



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Papel de los ácidos nucleicos citoplasmáticos de los baculovirus en la producción de IFN-I
en células no inmunes de mamífero

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Química Biológica

Lic. Sabrina Amalfi

Directora de Tesis: Dra. Victoria Alfonso

Consejero de Estudios: Dr. Luis Alberto Scolaro

Lugar de trabajo: Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular-IABIMO- INTA-
CONICET.

Fecha de defensa: 28/03/19

Papel de los ácidos nucleicos citoplasmáticos de los baculovirus en la producción de IFN-I en células no inmunes de mamífero

El baculovirus AcMNPV es un virus envuelto, con genoma DNA de doble cadena, patógeno de insectos. Posee un complejo ciclo de replicación bifásico en el que participan dos fenotipos: los virus brotados (BV) y los virus derivados de los cuerpos de oclusión (ODV), los cuales son estructural y funcionalmente distintos. Los BV son capaces de transducir genes bajo la regulación de un promotor adecuado en células de mamífero, aunque no pueden replicar su genoma en este hospedador. Dentro de las aplicaciones de los baculovirus como herramienta biotecnológica en mamíferos, se destacan su uso para el desarrollo de vacunas, para el *delivery* de genes y como inmunomoduladores. Se ha descrito una potente respuesta inmune innata inducida por BV en mamíferos, capaz de montar un estado antiviral inespecífico por vías independientes de TLR. Así, este trabajo de Tesis tiene como finalidad estudiar la participación de los ácidos nucleicos baculovirales citosólicos en la producción de un estado antiviral en células no inmunes de mamífero. En primer lugar, mediante ensayos de transcripción con baculovirus recombinantes se demostró que el citoplasma es el principal destino que alcanza el genoma baculoviral en distintos tipos celulares no inmunes. A continuación, se observó que los BV -pero no los ODV- son capaces de producir un estado antiviral y un aumento de IFN β en fibroblastos murinos. Además, se determinó que baculovirus pseudotipados con la proteína G (VSV) ingresan a la célula de manera más eficiente pero no producen mayores niveles de IFN β . Finalmente, se estudió la participación de distintos sensores citosólicos de DNA en células murinas y en células humanas infectadas con BV y se observó que la enzima RNA Pol III no está relacionada en el establecimiento del estado antiviral. La vía cGAS-STING en células murinas fue estudiada mediante edición génica por CRISPR-Cas9, mientras que en células epiteliales humanas se estudió mediante transcomplementación de cGAS o cGAS y STING en las células HEK293 y HEK293 T, respectivamente. Los resultados mostraron que STING es una proteína necesaria para el establecimiento de un estado antiviral en células de mamífero. Además, al menos dos vías de señalización distintas impactan en STING y contribuyen al estado antiviral por baculovirus. La detección del genoma viral por el sensor cGAS induce la respuesta celular más potente y es necesaria para la producción de IFN β . Además, la activación de STING, de un modo cGAS independiente, da lugar a un estado antiviral en el cual, en células epiteliales humanas, participa la producción de IFN λ 1. En conclusión, los resultados de esta Tesis muestran que el genoma del baculovirus AcMNPV disponible en alta proporciones en el citosol en el contexto de infección de células no inmunes de mamífero, desempeña un papel relevante en el establecimiento de un estado antiviral y en la producción de IFN I y III a través del impacto en la vía de reconocimiento de ácidos nucleicos cGAS-STING.

Palabras claves: AcMNPV, sensores de ácidos nucleicos, interferones, STING, cGAS.

