la infección ; iv) en ciertos casos es difícil de concentrar las partículas virales sin perder infecciosidad, además de ser costoso económicamente ; v) la regulación de la expresión del transgén no es todavía eficaz ; vi) no existe aún estrategias verdaderamente

eficaces de *targeting* celular. Por estas razones, numerosos laboratorios académicos y privados, como así también industriales trabajan para mejorar esta tecnología y hacerla eficiente, real, poco costosa, conveniente y segura.

### 3- Los Vectores Retrovirales y el *Targeting* Celular

El *targeting* celular utilizando vectores retrovirales es un tema de investigación central en la terapia génica y en la biotecnología. Como se ha dicho antes, a pesar de la ventajas de los retrovirus como vectores de transferencia de genes, importantes carencias tecnológicas deben aun mejorarse. Por ejemplo, el hecho de que varios tipos celulares, de interés terapéutico, no son infectables o son refractarios a la infección retroviral. Además, es imposible actualmente redirigir la infección retroviral hacia ciertos tipos celulares específicos. Es por estas razones que nace el ***targeting* celular utilizando vectores retrovirales**, es decir tratar de **redefinir la especificidad de infección de los retrovirus** [143, 144].

Hoy en día, dos grandes estrategias de *targeting* celular utilizando vectores retrovirales, no exclusivas, han sido desarrolladas: i) La primera consiste en producir vectores de transferencia permitiendo una expresión tejido-específica, y/o inductible, del transgén, de acuerdo al enhancer/promotor elegido para transcribir este último; ii) la segunda consiste en modificar el tropismo de los vectores retrovirales con el objetivo de redirigir la unión hacia un otro receptor celular específico. Este capítulo detalla solamente la segunda, es decir, las diferentes estrategias (ver 3.2 - Estrategias) desarrolladas para lograr un reconocimiento y una entrada específica de los vectores retrovirales en un tipo celular específico, luego de una interacción con una molécula de superficie celular determinada. Las glicoproteínas Env de los oncoretrovirus murinos MLVs *ecotropic* (MLV-E, infecta sólo células murinas) y *amphotropic* (MLV-A, infecta la mayoría de células de mamífero, como células humanas) y de los oncoretrovirus aviarios SNV (no infectan células humanas) son las más utilizadas para extender o restringir su tropismo natural [145].

### 3.1 - Aplicaciones potenciales del *targeting* celular utilizando vectores retrovirales en terapia génica

Los retrovirus penetran en la célula luego del reconocimiento de la gpEnv a un receptor en la superficie celular. La redefinición del tropismo retroviral implica entonces, por un lado, la identificación de marcadores de superficie celular competentes para la entrada del virus en la célula, y por otro, el desarrollo de métodos eficaces de unión entre los retrovirus y estos nuevos receptores.

Las aplicaciones posibles de esta tecnología pueden dividirse en dos aspectos:

1 - Mejorar la infección *in vitro* de poblaciones celulares homogéneas donde el receptor natural es limitante o incompetente para la infección. La transferencia de genes en hepatocitos, linfocitos T y *stem cells* hematopoyéticas, es por ejemplo poco eficaz, mismo con concentraciones altas de viriones. Infectar a través de una molécula diferente al receptor natural permitiría entonces aumentar los rendimientos terapéuticos de protocolos de terapia génica que implican etapas *ex vivo*.

2 - Lograr un verdadero *targeting* celular. *In vitro*, por ejemplo, una aplicación importante sería la inmortalización de tipos celulares poco representados en poblaciones celulares complejas, utilizando vectores que expresen oncogenes. A partir de biopsias de pacientes, se podrían establecer modelos celulares de patologías humanas. *In vivo*, las técnicas de *targeting* celular harían posible la administración directa de retrovirus recombinantes en pacientes para llevar un gen terapéutico en un órgano o tejido específico. Además, esta tecnología sería útil en numerosas aplicaciones fundamentales, por ejemplo, en un contexto de tumorigénesis o desarrollo. En efecto, se podrían llevar genes específicos a cualquier tejido en cualquier momento de la vida del animal.

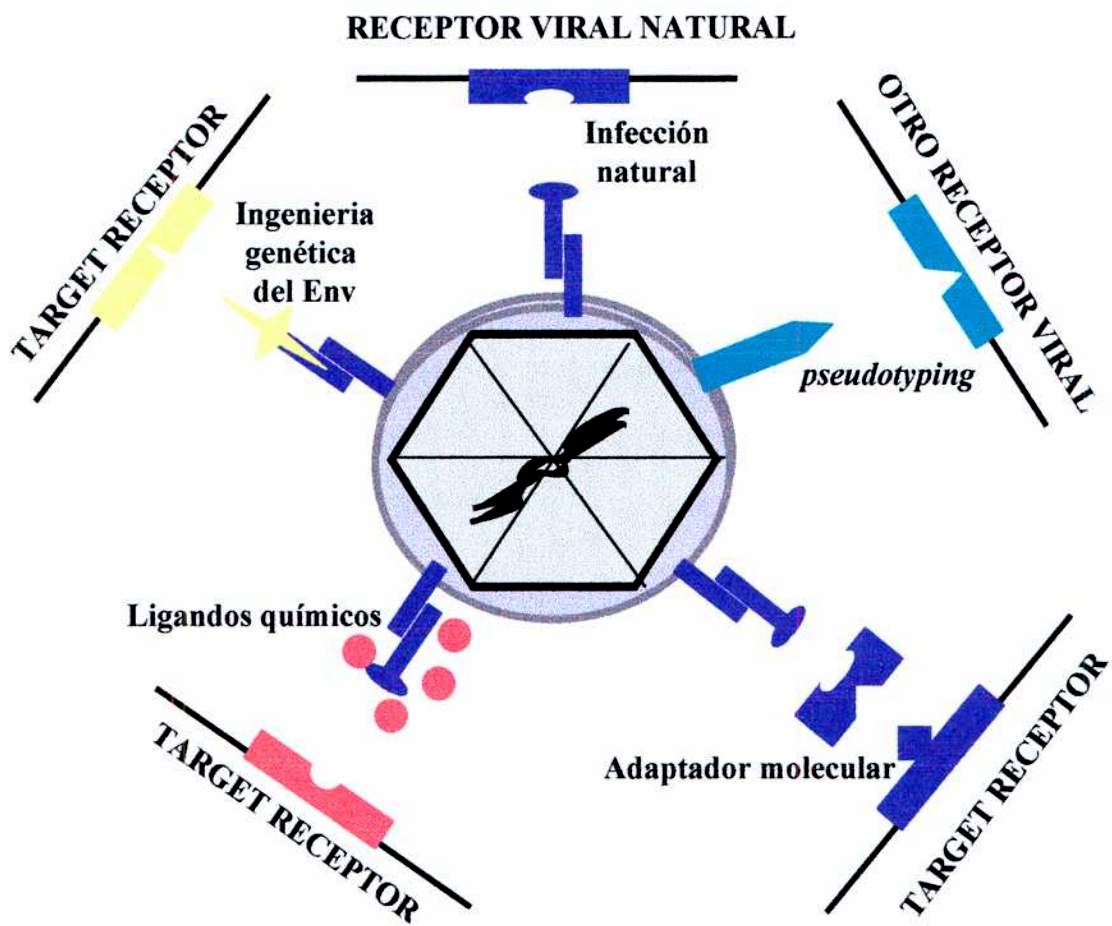


Figura 13 : Estrategias de *targeting* celular utilizando vectores retrovirales

## 3.2 - Estrategias

Varias estrategias pueden utilizarse para redefinir el tropismo de un retrovirus (Figura 13). La primera consiste en remplazar la gpEnv de un retrovirus por la de un otro retrovirus o virus (*pseudotyping*). Otra consiste en unir covalentemente o no, en la superficie de los viriones, agentes que presenten una afinidad por distintos marcadores de superficie celular diferentes al receptor natural. Por último, modificar genéticamente la gpEnv. A pesar de que esta última es probablemente la mejor debido a su potencial y flexibilidad, las dos primeras han permitido, por un lado, mejorar la infección *in vitro*, y por el otro, la identificación de moléculas membranas permisivas para la infección.

A continuación se describen las distintas estrategias en un contexto de los MLVs debido a que estos son los más utilizados para la transferencia de genes en el hombre. Sin embargo, en ciertos casos los vectores derivados de los retrovirus humanos o aviarios serán considerados debido a su creciente importancia.

### 3.2.1 - *Pseudotyping*

El principio de *pseudotyping* de vectores retrovirales es fácilmente realizable desde un punto de vista técnico, ya que solo se trata de remplazar el gen *env wt*, por otro gen *env*, en las líneas de empaquetaje. El límite se encuentra en la capacidad de los retrovirus en incorporar proteínas heterólogas (ver 1.6- La glicoproteína Env). La mayoría de los *pseudotyping* realizados hoy en día han sido más que nada para mejorar la infección celular *in vitro* y no para llevar a cabo *targeting* celular. Los ejemplos más clásicos son el hecho de "pseudotipar" vectores retrovirales con VSV-G o la glicoproteína de GALV que permiten una mejor transducción de numerosos tipos celulares comparados con los vectores que expresan la gpEnv de MLV-A. Un resultado interesante de transferencia de genes *in vivo* y realizando *targeting* celular gracias al *pseudotyping*, es el obtenido con vectores MLVs expresando la gp120 de HIV-I. Estos vectores son capaces de transducir específicamente células CD4+ [53, 146]. Un ejemplo de la extensión de esta estrategia ha sido la de incorporar en la superficie de vectores MLVs los receptores de HIV-I (CD4 y CCR5 o CXCR4). Estos últimos son capaces de transducir células infectadas por las cepas HIV-I tropismo M o T respectivamente [147, 148]



### 3.2.2 - Adaptadores moleculares

La utilización de adaptadores moleculares biespecíficos permitió demostrar por la primera vez que es posible de realizar *targeting* celular *via* una molécula de superficie elegida arbitrariamente [149, 150]. Estos agentes "puente" fueron utilizados para infectar células humanas con vectores MLV murinos. Estaban constituidos de un anticuerpo anti-virus asociado a un anticuerpo anti-molécula de superficie (citokina u hormona). También es posible utilizar la MHC clase I o II, el receptor de la EGF o de la insulina, sin embargo la eficiencia de infección es muy baja. Otras moléculas, como el receptor de LDL, de la galactosa, etc., no permiten la infección retroviral [149]. Esta observación sugiere que una unión eficaz a un receptor no es suficiente para garantizar una infección celular. Esta noción es confirmada por la modificación genética de Env [151].

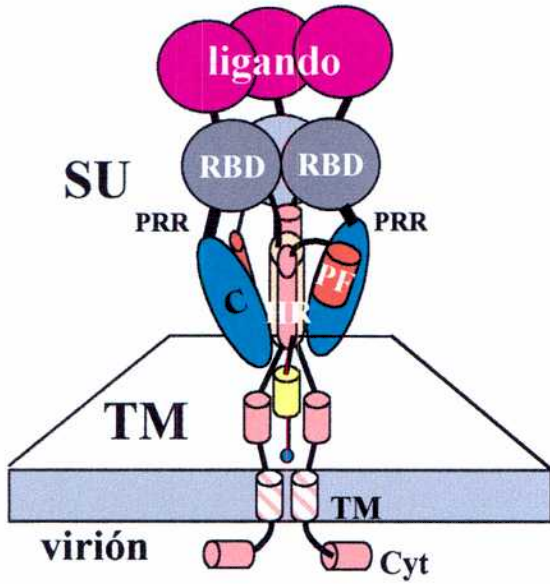
### 3.2.4 - Unión de agentes químicos

La redefinición del tropismo retroviral también fue obtenida uniendo químicamente la lactosa al vector MLV, logrando la infección de hepatocitos *via* el receptor de la galactosa [152]. Sorprendentemente, la infección *via* el mismo receptor pero utilizando los adaptadores moleculares no es posible [149], lo que sugiere que la manera de interactuar de los retrovirus con la molécula de superficie celular es un parámetro crítico para la infección.

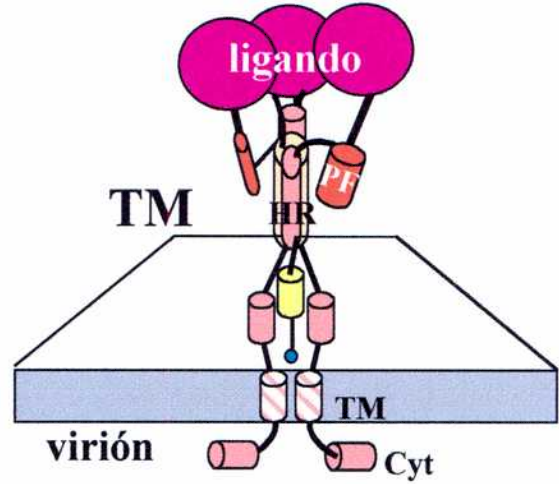
### 3.2.5 - Modificación genética de Env

Al día de hoy, tres estrategias han sido desarrolladas para modificar la especificidad de la unión de los Envs retrovirales. La primera consiste en agregar un nuevo dominio de unión a la SU, la segunda, a modificar sutilmente la SU, y la tercera a substituir porciones importantes de la SU que contienen el dominio natural de unión por otros péptidos "ligantes".

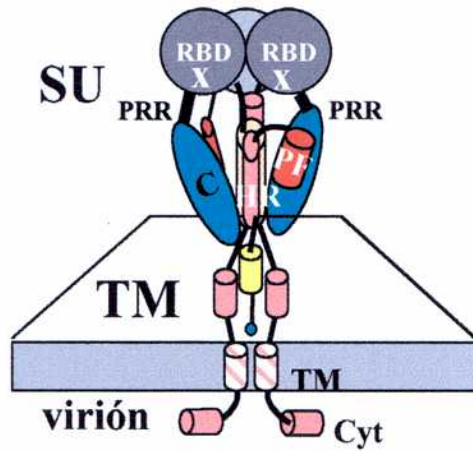
**Adición de un ligando en N-terminal de la SU**



**Substitución de la SU**



**Modificación sutil de la SU (X)**



**Figura 14 : Modificación genética de la gpEnv *ecotropic* del virus MoMLV**

**Adición de nuevos dominios a la SU.** Diversos polipéptidos han sido fusionados al extremo N-terminal de la SU *ecotropic* de MoMLV: citokinas, factores de crecimiento [151], fragmentos de la heregulina [52], diferentes scFv (minianticuerpos) dirigidos contra marcadores de superficie celular [144, 153-157]. Las quimeras (alrededor de 50 diferentes) son en general bien expresadas, establemente incorporadas en los viriones y permiten una unión específica de las partículas retrovirales a las moléculas de superficie elegidas. Sin embargo, una verdadera infección se obtiene en muy pocos casos : scFv anti el receptor LDL-R [157], scFv anti MHC I [155], scFv anti un antígeno carcinoembrionario [154]. Cabe destacar que la infecciosidad usando estas quimeras es baja (entre  $10^2$  y  $10^4$  p.i./ml), posiblemente debido a que la adición del dominio de unión no permite correctamente, en ciertos casos, la actividad de fusión aportada por gpEnv [158]. Además, la presencia de un ligando en la posición N-terminal de la SU *ecotropic* no afecta la infecciosidad de la gpEnv recombinante en las células murinas.

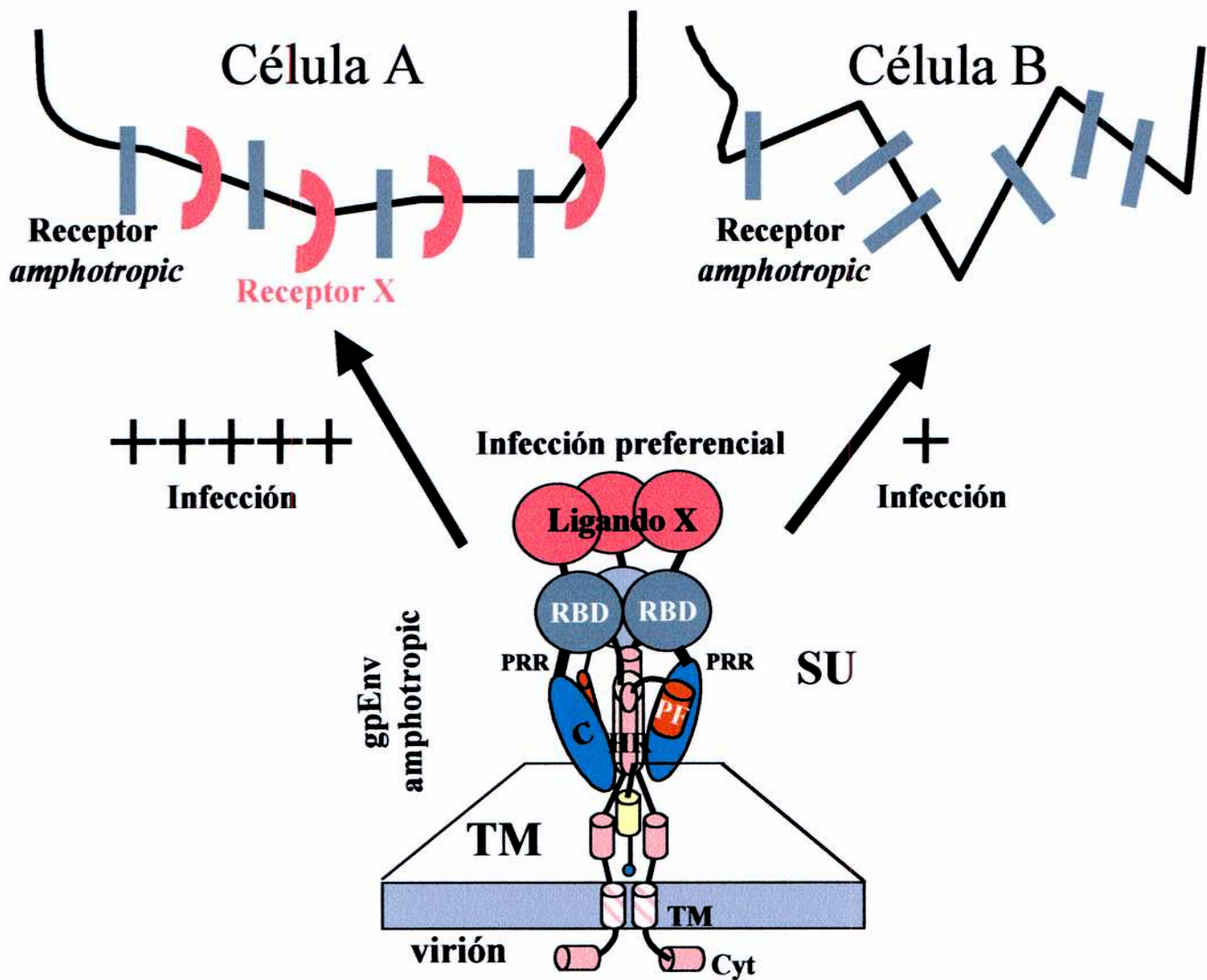
**Modificación sutil de la SU** (Figura 14). La idea aquí es de perturbar lo menos posible la estructura general de las moléculas Env a través de una « cirugía genética » fina.

Un pequeño péptido de 16 aminoácidos conteniendo un motivo que se une específicamente a las integrinas, fue insertado en el dominio de unión del Virus de la Leucemia y del Sarcoma Aviario (ALSV) en una región, que según análisis informáticos, podría tolerar la inserción de polipéptidos [159]. Se logró una infección poco eficiente de células humanas.

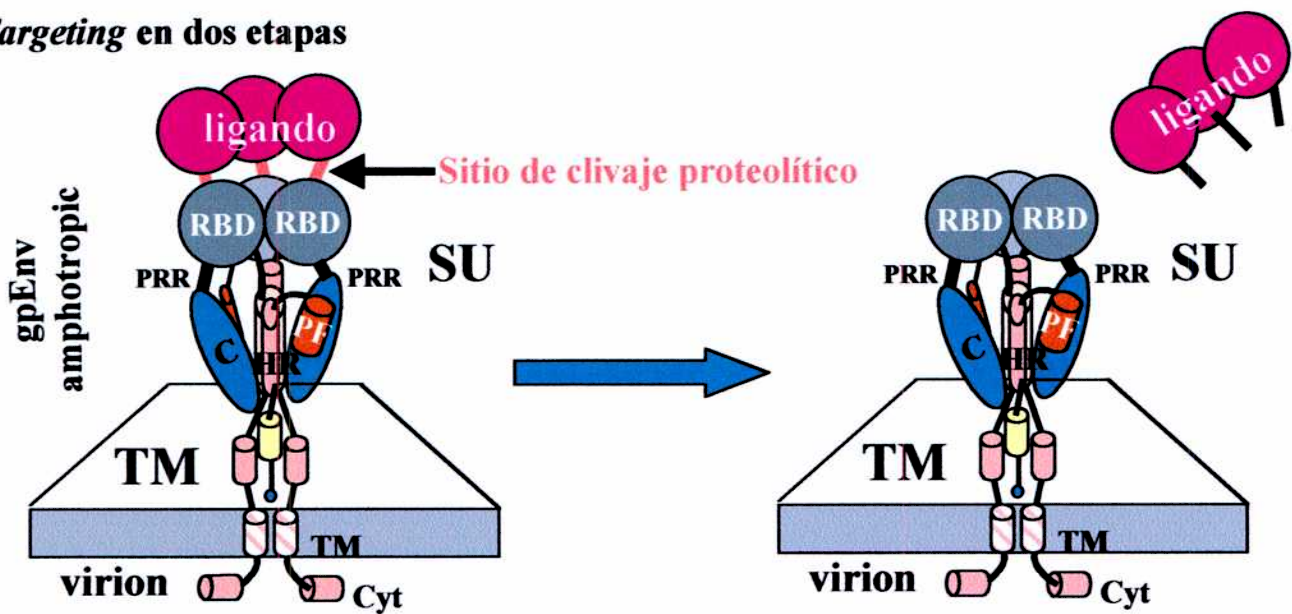
Otras estrategias parecidas se llevaron a cabo con la gpEnv de MLV, sin obtener una verdadera infección debida al *targeting*. Pero la determinación reciente de la estructura tridimensional de la SU de HIV-I y del extremo N-terminal de la SU de los MLVs [160], debería ayudar enormemente al desarrollo de este tipo de modificaciones. Se debe señalar que muchos de los cortos péptidos lineales muestran una baja afinidad por sus ligandos cuando se los expresa en proteínas heterólogas, ya que su contexto tridimensional es diferente al de sus proteínas originales.

**Substitución de dominios de la gpEnv de MLV-E y de SNV (virus aviario de la necrosis del bazo)** (Figura 14). La región de la SU *ecotropic* de MoMLV ha sido remplazada por diversos motivos de unión : la eritropoyetina (EPO) [161], la heregulina [162], CD4 ([163]. Una vez más, se logra un bajo rendimiento de infección de células humanas. Además, la coexpresión de un Env *wild type* es necesaria, sin conocerse aún los motivos. Se sugiere que la incorporación de las glicoproteínas quimeras en las partículas virales se ve favorecida por la presencia de Env *wild type* que induce un correcta oligomerización. Otras quimeras que remplazan el motivo N-terminal de Env de MoMLV son incapaces de redirigir la infección (II-2-Env, EGF-Env). Un estudio detallado revela que estas quimeras no se encuentran presentes en la superficie celular, requisito primordial para la incorporación en las partículas virales. Esto puede deberse, o bien a un déficit en el transporte de la molécula hacia la membrana, un problema en la asociación entre la TM y la SU quimera, o no puede descartarse una degradación en la periferia celular. Todo esto para señalar que la modificación genética de Env puede tener otras consecuencias y no solo en su capacidad de unión al receptor.

La substitución de diferentes dominios de la SU de los vectores retrovirales derivados de los SNVs por distintos scFv ha sido utilizada para infectar células humanas. Sorprendentemente, la Env de los SNVs tolera mejor las modificaciones estructurales que la Env de los MLVs. La substitución completa de la SU, es decir, la fusión scFv-TM es tan eficaz para el *targeting* como la substitución de ciertas zonas de la SU [164, 165]. Aquí también la coexpresión, en la superficie viral, con un Env *wild type* es necesaria.



**Targeting en dos etapas**



**Figura 15 : Modificación genética de la gpEnv *amphotropic* de MLV**

### 3.2.6 – Modificación genética de Env *amphotropic*

Las experiencias con las quimeras Env *ecotropic* indican que se debe explotar mejor el potencial de fusión disponible en la parte *wild type* de Env. Dado el gran poder de fusión de los Envs *amphotropic*, se han desarrollado tres estrategias de *targeting* celular utilizando estos últimos.

**La infección preferencial** (Figura 15). La adición N-terminal de diversos ligandos en el Env *amphotropic* conduce a observaciones similares a las obtenidas con las quimeras Env *ecotropic*. Sobretudo que los viriones se pueden unir a una molécula de superficie, pero también a su receptor natural, infectando la célula via este último [151]. En lo que respecta al *targeting* se han obtenido resultados interesantes con un Env *amphotropic* quimera construido insertando en N-terminal un anticuerpo recombinante (scFv) dirigido contra un antígeno tumoral (HMWMAA, *High Molecular Weight Melanoma-Associated Antigen*) que se expresa en las células de melanomas a altas densidades. Estos viriones pueden infectar células que expresan solamente el receptor *amphotropic*, pero de manera interesante, infectan mucho mejor las células que expresan las dos moléculas. No se obtiene una infección *targeting* pero al menos una infección preferencial que depende del grado de expresión de los dos receptores [155]. Estos trabajos abren nuevas perspectivas para aplicaciones originales.

**Targeting inverso.** El objetivo es el mismo que en el *targeting* directo, es decir, de infectar un solo tipo celular que se encuentra en poblaciones celulares complejas. La diferencia es que aquí los viriones se asociarán a todos los tipos celulares infectando uno o pocos tipos.

Esta estrategia se basa en la observación de que los virus que expresan las quimeras EGF-Env *amphotropic*, pueden infectar células humanas solamente si estas no expresan o lo hacen en bajas cantidades el receptor EGF. No se conocen aún los mecanismos. Aquí la infección se hace via el receptor *amphotropic*.

Por lo que concierne a las aplicaciones de esta estrategia, ciertas terapias anticancerosas constituyen una buena elección. Por ejemplo, la transferencia de genes de resistencia a drogas anticancerosas (*mdr*) en las *stem cells* hematopoyéticas. La transferencia se realiza *ex vivo* en células de la médula ósea y luego se reimplanta en los pacientes. A continuación se trata al

paciente con quimioterapia, que en condiciones normales destruyen todo el sistema hematopoyético. Pero gracias a esta estrategia y a que las células cancerosas expresan muy a menudo cantidades importantes de receptor EGF, solo las células hematopoyéticas sanas son transducidas con el vector de resistencia a drogas.

**Targeting en dos etapas** (Figura 15). Se basa en la observación de que viriones expresando quimeras derivadas del Env *amphotropic* pueden ser « secuestrados » en la superficie celular por la nueva molécula de membrana elegida para el *targeting*. Primero los viriones se unen a la molécula *targeting* (etapa específica) y luego un mecanismo auxiliar se activa para permitir la infección por la vía natural de la entrada de los viriones a la célula.

Estas moléculas quimeras presentan un sitio específico de clivaje proteolítico por una proteasa de membrana entre el ligando y el extremo N-terminal del Env *amphotropic*. Entonces : i) el virus se une al receptor *target*. Esto favorece la interacción con la proteasa de membrana que cliva y libera el dominio de unión al receptor *amphotropic*, ii) la glicoproteína *amphotropic* « liberada » reconoce su receptor y el virus penetra en la célula [166]. La aplicación de esta estrategia se basa entonces en la expresión de proteasas membranas en la superficie de las células *target*. Las proteasa MMP [167] y plasmina han sido utilizadas con éxito para infectar, mediante el *targeting* en dos etapas, células humanas.

### 3.2.7 – Conclusión

La redefinición del tropismo retroviral se ha logrado en ciertos modelos de estudio. Sin embargo los rendimientos de infección son bajos y ninguna experiencia de *targeting* verdadero (infección de una célula particular en una población compleja) ha sido publicado. Se debe mejorar aún mucho esta tecnología antes de realizar aplicaciones eficaces *in vivo*, en el animal o en el hombre.

Las limitaciones y los fracasos pueden clasificarse en dos grupos : las limitaciones en las células productoras y aquellas que intervienen luego del reconocimiento del receptor por las partículas retrovirales. En el primer caso, visto y considerando la biología compleja de las gpEnvs [98], no es sorprendente que las modificaciones, aunque sean sutiles, sobre esta molécula pueda alterar su biosíntesis, su transporte y/o su incorporación en las partículas virales. Resta esperar mejores estudios sobre la estructura/función de las diferentes gpEnvs, como así también la determinación de sus estructuras terciarias y cuaternarias. En segundo

lugar, la identificación de marcadores de superficie aptos no solamente para unir partículas virales, sino también para permitir la penetración eficaz en la célula, es esencial para el futuro del *targeting* celular. La entrada a la célula es un proceso multietapas donde intervienen muchos factores y el desarrollo de métodos que permitan una mejor unión al receptor o coreceptor y que preserven el potencial de fusión de los Envs modificados, constituyen una base incontornable para el desarrollo de estrategias de *targeting* celular utilizando vectores retrovirales.



**B**

**MATERIALES Y  
METODOS**

## B - Materiales y métodos

### 1- Plásmidos, vectores de expresión y plásmidos provirales

Todas las manipulaciones y preparaciones de ADN recombinante y las transformaciones y cultivos de bacterias transformadas fueron realizadas por métodos establecidos, compilados en el manual de Sambrook et al. [168]. Algunos protocolos fueron modificados parcialmente y se detallan más adelante.

#### C1 – Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de infección

- Los vectores de expresión *marker* pRL-TK que codifica el gen de la luciferasa *renilla* y pEGFP-C1 que codifica para la proteína EGFP se obtuvieron de Clontech.
- pUHC-13-3 codifica el gen de la luciferasa *firefly* bajo el control del operador/promotor tet.
- pUHD-15-1 expresa el transactivador tTa regulable por la tetraciclina (o su análogo : la doxiciclina) [169].
- Las secuencias de los Envs *ecotropic* y *amphotropic* de MLV fueron amplificadas por PCR a partir de los plásmidos FBEMOSALF y FB4070ASALF, respectivamente [151]. Luego fueron clonados entre los sitios Eco RI y Xba I y Sac II y Xba I localizados *downstream* de la secuencia del operador tet en el plásmido pUHD-10-3 [169] para dar los vectores de expresión inductibles por la tetraciclina, PM361 y PM377, respectivamente.
- El plásmido de empaquetaje CMV $\Delta$ R8.9 [10] codifica los genes gag, pol, tat, y rev de HIV-I.
- El vector lentiviral y plásmido de empaquetaje pNL4-3.HSA.R+E- codifica todos los genes de HIV-I excepto env y además transduce el gen *marker* HSA (CD24 de ratón) que se expresa en la superficie de las células transducidas bajo el control de la LTR de HIV-I [170]

- El plásmido CD286 es un vector lentiviral que contiene la secuencia flap de HIV-I. Este vector, derivado de HIV-I, transduce la EGFP bajo el control del promotor hCMV. La construcción fue derivada del plásmido pHR-CMVlacZ [126] reemplazando lacZ por el gen de la EGFP.

- La secuencia del cDNA del Env de tropismo « M » AD8 gp120 de HIV-I fue clonada a partir del plásmido pCMVAD8env [126] entre los sitios Eco RI y Xba I localizados *downstream* de la secuencia del operador tet en el plásmido pUHD-10-3 [169] para dar el vector de expresión Env inductible por la tetraciclina, PM636.

### D1 - Targeting celular *in vivo*

- El vector retroviral competente para la replicación AkvU3-EGFP es isogénico al AkvBi-EGFP descrito en Jespersen et al. 99 [171], salvo que la secuencia del *spacer* de la región 3' del IRES **AAAAACACGATTGCCGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCCGCGGTCGACATGGTGAGC** ha sido cambiada por el *spacer* **AAAAACACGATAATACCATGGTGAGC** propuesto por Morgan et al.[172], donde i) letras itálicas corresponden a la secuencia de EGFP, ii) letras subrayadas corresponden a codones de iniciación o a codones de iniciación mutados, iii) letras en negrita corresponden a las secuencias *spacer*, y iv) el resto corresponde al elemento IRES derivado del virus de la encefalomiocarditis (EMCV). La producción de retrovirus AkvU3-EGFP se describe en Jespersen 99[171].

- El vector AkvU3-EGFP fue digerido con la enzima de restricción Cel II de manera a retirar el cassette IRES-EGFP y en su lugar fue clonado utilizando el mismo sitio de restricción el cassette IRES-v-Ha-Ras proveniente de un plásmido intermediario construido en el laboratorio para dar el vector competente para la replicación AkvU3-v-Ha-Ras.

- pKZ261 es un vector de expresión de tv-a (que posee además un triple *tag* HA) bajo el control del hCMVp en el vector pBR322. El plásmido pw120 contiene el promotor distal LCK en el vector pUC19. Para la construcción de un vector de expresión tv-a bajo el control del promotor T específico LCK (PM466) : i) se digiere pCDNA3 con Bgl II y Bam HI para

retirar el hCMVp ; ii) se clona LCKp a partir del plásmido pw120 en el lugar dejado por el hCMVp en el sitio único de restricción de pCDNA3 Not I; iii) se clona finalmente el cDNA de tv-a a partir del plásmido pKZ261 entre los sitios únicos de restricción Not I y Xba I de pCDNA3.

## 2- Líneas celulares

- TelCeb 6 deriva de TE671 *human rhabdomyosarcoma* cells [119]. Producen partículas retrovirales *bald* (sin Env) derivadas de MLV, llevando el gen *marker* nls- $\beta$ -galactosidasa.
- Las líneas NIH3T3.tv-a y TE671.tv-a fueron transfectadas de manera estable con el plásmido pKZ261 y expresan de manera constitutiva el receptor tv-a en su superficie celular.
- Tel A y 3A2B6 son líneas estables derivadas de TelCeb 6 que expresan los Envs *amphotropic* y *ecotropic* respectivamente.
- Las líneas celulares derivadas de ratón: fibroblastos NIH 3T3 y *Mus dunni*, y mioblastos C2C12 y las líneas celulares derivadas del hombre: keratinocitos A431, linfocitos T H9 o Jurkat y fibroblastos 293T fueron obtenidas del ATCC.
- 293T TetON fueron obtenidas de Clontech y expresan de manera estable el complejo de proteínas rtTA (*reverse tetracycline-controlled transactivator*).
- HOS R5 es una línea de fibroblastos humanos que expresa de manera estable las moléculas de superficie CD4 y CCR5 y fueron obtenidas de Clontech.
- QT6 es una línea celular proveniente de codorniz que expresa naturalmente el receptor específico del ASLV-A, receptor tv-a y fueron donadas por el laboratorio de C. Bagnis en Marseilla, Francia.
- Las células derivadas de TE671, *Mus dunni*, BOSC 23, NIH 3T3, HOS R5, 293T y 293T TeTON fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco/BRL), C2C12 en 1:1 mezcla de HAM-F12 (Eurobio) y DMEM y A431, H9 y Jurkat en medio RPMI 1640 (Gibco/BRL). Todas con suplemento de 10% de suero fetal bovino inactivado (salvo 293T TeTON: *TeT System Approved Fetal Bovine Serum*, Clontech), 2 mM de glutamina, 100 ug/ml de estreptomycin y 100 unidades/ml de penicilina. QT6 fue cultivada en medio 199, 1% suplemento suero de pollo y 10% de suero fetal bovino inactivado.

### 3- Transfecciones

Todas las transfecciones transitorias y estables se llevaron a cabo utilizando el método de precipitación por fosfato de calcio [168].

#### C3 - Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de infección

- Los plásmidos pRL-TK y pEGFP-C1 fueron utilizados para la normalización de la transfección de los experimentos con transfecciones transitorias.

- **En los experimentos con MLV**,  $2 \times 10^5$  células por pozo (*in 6 well culture plates*, Nunc) fueron transfectadas usando 2 ug del plásmido relevante mas 0.1 ug de pRL-TK. Para obtener células productoras de virus expresando de manera inductible los Envs *amphotropic* y *ecotropic*, las células TelCeb 6 fueron transfectadas de manera estable con el plásmido pUHD-15-1 y clones individuales fueron seleccionados. Estos clones fueron tranfectados de manera transitoria con el plásmido pUHC-13-3 para determinar su capacidad de inducción o represión por la doxiciclina. El clon celular Tel179.9 fue elegido como el mejor para responder de manera doxiciclina dependiente. Este último fue transfectado de manera estable con los vectores Env de expresión *ecotropic* y *amphotropic* PM361 y PM377 para dar los clones celulares CPM64 y CPM79, respectivamente.

- **En los experimentos con HIV-I**,  $2 \times 10^5$  células por pozo (*in 6 well culture plates*, Nunc) fueron cotransfectadas usando 3 ug del plásmido relevante más 1 ug de pEGFP-C1.

En todos los casos, 15 horas después de la transfección las células son lavadas 3 veces con PBS (0.15 M NaCl, 0.001 M NaPO<sub>4</sub>, pH7) y se agrega medio conteniendo concentraciones diferentes de doxiciclina.

#### 4- Análisis de Facs e *immunoblotts* contra la glicoproteína Env gp70 o gp120

##### C4 - Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de infección

- La expresión de Env en la superficie celular fue cuantificada utilizando análisis de citometría como se describe en Lavilette et al.[71], usando el anticuerpo monoclonal 83A25 [173] dirigido contra la gp70 de MLVs o el anticuerpo 2G12 dirigido contra la gp120 [174]

- La cuantificación por *immunoblotts* de las gpEnvs asociadas a los viriones se realizó de la siguiente manera: 1.2 ml de sobrenadante de cultivos conteniendo los viriones fue llevado a una concentración final de CaCl<sub>2</sub> de 10 mM; luego de dejar precipitar los viriones durante 30 minutos a temperatura ambiente se centrifuga a 15000 x g durante 1 minuto y se resuspende en 10 ul de *electrophoresis loading buffer*.

- La cuantificación por *immunoblotts* de las gpEnvs asociadas a las células se realizó de la siguiente manera: se lavan las células con PBS, se lisan en una solución triplex (50 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 0.2% NaN<sub>3</sub>, 0.1% SDS, 1% NP40, 0.5% Na deoxicolato, 2mg/ml leupeptina) durante 30 minutos a 4°C. Se extrae el núcleo del *pellet* luego de centrifugar a 15000 x g durante 10 minutos. Se mide la concentración de proteína total y se cargan en gel para electroforesis 75 ug.

- Las muestras de proteínas virales y celulares se fraccionan en un gel SDS 10% poliacrilamida y luego son transferidas a membranas de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell) y la inmunodetección se realiza como se describe en Marin et al [155] utilizando un anticuerpo de cabra anti-gp70 (Quality Biotach Inc) o un anticuerpo de oveja anti-gp120 (SITBON). En los extractos de partículas virales se normaliza utilizando un anticuerpo monoclonal (R187b) [175] anti-p30<sup>gag</sup> de MLV o un anticuerpo monoclonal anti-p24 (p55 N2-4) de HIV-I (NIH Aids Reagent Program). El software NIH IMAGE fue utilizado para cuantificar la cantidad de proteína inmunodetectada.

## **5- Títulos virales**

### **C5 - Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de infección**

Los títulos virales fueron determinados por duplicado usando sobrenadantes de cultivos de células productoras de virus cultivados durante 24 horas en confluencia con diferentes concentraciones de doxiciclina.

#### **Análisis de títulos virales de los vectores retrovirales que codifican LacZ**

Para los títulos determinados sobre las células NIH 3T3, A431 y C2C12, estas últimas son cultivadas en placas (Nunc) de 12 pozos ( $2 \times 10^4$  células por pozo). 24 horas más tarde, el medio es cambiado y remplazado por 1 ml de medio conteniendo diluciones seriadas de partículas retrovirales MLV, más 8 ug/ml de polibreno (Sigma). La infección se lleva a cabo *overnight* y luego el medio es remplazado. 48 horas más tarde se realiza una coloración X-gal (Eurobio) y se cuentan las unidades formadoras de colonias (ufc/ml), que se distinguen por su color azul [155], utilizando un microscopio de contraste de fase.

Para infectar las células T no adherentes H9 se utilizó el método de la fibronectina detallado en Dardalhon et al. [176].

En las experiencias de cinética, la infección se lleva a cabo durante diferentes períodos de tiempo, y no *overnight*, y luego se lava 3 veces con PBS frío antes de agregar 1 ml de medio de cultivo.

#### **Análisis de títulos virales de los vectores lentivirales que codifican la EGFP**

Para los títulos determinados sobre las células HOS R5, estas últimas son cultivadas en placas (Nunc) de 96 pozos ( $2 \times 10^3$  células por pozo). 24 horas más tarde, el medio es cambiado y remplazado por 200 ul de medio conteniendo diluciones seriadas de partículas lentivirales HIV-I, más 8 ug/ml de polibreno (Sigma). La infección se lleva a cabo *overnight* y luego el medio es remplazado. 24 horas más tarde se cuentan las unidades formadoras de

colonias (ufc/ml), bajo microscopio fluorescente, gracias a la autofluorescencia de la proteína EGFP.

#### **D5 - Targeting celular *in vivo***

Los títulos virales fueron determinados por duplicado usando sobrenadantes de cultivos de células productoras de virus cultivados durante 72 horas en confluencia.

Para los títulos determinados sobre las células *Mus dunni*, estas últimas son cultivadas en placas (Nunc) de 96 pozos ( $2 \times 10^3$  células por pozo). 24 horas más tarde, el medio es cambiado y remplazado por 200  $\mu$ l de medio conteniendo diluciones seriadas de vectores retrovirales AkvU3-EGFP o Akv MLV, más 8  $\mu$ g/ml de polibreno (Sigma). La infección se lleva a cabo *overnight* y luego el medio es remplazado. 24 horas más tarde se cuentan las unidades formadoras de colonias (ufc/ml). En el caso de AkvU3-EGFP, se utiliza un microscopio a fluorescencia, gracias a la autofluorescencia de la proteína EGFP. En el caso de Akv MLV se utiliza un análisis de inmunofluorescencia indirecta [173], utilizando un anticuerpo monoclonal 83A25 dirigido contra la glicoproteína Env de MLV y un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FITC (Sigma).

## **6- Citometria de flujo**

### **C6 - Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de infección**

Las células HOS R5 transducidas con los vectores lentivirales HSA (CD24) fueron identificadas utilizando un anticuerpo anti-CD24 (M1/69 Becton Dickinson Pharmingen) de ratón conjugado al fluorocromo *phycoerythrin* (PE). La expresión de CCR5 en las células HOS R5 se identificó utilizando un anticuerpo de ratón anti-CCR5 (2D7/CCR5 Becton Dickinson Pharmingen) y un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado al fluorocromo FITC (SIGMA). Las células fueron incubadas 30 minutos a 4°C con el anticuerpo específico y luego lavadas 2 veces en PBS antes del análisis de citometria. Para la separación de partículas lentivirales de la gp120 soluble provenientes del *shedding* se utilizaron columnas de concentración Vivaspin 20 ml  $1 \times 10^6$  MWCO PES (Sartorius). El sobrenadante filtrado conteniendo las partículas lentivirales y la gp120 soluble fue



centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos en las columnas. Los viriones son recuperados en el filtro (200 ul) y la gp120 soluble en el sobrenadante. Los primeros son utilizados para infectar HOS R5 y llevar a cabo análisis de *immunoblots* utilizando un anticuerpo anti gp41 (TM del Env de HIV-1) (240 NIH Aids Reagent Program) que solo se expresa en los viriones.

#### **D6 - Targeting celular *in vivo***

Las células mononucleares provenientes del bazo fueron purificadas luego de sacrificar los ratones 1, 4, 7, 12, 30 y 60 días luego de la infección (inyección). Para esto, el o los bazos se ponen en una placa de petri con 10 ml de medio RPMI. Se utiliza una jeringa y una pipeta para disgregar los esplenocitos. Las células se centrifugan a 490 x g, 18°C, 5 minutos y el *pellet* es resuspendido en medio RPMI mas una solución de lisis de eritrocitos (32x10<sup>-6</sup> M EDTA, 0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 0.01 M KHCO<sub>3</sub>). Luego de centrifugar 490 x g, 18°C, 5 minutos, las células se incuban a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 2 horas, para separar las células adherentes, en general macrófagos y células dendríticas. Las células en suspensión se centrifugan en una solución de 8 ml de medio HBBS (*Hank's Balanced Salt Solution*, BioWhittaker Europe) más 4 ml de Ficoll (Ficoll-Paque<sup>TM</sup> plus, Amersham) a 330 x g durante 20 minutos, 18°C y los linfocitos se recuperan de la interfase. Finalmente son lavados 2 veces con PBS y 2 veces con medio RPMI antes de incubarlos con sus anticuerpos específicos. Para identificar el fenotipo y el porcentaje de los diferentes linfocitos se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos anti-ratón conjugados con el fluorocromo PE: anti-CD3 (T), anti-CD19 (B) y anti-PAN NK (NK) (Pharmingen) en células provenientes de ratones infectados y no infectados. Las células infectadas se detectaron gracias a la autofluorescencia de la EGFP. Las células fueron incubadas 30 minutos a 4°C con el anticuerpo específico y luego lavadas 2 veces en PBS antes del análisis de citometría.

### **7- Viremia**

#### **D7 - Targeting celular *in vivo***

La viremia sanguínea se determinó infectando, por duplicado y con diluciones seriadas de suero proveniente de los ratones, las células *Mus dunni*. Luego se cuenta en el microscopio fluorescente las unidades formadoras de colonias (ufc/ml) por autofluorescencia directa de la

EGFP o en análisis de inmunofluorescencia indirecta [173], utilizando un anticuerpo monoclonal 83A25 dirigido contra la glicoproteína Env de MLV.

## **8- Infección retroviral de ratones**

### **D8 - Targeting celular *in vivo***

Los ratones NIH swiss fueron obtenidos de CERJ (Francia). Los grupos experimentales comprenden camadas individuales de entre 14 y 18 ratones. Los animales se quedan con su madre hasta las tres semanas de edad. Tres camadas fueron utilizadas para la infección. Se infectan ratones de 3 o 4 días de edad. Dos fueron inyectadas intraperitonealmente con 100  $\mu$ l de AkvU3-EGFP ( $1 \times 10^5$  UCF/ml) y otra con Akv MLV ( $1 \times 10^5$  UCF/ml). Finalmente se utilizó otra camada no infectada como control.

Un grupo de ratones de cada camada fue sacrificado los días 1, 4, 7, 12, 30 y 60 luego de la infección. Primero se los sangró para determinar la viremia y luego el bazo es extraído para realizar análisis de citometría y preparar ADN para análisis de PCR.

## **9- PCR**

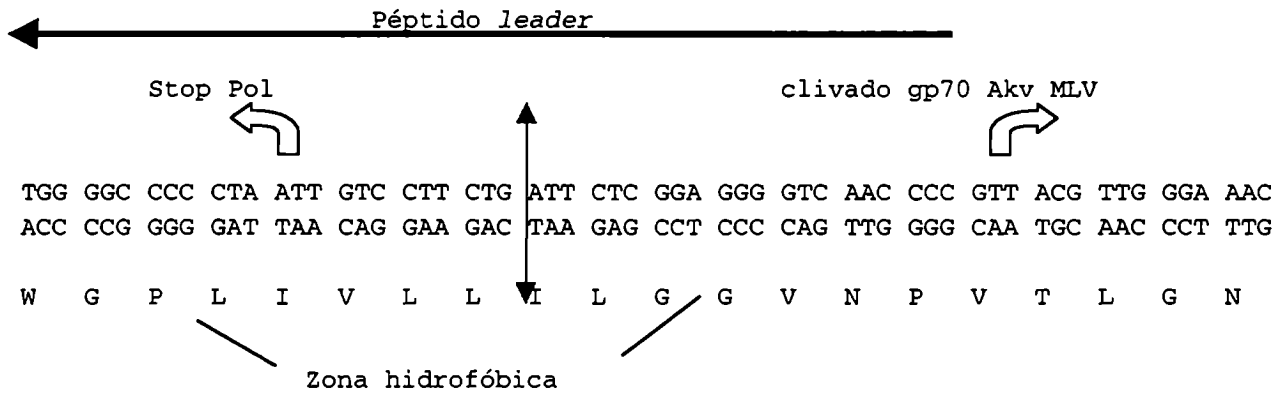
### **D9 - Targeting celular *in vivo***

El ADN es purificado de las células del bazo [177]. La amplificación por PCR se realiza en 25  $\mu$ l de Buffer PCR conteniendo 100 a 400 ng de ADN purificado del bazo, 25 pmol de cada *primer*, 0.2 mM dNTPs y 0.5 U de AmpliTaqGold DNA *polymerase* (PerkinElmer). Luego de una activación de 9 minutos a 94°C, la reacción se lleva a cabo durante 40 ciclos (1.2 minutos a 94°C, 1.2 minutos a 60°C, 3 minutos a 72°C). Los 40 ciclos son seguidos de una incubación de 7 minutos a 72°C. Los *primers* utilizados coinciden con las secuencias localizadas fuera del cassette IRES-EGFP, en la región 3' del gen env (posición 7562 a 7590) y en la región U3 (posición 8185 a 8213). Estos dos *primers* amplifican un fragmento de ADN de 651 pb del genoma *wild type* de Akv y un fragmento de 1983 pb del AkvU3-EGFP.

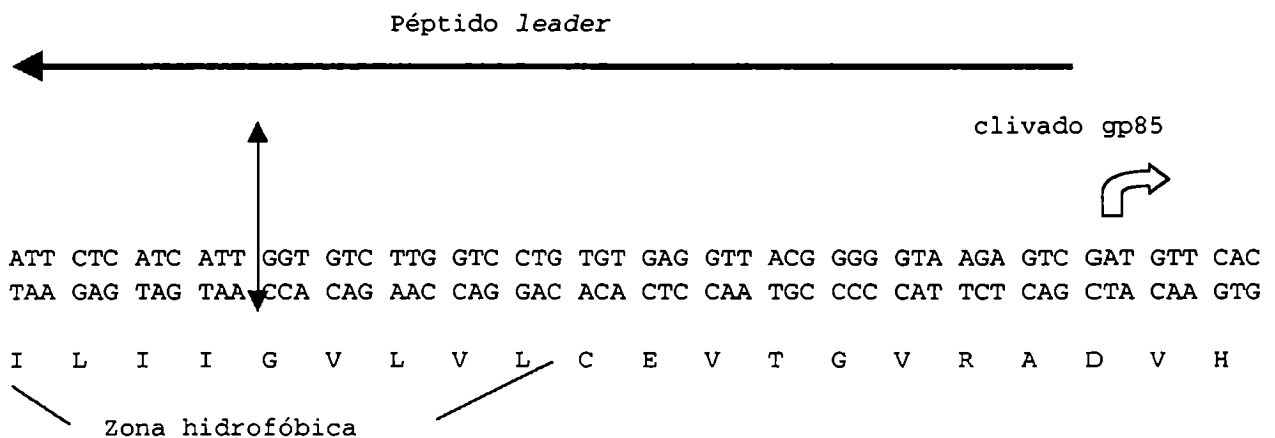
## 10 - Estrategia para clonar la glicoproteína Env de ASLV-A gp85 (pseudotyping)

### D10 - Targeting celular *in vivo*

#### Estructura de ENV ecotropico de Akv MLV en la región de recombinación:

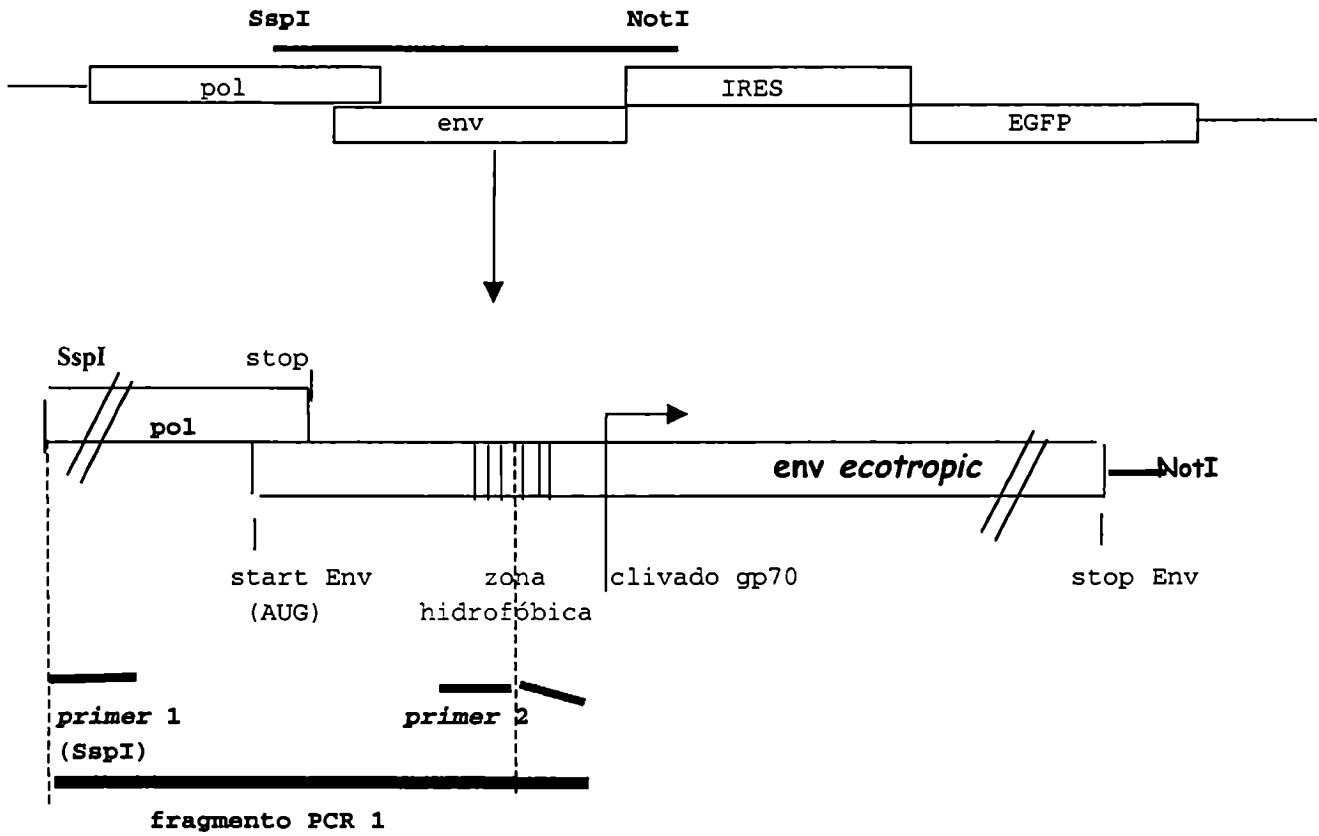


#### Estructura de ENV de ASLV-A en la región de recombinación:

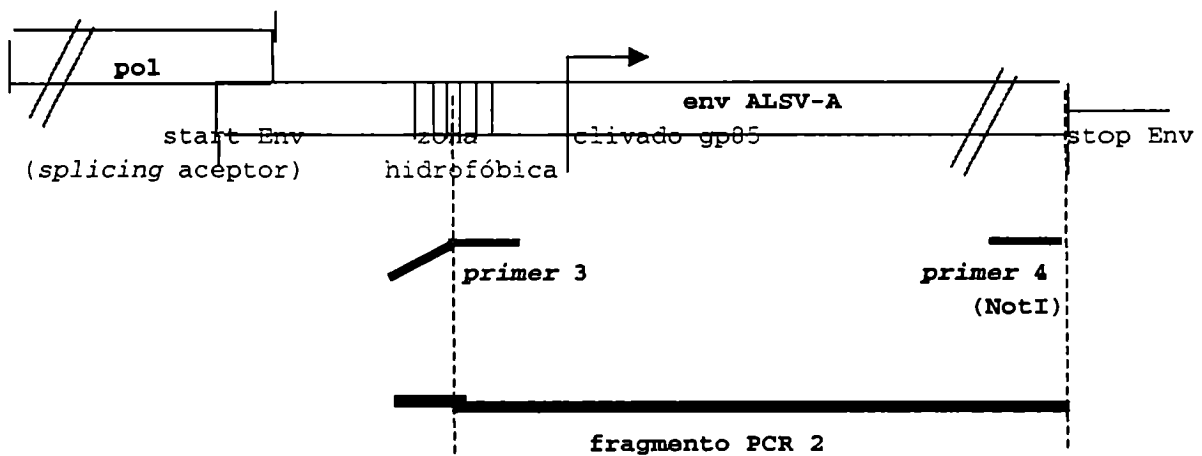


Recombinación en los dominios hidrofóbicos de los péptidos *leader*

Vector AkvU3-EGFP:



Vector Env gp85 de ALSV-A:



mezcla de fragmentos 1 y 2 en PCR



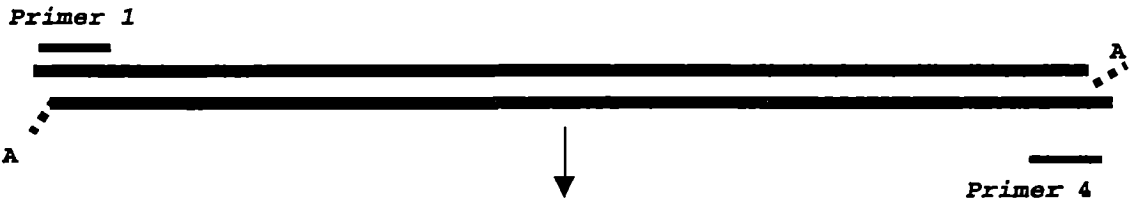
Desnaturalización / hibridación



polimerización



Amplificación PfuI + Taq



Clonado en plásmido intermediario



Digestión SspI/NotI y clonado en AkvU3-EGFP

**C**

# **RESULTADOS**

**Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de  
infección**

## C – RESULTADOS

### Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de infección

#### INTRODUCCION

Como ya se ha comentado, la glicoproteína Env cumple un rol primordial en la entrada del retrovirus a la célula, no solo porque es la responsable del reconocimiento específico del receptor en la superficie celular, sino porque también es la mediadora de la fusión entre las dos membranas celular y viral. Proceso que permite la entrada de la cápside al citoplasma. Sin embargo, el primer evento de la infección es la etapa de adsorción que se realiza independientemente de la presencia de Env en la superficie viral [178, 179].

No se han realizado estudios para determinar el número de moléculas Env expresadas en una partícula MLV *wild type*. Sin embargo, a fines de los 80, utilizando técnicas de microscopia electrónica combinadas a análisis de imagen rotacional por computadora, dos laboratorios independientes [180-182] sugieren que son 72 los trímeros de gp41/gp120 (*knobs* o proyecciones) que se expresan en condiciones « normales » en la superficie de HIV-I, es decir 216 moléculas gp120 por virión.

Los aspectos cuantitativos de la infección celular por los retrovirus MLV o HIV-I han sido poco estudiados. Análisis de la cinética del *binding* de las de moléculas Env de MLV solubles o de viriones a las células [59, 183-186] sugieren que la unión de MLV es esencialmente debida a interacciones multivalentes no cooperativas. Los viriones deberían expresar muchas copias de Env, en su forma de oligómero, para unirse a las células, que deberían expresar muchas copias del receptor [59]. En lo que respecta a HIV-I muy pocos trabajos han sido publicados, [187-189] los cuales utilizando modelos matemáticos y midiendo la cinética de infección usando moléculas CD4s (solubles) para inhibir el *binding* entre las partículas lentivirales y las células demuestran que HIV-I precisa de múltiples moléculas de

gp120 para mediar una infección eficaz (más del 50% de las moléculas presentes en su superficie)

Antes de mi llegada al laboratorio en octubre 1997, el laboratorio de Marc Piechaczyk había demostrado que es posible construir moléculas Env quimeras constituidas por un minianticuerpo (scFv) fusionado a la glicoproteína Env *ecotropic* de MLV, a fin de redirigir la infección hacia células humanas [155]. Sin embargo la capacidad de infección de estos vectores es baja. Al llegar al laboratorio nos preguntamos cual o cuales podrían ser las razones mecánicas de esta pobre capacidad de infección. Una primera, o parcial respuesta fue aportada por Georgios Karavanas (manuscrito en preparación), estudiante del laboratorio, y es que la actividad de fusión de las moléculas quimeras es reducida con respecto a las moléculas *wild type* Env. Además, observamos que la incorporación de las moléculas scFv-Env en las partículas retrovirales es poco eficaz (Figura 1). Luego de esta observación, decidimos estudiar la hipótesis de que el hecho de disponer de partículas retrovirales con pocas Env en la superficie podría influir directamente también con los resultados de baja capacidad de infección. Es por eso, y dado que los aspectos cuantitativos de la infección celular por los retrovirus ha sido poco documentada, que quisimos determinar la influencia de la densidad de Env *wild type* en la superficie retroviral de los MLV y de los HIV-I y su capacidad de infección. Con este objetivo, desarrollamos en un primer modelo, un sistema de producción de partículas virales expresando cantidades variables de Env MLV *ecotropic* y *amphotropic* y cuantificamos luego su capacidad de infección. Inesperadamente, nuestros resultados sugieren que una pocas moléculas Env son suficientes para infectar una célula [190]. Además, muestran que existe un umbral donde una determinada cantidad de Env es requerida para obtener una infección eficiente y que a pesar de incorporar mas moléculas de Env no se mejoran los títulos virales. Todo esto contradice la idea admitida corrientemente de que se necesitan de un gran número de interacciones no cooperativas para obtener una infección eficaz en los MLVs.