Role of the cytoplasmic nucleic acids of the baculovirus AcMNPV in the production of a IFN-I in non-immune mammalian cells

The baculovirus AcMNPV is an enveloped virus with a double-stranded DNA genome and is a pathogen of insects. It possesses a complex biphasic replication cycle with two phenotypes involved: budded virus (BV) and occlusion-derived virus (ODV), which are structurally and functionally different. The BV is capable of transducing genes under the control of an adequate promoter in mammalian cells, although it cannot replicate its genome in this host. Among the applications of baculoviruses as a biotechnological tool in mammals, is worth mentioning their use for vaccine development, gene delivery and as immunomodulators. A strong innate immune response induced by BV in mammals has been described, and it is capable of inducing an unspecific antiviral state, independent of TLR pathways. Thus, this thesis aims to study the role of baculoviral cytoplasmic nucleic acids in the production of an antiviral state in non-immune mammalian cells. First, transcription assays with recombinant baculovirus showed that cytoplasm is the main destination reached by baculoviral genome in different non-immune cell lines. Next, it was observed that BVs -but not ODVs- are capable of producing an antiviral state and an increase of IFN β in murine fibroblasts. Furthermore, we determined that baculoviruses pseudotyped with protein G (VSV) enter the cell more efficiently without the production of higher levels of IFN β . Finally, we studied the involvement of different cytosolic DNA sensors in murine and human cells infected with BV. It was observed that RNA Pol III does not participate in the establishment of the antiviral state. We then studied the cGAS-STING pathway with CRISPR-Cas9 gene editing in murine cells, whereas in human epithelial cells was studied with trans-complementation of cGAS or cGAS and STING in HEK293 and HEK293 T, respectively. The results showed that STING is required for the establishment of an antiviral state in mammalian cells. Moreover, at least two different signaling pathways have an impact on STING and contribute to the baculovirus induced antiviral state. The detection of the viral genome by cGAS sensing induces the strongest cellular response and it is necessary for the production of IFN β . Additionally, the cGAS-independent STING activation produces an antiviral state in human epithelial cells where the production of IFN λ 1 is involved. In conclusion, the results of this thesis show that the genome of the baculovirus AcMNPV available in high levels in the cytosol during the infection of non-immune mammalian cells, has a relevant role in the establishment of an antiviral state and in the production of IFN I and III through its impact in the nucleic acids sensing pathway of cGAS-STING.

Keywords: AcMNPV, nucleic acids sensors, interferons, STING, cGAS.

Abreviaturas de uso frecuente de esta Tesis:

AcMNPV: *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus

BHK-21: células derivadas de tejido renal de hámsteres neonatos

BV: virus brotado (del inglés: *budded virus*)

CAG: promotor sintético de expresión en mamífero

cGAS: del inglés: *cyclic GMP-AMP synthase*

cGAMP: del inglés: *cyclic GMP-AMP*

CRISPR: del inglés: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

DNA: ácido deoxiribonucleico

dsDNA: ácido deoxiribonucleico de cadena doble

dpi: días postinfección.

eGFP: proteína fluorescente verde (del inglés.: *green fluorescent protein*).

HEK293; HEK293 T: líneas celular epitelial derivada de tejido embrionario de riñón humano

hpi: horas portinfección

IFN: interferones

IFNAR: receptor heterodimérico IFN α/β

IL: interleuquinas

MAVS: del inglés: *mitochondrial antiviral-signaling protein*

MEF: fibroblastos de embrión murino

MOI: multiplicidad de infección (del inglés: *multiplicity of infection*).

mRNA: ARN mensajero

MyD88: factor de diferenciación mieloide 88 (del inglés: *myeloid differentiating factor 88*)

NF- κ B: factor nuclear kappa B (del inglés: *nuclear factor-kappa B*)

NIH/3T3: línea celular fibroblástica derivada de tejido embrionario de ratón

Abreviaturas

ODV: virus derivado de cuerpo de oclusión (del inglés: *occlusion-derived virus*)

PAM: protospacer adjacent motif

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés: *pathogen-associated molecular patterns*).