En la medida de que estos resultados replantean ciertas interpretaciones sobre las etapas precoces de la infección por MLV, nos propusimos en un segundo modelo, a extender estas experiencias utilizando la glicoproteína Env de HIV-I gp120 de tropismo M (utiliza el coreceptor CCR5), incorporándola en diferentes cantidades en vectores lentivirales. Como se explicará a lo largo de este capítulo, obtuvimos resultados similares a los de los vectores



MLV (Bachrach et al.2001 en preparación). Además en experiencias paralelas nuestros resultados sugieren que un mayor número de moléculas de gp120 expresadas en los viriones y en contacto con la superficie celular favoriza la activación del promotor LTR de HIV-I.

## RESULTADOS

### Capacidad de infección de viriones que expresan diferentes cantidades de Env MLV *amphotropic* en transfecciones transitorias

Para determinar como la cantidad de Env influye en la capacidad de infección de los MLVs utilizamos primero transfecciones transitorias para producir poblaciones homogéneas de viriones expresando diferentes cantidades de Env. La línea celular TelCeb 6 produce partículas retrovirales no infecciosas (sin Env o *bald*) derivadas de MoMLV, que expresan el gen *marker*  $\beta$ -galactosidasa [119]. Estas células fueron transfectadas de manera a expresar constitutivamente el transactivador transcripcional tTA (clon celular Tel179.9), que es regulado negativamente por la doxiciclina (Dox) y luego, transfectadas de manera transitoria, en presencia de diferentes concentraciones de Dox, con el plásmido PM377, que expresa el gen *env amphotropic* bajo el control del operador tet (que responde al transactivador tTA) (Figura2).

Los experimentos de *immunoblots* utilizando un anticuerpo específico anti-MLV Env fueron realizados en duplicado para determinar la abundancia de Env en las células transfectadas y en las partículas virales liberadas en el sobrenadante de cultivo. En los dos casos, la cantidad de Env varia según la concentración de Dox (variación no lineal) (Figura 3Aa, 3Ab). En paralelo se llevaron a cabo análisis de citometria de flujo de las células transfectadas, para determinar la expresión célula a célula de Env asociado a la superficie celular (Figura 3B). En las diferentes condiciones utilizadas (10 y 100 ngDox/ml), la gran mayoría de las células (más del 80%) se encuentran en picos homogéneos de fluorescencia, mientras que el remanente, que corresponde probablemente a células no o pobremente transfectadas, muestran baja o nada de fluorescencia. Estos resultados demuestran la expresión homogénea de Env en la superficie de cada célula transfectada. Además, el *ratio* de fluorescencia entre estos picos (2.3) es comparable al *ratio* de la abundancia de Env (2.5) determinada por *immunoblotting*, confirmando que la acumulación de Env es Dox dependiente.

Para determinar el título viral de los viriones infecciosos liberados en el sobrenadante de los cultivos celulares, estos últimos fueron utilizados para infectar (por cuadruplicado) fibroblastos murinos NIH3T3 (Figura 4A). En la figura 4B se comparan los títulos virales de cada población retroviral con la abundancia de Env, determinada utilizando los *immunoblots* dirigidos contra las partículas virales (ver Materiales y Métodos). Una primera observación interesante es que no existe una relación lineal entre la cantidad de Env y la capacidad de infección. A bajas concentraciones de Dox (0 – 1 ngDox/ml) (mucho Env), una variación de 10 veces en la cantidad de Env no afecta significativamente el título viral, indicando la existencia de un umbral, por el cual, una mejor incorporación de Env, no mejora la capacidad de infección. A altas concentraciones de Dox (100 – 1000 ngDox/ml) (poco Env) un incremento de 2 veces de moléculas de Env resulta en un incremento en el título viral de 10 veces, sugiriendo la posibilidad de una cooperación entre las moléculas de Env a bajas densidades. A condiciones intermedias de Dox (1 – 100 ngDox/ml), las variaciones de Env están asociadas a las variaciones en el título viral, favoreciendo la idea de que múltiples interacciones Env-receptor mejoran la infección.

**Capacidad de infección de viriones que expresan diferentes cantidades de Env MLV  
*amphotropic* y *ecotropic* en transfecciones estables**

Luego quisimos investigar si con otro Env de MLV (*ecotropic*) observábamos los mismos resultados. Para esto, la línea Tel179.9 fue transfectada de manera estable por los vectores Env *ecotropic* y Env *amphotropic* bajo el control del operador tet, de donde derivaron los clones celulares CPM64 y CPM79, respectivamente. Como en la experiencias anteriores, CPM64 y CPM79 fueron cultivadas con diferentes concentraciones de Dox y luego los sobrenadantes fueron utilizados para infectar por triplicado las células NIH3T3 y para cuantificar la glicoproteína Env asociada a los viriones (Figura 5A-B y 6A-B, respectivamente). Los análisis de citometría también muestran una expresión homogénea de Env en la superficie celular según las condiciones utilizadas (data non shown).

Es interesante resaltar que la caída en la abundancia de Env observada entre 0 y 0.1 ngDox/ml fue más dramática que en las transfecciones transitorias. La razón no fue investigada pero podría reflejar una respuesta diferencial a tTA entre los genes asociados o no a la cromatina. Sin embargo, los resultados esenciales no cambian, ya que : i) a bajas concentraciones de Dox (0 y 0.1 ngDox/ml)(mucho Env), una variación de entre 50 y 80 veces en la cantidad de Env *ecotropic* y *amphotropic*, respectivamente, no cambia el título viral. ; ii) a concentraciones intermedias, una reducción de Env resulta una reducción de la capacidad de infección y iii) a altas concentraciones (poco Env) un efecto de sinergia es nuevamente observado. En el caso del Env *ecotropic*, un incremento de 2 (entre 10 y 1 ng Dox/ml) o 3 (entre 1 y 0.1 ng Dox/ml) veces en la abundancia de Env resulta en un incremento del título viral de 30 o 10 veces, respectivamente (Figura 5B). De la misma manera, con el Env *amphotropic*, entre 100 y 10 ngDox/ml o entre 10 y 1 ng Dox/ml resulta en un incremento de 10 o 40 veces del título viral, respectivamente (Figura 6B). Desafortunadamente, la sensibilidad del sistema tetraciclina (data non shown) no permite abolir por completo la infección, es decir, inhibir por completo la expresión de Env en las células y su consiguiente incorporación en las partículas virales, al menos en estas líneas celulares. Sin embargo, los bajos niveles de infección a altas concentraciones de Dox son claramente Env dependientes, debido a que partículas no infecciosas fueron detectadas en experimentos paralelos utilizando Tel179.9 como fuente productora de viriones.

### Capacidad de infección de viriones que expresan diferentes cantidades de Env MLV *amphotropic* y *ecotropic* en varios tipos celulares

Luego determinamos si este efecto era dependiente del tipo celular utilizado para infectar. En una serie de experimentos, sobrenadantes de cultivos de CPM64, crecidas bajo diferentes concentraciones de Dox fueron utilizados para infectar C2C12 (línea de miocitos de ratón) (Figura 7A). En otra serie de experimentos, bajo las mismas condiciones pero utilizando sobrenadantes de CPM79 se infectaron A431 (línea de keratinocitos humanos) y H9 (línea de linfocitos T humanos) (Figura 7B). El mensaje final de estos experimentos es similar a los experimentos llevados a cabo con NIH3T3. La sola diferencia notable es que las células A431 y H9 son menos sensibles a la infección.

### Cinética de la infección utilizando retrovirus que expresan diferentes cantidades de Env MLV *amphotropic* y *ecotropic*

Nos propusimos finalmente investigar como la abundancia de Env en la superficie viral puede afectar la cinética de la infección celular por MLVs. Se llevaron a cabo experiencias por duplicado, donde células NIH3T3 fueron expuestas durante diferentes periodos de tiempo a sobrenadantes de cultivo provenientes de CPM64 y CPM79 cultivadas en ausencia o con 0.1 ng Dox/ml. En paralelo, las variaciones de Env asociado a la partícula viral se determinó por *immunoblots*. En una fase inicial (0 a 20 minutos), un rápido incremento en el número de células infectadas se observó en los dos casos, indicando una rápida unión de los virus a las células (ver [59, 179]) (Figura 8). En ausencia de Dox (máxima cantidad de Env), el *plateau* de máxima infección es alcanzado rápidamente (entre 30 y 60 minutos), mientras que con 0.1 ng Dox/ml, donde 50 y 80 veces menos de Env *ecotropic* y *amphotropic* está asociado a las partículas virales, respectivamente, se alcanza el mismo *plateau* de máxima infección (lo que es coherente con las Figura 5 y 6) pero más lentamente (alrededor de 120 minutos). Debido a que la adsorción a la célula es independiente de la presencia de Env, es decir es eficaz con o sin Env [179], estos resultados sugieren que la reducción de Env asociado a la partícula viral afecta principalmente una etapa post-adsorción en el proceso de infección (ver Discusión).

### Capacidad de infección de vectores lentivirales derivados de HIV-I que expresan diferentes cantidades de glicoproteína Env AD8 gp120 en su superficie

Luego de los resultados interesantes obtenidos con las partículas MLV nos propusimos realizar el mismo tipo de experiencias pero utilizando vectores lentivirales derivados de HIV-I y la glicoproteína Env gp120 AD8 que presenta un tropismo M, es decir que utiliza como coreceptor la molécula CCR5, además del receptor natural de HIV-I, CD4. Para estudiar entonces como la cantidad de Env gp120 influye en la capacidad de infección de vectores HIV-I, utilizamos un sistema sensiblemente diferente al utilizado con los MLVs. Para obtener poblaciones homogéneas de viriones HIV-I expresando diferentes cantidades de Env gp120 AD8 realizamos cotransfecciones transitorias, en presencia de diferentes concentraciones de Dox, de la línea celular de fibroblastos humanos 293T TetON. Esta línea expresa de manera estable y constitutiva el complejo de proteínas rtTA (*reverse tetracycline-controlled transactivator*) que es regulado positivamente por la tetraciclina (o la Dox), es decir que en presencia de la Dox activa el operador/promotor tet. En un primer momento las transfecciones fueron realizadas con : un plásmido de empaquetaje de segunda generación CMV $\Delta$ R8.9 derivado de HIV-I, un plásmido « vector de expresión » CD286 que se trata de un vector lentiviral derivado de HIV-I que transduce la EGFP bajo el control del promotor hCMV y el plásmido « vector de expresión » PM636 que expresa la Env gp120 AD8, bajo el control del promotor/operador tet (que responde al transactivador rtTA) (Figura 9).

Los experimentos de *immunoblots* utilizando un anticuerpo específico anti-gp120 Env fueron realizados en triplicado para determinar la abundancia de gp120 Env en las células 293T TetON transfectadas y en las partículas lentivirales liberadas en el sobrenadante de cultivo. En los dos casos, la cantidad de Env varía según la concentración de Dox (variación no lineal) (Figura 10Aa, 10Ab). En paralelo se llevaron a cabo análisis de citometría de flujo de las células transfectadas, para determinar la expresión célula a célula de gp120 Env asociado a la superficie celular (Figura 10B). En las diferentes condiciones utilizadas (10, 100 y 1000 ngDox/ml), la mayoría de las células transfectadas (más del 40%) se encuentran en picos homogéneos de fluorescencia, mientras que el remanente, que corresponde probablemente a células no o pobremente transfectadas, muestran baja o nada de fluorescencia. Estos resultados, como en las experiencias con MLV, demuestran la expresión homogénea de gp120 Env en la superficie de cada célula transfectada. Además, el *ratio* entre

los picos de fluorescencia (4.3 entre 1000 y 100 ng Dox/ml y 3 entre 100 y 10 ng Dox/ml) es comparable al *ratio* de la cuantificación de la abundancia de Env realizada a partir de *immunoblots* (4 entre 1000 y 100 ng Dox/ml y 3.4 entre 100 y 10 ng Dox/ml) (Figura 10B), confirmando que la acumulación de gp120 Env es Dox dependiente.

Para determinar el título viral de los viriones infecciosos liberados en el sobrenadante de los cultivos celulares, estos últimos fueron utilizados para infectar (por cuadruplicado) fibroblastos humanos HOS R5, que expresan de manera estable las moléculas CD4 y CCR5 en su superficie. En la Figura 11 se comparan los títulos virales de cada población lentiviral con la abundancia de gp120 Env, determinada utilizando los *immunoblots* dirigidos contra de las partículas virales (ver Materiales y Métodos). Una primera observación interesante es que no existe una relación lineal entre la cantidad de Env y la capacidad de infección. Similar a los resultados obtenidos con los Envs *ecotropic* y *amphotropic*, a altas e intermedias concentraciones de Dox (1000, 100 y 10 ng Dox/ml) (recordar que aquí se trata del sistema TeTON y no TeTOFF como en los experimentos con MLV), una variación de 6 veces en la cantidad de gp120 Env no afecta significativamente el título viral, indicando de nuevo la existencia de un umbral, por el cual, una mejor incorporación de gp120 Env, no mejora la capacidad de infección. Al menos con el serotipo AD8 estudiado y las células HOS R5. A bajas concentraciones de Dox (entre 0 y 10 ng Dox/ml) un incremento de 2 veces de moléculas de Env resulta en un incremento en el título viral de entre 10 y 100 veces, según el experimento, sugiriendo la posibilidad de una cooperación entre las moléculas de gp120 Env a bajas densidades. Utilizando concentraciones intermedias entre 0 y 10 ng Dox/ml no se han podido obtener resultados que detallen o clarifiquen lo que sucede entre estos dos puntos.

#### **Activación diferencial del LTR de HIV-I entre partículas lentivirales derivadas de HIV-I que expresan diferentes cantidades de glicoproteína Env AD8 gp120 en su superficie**

En una segunda serie de experimentos quisimos determinar la influencia de la abundancia de gp120 en la superficie retroviral con la activación del LTR de HIV-I. Para este propósito la línea 239T TeTON fue cotransfectada de manera transitoria con los siguientes vectores : el plásmido « vector de expresión » PM636 que expresa la Env gp120 AD8, bajo el control del promotor/operador tet y el vector lentiviral-plásmido de empaquetaje pNL4-

3.HSA.R+E- que codifica todos los genes de HIV-I excepto env y además transduce el gen *marker* HSA (CD24 de ratón) que se expresa en la superficie de las células transducidas bajo el control de la LTR de HIV-I (Figura 12). Antes de la infección de las células HOS R5, los vectores lentivirales fueron separados de la gp120 soluble proveniente del *shedding* utilizando columnas de concentración de  $1 \times 10^6$  MWCO. Los viriones poseen un peso molecular de  $1 \times 10^8$  y los antígenos virales de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$  [189]. A continuación las células HOS R5 fueron infectadas *overnight* y en paralelo se llevaron a cabo análisis de *immunoblots* para cuantificar la cantidad de gp120, esta vez utilizando un anticuerpo anti gp41 (TM del Env de HIV-I) para confirmar la presencia en el concentrado lentiviral de gp120 unido únicamente a los viriones. La Figura 13A muestra los análisis de citometría de flujo dirigidos contra la proteína *marker* CD24. Como se puede apreciar el nivel de expresión (fluorescencia) de CD24 en la superficie de las células transducidas varía según la cantidad de gp120 incorporada en los viriones (Figura 13B). En efecto, a más gp120 en la superficie viral, mayor expresión de CD24 (comparar ng Dox/ml (+/- Env) con fluorescencia (+/- CD24)), lo que sugiere una mayor activación del LTR de HIV-I. Estos resultados sugieren que un aumento en la expresión de gp120 en la superficie viral en el momento de la infección produce una activación del LTR de HIV-I en las células infectadas induciendo de esta manera la transcripción de los genes retrovirales. El mecanismo de este fenómeno será estudiado en el laboratorio en próximas experiencias. Estos resultados podrían explicar el porque del "exceso" de incorporación de gpEnv en la superficie viral, es decir, que estas glicoproteínas no solo tendrían un rol primordial en la entrada a la célula, sino también en la activación de su LTR, al menos en los primeros estadios de la infección.

#### **Activación diferencial del LTR de HIV-I por la Env AD8 gp120 soluble**

En una última serie de experimentos quisimos analizar si la activación del LTR de HIV-I en presencia de grandes cantidades de gp120 Env depende de que estas moléculas se encuentren o no en la superficie viral. Para esto, las células HOS R5 fueron infectadas con vectores lentivirales CD24 (separados de la gp120 soluble) expresando pocas o muchas moléculas de gp120 en su superficie (condición 0 o 1000 ng Dox/ml respectivamente) (Figura 14). En paralelo se agregaron al cultivo lentiviral muchas o pocas moléculas de gp120 Env proveniente del *shedding* (condición 1000 o 0 ng Dox/ml, respectivamente), luego del filtrado por columna de  $1 \times 10^6$  MWCO. Las experiencias se realizaron agregando la gp120 Env



soluble 15 horas luego de la infección (Figura 14A) o junto con los vectores lentivirales (Figura 14B). El análisis de los niveles de expresión de CD24 y del porcentaje de células infectadas se determinó mediante citometría de flujo (Figura 14A y B). Como en la experiencia anterior, en todos los casos estudiados, el porcentaje de células infectadas y los niveles de expresión de CD24 son significativamente diferentes bajo las dos condiciones, con partículas expresando mucho o poco Env en su superficie. Entre 5-8% de células infectadas con un *mean* de fluorescencia de 18-22 con partículas expresando poco Env (0 ngDox/ml). 30% de células infectadas con un *mean* de fluorescencia de 50-74 con partículas expresando mucho Env (1000 ngDox/ml). Sin embargo, cuando grandes cantidades de gp120 soluble (+ gp120 soluble 1000 ng Dox/ml) es agregado en el medio 15 horas luego de la infección (Figura 14A), se observa un incremento de entre 2 y 3 veces en la expresión de CD24. De 18 a 38 de *mean* de fluorescencia en la condición 0 ng Dox/ml y de 74 a 206 en 1000 ng Dox/ml. Este incremento está directamente asociado a la cantidad de gp120 Env ya que cuando se agrega poco de esta molécula (+ gp120 soluble 0 ng Dox/ml) el incremento de la expresión de CD24 no es significativo. Como la expresión de CD24 se encuentra bajo el control del LTR de HIV-I, estas experiencias sugieren que la activación del LTR puede gatillarse también mediante moléculas de gp120 solubles en contacto con la membrana celular.

Contrariamente, cuando la gp120 Env soluble es agregada al mismo tiempo que los viriones (Figura 14B) se observa una reducción significativa en el porcentaje de células infectadas en las dos condiciones estudiadas, ya que estas moléculas compiten por la unión al receptor CD4 y coreceptor CCR5. En efecto, cuando se agregan grandes cantidades de gp120 Env soluble (+ gp120 soluble 1000 ng Dox/ml) se observa una reducción en el porcentaje de células infectadas del 7.5% a 0.5% en condición 0 ng Dox/ml y de 27% a 16% en condición 1000 ng Dox/ml. Además, en este último caso se observa un aumento de 1.5 veces en la expresión de CD24 (de 50 a 73 *mean* de fluorescencia), por lo cual, la gp120 soluble que compete por la molécula CD4 podría también activar el LTR. Por otra parte, no se observa una reducción significativa en el porcentaje de células infectadas cuando se agregan pocas moléculas de gp120 Env soluble (+ gp120 soluble 0 ng Dox/ml).

## DISCUSION y CONCLUSION

En el área de la retrovirología se asume comunmente que varias interacciones Env-receptor no cooperativas son necesarias para una entrada eficaz del virus a la célula [188]. Inesperadamente, los trabajos llevados a cabo durante esta tesis muestran que en el caso de retrovirus MLVs y HIV-I, pocas moléculas Env por partícula viral permiten la infección de la célula. Sin embargo, la reducción de hasta 100 veces de moléculas Env expresadas en la superficie viral de los MLVs y de 15 veces en HIV-I reduce dramáticamente, pero no totalmente la infección por los vectores derivados de estos dos retrovirus. La diferencia entre los dos retrovirus (100 y 15) podría ser explicada según varias posibilidades : Quizás los MLVs posean más moléculas Env en su superficie que HIV-I y dada la diferente morfología entre los dos viriones esto sería posible. En efecto, aun no se conoce el número de moléculas Env que se expresan en los retrovirus *wild type* MLVs, mientras que estudios de microscopia electrónica combinados con análisis por computadora muestran que HIV-I posee entre 200 y 400 moléculas Env gp120 en su superficie [181]. Por otra parte, si se asume que por analogía a HIV-I, los MLVs incorporan un número similar de moléculas Envs en sus membranas, podría explicarse que los sistemas utilizados en cada experiencia (tetraciclina TeTOFF para los MLVs y TeTON para HIV-I) no inducen con la misma intensidad (TeTOFF lo hace mucho más que TeTON-data non shown) la expresión del gen de interés (Env en este caso), al menos en las líneas celulares utilizadas.

En acuerdo con los resultados de este trabajo, recientemente se ha demostrado que solo un trímero de hemaglutinina es suficiente para gatillar la fusión del virus de la Influenza con las células infectadas [191], como así también fue propuesto que alrededor de 6 moléculas CCR5 son suficientes para formar el poro de entrada de HIV-I tropismo M [202] y que sólo 3 moléculas de CD4 son eficientes para activar los trímeros Env de HIV-I. Además, Zavorotinskaya et al. [192] demuestran que la incorporación en viriones MLVs de precursores Env no procesados como moléculas predominantes (deficientes en el clivado proteolítico SU-TM, por ende no pueden gatillar la fusión entre las membranas) junto con una minoría de Env procesados, conservan parte de su poder infeccioso, indicando que una pocas TM maduras

son suficientes para permitir la fusión entre el virus y la célula. Dado a que las interacciones funcionales entre los heterodímeros SU-TM pueden ocurrir entre trímeros Env [74, 193], no se puede descartar una cooperación entre los Env no procesados y los Env procesados. El trabajo de McKeating et al. [189] utilizando análisis de cromatografía de exclusión para separar la gp120 de los viriones muestra, como nuestros resultados, que una gran pérdida de infecciosidad puede deberse a una relativamente pequeña pérdida de moléculas gp120 Env expresadas en la superficie viral.

Desafortunadamente, la sensibilidad del sistema utilizado no nos permitió lograr condiciones de inhibición total de la infección, por ende, de identificar de manera precisa el número mínimo de moléculas Env necesarias para la infección. Además, cabe recordar que en el caso de los vectores derivados de HIV-I se han utilizado para los análisis de infección, fibroblastos transfectados de manera estable con CD4 y CCR5, que no son las células naturalmente infectadas por HIV-I. Sería interesante, entonces, llevar a cabo el mismo tipo de experiencias con células primarias infectables naturalmente por HIV-I (linfocitos T, macrófagos, etc.). Además de analizar que sucede con el la gp120 de tropismo T, que utiliza comúnmente el coreceptor CXCR4 y que aparece tardíamente en el curso de la infección.

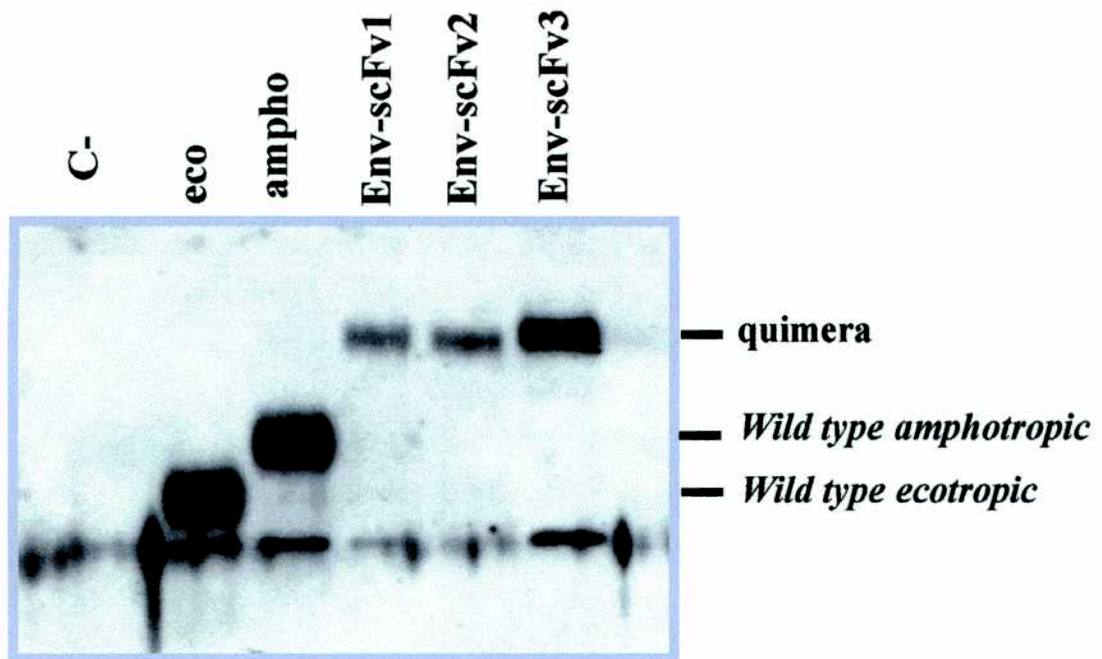
Nuestros resultados demuestran que la eficiencia de infección es dependiente de la densidad de Env hasta un cierto umbral, donde una mayor incorporación de Env no mejora los títulos virales independientemente del tipo celular utilizado. Además, sugieren la posibilidad de una cooperación entre las moléculas Envs cuando se encuentran incorporadas a bajas densidades en las partículas virales. Sin embargo, para probar definitivamente la cooperatividad se debería poner a punto técnicas comparables a la citometría de flujo que permitan determinar las pocas Envs incorporadas a nivel de cada partícula viral, para excluir formalmente que una fracción de estas últimas exprese significativamente altas cantidades de Env pudiendo perturbar las conclusiones. Los mecanismos de cooperatividad pueden ser explicados de varias maneras no excluyentes. Una primera posibilidad sería la existencia de interacciones funcionales entre los trímeros Env para reclutar varios receptores o para formar más eficientemente los poros de fusión luego de la unión del virus a uno o más receptores. Otro posible mecanismo sería que los monómeros Env (un monómero es una asociación TM-SU) se disocien y asocien en la superficie viral: un incremento de Env favorecería la reasociación de los monómeros, y en consecuencia una cooperación funcional entre trímeros.

La idea de que los viriones puedan incorporar aparentes excesos de Env es interesante. En nuestra experiencia con HIV-I nuestros resultados sugieren que un exceso de Env gp120 de tropismo M en la superficie viral permitiría una mejor inducción de la activación del LTR de HIV-I en las células infectadas, seguramente por una vía de señalización celular próximamente a ser estudiada en el laboratorio. En efecto, varios trabajos aportan suficientes datos sobre la implicancia de gp120 en la activación de diferentes vías de señalización [203]. Intimamente asociado con nuestro trabajo, Popik W et al [204] demuestra la activación de ERK kinasas utilizando el mismo serotipo de Env que en este trabajo, la gp120 AD8. Esta activación podría ser de suma importancia en los primeros estadios de la infección natural de HIV-I permitiendo la expresión de sus proteínas, por ende, una eficaz replicación. Por otra parte, el frecuentemente observado *shedding* que provoca una acumulación extracelular de gp120 soluble, mientras que en *in vivo* se lo asocia a la activación de la apoptosis, de la secreción de citocinas, de la modificación del funcionamiento de neuronas o macrófagos, etc. [205-207] en nuestras experiencias parecería competir por la unión a CD4 (y CCR5) con las partículas lentivirales a la célula. Este fenómeno ha sido observado en otros trabajos [187, 189]. Por otra parte, en ciertas situaciones, quizás la incorporación de grandes cantidades se realice para compensar justamente los efectos del *shedding* de Env [194]. Sin excluir esta posibilidad, nuestras experiencias con los MLVs son consistentes con la idea de que aumentando la densidad de Env se acelera el proceso de infección. Los retrovirus se adsorben rápidamente a las células independientemente de la presencia de moléculas Env y luego realizan un *scanning* de la membrana celular en busca de sus receptores específicos [179]. Es posible que el atraso en la unión de los viriones con reducida cantidad de Env en su superficie se deba simplemente a la reducción de la frecuencia de la unión viral a su receptor durante la etapa de *scanning*. Alternativamente, altas densidades de Env debería resultar en una rápida frecuencia de encuentro con los receptores, en consecuencia, una entrada más rápida a la célula.

Cabe destacar que todos estos experimentos fueron llevados a cabo *in vitro* con vectores defectivos para la replicación, no puede entonces descartarse que altas concentraciones de Env sean necesarias para una eficiente replicación *in vivo*. Los resultados obtenidos con la gp120 de HIV-I y la activación del LTR están en acuerdo con esta hipótesis. Por lo que respecta a la continuación de estas experiencias el laboratorio ha comenzado a estudiar el comportamiento de otros tipos de moléculas Env de diferentes retrovirus y/o de

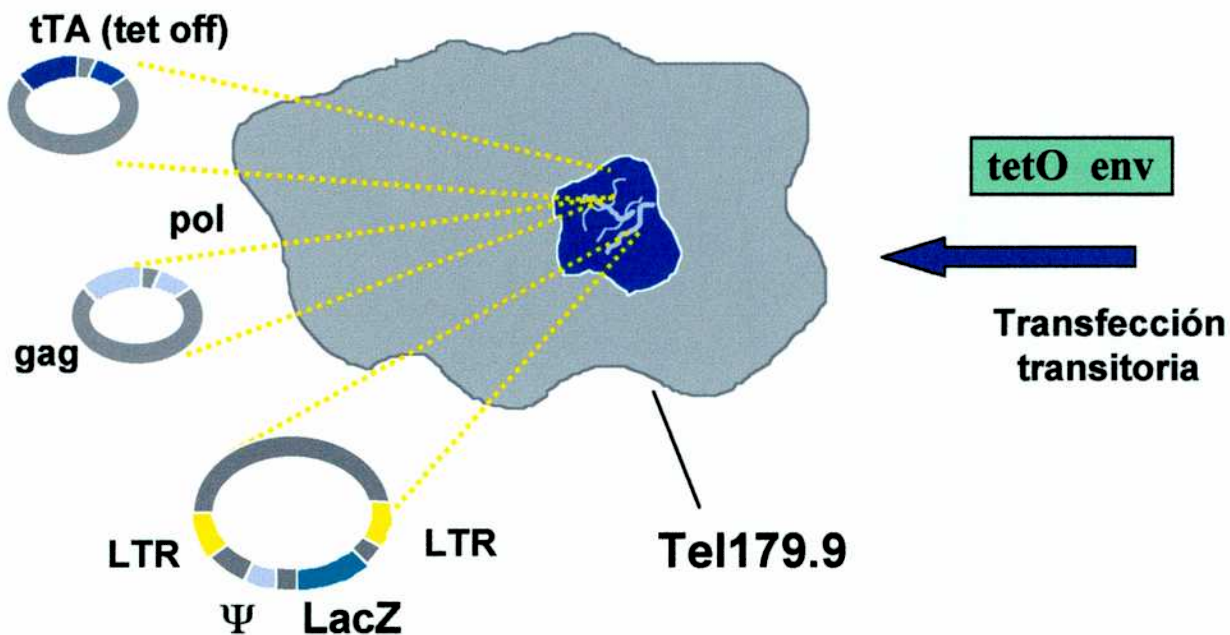
virus, como así también en profundizar los aspectos cauntitativos de este análisis (cuántas moléculas Env de distintos retrovirus son realmente necesarias para infectar una célula).

Los vectores retrovirales derivados de MLVs y los lentivirales derivados de HIV-I son muy utilizados en transferencia de genes en el laboratorio y en protocolos clínicos, a pesar de esto, esta tecnología presenta numerosas limitaciones. Mas específicamente, el desarrollo de técnicas de *targeting* celular basadas en la modificación genética de Env ha encontrado serias dificultades. Es posible redirigir la infección pero los rendimientos son muy bajos [143-145]. Estos bajos rendimientos son debido en parte a la pobre capacidad de fusión de los Env modificados [195, 196]. Además, es común de pensar que la reducida incorporación de los Env modificados en los viriones es también una causa fundamental. Este trabajo muestra que no debería necesariamente ser el caso, especialmente cuando se realizan largas incubaciones (horas) de los virus con las células, ya que la densidad de Env, al menos hasta un cierto umbral, actua principalmente en la cinética de infección y tiene poco, o casi nada, de efecto en el rendimiento final de la infección.

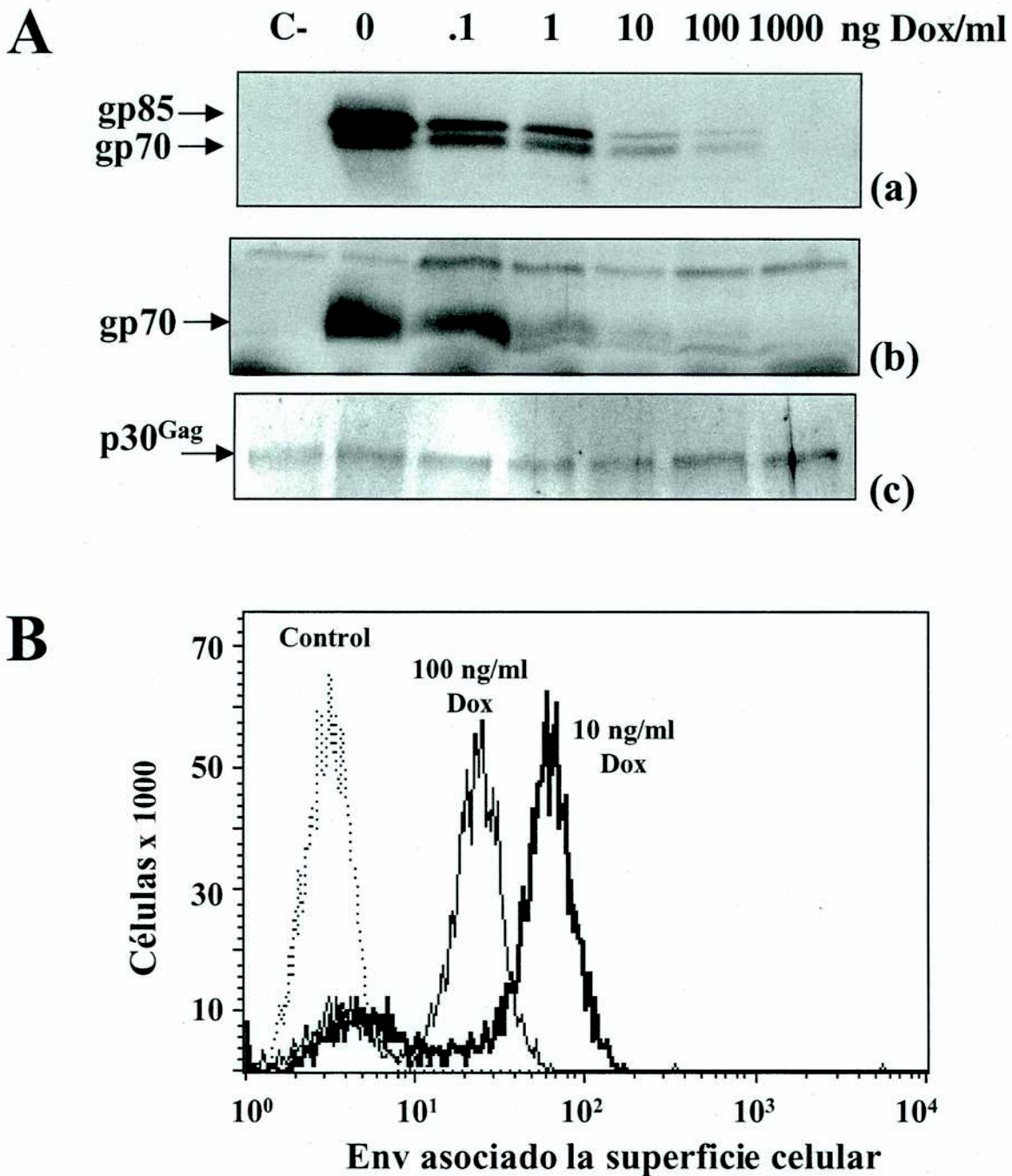


**Figura 1: Incorporación de moléculas Env quimeras en las partículas retrovirales (*immunoblots anti Env de MLVs*)**

1 y 2: Env-anti-MHC class I scFv quimera ; 3: Env anti-lysozyme scFv quimera ; C-: control negativo



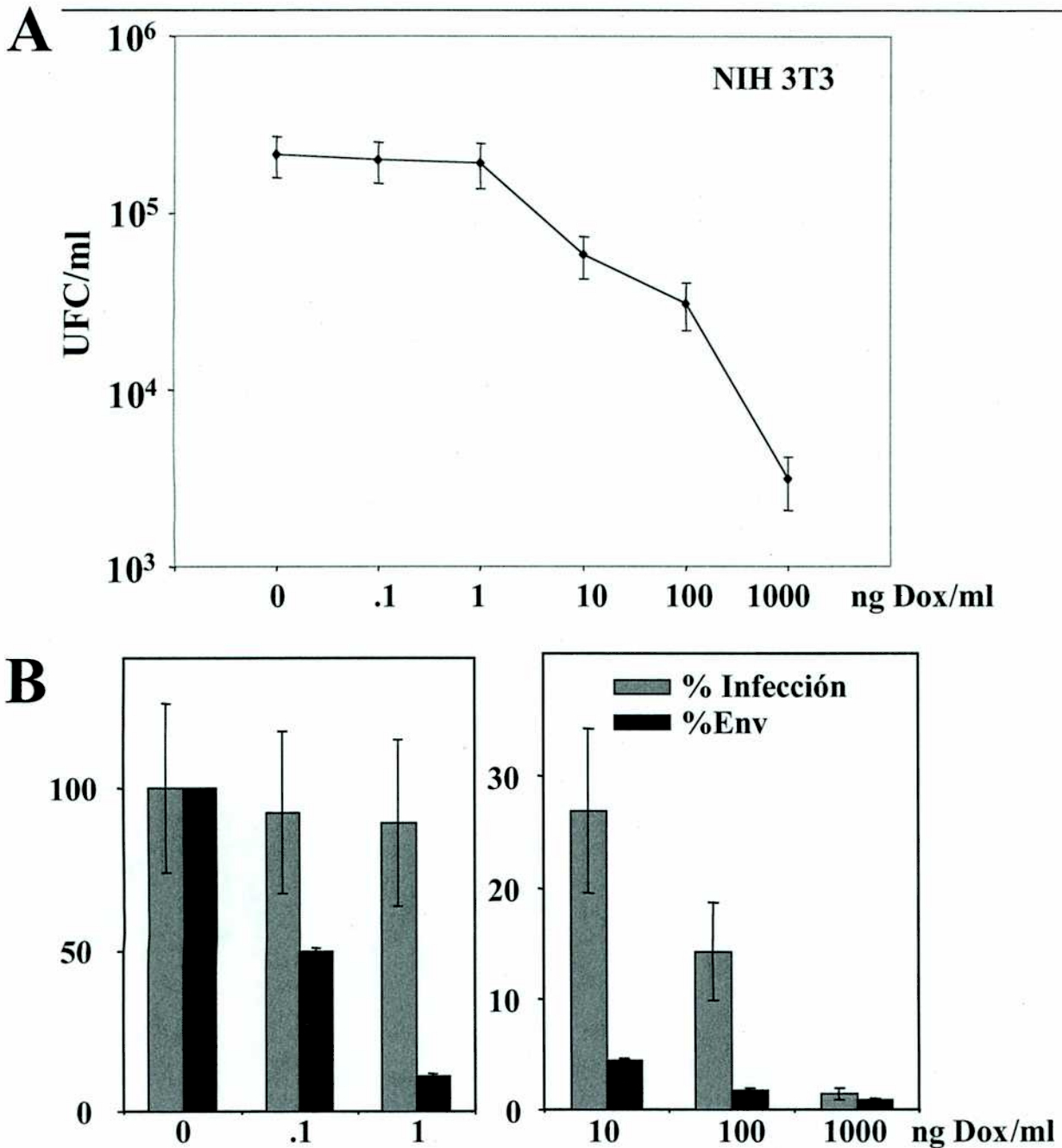
**Figura 2: Producción de vectores *amphotropic* expresando diferentes cantidades de Env mediante transfecciones transitorias de un vector regulable por la doxiciclina**



**Figura 3: Capacidad de infección de viriones que expresan diferentes cantidades de Env MLV *amphotropic* en transfecciones transitorias**

A: Cantidad de Env determinada en *immunoblots*. (a) extractos celulares; (b) partículas virales; (c) partículas virales anti-gag p30 utilizado para normalización. Solo se presentan *immunoblots* expuestos a cortos períodos de tiempo. Exposición a períodos más largos de tiempo permiten visualizar Env a altas concentraciones de Dox.

B: Análisis de citometría de flujo para determinar la expresión de Env en la superficie celular. Experiencias llevadas a cabo con el anticuerpo monoclonal anti-Env 83A25.

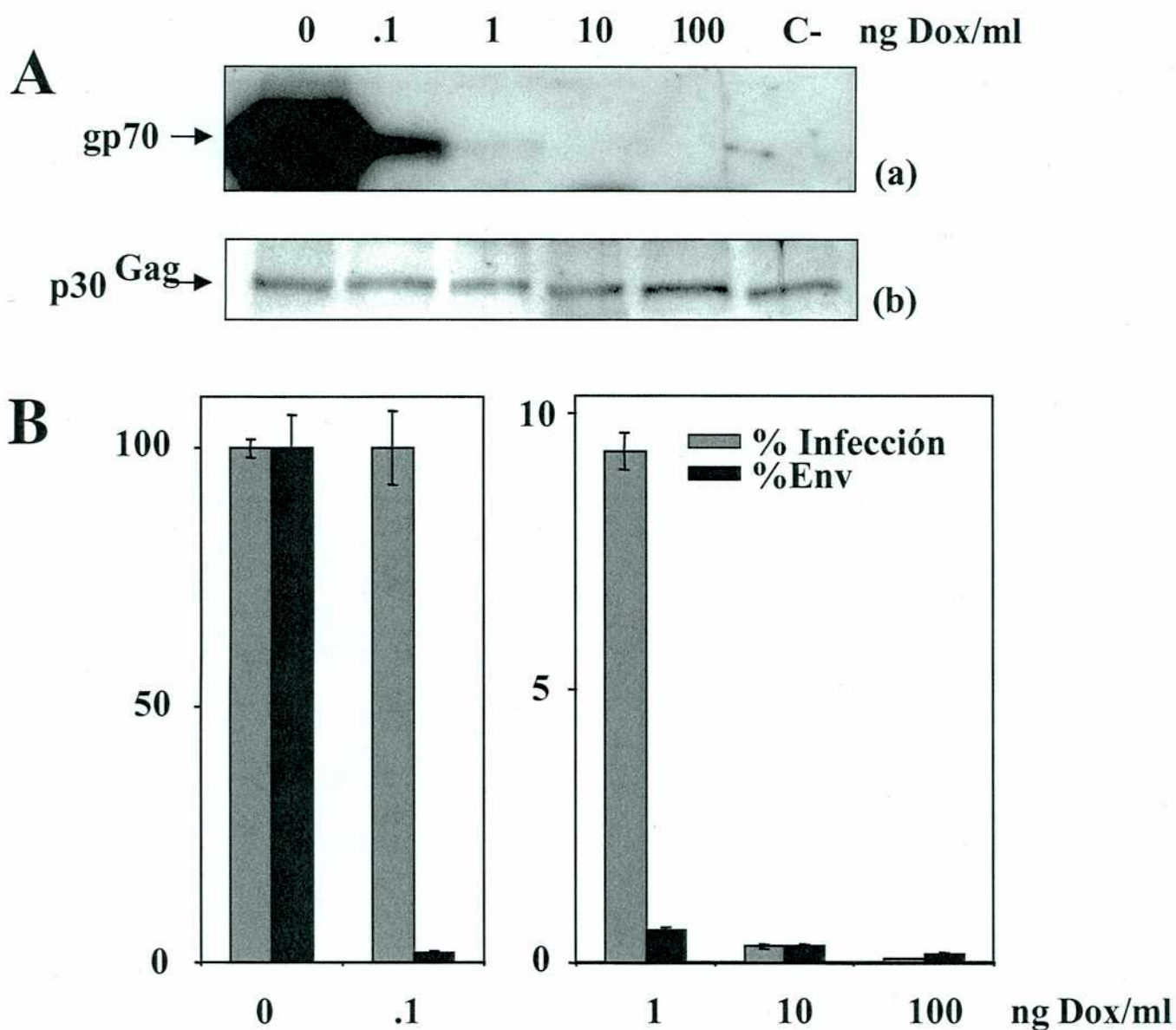


**Figura 4 : Capacidad de infección de viriones que expresan diferentes cantidades de Env MLV *amphotropic* en transfecciones transitorias**

A: Títulos virales determinados sobre las células NIH3T3. Estas últimas son infectadas con diluciones seriadas de partículas retrovirales MLV. La infección se lleva a cabo *overnight* y luego el medio es remplazado. 48 horas más tarde se realiza una coloración X-gal y se cuentan las unidades formadoras de colonias (ufc/ml), utilizando un microscopio de contraste de fase.

B: Abundancia relativa de Env versus títulos virales. La abundancia de Env y el título viral en ausencia de Dox fue considerado como 100%. La desviación standard es representada por las barras de errores.

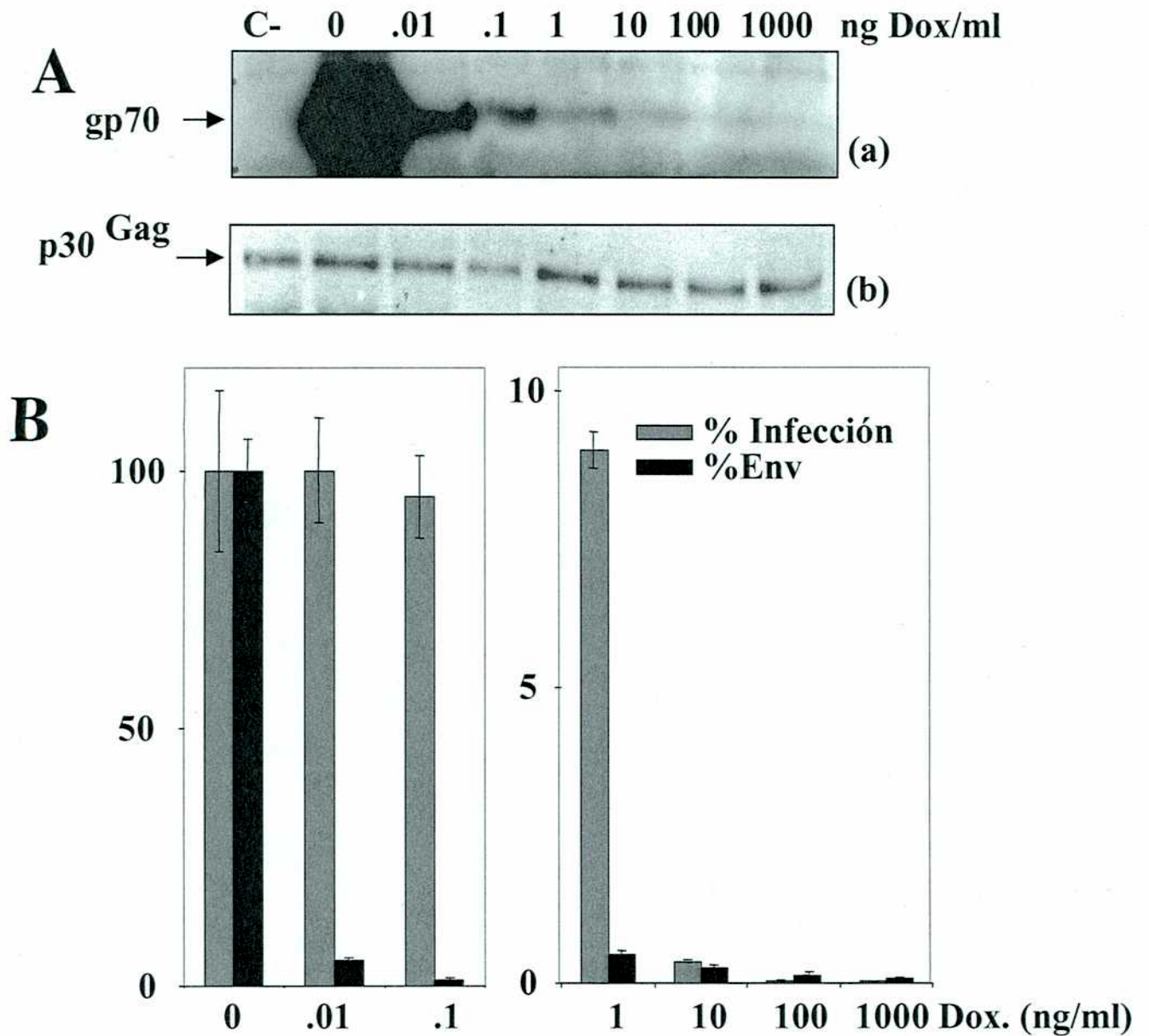




**Figura 5 : Capacidad de infección de viriones que expresan diferentes cantidades de Env MLV *ecotropic* en transfecciones estables**

A: Cantidad de Env determinada en *immunoblots*. (a) partículas virales; (b) partículas virales anti-gag p30 utilizado para normalización. Solo se presentan *immunoblots* expuestos a cortos períodos de tiempo. Exposición a períodos más largos de tiempo permiten visualizar Env a altas concentraciones de Dox.

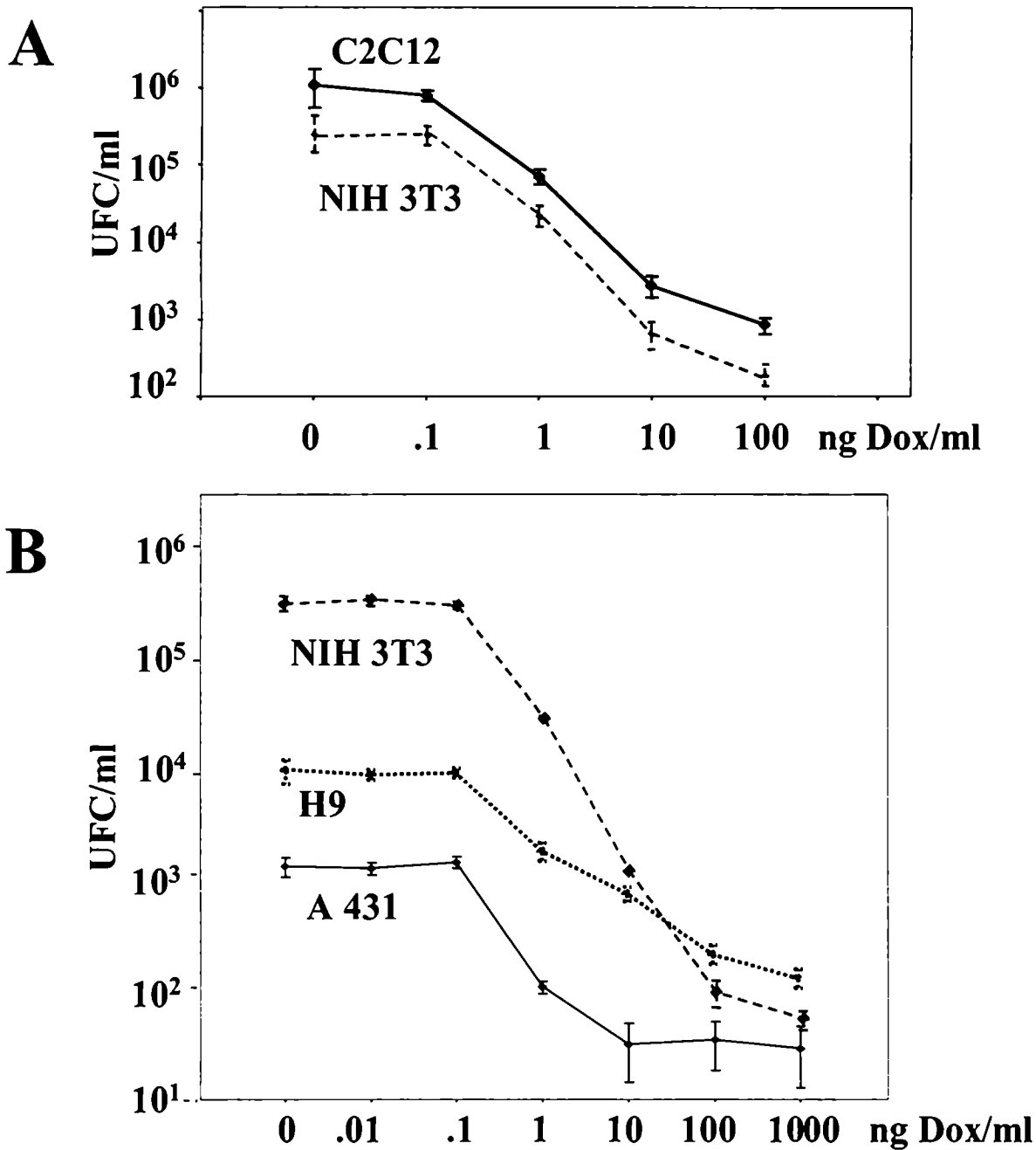
B: Abundancia relativa de Env versus títulos virales. La abundancia de Env y el título viral en ausencia de Dox fue considerado como 100%. La desviación standard es representada por las barras de errores.



**Figura 6 : Capacidad de infección de viriones que expresan diferentes cantidades de Env MLV *amphotropic* en transfecciones estables**

A: Cantidad de Env determinada en *immunoblots*. (a) partículas virales; (b) partículas virales anti-gag p30 utilizado para normalización. Sólo se presentan *immunoblots* expuestos a cortos períodos de tiempo. Exposición a períodos más largos de tiempo permiten visualizar Env a altas concentraciones de Dox.

B: Abundancia relativa de Env versus títulos virales. La abundancia de Env y el título viral en ausencia de Dox fue considerado como 100%. La desviación standard es representada por las barras de errores.

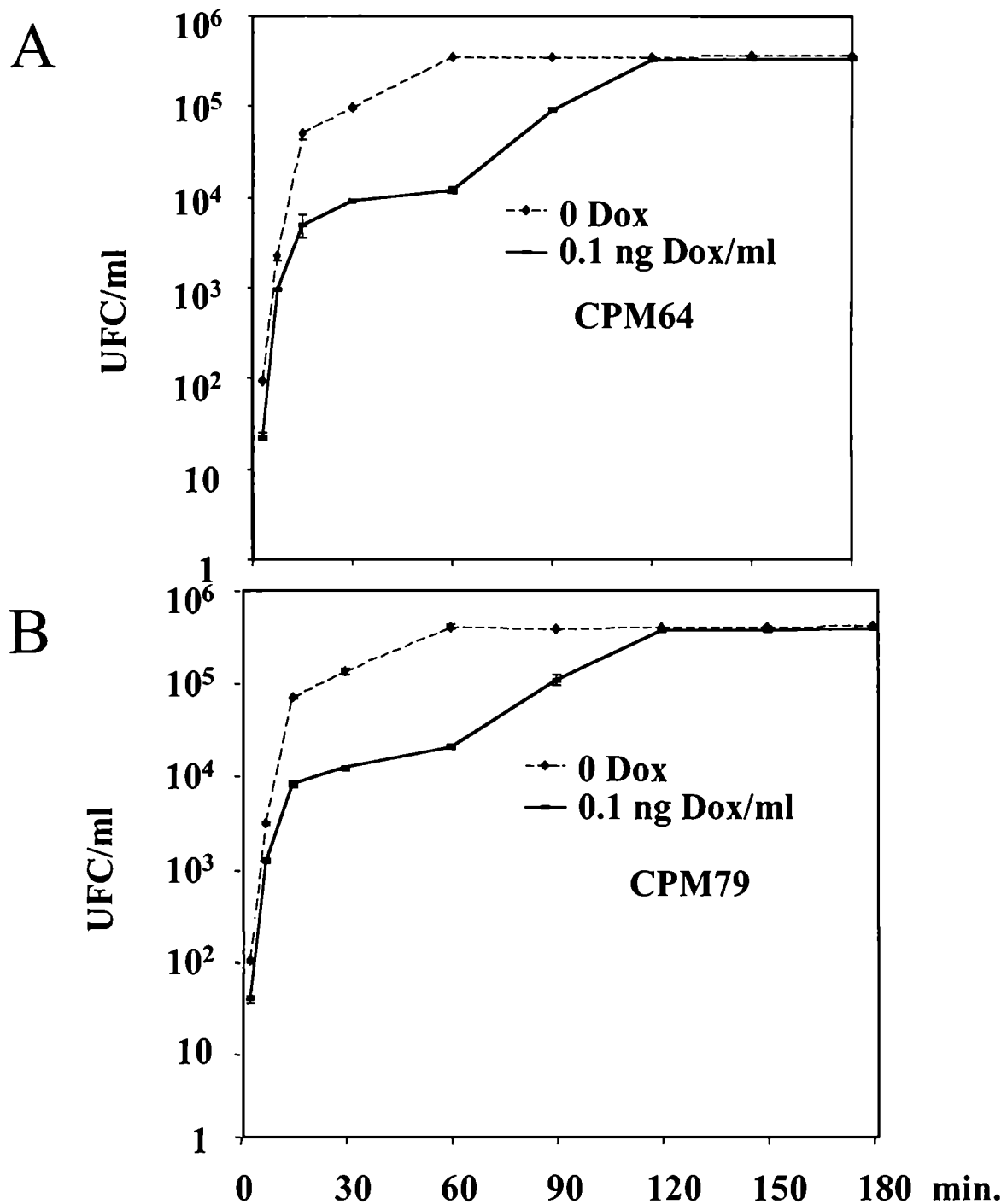


**Figura 7 : Capacidad de infección de viriones que expresan diferentes cantidades de Env MLV *amphotropic* y *ecotropic* en varios tipos celulares**

A: Títulos virales de partículas *ecotropic* determinados sobre células NIH3T3 y C2C12

B: Títulos virales de partículas *amphotropic* determinados sobre células NIH3T3, H9 y A431

Las células son infectadas con diluciones seriadas de partículas retrovirales MLV. La infección se lleva a cabo *overnight* y luego el medio es remplazado. 48 horas más tarde se realiza una coloración X-gal y se cuentan las unidades formadoras de colonias (ufc/ml), utilizando un microscopio de contraste de fase.



**Figura 8 : Cinética de la infección utilizando retrovirus que expresan diferentes cantidades de Env MLV *amphotropic* y *ecotropic***

A: células CPM64 (*ecotropic*) fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de Dox. Los títulos virales se determinaron infectando por duplicado células NIH3T3 durante diferentes períodos de tiempo

B: células CPM79 (*amphotropic*) fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de Dox. Los títulos virales se determinaron infectando por duplicado células NIH3T3 durante diferentes períodos de tiempo

C- Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de infección

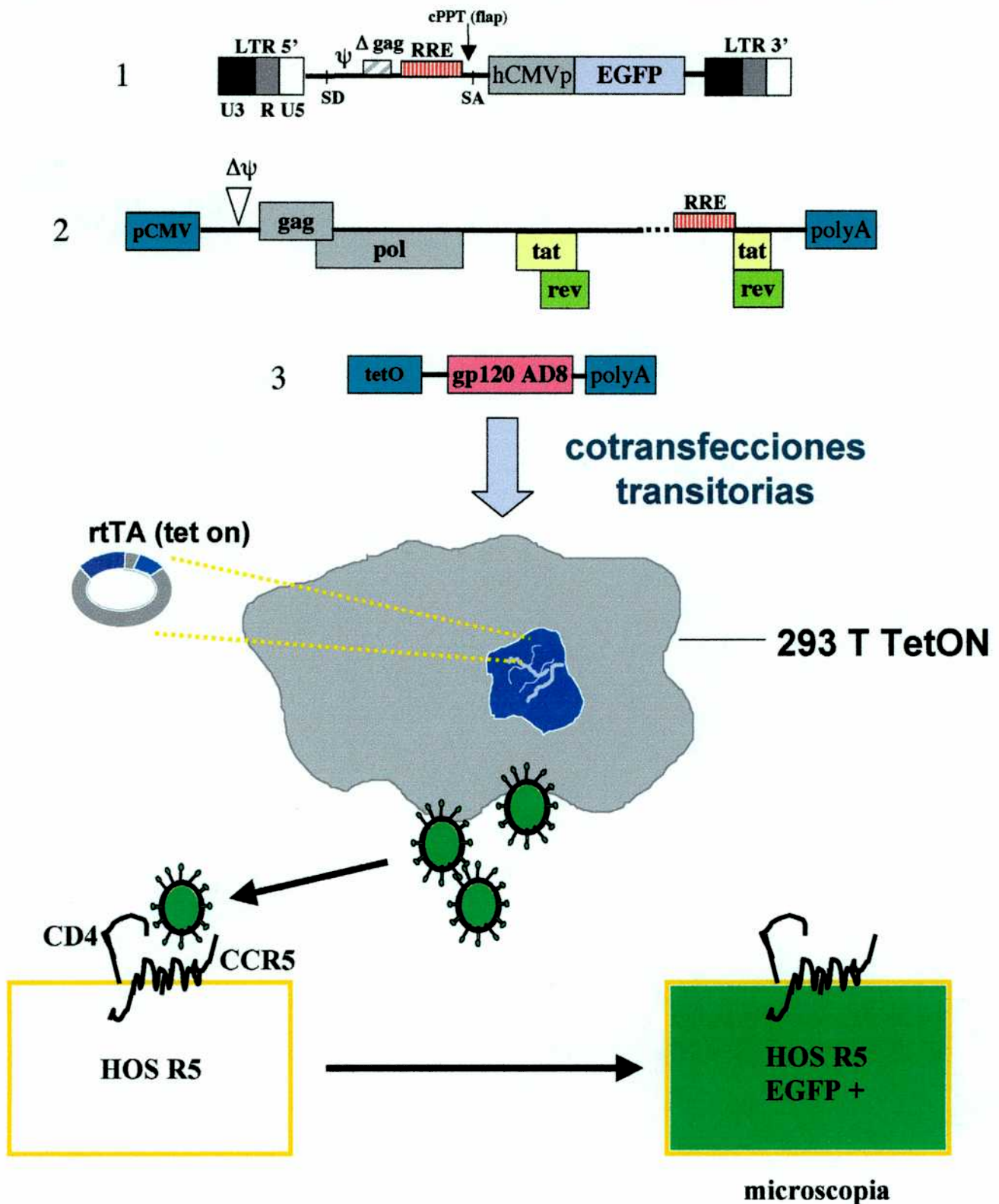
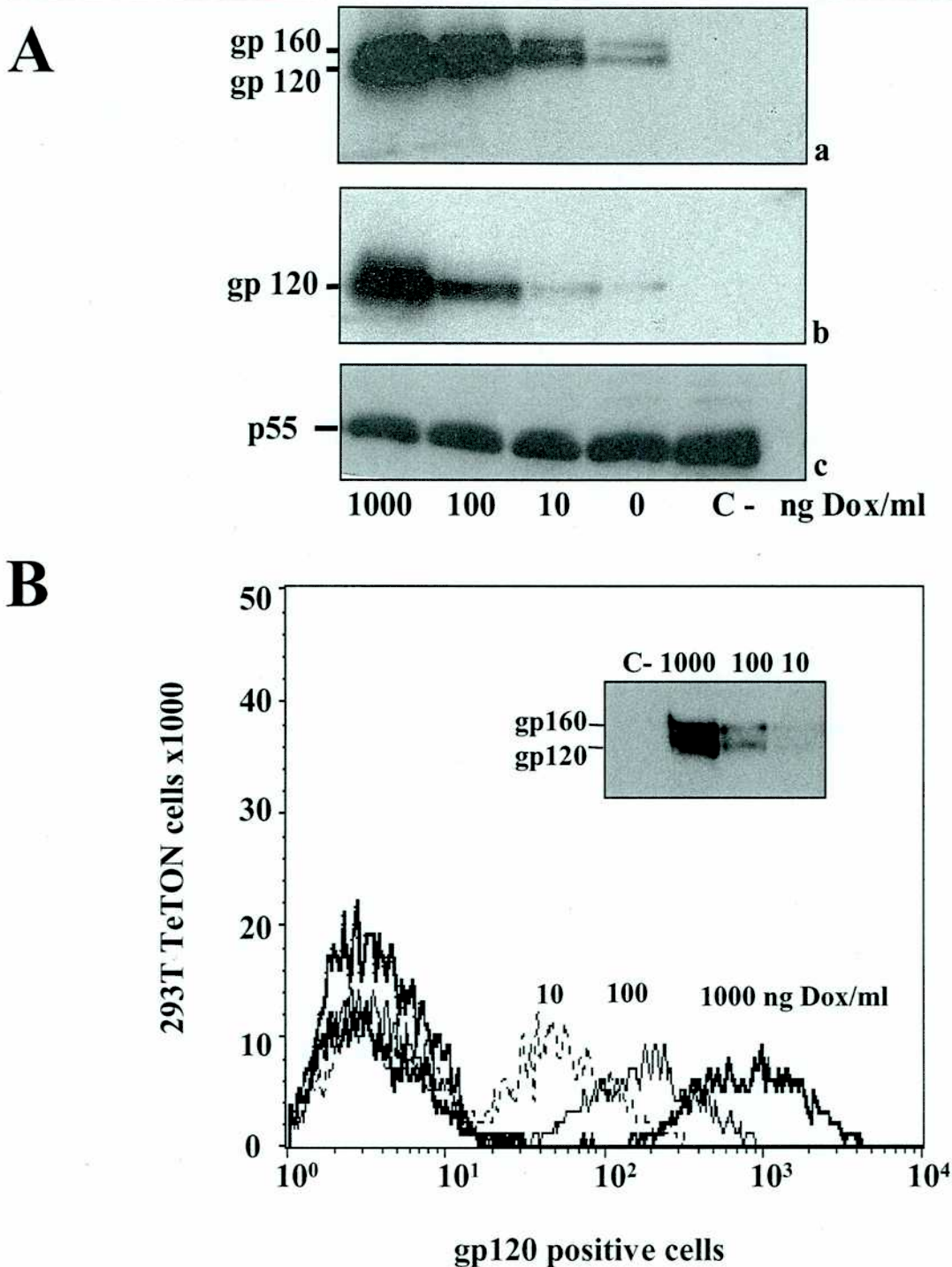


Figura 9: Producción de vectores lentivirales «EGFP» expresando diferentes cantidades de Env gp120 mediante cotransfecciones transitorias

C- Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de infección

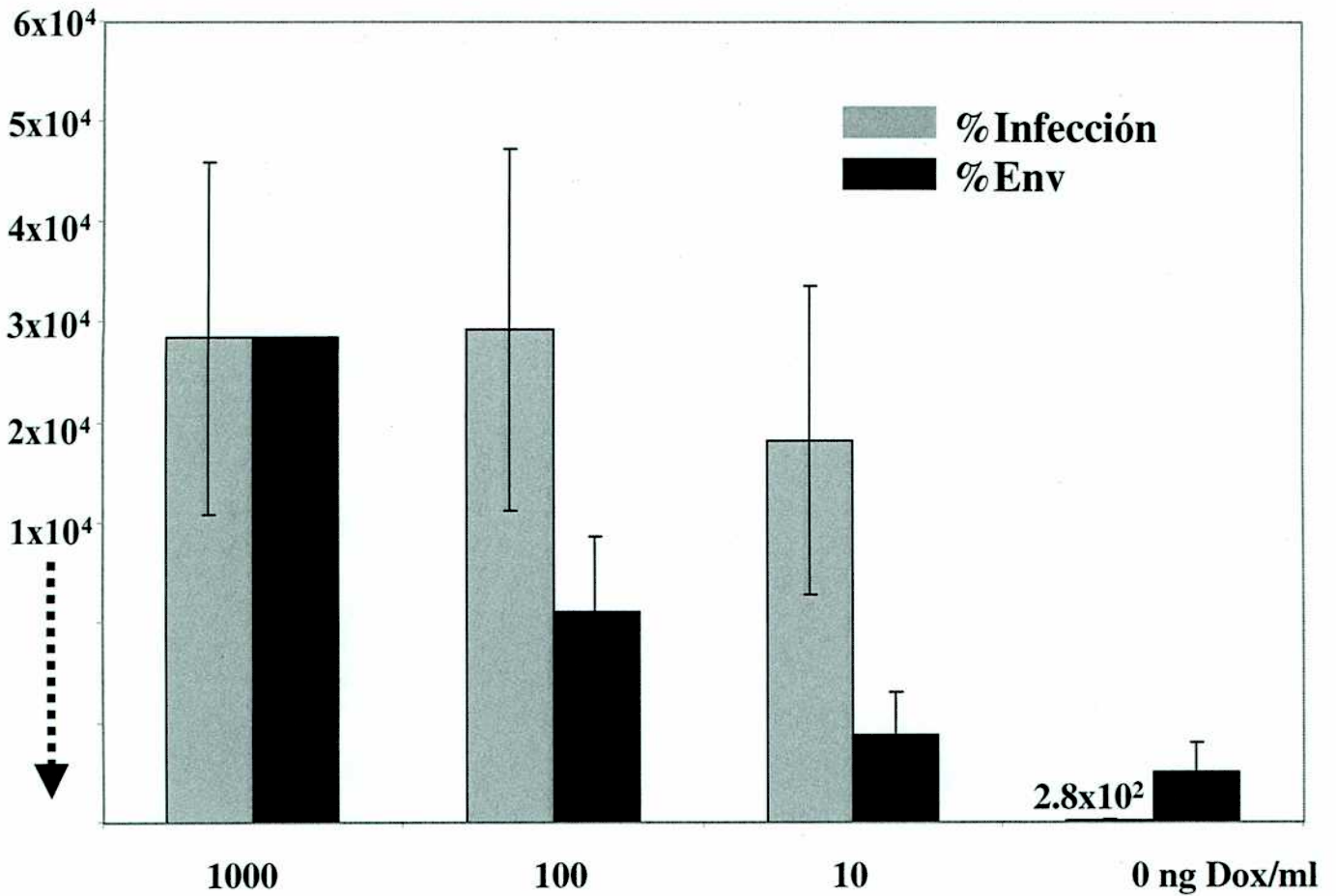


**Figura 10 :Capacidad de infección de vectores lentivirales derivados de HIV-I que expresan diferentes cantidades de glicoproteína Env AD8 gp120 en su superficie**

A: Cantidad de Env determinada en *immunoblots*. (a) extractos celulares; (b) partículas virales; (c) partículas virales anti-gag p24 utilizado para normalización. Sólo se presentan *immunoblots* expuestos a cortos períodos de tiempo.

B: Análisis de citometría de flujo para determinar la expresión de Env en la superficie celular. Experiencias llevadas a cabo con el anticuerpo monoclonal anti-Env 2G12.

C- Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de infección



**Figura 11 : Capacidad de infección de viriones lentivirales que expresan diferentes cantidades de Env AD8 gp120 en cotransfecciones transitorias**

Abundancia relativa de Env versus títulos virales. La abundancia de Env y el título viral en presencia de 1000 ng Dox/ml fue considerada como 100%. La desviación standard es representada por las barras de errores.

C- Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de infección

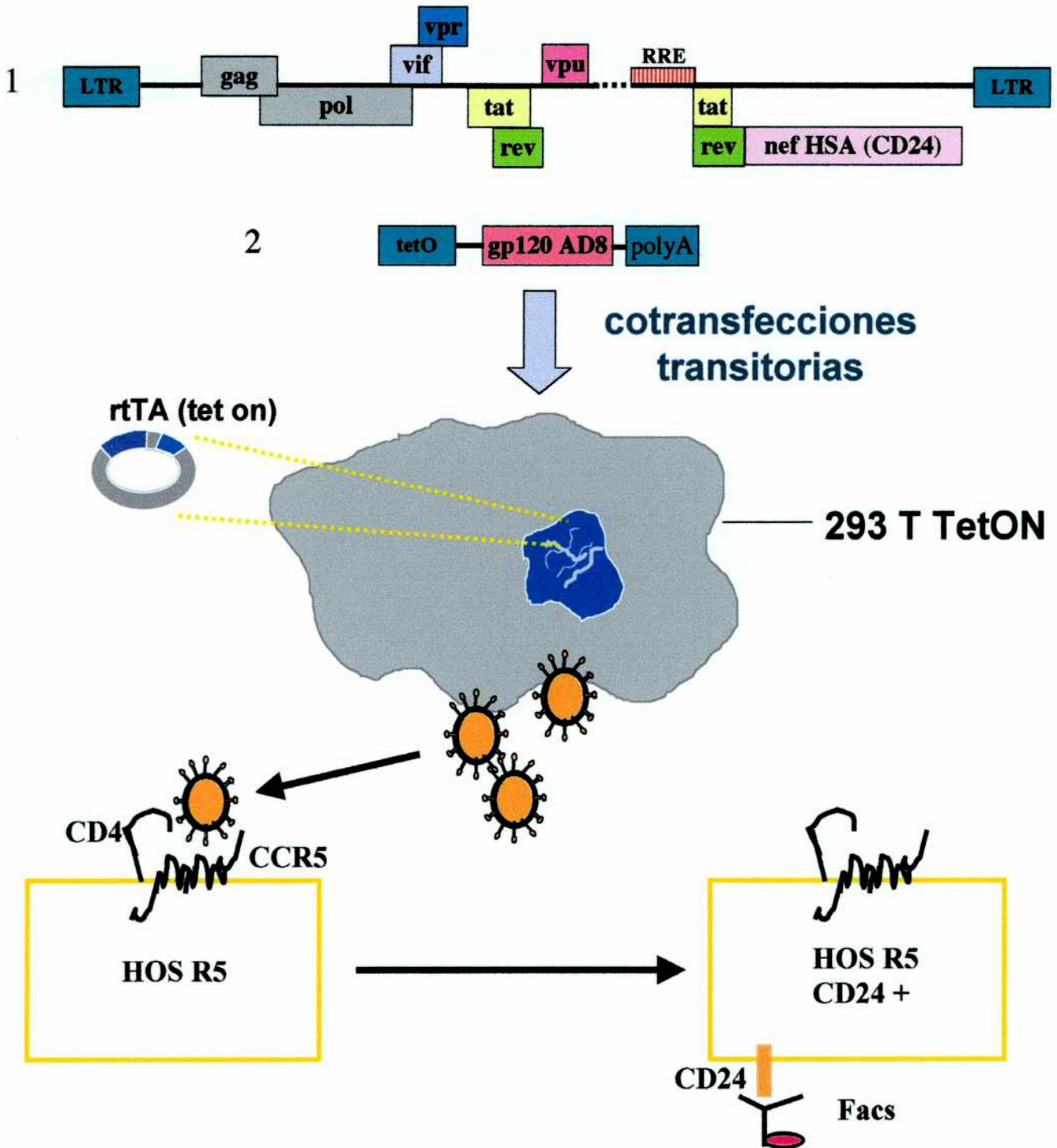
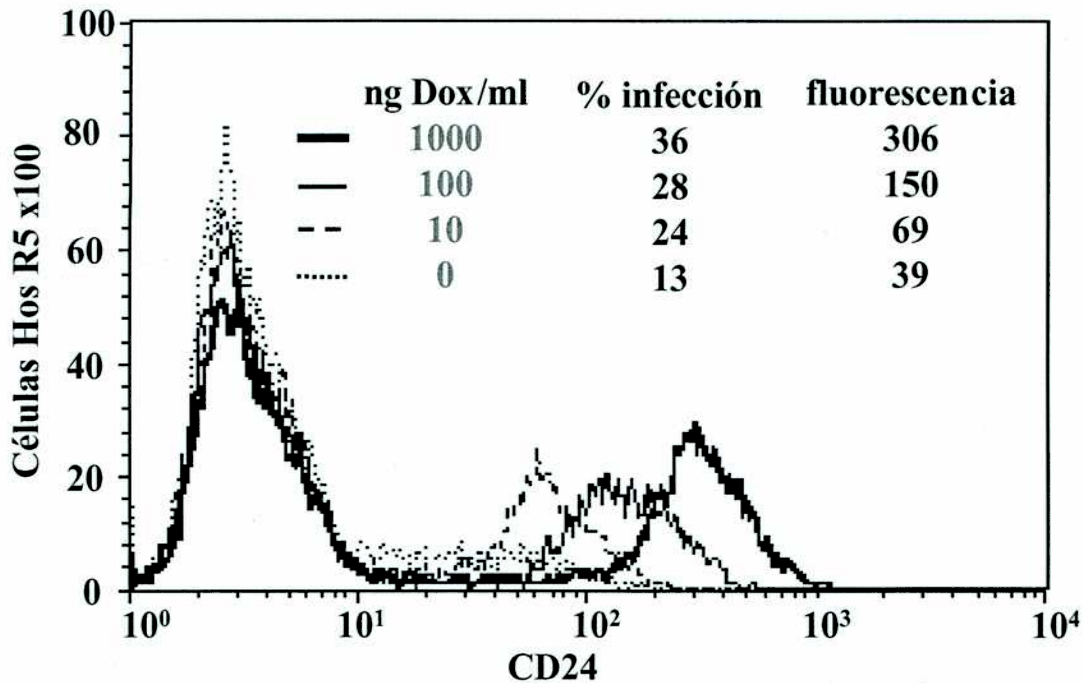


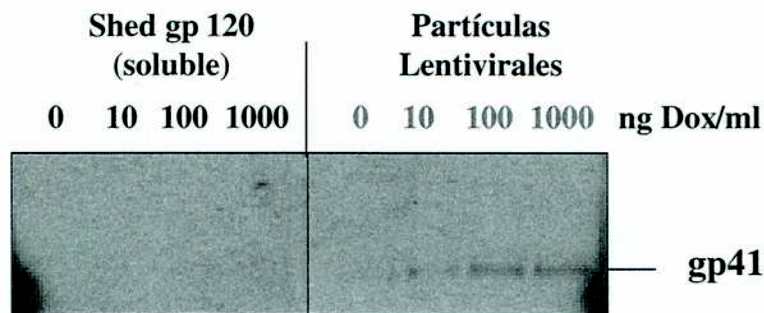
Figura 12: Producción de vectores lentivirales «LTR-CD24» expresando diferentes cantidades de Env gp120 mediante cotransfecciones transitorias



A



B

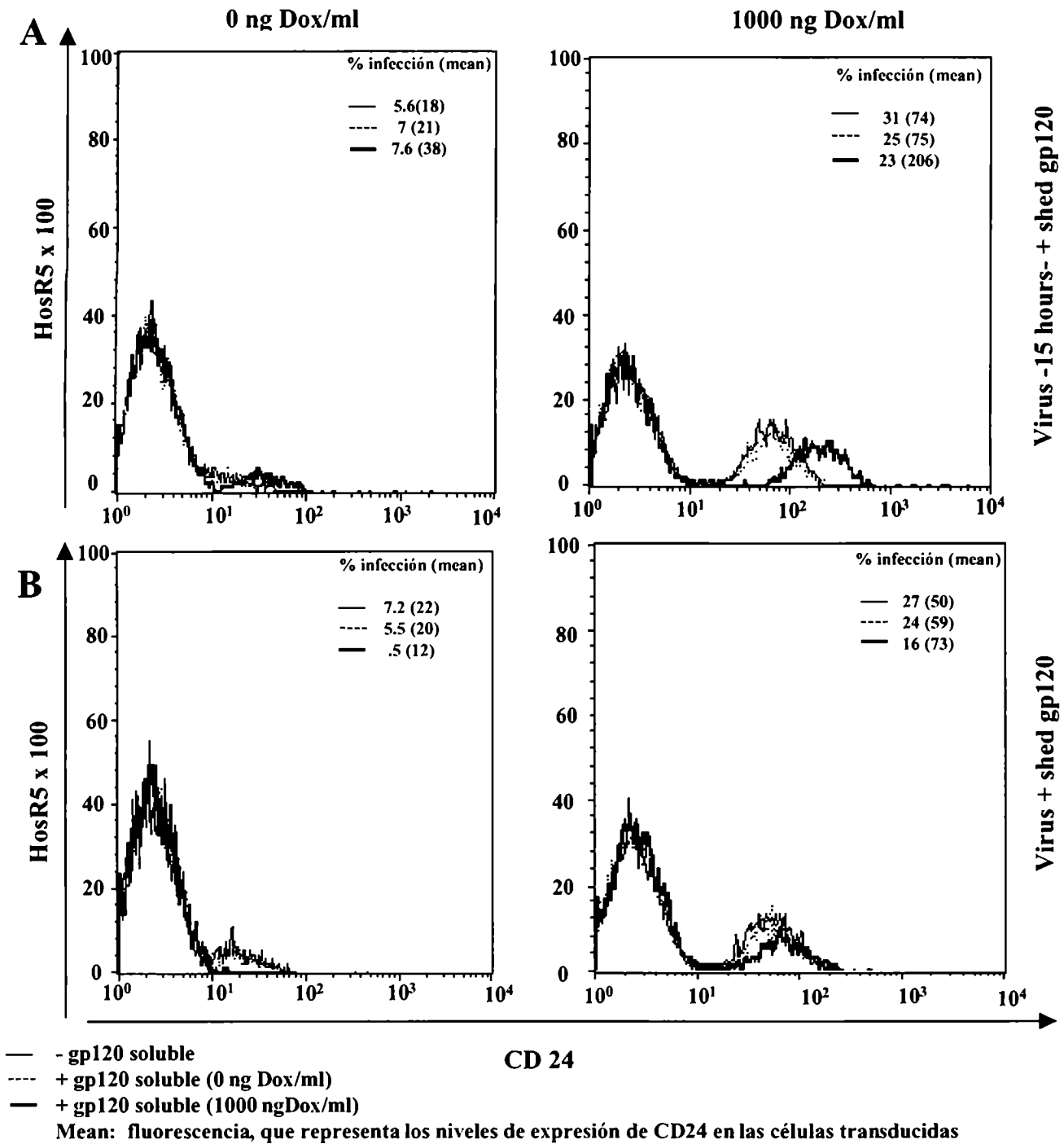


**Figura 13: Activación diferencial del LTR de HIV-I entre partículas lentivirales derivadas de HIV-I que expresan diferentes cantidades de glicoproteína Env AD8 gp120 en su superficie**

A: citometría de flujo para detectar la transducción de CD24 en HOS R5. Estas últimas son infectadas con partículas lentivirales HIV-I desprovistas de gp120 soluble. La infección se lleva a cabo *overnight* y luego el medio es remplazado. 24 horas más tarde las células HOS R5 transducidas con los vectores lentivirales HSA son identificadas utilizando un anticuerpo anti-CD24 de ratón conjugado al fluorocromo *phycoerytrine* (PE).

B: *immunoblots* anti-gp41 para demostrar que las columnas  $1 \times 10^6$  MWCO separan los viriones de la gp120 soluble proveniente del *shedding*. El sobrenadante filtrado conteniendo las partículas lentivirales y la gp120 soluble es centrifugado directamente en las columnas. Los viriones son recuperados en el filtro (200  $\mu$ l) y la gp120 soluble en el sobrenadante. La gp41 (TM del Env de HIV-I) solo se encuentra asociada a los viriones.

C- Cantidad de glicoproteína Env y capacidad de infección



**Figura 14: Activación diferencial del LTR de HIV-I por la Env AD8 gp120 soluble**

A: Análisis de citometría de flujo para detectar la transducción de CD24 en HOS R5. 15 horas luego de la infección se agregan diferentes cantidades de gp 120.

B: Análisis de citometría de flujo para detectar la transducción de CD24 en HOS R5.

En el momento de la infección, junto con las partículas lentivirales, se agregan diferentes cantidades de gp 120.

**D**

# **RESULTADOS**

***TARGETING CELULAR IN VIVO***

## D – RESULTADOS

### *Targeting celular in vivo*

#### INTRODUCCION

Como ya se ha comentado en la introducción general, substituir el trasplante de células autólogas luego de ser genéticamente modificadas *ex vivo*, como se realiza en muchos protocolos de terapia génica, por una transferencia de genes directa en los pacientes es uno de los desafíos mayores de esta disciplina. Esta estrategia, sin embargo, presenta todavía varios obstáculos importantes a resolver : uno de ellos es el desarrollo de técnicas eficaces de *targeting* celular utilizando vectores retrovirales. Uno de mis objetivos de tesis fue de desarrollar un sistema de *targeting* celular *in vivo* en el ratón, utilizando en una primera etapa las condiciones más favorables para demostrar la funcionabilidad del sistema. Se trata entonces de una puesta a punto que en un futuro se tratará de mejorar para acercarse mas a la posibilidad de una aplicación concreta en clínica. En los resultados presentados a continuación se verá que hemos decidido trabajar en las siguientes condiciones « favorables » : i) utilizamos como célula *target*, células T o B dado que son relativamente abundantes y que se dividen activamente *in vivo* ; ii) utilizamos además, vectores competentes para la replicación (llamados maxivirus en el laboratorio ya que se trata del genoma *wild type* de un retrovirus más la inserción de un transgén), es decir, que si logramos la infección de una o pocas células *target*, el vector podrá replicarse, proliferar y salir para infectar otras células, aumentando así el título viral *in vivo* ; iii) los vectores expresan : 1- oncogenes potentes, lo cual permite una puesta en evidencia extremadamente sensible del éxito de la infección *target*, como así también, en un contexto más relacionado a la ciencia fundamental, de estudiar la oncogénesis debida a diferentes oncogenes, combinación de oncogenes u oncogenes mutados, a diferentes momentos del desarrollo del animal ; 2- genes *markers* como EGFP que permite un análisis rápido y cuantitativo por citometria de flujo.

La idea de nuestro sistema experimental es la siguiente (Figura 1) : Se construyen ratones transgénicos que expresen de manera tejido específica (en las células T) el receptor natural del Virus de la Leucemia y Sarcoma Aviario de tipo A (ALSV-A) (este virus no infecta células murinas). Este receptor, conocido como tv-a, se expresa naturalmente en ciertas células de aves como en el pollo, pero no en células murinas. Estos ratones serán infectados por vectores retrovirales derivados de MLV, competentes para la replicación, pero « pseudotipados » con la glicoproteína Env de ALSV-A, EnvA, y expresando el oncogén v-Ha-Ras o el gen *marker* EGFP. Solo las células que expresen tv-a en su superficie podrán ser infectadas por estos vectores. Como se detalla a continuación en los resultados, durante mi trabajo de tesis hemos logrado la construcción de estos vectores y validado su poder de replicación y transducción, tanto *in vitro* en diferentes tipos celulares como *in vivo* en el sistema hematopoyético. Además, hemos demostrado el poder transformante *in vitro* y oncogénico *in vivo* de los vectores v-Ha-Ras. Sin embargo, las verdaderas experiencias de *targeting* celular *in vivo* no son presentadas en este manuscrito, ya que los ratones transgénicos que expresan tv-a en las células T están siendo construidos en este momento por el grupo austriaco de Mathias Muller, con quien colaboramos en estas experiencias. Pero como se podrá apreciar, todas las herramientas desarrolladas y la puesta a punto nos permiten pensar seriamente que el *targeting* celular *in vivo* utilizando nuestra estrategia y nuestros vectores retrovirales es posible.

## RESULTADOS

### Diseño y construcción de un vector EGFP competente para la replicación (maxivirus AkvU3-EGFP)

Para lograr nuestros objetivos nos propusimos primero desarrollar y analizar la replicación y la capacidad de transducción de un vector murino competente para la replicación "simple". Es decir, que codifique para una proteína fácilmente detectable y que conserve la glicoproteína Env *ecotropic* natural. Dependiendo de los resultados de estos experimentos la idea sería de adaptar, luego, nuestro vector "simple" a un vector performante para el *targeting* celular, según nuestro sistema experimental, ya explicado. Es decir, expresando un oncogén y *pseudotipado* con la glicoproteína Env de ASLV-A. Para obtener este vector "simple", aprovechamos que el grupo de Finn Skou Pedersen en Dinamarca, con quien colaboramos, había construido un vector competente para la replicación, derivado del retrovirus *ecotropic* Akv MLV, insertando un cassette traduccional IRES-EGFP en la región U3 del LTR, vector AkvBi-EGFP [171]. El *spacer* entre la secuencia IRES y el codón de iniciación del gen EGFP de este vector, consistía en un *polylinker* con varios sitios únicos de restricción. Para mejorar la traducción de la EGFP, este *spacer* fue cambiado, para nuestros estudios, por una secuencia más corta y muy parecida a la secuencia *Leader* endógena del virus EMCV *wild type* [172] (Figura 2), generando de esta manera el vector AkvU3-EGFP. Este último expresa la EGFP hasta 10 veces más que el vector AkvBi-EGFP. Para nuestros estudios *in vivo* con el vector AkvU3-EGFP hemos utilizado como control el vector que codifica para Akv MLV *wild type*. Cabe resaltar que estos vectores que han sufrido la inserción de un cassette en su región U3 son inestables en el tiempo, y luego de varios pasajes celulares *in vitro* el cassette se deletiona, perdiendo de esta manera la expresión del transgén. El grupo danés trabaja en el presente para mejorar la estabilidad de este vector.

### **Transducción de EGFP *in vivo* utilizando AkvU3-EGFP**

Nuestro primer desafío fue de determinar la capacidad de este vector para transducir la EGFP *in vivo*, en ciertas células hematopoyéticas (linfocitos B, linfocitos T), debido a nuestro interés ya comentado en la Introducción de este capítulo. Para esto, ratones NIH swiss recién nacidos de 3 o 4 días de edad fueron infectados intraperitonealmente (IP) con  $10^4$  UFC de AkvU3-EGFP y las células del bazo fueron analizadas a diferentes momentos luego de la infección (días 1, 4, 7, 12, 30 y 60 postinfección). En paralelo, células de bazo de ratones infectados con Akv MLV fueron analizadas e utilizadas como control negativo de la expresión de EGFP. 4 camadas fueron utilizadas por experimento, 2 fueron infectadas con AkvU3-EGFP, 1 con Akv MLV y otra no infectada. Realizamos tres experimentos separados obteniendo resultados similares. Por una cuestión de simplicidad se presentan aquí los resultados de un solo experimento.

Luego de purificar las células mononucleares del bazo, la expresión de la EGFP fue detectada por análisis de citometria de flujo de células no adherentes (linfocitos) (Figura 3, columna izquierda). Mientras que no se detectan células EGFP positivas un día después de la infección, más del 50% de las células son EGFP positivas 4 días postinfección y alrededor de 50% 7 días postinfección. Luego del día 7 el porcentaje de células EGFP positivas cae abruptamente hasta niveles no detectables.

Para determinar que tipo celular fue infectado, utilizamos anticuerpos conjugados al fluorocromo PE dirigidos contra diferentes marcadores de superficie específicos de las distintas líneas de linfocitos: anti-CD3 (Linfocitos T), anti-CD19 (Linfocitos B) y anti-PanNK (NK) (Figura 3, columna del medio). Como en ningún caso la suma de los porcentajes de las células B, T y NK EGFP positivas da 100%, podemos concluir que otro tipos celulares no reconocidos por los anticuerpos utilizados, fueron también infectados por AkvU3-EGFP. El fenotipo de estas células no fue analizado. Curiosamente, durante los días 4 y 7 postinfección donde las células no adherentes del bazo infectadas son abundantes, no se observan células adherentes EGFP positivas (Figura 3, columna derecha).

Un claro ejemplo de la variación entre los distintos animales de la transducción de la EGFP se observa en el ratón de la camada 1, analizado el día 30 postinfección. Al día 12

postinfección, la expresión de la EGFP había decrecido a alrededor de 1% de las células no adherentes del bazo en las dos camadas estudiadas. Sin embargo, al día 30, el ratón de la camada 1 presenta 12% de sus células no adherentes del bazo como EGFP positivas, y además es el único animal que presenta células adherentes del bazo EGFP positivas (18%).

### **Infección de células T, B y NK del bazo utilizando AkvU3-EGFP**

Los análisis de citometría nos permitió, a continuación, la cuantificación del total de las poblaciones B, T y NK, como así también de cada subpoblación EGFP positiva. Los histogramas en la Figura 4 muestran los porcentajes del total de las poblaciones B, T y NK (primera barra), de la población B, (segunda barra) de la población T, (tercera barra) y de la población NK (cuarta barra) en animales no infectados, infectados con Akv MLV o infectados con AkvU3-EGFP. Los análisis 1 día después de la infección no revelan ninguna diferencia entre las poblaciones B, T y NK de los ratones infectados o no infectados. Sin embargo, las poblaciones de B+T+NK de los ratones infectados con Akv MLV y AkvU3-EGFP decrece el día 4 (40-45%) y el día 7 (30-35%) comparado con las poblaciones de los animales no infectados (60%), siendo las poblaciones T y NK las más afectadas. Más adelante las diferencias entre los animales infectados y no infectados desaparece, quizás con un atraso en la población NK. Estos resultados no nos permiten concluir si estos números reflejan una baja en las células linfoides o un aumento en otro tipo de células atraídas por la infección (macrófagos, células dendríticas, etc.).

En concordancia con la Figura 3, las células EGFP positivas abundan los días 4 y 7 postinfección (barras grises).



### **Viremia en ratones infectados con el maxivirus AkvU3-EGFP**

La viremia (cantidad de virus que se encuentran en la circulación sanguínea) fue determinada por inmunofluorescencia directa de la EGFP o por análisis de inmunofluorescencia indirecta (FIA) (ver Materiales y Métodos). En ambos casos es expresada en UFC/ml en la Tabla 1.

No fue detectada la presencia de virus en sangre 1 día después de la infección, ni en los animales infectados con Akv MLV, ni con AkvU3-EGFP. Partículas virales que incorporaron la secuencia EGFP fueron detectadas en sangre 4 días postinfección y hasta 60 veces más de este tipo de partículas fueron detectadas 7 días postinfección, para luego caer hasta niveles no detectables el día 60 postinfección. Sin embargo, utilizando el análisis de FIA la presencia de virus es detectada hasta el último día del experimento en todos los animales infectados. Para los animales infectados con Akv MLV, se utilizó el análisis de FIA, y se detectaron a partir del día 4, en todos los animales, y hasta el día 60 postinfección, niveles constantes de partículas virales. Estos animales presentan entre 2 y 5 veces más de viremia que los animales infectados con AkvU3-EGFP.

### **Análisis de PCR en células del bazo infectadas con AkvU3-EGFP**

Para detectar la presencia de ADN proviral integrado en las células del bazo se llevaron a cabo análisis de PCR. Para esto se utilizaron un par de *primers* que permiten la amplificación de una banda de 651 pb de la forma *wild type* de los provirus de Akv MLV y una banda de 1983 pb de los AkvU3-EGFP (Figura 5). Los ratones no infectados (C: control) presentan una banda correspondiente a una secuencia retroviral endógena que difiere del Akv MLV en una mutación puntual en la región U3 (data non shown). En las muestras de ADN provenientes de animales infectados con AkvU3-EGFP tres bandas fueron identificadas y clonadas. La banda que migra más rápidamente, encontrada en el primer día luego de la infección corresponde a la secuencia endógena. Una banda que migra un poco menos corresponde a la secuencia Akv MLV y la banda que migra más lentamente a la secuencia Akv MLV conteniendo el cassette IRES-EGFP. En los días 4 y 7 postinfección la banda que

contiene el cassette IRES-EGFP es la predominante, mientras que la banda Akv MLV lo es el día 12 postinfección. Los días 30 y 60 solo se detecta esta última. Utilizando *primers* específicos de EGFP y de env hemos amplificado bandas correspondientes a los tamaños esperados del cassette IRES-EGFP. Sin embargo las bandas de los días 30 y 60 no son tan intensas como en los primeros días luego de la infección, indicando que el nivel del vector AkvU3-EGFP ha bajado o dicho de otra manera que el cassette se ha perdido o "deleteado", como en los experimentos realizados *in vitro* por el grupo de Pedersen. Luego de estos análisis podemos concluir que la "pérdida" del cassette IRES-EGFP dependiente del tiempo, corresponde con los resultados obtenidos en los análisis de viremia y de citometria de flujo (Tabla 1 y Figura 3).

### **Construcción y validación del vector AkvU3-v-Ha-Ras**

A pesar de que se produce una delección del cassette IRES-EGFP (tanto *in vitro* como *in vivo*) dependiente del tiempo y de la replicación del virus, hemos demostrado la eficiencia del vector AkvU3-EGFP para transducir en una ventana de tiempo, ciertas células hematopoyéticas *in vivo*. Por esta importante razón consideramos que si logramos infectar una o pocas células que expresen el receptor tv-a, en los primeros momentos de la infección (entre los días 4 y 7) con nuestro vector "pseudotipado" con la glicoproteína Env de ALSV-A, es suficiente para demostrar que el *targeting* celular *in vivo* utilizando vectores retrovirales es posible. Pero sin olvidar nuestro interés en la oncogénesis, decidimos a continuación de utilizar el vector AkvU3-EGFP como base para construir nuestro vector oncogénico, AkvU3-v-Ha-Ras (Figura 6).

La construcción de AkvU3-v-Ha-Ras consistió simplemente en remplazar el cassette IRES-EGFP del vector AkvU3-EGFP por un cassette IRES-v-Ha-Ras utilizando el sitio de restricción Cel II. Cabe recordar que se trata todavía de un vector *ecotropic*, es decir que puede infectar diferentes tipos celulares murinos. Para demostrar el poder transformante *in vitro* de este vector, se lo utilizó para infectar fibroblastos embrionarios NIH3T3 de ratón. Se determinó luego por *immunoblots* la expresión de v-Ha-Ras en estas células (Figura 7A) y se observó mediante la técnica de carencia de suero la aparición de *foci* en las placas infectadas. En paralelo se infectaron intraperitonealmente 2 camadas de ratones recién nacidos (de 3 o 4

días de edad) NIH Swiss con  $10^4$  UFC de AkvU3-v-Ha-Ras. En los primeros dos meses luego de la inyección, el 60% de los ratones desarrolla un tumor, la mayoría de estos en el bazo (Figura 7B). Cabe resaltar que Akv MLV es conocido como un retrovirus que induce tumores B en ratones luego de 12 a 24 meses postinfección. Los ratones que han sufrido el desarrollo de un tumor han sido sacrificados y las muestras de tumores, de suero y de diferentes tejidos han sido guardadas y serán próximamente analizadas. Tanto para las experiencias *in vitro* como *in vivo* el vector Akv MLV ha sido utilizado como control. Luego de estas experiencias donde se demuestra el poder oncogénico de nuestra construcción, y mientras otra parte del laboratorio interesada a la oncogénesis se dedica a estudiar y analizar más en detalle los aspectos anatopatológicos y moleculares de los tumores AkvU3-v-Ha-Ras, decidimos realizar el « pseudotyping » de AkvU3-v-Ha-Ras y de AkvU3-EGFP con la glicoproteína Env gp85 de ALSV-A.

#### ***Pseudotyping de AkvU3-EGFP y de AkvU3-v-Ha-Ras con la glicoproteína Env de ALSV-A***

La última etapa para construir el vector destinado a las verdaderas experiencias de *targeting* fue la de remplazar la glicoproteína Env *ecotropic* gp70 en el genoma *wild type* de Akv MLV por la glicoproteína Env gp85 de ALSV-A que reconoce el receptor tv-a en la superficie de células de diferentes aves (Figura 8). Este clonaje fue realizado por el laboratorio de Claude Bagnis, en el Instituto Paoli Calmette en Marseille, con quien colaboramos. Cabe destacar que se trata de una verdadera « cirugía molecular », ya que el final del ORF del gen pol (integrasa) de Akv MLV comparte secuencias con el inicio del gen env. La estrategia, diseñada en el laboratorio, se trata de la recombinación entre los dos genes env en la región hidrofóbica (transmembranaria) de los péptidos « leader » de Env *ecotropic* y Env ALSV-A. Es decir, que el péptido « leader » del vector definitivo tendrá un dominio quimera, el cual la región hidrofóbica estará compuesta de la mitad de aminoácidos del Env *ecotropic* y la otra mitad del Env ALSV-A. La estrategia se encuentra esquematizada en Materiales y Métodos.

Para demostrar la capacidad de infección *in vitro* de estos vectores « pseudotipados » con Env ALSV-A se infectaron , en un primer momento, las líneas NIH3T3 murinos o TE671 humanas expresando de manera estable el receptor tv-a (Figura 9B). Estas poblaciones

celulares fueron construidas en el laboratorio utilizando un vector de expresión constitutivo de tv-a (pKZ261). En una segunda etapa, (Figura 10) los vectores fueron utilizados para infectar una línea celular derivada de codorniz (QT6) que expresa naturalmente el receptor tv-a en su superficie. Sobrenadante de estas células fue luego utilizado para infectar otras poblaciones de células QT6 (diferentes pasajes o *rounds* de infección) demostrando su capacidad de replicación y transducción *in vitro* mediante análisis de citometría de flujo y de microscopía a fluorescencia.

Finalmente, como en las primeras experiencias *in vivo*, ratones transgénicos C57/BL6 recién nacidos, expresando tv-a de manera constitutiva en varios tipos celulares (incluidas las células del bazo) fueron infectados con  $7 \times 10^3$  UFC de AkvU3-EGFP/EnvA. 4 días luego de la inyección intraperitoneal las células del bazo fueron analizadas por citometría de flujo. La Figura 10 muestra que entre 10 y 20% de estas células son EGFP positivas. Nuevamente nuestro nuevo vector es capaz de transducir la EGFP eficazmente *in vivo*, al menos ciertas células del bazo en un periodo de tiempo determinado. No se han realizado aún análisis del fenotipo de estas células, ni continuado los análisis durante mas tiempo.

### **Construcción y validación de un vector de expresión de tv-a T específico**

Para la construcción de un ratón transgénico que exprese el receptor natural de ASLV-A, tv-a, solamente en las células T, se construyó en el laboratorio un vector de expresión tv-a bajo el control del promotor T específico lck (PM466). Antes de ser enviado al laboratorio de Mathias Muller en Austria, responsable de la construcción del ratón transgénico, se llevaron a cabo experiencias de transfección transitorias sobre diferentes líneas celulares para confirmar la expresión específica de tv-a. Por análisis de *immunoblots* sólo se observa una expresión de tv-a en una línea celular T humana (Jurkat) (Figura 9A) y no en otros tipos celulares no T.

Al momento de escribir este manuscrito y con los vectores AkvU3-EGFP/EnvA (confirmado su poder de transducción *in vitro* e *in vivo*) y AkvU3-v-Ha-Ras/EnvA ya construidos, estamos esperando la construcción definitiva en el laboratorio de Mathias Muller y la llegada a Montpellier de los ratones transgénicos tv-a T específicos para llevar a cabo las verdaderas experiencias de *targeting* celular y/o *targeting* oncogénesis *in vivo* utilizando vectores retrovirales.

## DISCUSION y CONCLUSION

Los vectores utilizados para la transferencia estable de genes en células hematopoyéticas derivan generalmente de retrovirus del grupo MLV [197]. Utilizando la EGFP como gen *marker* y el bazo como tejido de estudio, este trabajo demuestra en una primera serie de experimentos, que estos vectores transducen eficazmente ciertas células hematopoyéticas de ratón *in vivo*. La EGFP es aportada por un vector derivado del retrovirus Akv MLV que posee todos los genes necesarios para su replicación viral y que logra efectuar varios pasajes (*rounds*) de infección en el animal. Para favorecer la distribución en los tejidos del animal, el vector fue inyectado en ratones recién nacidos dado que estos poseen una inmunotolerancia. Luego de 4 y 7 días después de la infección de  $10^4$  UFC, más del 50% de las células no adherentes del bazo fueron determinadas como EGFP positivas. En estas células se encuentran células B, T y NK. Más tarde la población de células EGFP positivas decrece o desaparece, encontrando variaciones importantes entre los animales. Sin embargo, por análisis de PCR en células del bazo, secuencias del vector se detectan todavía en el genoma celular. El hecho de que en la mayoría de los casos las células adherentes del bazo analizadas entre los días 1 y 60 luego de la inyección sean EGFP negativas se explica de la posible diferencia de infección y/o transducción de los distintos tipos celulares que se encuentran en el bazo.

Otro evento interesante es la presencia de células adherentes EGFP positivas en sólo uno de los animales infectados. Este último además fue el único en presentar células no adherentes EGFP positivas luego de 30 días postinfección. Variaciones similares fueron observadas en otro experimento independiente (data non shown). Estas variaciones entre los ratones pueden explicarse por eventos estocásticos durante la infección habiendo podido infectar células progenitoras específicas en este ratón o la aparición de diferentes variantes del vector luego de la delección del cassette.

Este modelo, de eficaz transferencia de genes *in vivo*, podría contribuir a varias aplicaciones donde la eficiencia de la transferencia, como así también el tipo celular y el momento de la infección son importantes. A pesar de esto, uno de los problemas mayores en este modelo es la pérdida en el tiempo de la expresión del transgén en las células del bazo. Previos estudios en cultivos celulares utilizando este tipo de vectores demuestran que luego de varios pasajes de infección aparecen variantes del virus con deleciones en el cassette heterólogo que aparentemente poseen una mejor y más rápida replicación. Lo mismo ha sido observado *in vivo*. Las células del bazo tienen un conocido *turnover* [198]. Luego de la eliminación de las primeras células infectadas con el vector AkvU3-EGFP, nuevas células serían infectadas con los virus que ya han perdido el cassette traduccional IRES-EGFP. Además, la interferencia debida al receptor prevendría la superinfección de estas nuevas células infectadas por vectores que aún poseen la EGFP. Para mejorar la estabilidad de estos vectores diferentes estrategias son tenidas en cuenta, como por ejemplo, la eliminación de ciertos nucleótidos que favorecen la deleción por recombinación homóloga [199].

Otra limitación de este modelo es la necesidad de utilizar ratones recién nacidos para escapar de la respuesta inmune contra el transgén o las proteínas virales. Es sabido que los MLVs poseen una actividad tumorigénica sobretodo en ratones recién nacidos. Por este motivo próximos estudios serán realizados con animales adultos inmunocomprometidos.

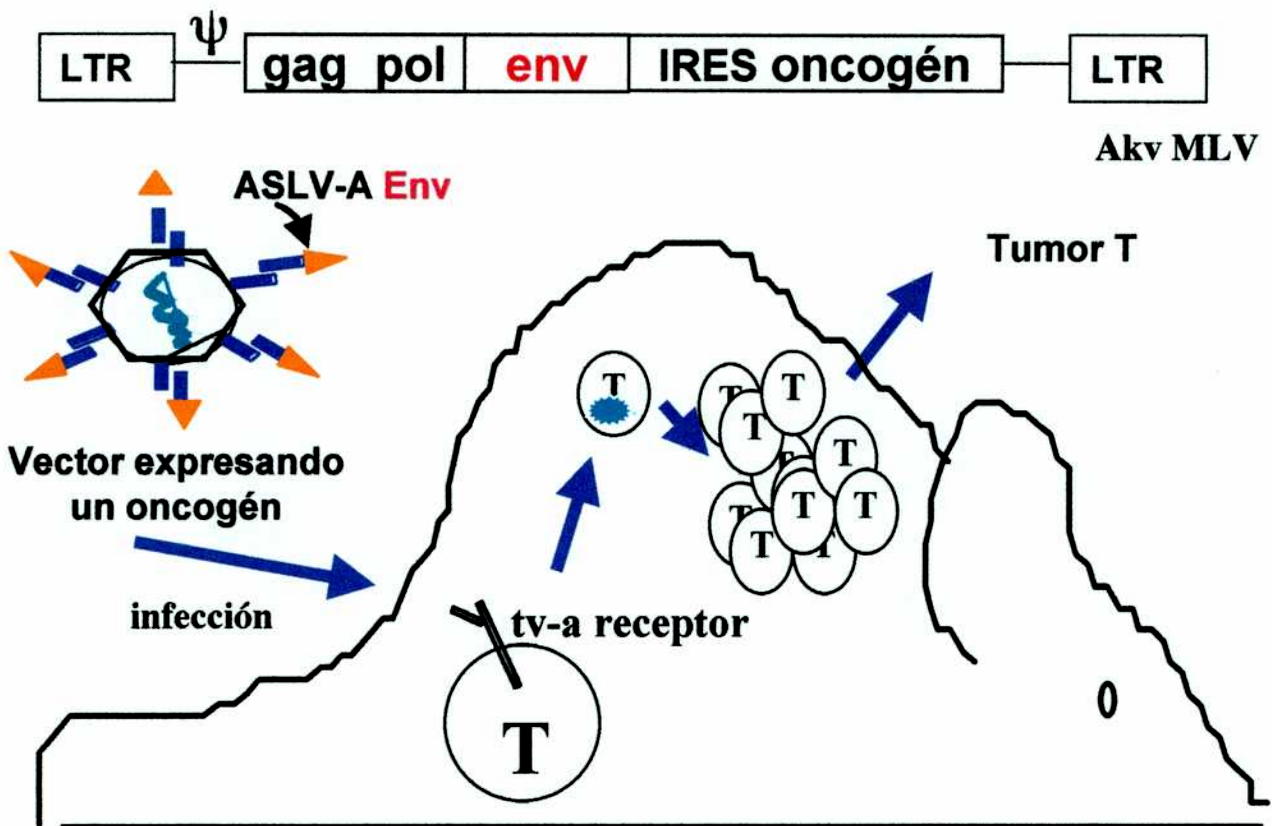
Un punto a destacar es que durante este trabajo se han construido, por la primera vez, vectores retrovirales competentes para la replicación derivados de MLV y « pseudotipados » con el Env de ASLV-A. Además de haber demostrado su poder de infección y transducción *in vitro* e *in vivo*.

Otro punto a tener en cuenta es la diferente eficiencia de transducción *in vivo* entre los vectores EGFP *ecotropic* (más de 50% de las células no adherentes del bazo 4 días luego de la infección) y los vectores « pseudotipados » con la Env de ASLV-A (entre 10 y 20%). Quizás la mas importante causa se deba a que en el primer caso se utilizan ratones de la cepa Swiss NIH3T3 que son sensibles a la infección por retrovirus MLVs y en el segundo se utilizan ratones transgénicos tv-a derivados de la cepa C57/BL6. Estos últimos poseen una restricción, conocida como restricción fv-1[200, 201], contra la proteína Gag de ciertos MLVs. Esta

restricción favorece a las células que son mucho menos sensibles (protegidas) contra la infección de estos virus. Estos ratones transgénicos fueron donados al laboratorio. Sin embargo, nuestra construcción que se lleva a cabo en este momento del ratón transgénico tv-a expresión T específica tiene en consideración todos los aspectos sobre este tipo de restricciones. Es decir, que utilizamos una cepa de ratón permisiva y sensible a la infección por los MLVs. Otra explicación podría ser que la expresión del receptor tv-a en las células del bazo murino no sea muy eficaz o que tv-a necesite ciertas interacciones con proteínas dentro de la célula o en la membrana donde se expresa naturalmente (aves).

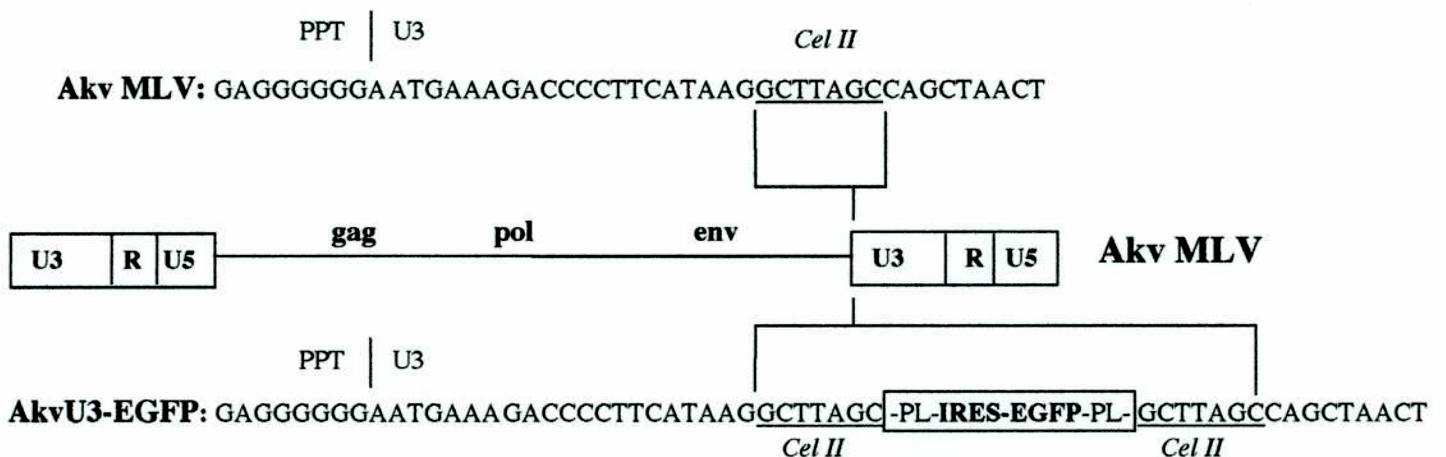
En lo que respecta a los vectores oncogénicos, el hecho de clonar el gen v-Ha-Ras no afecta la capacidad de replicación o transducción del vector tanto *in vitro* como *in vivo*. No se han llevado a cabo análisis sobre la posible delección del cassette IRES-v-Ha-Ras y las experiencias para demostrar que la aparición de los tumores en los ratones infectados con AkvU3-v-Ha-Ras es debida a la sobreexpresión de v-Ha-Ras en estas células se están llevando a cabo en el presente. Quizás, uno de los aspectos más interesantes de este modelo es que a diferencia de los animales transgénicos que expresan un oncogén en todas las células o en todas las células de un tejido, nuestro modelo permitiría infectar con retrovectores que expresen un oncogén un número reducido de células. En el primer caso, el tumor podría desarrollarse a partir de todas las células de un tejido y con nuestro modelo lo haría a partir de unas pocas. Este último caso es mucho más cercano a la realidad del desarrollo de un tumor.

Lamentablemente en este momento contamos con los vectores, que creemos hemos demostrado su funcionabilidad *in vitro* e *in vivo* pero para llevar a cabo las verdaderas experiencias de *targeting* celular, con los vectores EGFP, o de *targeting* oncogénesis, con los vectores v-Ha-Ras, necesitamos un modelo de ratón que exprese el receptor tv-a en un solo tejido. Este tipo de animal transgénico existe y hemos tratado de entablar colaboraciones con diferentes laboratorios de USA que disponen de estos ratones, pero las conexiones fueron infructuosas. Por este motivo decidimos construir nuestro propio modelo, experiencia que se lleva a cabo en el presente. Sin embargo, durante este trabajo se han creado casi todas las herramientas necesarias y los resultados obtenidos durante esta « puesta a punto » nos permiten pensar seriamente que el *targeting* celular *in vivo* utilizando nuestra estrategia y nuestros vectores retrovirales es posible.



**Figura 1 :Modelo experimental para el targeting celular in vivo**

Un ratón transgénico que expresa el receptor natural del ALSV-A, tv-a , en las células T.  
Un vector retroviral murino competente para la replicación, « pseudotipado » con ALSV-A Env y expresando un oncogén



**Figura 2: Representación esquemática del vector competente para la replicación maxivirus AkvU3-EGFP**



D- Targeting celular in vivo

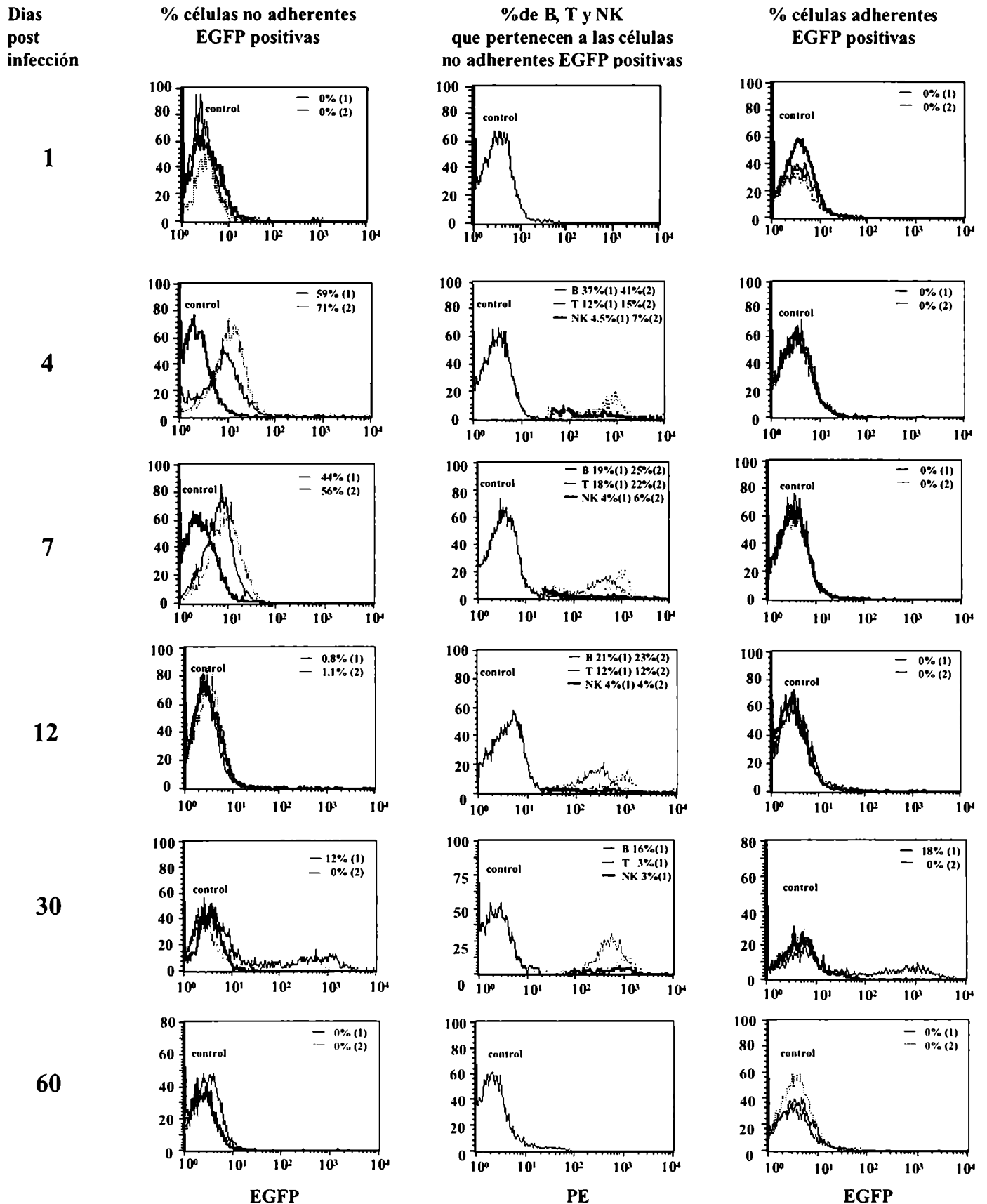
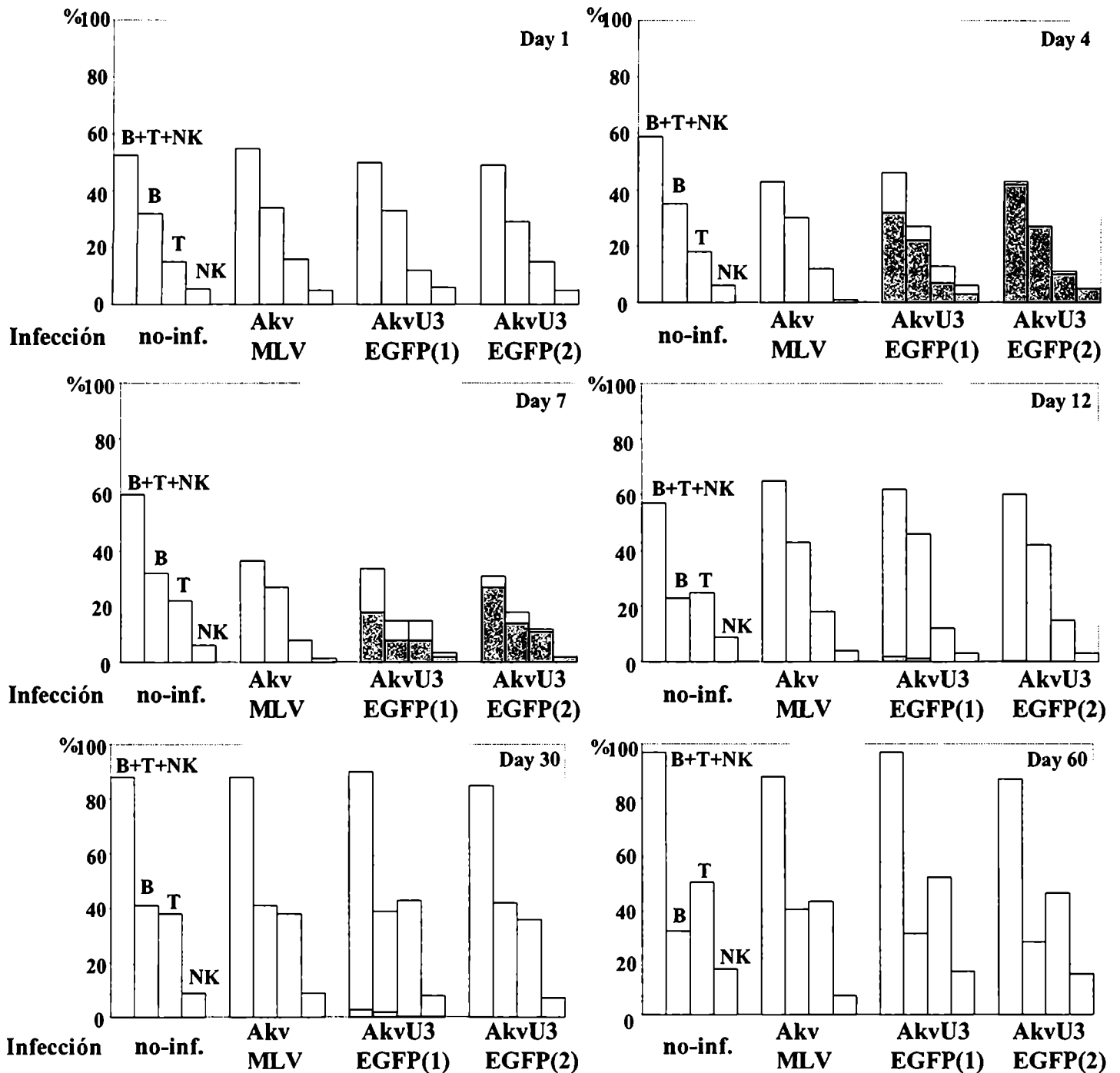


Figura 3: Transducción de EGFP *in vivo* utilizando AkvU3-EGFP

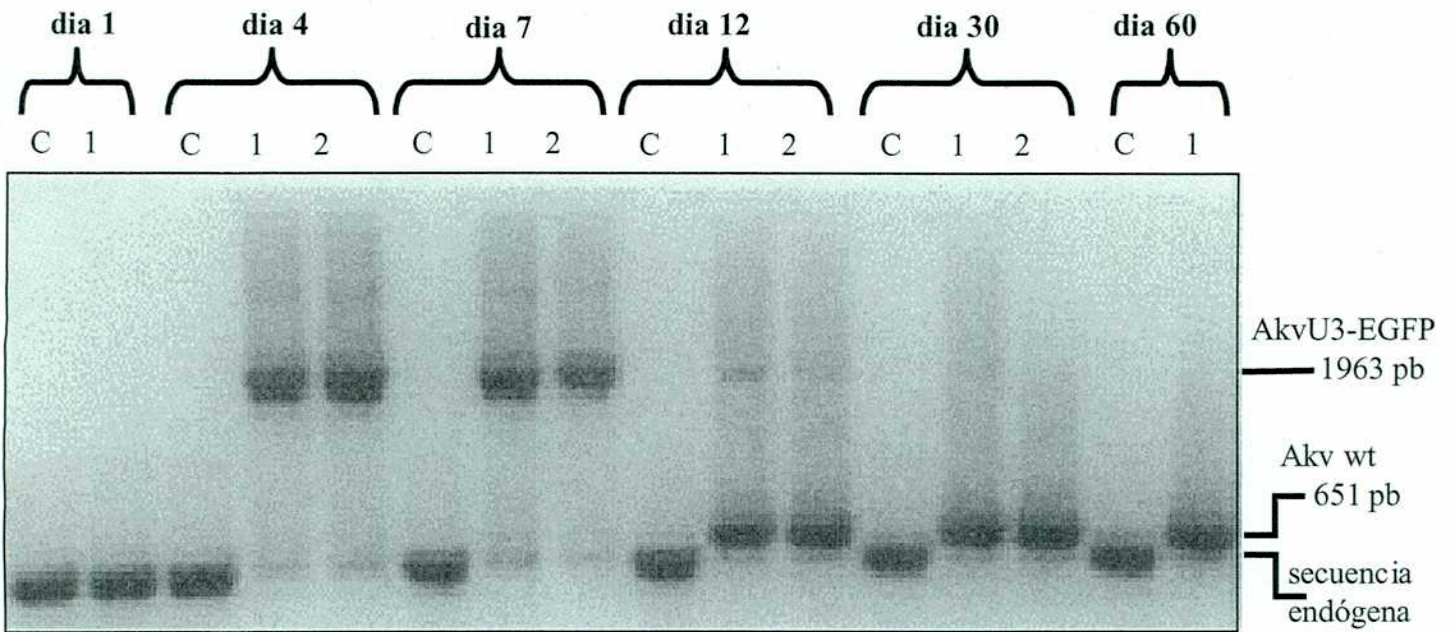
(1) camada 1 (2) camada 2



células EGFP positivas (1) camada 1; (2) camada 2; No-inf.: animales no infectados

**Figura 4: Infección de células T, B y NK del bazo utilizando AkvU3-EGFP**

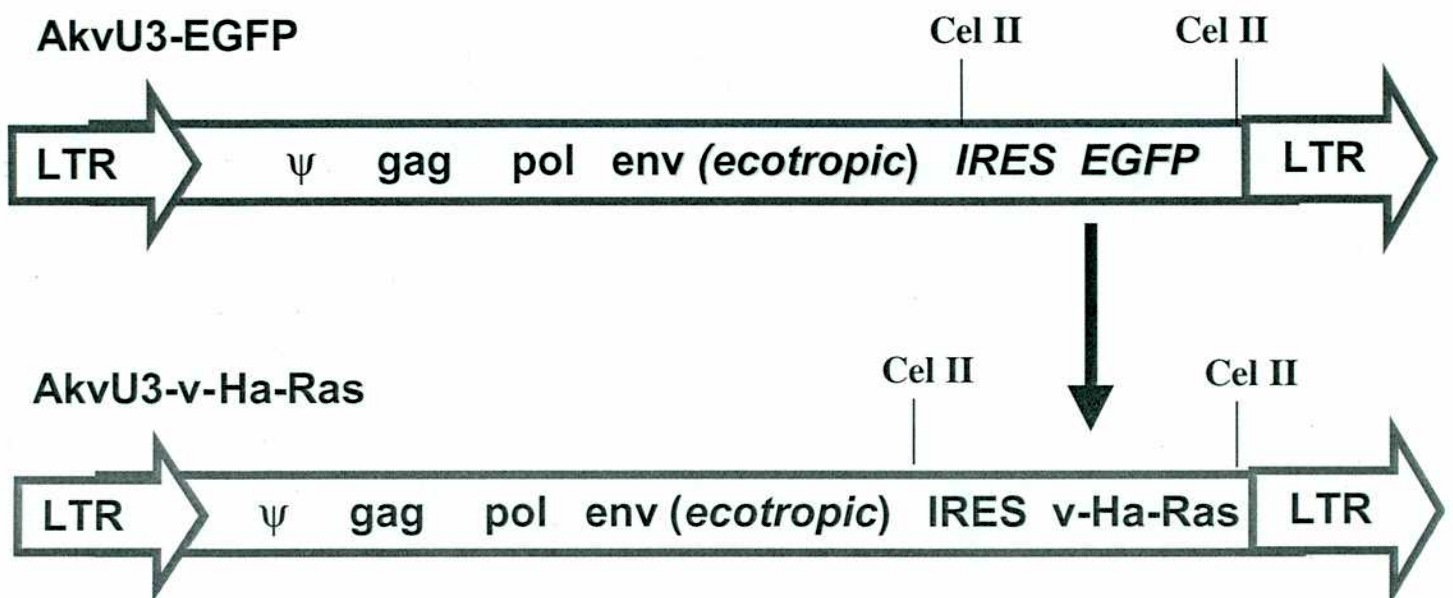
Las células mononucleares provenientes del bazo fueron purificadas luego de sacrificar los ratones 1, 4, 7, 12, 30 y 60 días luego de la infección. Análisis de citometría de flujo se llevaron a cabo para determinar la transducción de EGFP y el porcentaje de los diferentes linfocitos provenientes de ratones infectados y no infectados. Para esto se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos anti-ratón conjugados con el fluorocromo PE: anti-CD3 (T), anti-CD19 (B) y anti-PAN NK (NK)



**Figura 5: Análisis de PCR en células del bazo infectadas con AkvU3-EGFP**

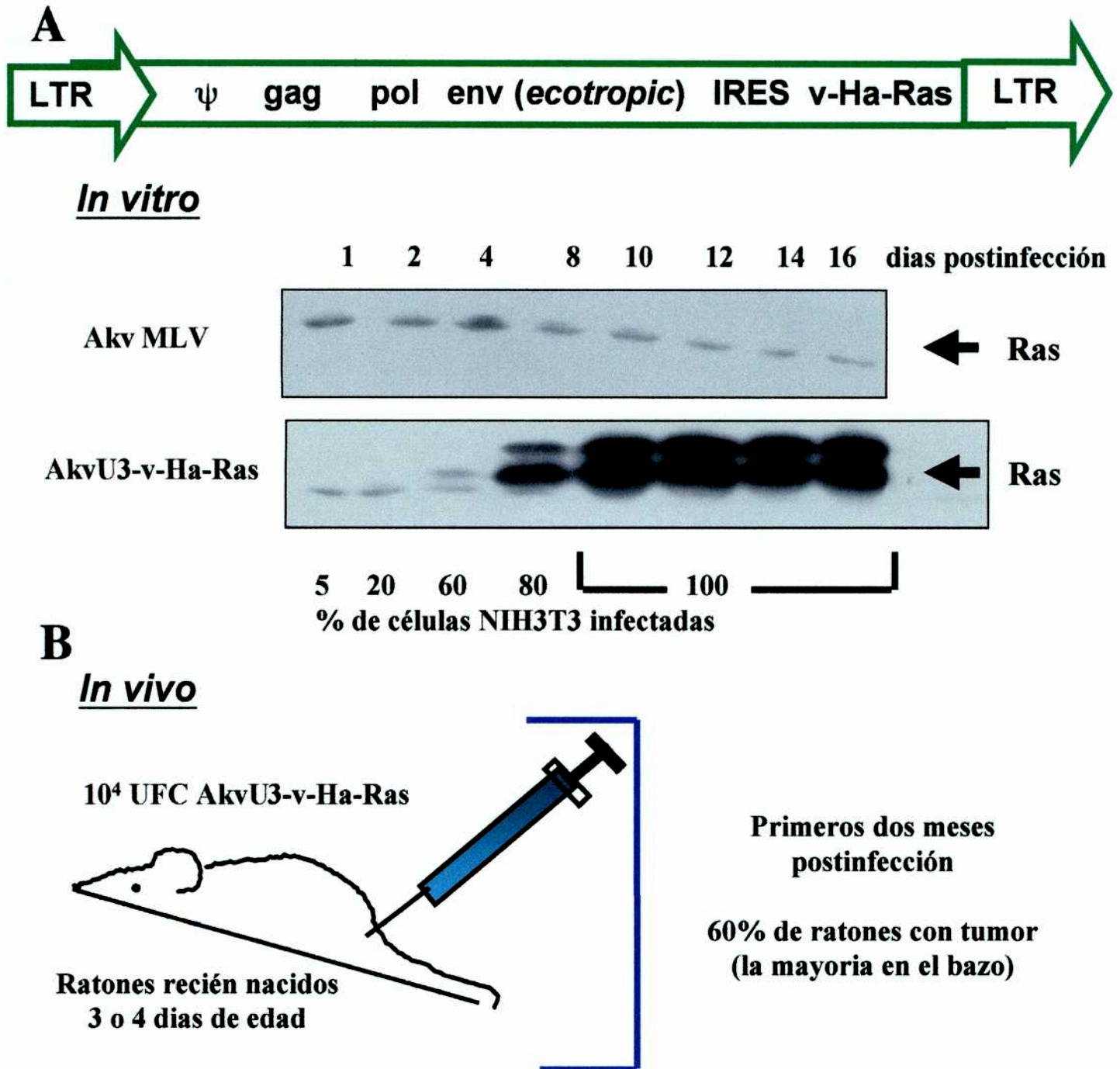
C: control, animales no infectados

Los *primers* utilizados coinciden con las secuencias localizadas fuera del cassette IRES-EGFP, en la region 3' del gen *env* y en la región U3. Estos dos *primers* amplifican un fragmento de ADN de 651 pb del genoma *wild type* de Akv y un fragmento de 1983 pb del AkvU3-EGFP.



**Figura 6: Construcción de un vector v-HA-Ras competente para la replicación**

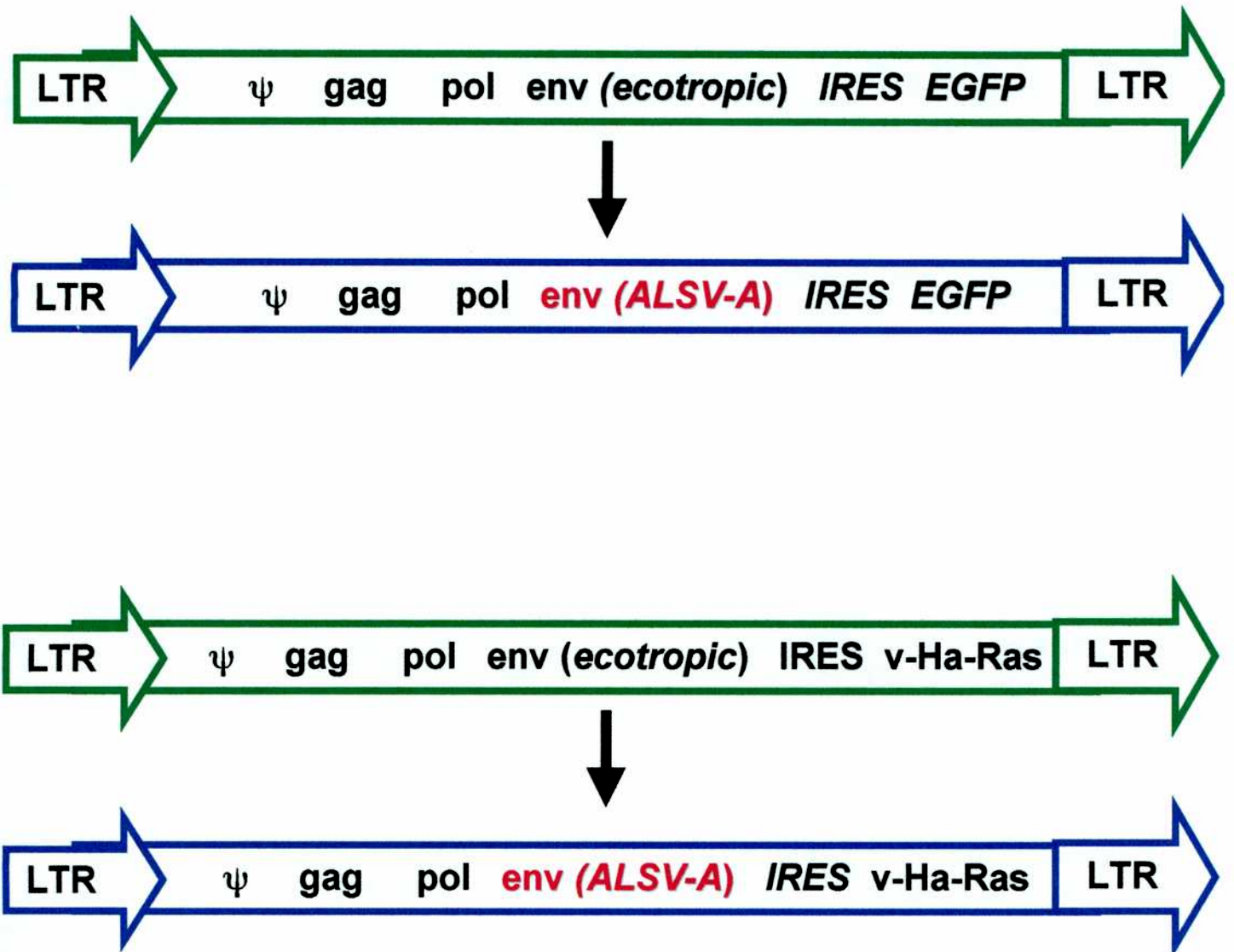
El cassette IRES EGFP es reemplazado por IRES v-Ha-Ras mediante enzimas de restricción



**Figura 7: Construcción y validación del vector AkvU3-v-Ha-Ras**

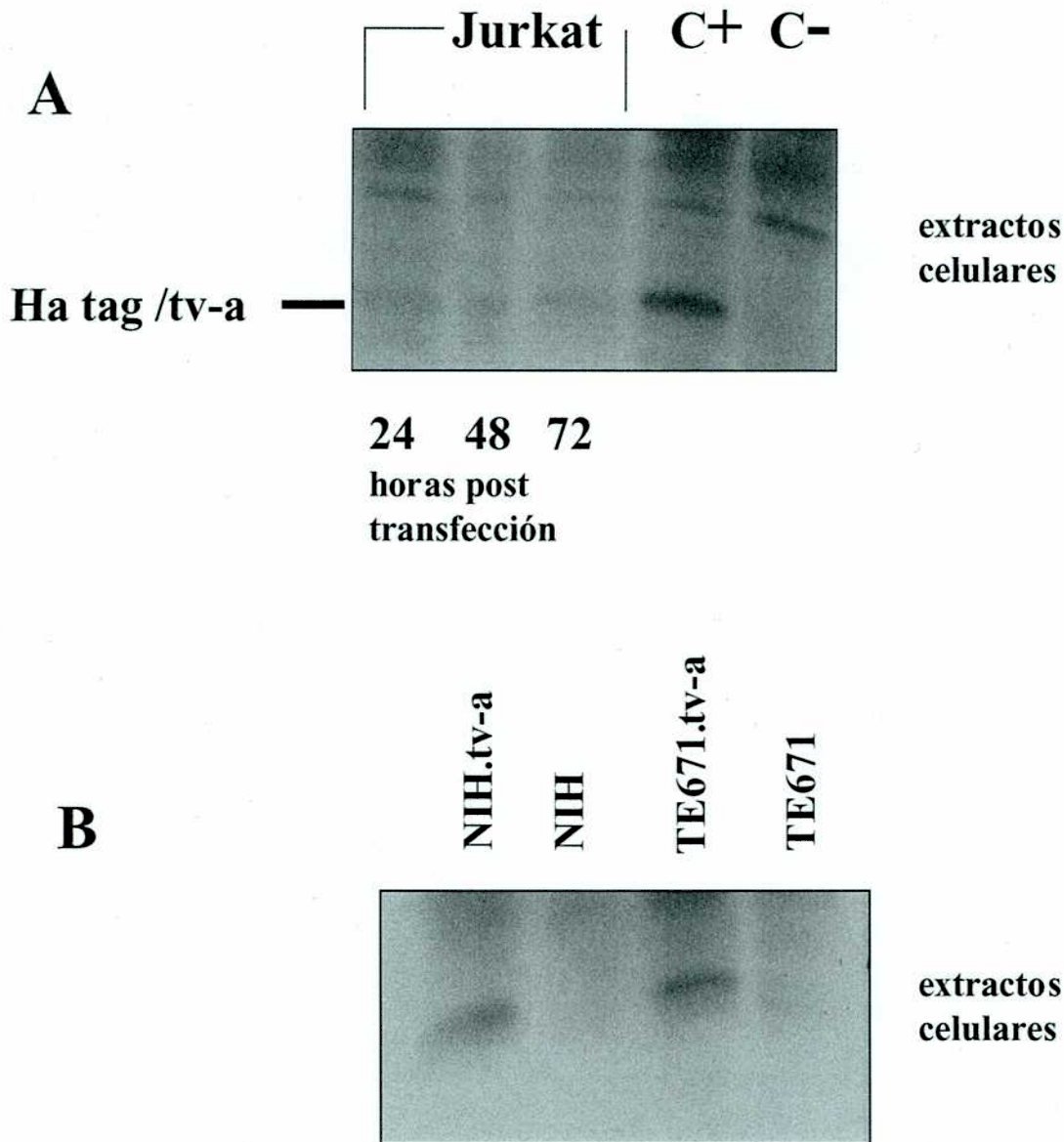
A: Validación del poder transformante *in vitro*. NIH 3T3 son infectadas con AkvU3-v-Ha-Ras o Akv MLV e *immunoblots* anti-v-Ha-Ras son llevados a cabo a diferentes periodos de tiempo. En paralelo utilizando AkvU3-EGFP se determina por análisis de citometria de flujo el porcentaje de células infectadas.

B: Validación del poder oncogénico *in vivo*. Se infectan intraperitonealmente ratones de 3 o 4 dias de edad con 10<sup>4</sup>UCF de AkvU3-v-Ha-Ras. Se observa la aparición del tumor mediante la técnica de palpado y luego los ratones son sacrificados para análisis posteriores. Ratones infectados con Akv MLVson utilizados como control



**Figura 8 : Pseudotyping de AkvU3-EGFP y de AkvU3-v-Ha-Ras con la glicoproteína Env de ALSV-A**

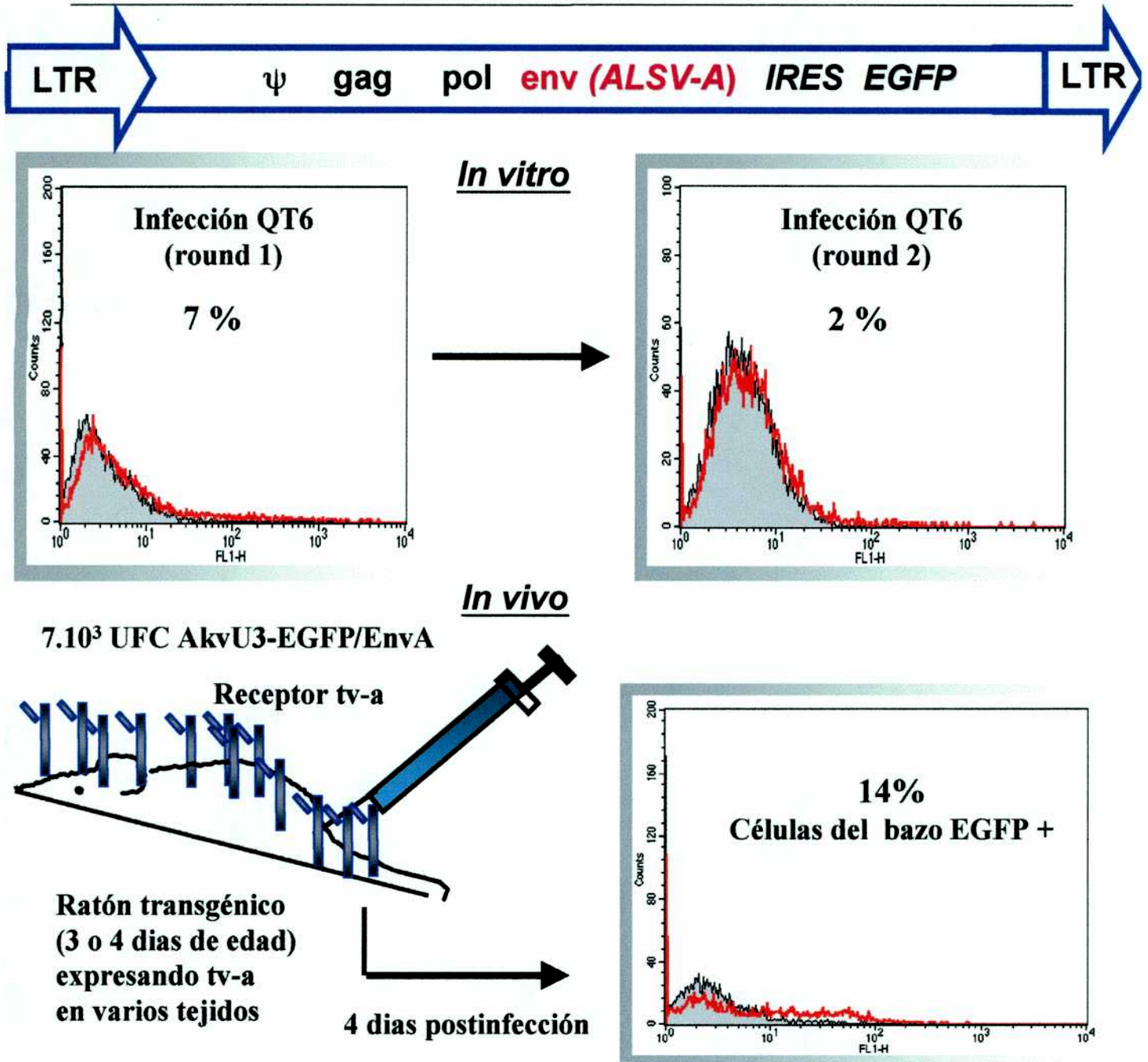
La estrategia es la recombinación entre los dos genes env en la región hidrofóbica (transmembranaria) de los péptidos *leader* de Env *ecotropic* y Env ALSV-A. Finalmente el péptido *leader* del vector « pseudotipado » posee un dominio quimera, donde la región hidrofóbica está compuesta de la mitad de aminoácidos del Env *ecotropic* y la otra mitad del Env ALSV-A.



**Figura 9 : Transfección transitoria y estable de tv-a en diferentes líneas celulares**

A: *Immunoblots* anti-HA para determinar la expresión transitoria del receptor tv-a en una línea de linfocitos T humanos Jurkat gracias a la construcción LCKp / tv-a. No se detecta expresión en otras líneas celulares (data non shown).

B: *Immunoblots* anti-HA para determinar la expresión estable de tv-a en fibroblastos humanos y murinos gracias a la transfección de estas células con un vector hCMVp / tv-a.



**Figura 10 : Validación *in vitro* e *in vivo* del vector AkvU3-EGFP/EnvA**

*In vitro*: El vector AkvU3-EGFP/EnvA es utilizado para infectar la línea celular QT6 que expresa naturalmente el receptor tv-a en su superficie. Sobrenadante de estas células es luego utilizado para infectar nuevas células QT6 (diferentes pasajes o *rounds* de infección) demostrando su capacidad de replicación y transducción mediante análisis de citometría de flujo y de microscopía a fluorescencia (data non shown).

*In vivo*: Se infectan intraperitonealmente ratones de 3 o 4 días de edad con  $7 \times 10^3$  UCF de AkvU3-EGFP/EnvA. Las células mononucleares provenientes del bazo son purificadas luego de sacrificar los ratones 4 días luego de la infección. Análisis de citometría de flujo se llevan a cabo para determinar la transducción de EGFP.

Dias post- infección	1	4	7	12	30	60	
# 83A25 * EGFP	# 83A25 * EGFP	# 83A25 * EGFP	# 83A25 * EGFP	# 83A25 * EGFP	# 83A25 * EGFP	# 83A25 * EGFP	
Akv MLV	0.6 10 <sup>4</sup> 1.8 10 <sup>4</sup>	5.5 10 <sup>5</sup> 6.5 10 <sup>5</sup>	5.0 10 <sup>3</sup> 5.0 10 <sup>3</sup>	2.0 10 <sup>3</sup> 1.0 10 <sup>3</sup>	5.7 10 <sup>4</sup> 4.3 10 <sup>4</sup>	2.0 10 <sup>5</sup> 2.0 10 <sup>5</sup>	6.7 10 <sup>4</sup> 8.2 10 <sup>4</sup>
AkvU3-EGFP - (camada 1)	5.0 10 <sup>3</sup> 5.0 10 <sup>3</sup>	9.5 10 <sup>4</sup> 4.5 10 <sup>4</sup>	2.0 10 <sup>3</sup> 1.0 10 <sup>3</sup>	5.8 10 <sup>4</sup> 2.2 10 <sup>4</sup>	1.0 10 <sup>1</sup> 1.6 10 <sup>1</sup>	1.1 10 <sup>5</sup> 1.1 10 <sup>5</sup>	2.0 10 <sup>4</sup> 2.0 10 <sup>4</sup>
AkvU3-EGFP - (camada 2)	7.5 10 <sup>3</sup> 6.5 10 <sup>3</sup>	1.2 10 <sup>5</sup> 0.8 10 <sup>5</sup>	2.0 10 <sup>3</sup> 2.0 10 <sup>3</sup>	8.0 10 <sup>4</sup> 1.0 10 <sup>5</sup>	3 10 <sup>1</sup> 1.6 10 <sup>1</sup>	7.0 10 <sup>4</sup> 5.0 10 <sup>4</sup>	6.6 10 <sup>4</sup> 4.4 10 <sup>4</sup>

Tabla 1 Viremia

Un ratón por camada fue sacrificado a intervalos regulares de tiempo y la viremia fue determinada por duplicado (UFC/ml). No fue detectada ninguna viremia en los animales no infectados.

# Las células infectadas con virus expresando EGFP o virus que no expresan EGFP fueron analizadas por FIA usando un anticuerpo monoclonal específico contra la glicoproteína gp70 Env (83A25).

\* Las células infectadas con virus expresando la EGFP fueron analizadas por fluorescencia directa de la EGFP.



# **BIBLIOGRAFIA**

---

**Bibliografia**

1. Miller, A.D., *Human gene therapy comes of age*. Nature, 1992. **357**(6378): p. 455-60.
2. Mulligan, R.C., *The basic science of gene therapy*. Science, 1993. **260**(5110): p. 926-32.
3. Rosenberg, S.A., *et al.*, *Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction*. N Engl J Med, 1990. **323**(9): p. 570-8.
4. Blaese, R.M., *et al.*, *T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years*. Science, 1995. **270**(5235): p. 475-80.
5. Kay, M. and S. Woo, *Gene therapy for metabolic disorders*. Trends Genet., 1994. **10**: p. 253-257.
6. Crystal, R.G., *Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success*. Science, 1995. **270**(5235): p. 404-410.
7. Roth, J.A. and R.J. Cristiano, *Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going?* J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(1): p. 21-39.
8. Cohen-Haguenuer, *La Therapie Genique*. Editions Tec&Doc. Londres-Paris-New York 2001.
9. Kafri, T., *et al.*, *Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors*. Nat Genet, 1997. **17**(3): p. 314-7.
10. Zufferey, R., *et al.*, *Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(9): p. 871-5.
11. Miller, A.D., *Development and application of retroviral vectors*, in *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, Editors. 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY. p. 437-474.
12. Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H.E. Varmus, *Retroviruses*. 1997, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
13. Luciw, P.A., *Human Immunodeficiency viruses and their replication*. Chapter 60. In B.N. Fields, D.M. Knipe, P.W. Howley et al Fields Virology Third edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996: p. P1881.
14. Petropoulos, C., *Retroviral taxonomy* In Coffin J., Hughes S., Varmus H. (eds). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1997: p. p.757.

15. Vogt, V., *Retroviral virions and genomes* In Coffin J., Hughes S., Varmus H. (eds). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press). 1997: p. p 27.
16. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
17. Gallo, R.C., et al., *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 500-3.
18. Levy, J.A., et al., *Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS*. Science, 1984. **225**(4664): p. 840-2.
19. King, J.A., et al., *The extended packaging sequence of MoMLV contains a constitutive mRNA nuclear export function*. FEBS Lett, 1998. **434**(3): p. 367-71.
20. Bowerman, B., et al., *A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA*. Genes Dev, 1989. **3**(4): p. 469-78.
21. Quinn, E.R., L.G. Lum, and K.T. Trevor, *T cell activation modulates retrovirus-mediated gene expression*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(10): p. 1457-67.
22. Crawford, S. and S.P. Goff, *A deletion mutation in the 5' part of the pol gene of Moloney murine leukemia virus blocks proteolytic processing of the gag and pol polyproteins*. J Virol, 1985. **53**(3): p. 899-907.
23. Freed, E.O., *HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle*. Virology, 1998. **251**(1): p. 1-15.
24. Sandefur, S., et al., *Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag)*. J Virol, 2000. **74**(16): p. 7238-49.
25. Yuan, B., et al., *Infectivity of Moloney murine leukemia virus defective in late assembly events is restored by late assembly domains of other retroviruses*. J Virol, 2000. **74**(16): p. 7250-60.
26. Parent, L.J., et al., *Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins*. J Virol, 1995. **69**(9): p. 5455-60.
27. Garnier, L., et al., *Identification of retroviral late domains as determinants of particle size*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 2309-20.
28. Sherry, B., et al., *Role of cyclophilin A in the uptake of HIV-1 by macrophages and T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1758-63.
29. Darlix, J.L., et al., *First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses*. J Mol Biol, 1995. **254**(4): p. 523-37.

30. Hunter, E. and R. Swanstrom, *Retrovirus envelope glycoproteins*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1990. **157**: p. 187-253.
31. Sarkar, N.H., *The effects of 2-deoxyglucose and tunicamycin on the biosynthesis of the murine mammary tumor virus proteins, and on the assembly and release of the virus*. *Virology*, 1986. **150**(2): p. 419-38.
32. Pinter, A., W.J. Honnen, and J.S. Li, *Studies with inhibitors of oligosaccharide processing indicate a functional role for complex sugars in the transport and proteolysis of Friend mink cell focus-inducing murine leukemia virus envelope proteins*. *Virology*, 1984. **136**(1): p. 196-210.
33. Li, Z., A. Pinter, and S.C. Kayman, *The critical N-linked glycan of murine leukemia virus envelope protein promotes both folding of the C-terminal domains of the precursor polyprotein and stability of the postcleavage envelope complex*. *J Virol*, 1997. **71**(9): p. 7012-9.
34. Felkner, R.H. and M.J. Roth, *Mutational analysis of the N-linked glycosylation sites of the SU envelope protein of Moloney murine leukemia virus*. *J Virol*, 1992. **66**(7): p. 4258-64.
35. Dederá, D.A., R.L. Gu, and L. Ratner, *Role of asparagine-linked glycosylation in human immunodeficiency virus type 1 transmembrane envelope function*. *Virology*, 1992. **187**(1): p. 377-82.
36. Piguet, V., *et al.*, *The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors*. *Immunol Rev*, 1999. **168**: p. 51-63.
37. Pinter, A., *et al.*, *Localization of the labile disulfide bond between SU and TM of the murine leukemia virus envelope protein complex to a highly conserved CWLC motif in SU that resembles the active-site sequence of thiol- disulfide exchange enzymes*. *J Virol*, 1997. **71**(10): p. 8073-7.
38. Granowitz, C., J. Colicelli, and S.P. Goff, *Analysis of mutations in the envelope gene of Moloney murine leukemia virus: separation of infectivity from superinfection resistance*. *Virology*, 1991. **183**(2): p. 545-54.
39. McCune, J.M., *et al.*, *Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus*. *Cell*, 1988. **53**(1): p. 55-67.
40. Ragheb, J.A. and W.F. Anderson, *pH-independent murine leukemia virus ecotropic envelope-mediated cell fusion: implications for the role of the R peptide and p12E TM in viral entry*. *J Virol*, 1994. **68**(5): p. 3220-31.

41. Yu, X., et al., *The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions.* J Virol, 1992. **66**(8): p. 4966-71.
42. Dorfman, T., et al., *Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein.* J Virol, 1994. **68**(3): p. 1689-96.
43. Ono, A., M. Huang, and E.O. Freed, *Characterization of human immunodeficiency virus type 1 matrix revertants: effects on virus assembly, Gag processing, and Env incorporation into virions.* J Virol, 1997. **71**(6): p. 4409-18.
44. Cosson, P., *Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1.* Embo J, 1996. **15**(21): p. 5783-8.
45. Emi, N., T. Friedmann, and J.K. Yee, *Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus.* J Virol, 1991. **65**(3): p. 1202-7.
46. Eglitis, M.A., et al., *Evaluation of retroviral vectors based on the gibbon ape leukemia virus.* Gene Ther, 1995. **2**(7): p. 486-92.
47. Landau, N.R. and D.R. Littman, *Packaging system for rapid production of murine leukemia virus vectors with variable tropism.* J Virol, 1992. **66**(8): p. 5110-3.
48. Suomalainen, M. and H. Garoff, *Incorporation of homologous and heterologous proteins into the envelope of Moloney murine leukemia virus.* J Virol, 1994. **68**(8): p. 4879-89.
49. Hatzioannou, T., S.J. Russell, and F.L. Cosset, *Incorporation of simian virus 5 fusion protein into murine leukemia virus particles and its effect on the co-incorporation of retroviral envelope glycoproteins.* Virology, 2000. **267**(1): p. 49-57.
50. Denesvre, C., et al., *TM domain swapping of murine leukemia virus and human T-cell leukemia virus envelopes confers different infectious abilities despite similar incorporation into virions.* J Virol, 1996. **70**(7): p. 4380-6.
51. Wool-Lewis, R.J. and P. Bates, *Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines.* J Virol, 1998. **72**(4): p. 3155-60.
52. Schnierle, B.S., et al., *Expression of chimeric envelope proteins in helper cell lines and integration into Moloney murine leukemia virus particles.* Gene Ther, 1996. **3**(4): p. 334-42.

53. Mammano, F., *et al.*, *Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney murine leukemia virus particles and gene transfer into CD4+ cells.* J Virol, 1997. **71**(4): p. 3341-5.
54. Green, N., *et al.*, *Sequence-specific antibodies show that maturation of Moloney leukemia virus envelope polyprotein involves removal of a COOH-terminal peptide.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(10): p. 6023-7.
55. Ragheb, J.A. and W.F. Anderson, *Uncoupled expression of Moloney murine leukemia virus envelope polypeptides SU and TM: a functional analysis of the role of TM domains in viral entry.* J Virol, 1994. **68**(5): p. 3207-19.
56. Rein, A., *et al.*, *Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus Env protein.* J Virol, 1994. **68**(3): p. 1773-81.
57. Battini, J.L., O. Danos, and J.M. Heard, *Receptor-binding domain of murine leukemia virus envelope glycoproteins.* J Virol, 1995. **69**(2): p. 713-9.
58. Battini, J.L., *et al.*, *Receptor-binding properties of a purified fragment of the 4070A amphotropic murine leukemia virus envelope glycoprotein.* J Virol, 1996. **70**(7): p. 4387-93.
59. Yu, H., N. Soong, and W.F. Anderson, *Binding kinetics of ecotropic (Moloney) murine leukemia retrovirus with NIH 3T3 cells.* J Virol, 1995. **69**(10): p. 6557-62.
60. Battini, J.L., J.M. Heard, and O. Danos, *Receptor choice determinants in the envelope glycoproteins of amphotropic, xenotropic, and polytropic murine leukemia viruses.* J Virol, 1992. **66**(3): p. 1468-75.
61. Battini, J.L., O. Danos, and J.M. Heard, *Definition of a 14-amino-acid peptide essential for the interaction between the murine leukemia virus amphotropic envelope glycoprotein and its receptor.* J Virol, 1998. **72**(1): p. 428-35.
62. Morgan, R.A., *et al.*, *Analysis of the functional and host range-determining regions of the murine ectropic and amphotropic retrovirus envelope proteins.* J Virol, 1993. **67**(8): p. 4712-21.
63. Ott, D. and A. Rein, *Basis for receptor specificity of nonectropic murine leukemia virus surface glycoprotein gp70SU.* J Virol, 1992. **66**(8): p. 4632-8.
64. Bae, Y., S.M. Kingsman, and A.J. Kingsman, *Functional dissection of the Moloney murine leukemia virus envelope protein gp70.* J Virol, 1997. **71**(3): p. 2092-9.
65. Gray, K.D. and M.J. Roth, *Mutational analysis of the envelope gene of Moloney murine leukemia virus.* J Virol, 1993. **67**(6): p. 3489-96.

66. MacKrell, A.J., *et al.*, *Identification of a subdomain in the Moloney murine leukemia virus envelope protein involved in receptor binding*. J Virol, 1996. **70**(3): p. 1768-74.
67. Skov, H. and K.B. Andersen, *Mutational analysis of Moloney murine leukaemia virus surface protein gp70*. J Gen Virol, 1993. **74**(Pt 4): p. 707-14.
68. Wu, B.W., *et al.*, *Identification of regions in the Moloney murine leukemia virus SU protein that tolerate the insertion of an integrin-binding peptide*. Virology, 2000. **269**(1): p. 7-17.
69. Lavillette, D., *et al.*, *Activation of a cell entry pathway common to type C mammalian retroviruses by soluble envelope fragments*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 295-304.
70. Zavorotinskaya, T. and L.M. Albritton, *A hydrophobic patch in ecotropic murine leukemia virus envelope protein is the putative binding site for a critical tyrosine residue on the cellular receptor [In Process Citation]*. J Virol, 1999. **73**(12): p. 10164-72.
71. Lavillette, D., *et al.*, *A proline-rich motif downstream of the receptor binding domain modulates conformation and fusogenicity of murine retroviral envelopes*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9955-65.
72. Opstelten, D.J., M. Wallin, and H. Garoff, *Moloney murine leukemia virus envelope protein subunits, gp70 and Pr15E, form a stable disulfide-linked complex [published erratum appears in J Virol 1998 Oct;72(10):8460]*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6537-45.
73. Jones, J.S. and R. Risser, *Cell fusion induced by the murine leukemia virus envelope glycoprotein*. J Virol, 1993. **67**(1): p. 67-74.
74. Zhu, N.L., *et al.*, *Mutational analysis of the fusion peptide of Moloney murine leukemia virus transmembrane protein p15E*. J Virol, 1998. **72**(2): p. 1632-9.
75. Skehel, J.J. and D.C. Wiley, *Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 531-69.
76. Bullough, P.A., *et al.*, *Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion*. Nature, 1994. **371**(6492): p. 37-43.
77. Chen, J., *et al.*, *Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation*. Cell, 1998. **95**(3): p. 409-17.
78. Tailor, C.S., *et al.*, *Cloning and characterization of a cell surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(3): p. 927-32.

- 
79. Januszski, M.M., *et al.*, *Functional analysis of the cytoplasmic tail of Moloney murine leukemia virus envelope protein*. J Virol, 1997. **71**(5): p. 3613-9.
  80. Zhao, Y., *et al.*, *Functional domains in the retroviral transmembrane protein*. J Virol, 1998. **72**(7): p. 5392-8.
  81. Taylor, C.S. and D. Kabat, *Variable regions A and B in the envelope glycoproteins of feline leukemia virus subgroup B and amphotropic murine leukemia virus interact with discrete receptor domains*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 9383-91.
  82. Dalgleish, A.G., *et al.*, *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 763-7.
  83. Klatzmann, D., *et al.*, *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 767-8.
  84. Olshevsky, U., *et al.*, *Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding*. J Virol, 1990. **64**(12): p. 5701-7.
  85. Wu, L., *et al.*, *CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5*. Nature, 1996. **384**(6605): p. 179-83.
  86. Pleskoff, O., *et al.*, *Human immunodeficiency virus strains differ in their ability to infect CD4+ cells expressing the rat homolog of CXCR-4 (fusin)*. J Virol, 1997. **71**(4): p. 3259-62.
  87. Kwong, P.D., *et al.*, *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 648-59.
  88. Wang, H., *et al.*, *Plasma membrane receptors for ecotropic murine retroviruses require a limiting accessory factor*. J Virol, 1991. **65**(12): p. 6468-77.
  89. Haywood, A.M., *Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure*. J Virol, 1994. **68**(1): p. 1-5.
  90. Kizhatil, K. and L.M. Albritton, *Requirements for different components of the host cell cytoskeleton distinguish ecotropic murine leukemia virus entry via endocytosis from entry via surface fusion*. J Virol, 1997. **71**(10): p. 7145-56.
  91. Klasse, P.J., R. Bron, and M. Marsh, *Mechanisms of enveloped virus entry into animal cells*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **34**(1): p. 65-91.
  92. Miller, R.J., *et al.*, *Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses*. J Virol, 2000. **74**(16): p. 7187-95.
  93. Trono, D., *HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast*. Cell, 1995. **82**(2): p. 189-92.



94. Pollard, V.W. and M.H. Malim, *The HIV-1 Rev protein*. Annu Rev Microbiol, 1998. **52**: p. 491-532.
95. Whittaker, G.R. and A. Helenius, *Nuclear import and export of viruses and virus genomes*. Virology, 1998. **246**(1): p. 1-23.
96. Piguet, V. and D. Trono, *The Nef protein of primate lentiviruses*. Rev Med Virol, 1999. **9**(2): p. 111-20.
97. Schragar, J.A. and J.W. Marsh, *HIV-1 Nef increases T cell activation in a stimulus-dependent manner*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 8167-72.
98. Hunter, E., *Viral entry and receptors*, in *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, Editors. 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. p. 71-120.
99. Albritton, L.M., et al., *A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection*. Cell, 1989. **57**(4): p. 659-66.
100. Wang, H., et al., *Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter [see comments]*. Nature, 1991. **352**(6337): p. 729-31.
101. Wang, H., M.P. Kavanaugh, and D. Kabat, *A critical site in the cell surface receptor for ecotropic murine retroviruses required for amino acid transport but not for viral reception*. Virology, 1994. **202**(2): p. 1058-60.
102. Miller, D.G., R.H. Edwards, and A.D. Miller, *Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(1): p. 78-82.
103. van Zeijl, M., et al., *A human amphotropic retrovirus receptor is a second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(3): p. 1168-72.
104. Tailor, C.S., A. Nouri, and D. Kabat, *A comprehensive approach to mapping the interacting surfaces of murine amphotropic and feline subgroup B leukemia viruses with their cell surface receptors*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 237-44.
105. Rein, A. and A. Schultz, *Different recombinant murine leukemia viruses use different cell surface receptors*. Virology, 1984. **136**(1): p. 144-52.
106. Ott, D., R. Friedrich, and A. Rein, *Sequence analysis of amphotropic and 10A1 murine leukemia viruses: close relationship to mink cell focus-inducing viruses*. J Virol, 1990. **64**(2): p. 757-66.

107. Battini, J.L., J.E. Rasko, and A.D. Miller, *A human cell-surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses: possible role in G protein-coupled signal transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1385-90.
108. Bonham, L., G. Wolgamot, and A.D. Miller, *Molecular cloning of Mus dunni endogenous virus: an unusual retrovirus in a new murine viral interference group with a wide host range*. J Virol, 1997. **71**(6): p. 4663-70.
109. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 657-700.
110. Paxton, W.A., et al., *Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure*. Nat Med, 1996. **2**(4): p. 412-7.
111. Xiao, X., et al., *Constitutive cell surface association between CD4 and CCR5*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7496-501.
112. Rettinger, S.D., et al., *Liver-directed gene therapy: quantitative evaluation of promoter elements by using in vivo retroviral transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(4): p. 1460-4.
113. Palmer, T.D., et al., *Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1330-4.
114. Hoeben, R.C., et al., *Inactivation of the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in murine fibroblast cell lines is associated with methylation and dependent on its chromosomal position*. J Virol, 1991. **65**(2): p. 904-12.
115. Lund, A.H., M. Duch, and F.S. Pedersen, *Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(4): p. 800-1.
116. Jang, S.K., et al., *A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation*. J Virol, 1988. **62**(8): p. 2636-43.
117. Jang, S.K., et al., *Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo*. J Virol, 1989. **63**(4): p. 1651-60.

118. Arai, T., *et al.*, *A new system for stringent, high-titer vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus vector induction by introduction of Cre recombinase into stable prepackaging cell lines.* J Virol, 1998. **72**(2): p. 1115-21.
119. Cosset, F.L., *et al.*, *High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum.* J Virol, 1995. **69**(12): p. 7430-6.
120. Danos, O. and R.C. Mulligan, *Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(17): p. 6460-4.
121. Forestell, S.P., *et al.*, *Novel retroviral packaging cell lines: complementary tropisms and improved vector production for efficient gene transfer.* Gene Ther, 1997. **4**(6): p. 600-10.
122. Ory, D.S., B.A. Neugeboren, and R.C. Mulligan, *A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11400-6.
123. Wolgamot, G., J.E. Rasko, and A.D. Miller, *Retrovirus packaging cells expressing the Mus dunni endogenous virus envelope facilitate transduction of CHO and primary hematopoietic cells.* J Virol, 1998. **72**(12): p. 10242-5.
124. Burns, J.C., *et al.*, *Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 8033-7.
125. Mastromarino, P., *et al.*, *Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH.* J Gen Virol, 1987. **68**(Pt 9): p. 2359-69.
126. Naldini, L., *et al.*, *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.* Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
127. Naldini, L., *et al.*, *Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11382-8.
128. Dull, T., *et al.*, *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system.* J Virol, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
129. Deglon, N., *et al.*, *Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease.* Hum Gene Ther, 2000. **11**(1): p. 179-90.

130. Miyoshi, H., *et al.*, *Development of a self-inactivating lentivirus vector*. J Virol, 1998. 72(10): p. 8150-7.
131. Follenzi, A., *et al.*, *Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences*. Nat Genet, 2000. 25(2): p. 217-22.
132. Guenechea, G., *et al.*, *Transduction of human CD34+ CD38- bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third-generation lentiviral vectors*. Mol Ther, 2000. 1(6): p. 566-73.
133. Seppen, J., *et al.*, *Apical gene transfer into quiescent human and canine polarized intestinal epithelial cells by lentivirus vectors*. J Virol, 2000. 74(16): p. 7642-5.
134. Gasmi, M., *et al.*, *Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors*. J Virol, 1999. 73(3): p. 1828-34.
135. Kim, V.N., *et al.*, *Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1998. 72(1): p. 811-6.
136. Negre, D., *et al.*, *Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells*. Gene Ther, 2000. 7(19): p. 1613-23.
137. Mangeot, P.E., *et al.*, *Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells*. J Virol, 2000. 74(18): p. 8307-15.
138. Klages, N., R. Zufferey, and D. Trono, *A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors*. Mol Ther, 2000. 2(2): p. 170-6.
139. Buchschacher, G.L., Jr. and F. Wong-Staal, *Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases*. Blood, 2000. 95(8): p. 2499-504.
140. Trono, D., *Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent*. Gene Ther, 2000. 7(1): p. 20-3.
141. Corbeau, P., G. Kraus, and F. Wong-Staal, *Transduction of human macrophages using a stable HIV-1/HIV-2-derived gene delivery system*. Gene Ther, 1998. 5(1): p. 99-104.
142. White, S.M., *et al.*, *Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements*. J Virol, 1999. 73(4): p. 2832-40.
143. Karavanas, G., *et al.*, *Cell targeting by murine retroviral vectors*. Crit Rev Oncol Hematol, 1998. 28(1): p. 7-30.
144. Marin, M., D. Noël, and M. Piechaczyk, *Towards efficient cell targeting by recombinant retroviruses*. Molec. Med. Today, 1997. 3: p. 396--403.

145. Russell, S.J. and F.-L. Cosset, *Modifying the host-range properties of retroviral vectors*. J. Gene Medecine, 1999. 1: p. 300-311.
146. Lodge, R., *et al.*, *MuLV-based vectors pseudotyped with truncated HIV glycoproteins mediate specific gene transfer in CD4+ peripheral blood lymphocytes*. Gene Ther, 1998. 5(5): p. 655-64.
147. Endres, M.J., *et al.*, *Targeting of HIV- and SIV-infected cells by CD4-chemokine receptor pseudotypes*. Science, 1997. 278(5342): p. 1462-4.
148. Somia, N.V., *et al.*, *Retroviral vector targeting to human immunodeficiency virus type 1- infected cells by receptor pseudotyping*. J Virol, 2000. 74(9): p. 4420-4.
149. Etienne-Julan, M., *et al.*, *The efficiency of cell targeting by recombinant retroviruses depends on the nature of the receptor and the composition of the artificial cell-virus linker*. J. Gen. Virol., 1992. 73: p. 3251-3255.
150. Roux, P., P. Jeanteur, and M. Piechaczyk, *Cell targeting by recombinant retrovirus using bi-specific antibody complexes*, in *Vectors as tools for the study of normal and abnormal growth and differentiation*. 1989, Springer-Verlag. p. 153-164.
151. Cosset, F.L., *et al.*, *Retroviral retargeting by envelopes expressing an N-terminal binding domain*. J Virol, 1995. 69(10): p. 6314-22.
152. Neda, H., C. Wu, and G. Wu, *Chemical Modification of an Ecotropic Murine Leukemia Virus Results in Redirection of Its Target Cell Specificity*. J. Biol. Chem., 1991. 266: p. 14143-14146.
153. Ager, S., *et al.*, *Retroviral display of antibody fragments; interdomain spacing strongly influences vector infectivity*. Hum. Gene Ther., 1996. 7: p. 2157-2164.
154. Konishi, H., *et al.*, *Targeting strategy for gene delivery to carcinoembryonic antigen-producing cancer cells by retrovirus displaying a single-chain variable fragment antibody*. Hum Gene Ther, 1998. 9(2): p. 235-48.
155. Marin, M., *et al.*, *Targeted infection of human cells via major histocompatibility complex class I molecules by Moloney murine leukemia virus-derived viruses displaying single-chain antibody fragment-envelope fusion proteins*. J Virol, 1996. 70(5): p. 2957-62.
156. Russell, S., R. Hawkins, and G. Winter, *Retroviral vectors displaying functional antibody fragments*. Nucl. Acid Res., 1993. 21: p. 1081-1085.
157. Somia, N., M. Zoppé, and I. Verma, *Generation of targeted retroviral vectors by using single-chain variable fragment: An approach to in vivo gene delivery*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995. 92: p. 7570-7574.

158. Valsesia-Wittmann, S., *et al.*, *Improvement of retroviral retargeting by using amino acid spacers between an additional binding domain and the N terminus of Moloney murine leukemia virus SU*. J Virol, 1996. **70**(3): p. 2059-64.
159. Valsesia-Wittmann, S., *et al.*, *Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors*. J Virol, 1994. **68**(7): p. 4609-19.
160. Fass, D., *et al.*, *Structure of a murine leukemia virus receptor-binding glycoprotein at 2.0 angstrom resolution*. Science, 1997. **277**(5332): p. 1662-6.
161. Kasahara, N., A.M. Dozy, and Y.W. Kan, *Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions*. Science, 1994. **266**(5189): p. 1373-6.
162. Han, X., N. Kasahara, and Y.W. Kan, *Ligand-directed retroviral targeting of human breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(21): p. 9747-51.
163. Matano, T., *et al.*, *Targeted infection of a retrovirus bearing a CD4-Env chimera into human cells expressing human immunodeficiency virus type 1*. J Gen Virol, 1995. **76**(Pt 12): p. 3165-9.
164. Chu, T.H. and R. Dornburg, *Retroviral vector particles displaying the antigen-binding site of an antibody enable cell-type-specific gene transfer*. J Virol, 1995. **69**(4): p. 2659-63.
165. Chu, T.H. and R. Dornburg, *Toward highly efficient cell-type-specific gene transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 720-5.
166. Nilson, B.H., *et al.*, *Targeting of retroviral vectors through protease-substrate interactions*. Gene Ther, 1996. **3**(4): p. 280-6.
167. Peng, K.W., *et al.*, *A gene delivery system activatable by disease-associated matrix metalloproteinases*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(6): p. 729-38.
168. Sambrook J, F.E., Maniatis T, *Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd edition*. New York : Cold Spring Harbor Press. 1989.
169. Gossen, M., *et al.*, *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1766-9.
170. He, J., *et al.*, *Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity*. J Virol, 1995. **69**(11): p. 6705-11.
171. Jespersen, T., *et al.*, *Expression of heterologous genes from an IRES translational cassette in replication competent murine leukemia virus vectors*. Gene, 1999. **239**(2): p. 227-35.

172. Morgan, R.A., *et al.*, *Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry sites: development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy*. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(6): p. 1293-9.
173. Evans, L.H., *et al.*, *A neutralizable epitope common to the envelope glycoproteins of ecotropic, polytropic, xenotropic, and amphotropic murine leukemia viruses*. *J Virol*, 1990. **64**(12): p. 6176-83.
174. Park, E.J., *et al.*, *A global neutralization resistance phenotype of human immunodeficiency virus type 1 is determined by distinct mechanisms mediating enhanced infectivity and conformational change of the envelope complex*. *J Virol*, 2000. **74**(9): p. 4183-91.
175. Chesebro, B., *et al.*, *Characterization of monoclonal antibodies reactive with murine leukemia viruses: use in analysis of strains of friend MCF and Friend ecotropic murine leukemia virus*. *Virology*, 1983. **127**(1): p. 134-48.
176. Dardalhon, V., *et al.*, *Green fluorescent protein as a selectable marker of fibronectin-facilitated retroviral gene transfer in primary human T lymphocytes*. *Hum Gene Ther*, 1999. **10**(1): p. 5-14.
177. Gross-Bellard, M., P. Oudet, and P. Chambon, *Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells*. *Eur J Biochem*, 1973. **36**(1): p. 32-8.
178. Notter, M.F., J.F. Leary, and P.C. Balduzzi, *Adsorption of Rous sarcoma virus to genetically susceptible and resistant chicken cells studied by laser flow cytometry*. *J Virol*, 1982. **41**(3): p. 958-64.
179. Pizzato, M., *et al.*, *Initial binding of murine leukemia virus particles to cells does not require specific Env-receptor interaction*. *J Virol*, 1999. **73**(10): p. 8599-611.
180. Gelderblom, H.R., M. Ozel, and G. Pauli, *Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations*. *Arch Virol*, 1989. **106**(1-2): p. 1-13.
181. Gelderblom, H.R., *Assembly and morphology of HIV : potential effect of structure on viral function*. *AIDS*, 1991. **5**: p. 617-638.
182. Takahashi, I., *et al.*, *Envelope structure model of human immunodeficiency virus type 1*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1989. **2**(2): p. 136-40.
183. Eiden, M.V., *et al.*, *Characterization of a naturally occurring ecotropic receptor that does not facilitate entry of all ecotropic murine retroviruses*. *J Virol*, 1993. **67**(7): p. 4056-61.

184. Ganguly, K., V.S. Kalyanaraman, and M.G. Sarngadharan, *Analysis of the interaction between Rauscher murine leukemia virus and murine cell membrane receptor by in vitro binding assay*. *Cancer Lett*, 1983. **18**(1): p. 79-86.
185. Kadan, M.J., *et al.*, *Detection of receptor-specific murine leukemia virus binding to cells by immunofluorescence analysis*. *J Virol*, 1992. **66**(4): p. 2281-7.
186. Kalyanaraman, V.S., M.G. Sarngadharan, and R.C. Gallo, *Characterization of Rauscher murine leukemia virus envelope glycoprotein receptor in membranes from murine fibroblasts*. *J Virol*, 1978. **28**(3): p. 686-96.
187. Layne, S.P., J.L. Spouge, and M. Dembo, *Quantifying the infectivity of human immunodeficiency virus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(12): p. 4644-8.
188. Layne, S.P., *et al.*, *HIV requires multiple gp120 molecules for CD4-mediated infection*. *Nature*, 1990. **346**(6281): p. 277-9.
189. McKeating, J.A., A. McKnight, and J.P. Moore, *Differential loss of envelope glycoprotein gp120 from virions of human immunodeficiency virus type 1 isolates: effects on infectivity and neutralization*. *J Virol*, 1991. **65**(2): p. 852-60.
190. Bachrach, E., *et al.*, *Efficient cell infection by Moloney murine leukemia virus-derived particles requires minimal amounts of envelope glycoprotein*. *J Virol*, 2000. **74**(18): p. 8480-6.
191. Gunther-Ausborn, S., *et al.*, *Role of hemagglutinin surface density in the initial stages of influenza virus fusion: lack of evidence for cooperativity [In Process Citation]*. *J Virol*, 2000. **74**(6): p. 2714-20.
192. Zavorotinskaya, T. and L.M. Albritton, *Suppression of a fusion defect by second site mutations in the ecotropic murine leukemia virus surface protein*. *J Virol*, 1999. **73**(6): p. 5034-42.
193. Rein, A., *et al.*, *Evidence for cooperation between murine leukemia virus Env molecules in mixed oligomers*. *J Virol*, 1998. **72**(4): p. 3432-5.
194. Andersen, K.B., *A domain of murine retrovirus surface protein gp70 mediates cell fusion, as shown in a novel SC-1 cell fusion system*. *J Virol*, 1994. **68**(5): p. 3175-82.
195. Benedict, C.A., *et al.*, *Targeting retroviral vectors to CD34-expressing cells: binding to CD34 does not catalyze virus-cell fusion*. *Hum Gene Ther*, 1999. **10**(4): p. 545-57.
196. Zhao, Y., *et al.*, *Identification of the block in targeted retroviral-mediated gene transfer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(7): p. 4005-10.



197. medicine, j.o.g., Journal of Gene Medicine, <http://www.wiley.com/wileychi/genmed>.
198. Rolink, A.G., J. Andersson, and F. Melchers, *Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity*. Eur J Immunol, 1998. **28**(11): p. 3738-48.
199. Mikkelsen, J. and F. Pedersen, *review*. .
200. Rowe, W.P., J.B. Humphrey, and F. Lilly, *A major genetic locus affecting resistance to infection with murine leukemia viruses. 3. Assignment of the Fv-1 locus to linkage group 8 of the mouse*. J Exp Med, 1973. **137**(3): p. 850-3.
201. Lilly, F., *Susceptibility to two strains of Friend leukemia virus in mice*. Science, 1967. **155**(761): p. 461-2.
202. Kuhmann SE et al, *Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1*. J. Virol 2000;**74**: 7005-15.
203. Stanchev TS et al, *Human immunodeficiency virus type 1 and chemokines: beyond competition for common cellular receptors*. Cytokine and Growth Factor Reviews 2001;**12**: 219-243.
204. Popik W et al, *Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway*. J. Virol 1998;**72**: 6406-13.
205. Badley AD et al, *Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis*. Blood 2000;**96**: 2951-64.
206. Siliciano RF. et al, *The role of CD4 in HIV envelope-mediated pathogenesis*. Curr Top Microbiol Immunol 1996;**205**: 159-79.
207. Chirmule N. et al, *Envelope glycoproteins of: profound influences on immune functions*. Microbiol Rev 1996;**60**: 386-406.

## **Resumen**

La entrada de los retrovirus a la célula es mediada por interacciones específicas entre la glicoproteína retroviral Env y moléculas de superficie celular expresadas en la membrana. A la hora actual, muy pocos datos concernientes a la cuantificación de este proceso son disponibles. En una primera serie de experimentos, utilizando un sistema de expresión inductible, hemos expresado diferentes cantidades de Env en la superficie de vectores retrovirales derivados del Virus Moloney de la Leucemia Murina (MoMLV) y de vectores lentivirales derivados de HIV-1. Estos vectores han sido utilizados para determinar su capacidad de infección. Los resultados muestran que pocas moléculas Env son suficientes para infectar una célula. Sin embargo, incrementando la densidad de Env se acelera claramente el proceso de infección. Además, a bajas concentraciones de Env expresadas en la superficie viral los datos sugieren que estas moléculas podrían actuar en forma cooperativa. Estas observaciones tienen importantes consecuencias con respecto a la mejor comprensión del proceso natural de infección retroviral, pero también a la hora de diseñar vectores retrovirales aplicados a la transferencia de genes o terapia génica.

Por otro lado, con la idea de poner a punto un sistema de *targeting* celular *in vivo*, hemos diseñado un vector retroviral competente para la replicación que permite infectar la mayoría de las células del bazo de ratones Swiss recién nacidos, durante la primera semana de infección. Estos vectores serán utilizados próximamente para una primera serie de experiencias de *targeting*. Estos resultados confirman un modelo de transducción eficaz de células del bazo de ratón en una ventana de tiempo determinada. No pudiendo todavía aplicar estos vectores en clínica, resultan al menos interesantes para análisis de diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas en modelos animales, como así también el estudio del desarrollo y la evaluación de diferentes moléculas que puedan interferir con este proceso.

## **Palabras claves**

Retrovirus - Vectores Retrovirales – *Envelope* – Infección - *Targeting* Celular – Terapia Génica – Sistemas Inducibles – Animales Transgénicos - Oncogénesis