PPR: receptores de reconocimiento de patrones (del inglés: *pattern recognition receptors*)

RIG-I: del inglés: *retinoic acid inducible gene I*

RNA: ácido ribonucleico

RNA Pol III: enzima RNA polimersa tipo III

Sf9: línea celular derivada de tejido ovárico de *Spodoptera frugiperda*.

sgRNA: del inglés: single guide RNA

STING: del inglés: *stimulator of interferon genes*

T7 RNA Pol: enzima RNA polimerasa del fago T7

TCID₅₀: dosis infectiva 50 en cultivo de tejido (del inglés: *tissue culture infective dose 50*).

TLR: del inglés: *Toll like receptor*

TNF- α : del inglés: *Tumor necrosis factor*

UFP: unidades formadoras de placas de lisis.

Vero E6: línea celular derivada de tejido renal de mono africano verde.

VSV: virus de la estomatitis vesicular (del inglés: *vesicular stomatitis virus*)

INTRODUCCIÓN.....	1
Los baculovirus.....	1
Ciclo de infección en las células de insecto	3
Aplicaciones biotecnológicas de los baculovirus	4
Los baculovirus y las células de mamífero	5
Baculovirus como vectores de expresión en mamíferos.....	6
Baculovirus como inmunomoduladores y antivirales	7
Respuesta inmune innata en las infecciones virales: impacto de los baculovirus en mamíferos	8
Citoquinas.....	9
Interferones.....	9
Receptores de tipo Toll (TLR)	12
Sensores citosólicos	13
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	21
RESULTADOS	22
Evaluación de la proporción de genomas de baculovirus en el citoplasma y/o el núcleo de distintos tipos celulares de mamífero	22
Detección de genomas baculovirales accesibles en células de mamífero.....	22
Ensayo de hibridación fluorescente <i>in situ</i>	30
Estudio de la respuesta antiviral en células de mamífero no inmunes mediada por la infección con baculovirus de fenotipo brotado y derivados de los cuerpos de oclusión	31
Evaluación del estado antiviral generado luego de una infección con baculovirus brotados y derivados de los cuerpos de oclusión	32
Evaluación de la producción del mRNA de IFN β luego de una infección con baculovirus.....	34
Estudio de la producción relativa de los mRNA de distintos sensores de ácidos nucleicos.....	35
Diseño, construcción y evaluación de baculovirus recombinantes que lleven en su genoma secuencias para modular la actividad antiviral	36
Baculovirus pseudotipados con la glicoproteína G de VSV	36
Incorporación en el genoma viral de la secuencia VACV 70mer.....	41
Estudio de las vías de detección de dna citosólico en el contexto de una infección con baculovirus de fenotipo brotado en distintas células no inmunes de mamífero	42

Evaluación de la vía de la RNA Pol III en la producción de la actividad antiviral dada por la infección en células no inmunes con baculovirus	42
Estudio de la participación de STING y cGAS en el estado antiviral despertado por la infección de células no inmunes con baculovirus	43
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES.....	81
MATERIALES Y MÉTODOS	82
1.Células de insecto y mamífero, cepas bacterianas y virus.....	82
2.Reactivos y plásmidos.....	83
3.Técnicas de biología molecular y clonado generales.....	85
4.Técnicas virológicas.....	91
5.BV recombinantes	95
6.Construcción de otros plásmidos	100
7.Ensayos de transducción	101
8.Hibridación fluorescente in situ	102
9.Inmunomicroscopía de fluorescencia	103
10.Cuantificación de la intensidad de fluorescencia.....	103
11.Ensayo de actividad antiviral.....	103
12.Medición de la abundancia relativa de mRNA por RT-qPCR.....	104
13.Edición de las células NIH/3T3	106
14.Ensayos de transcomplementación.....	111
15.Análisis estadístico	112
BIBLIOGRAFÍA	113

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

LOS BACULOVIRUS

Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) y sus fenotipos

Los virus de la familia *Baculoviridae* son patógenos de insectos, principalmente de aquellos que pertenecen al orden *Lepidoptera*, aunque algunas especies de baculovirus también infectan los órdenes *Diptera* e *Hymenoptera* [1]. Son virus envueltos, con genomas de DNA circular de cadena doble de tamaño de entre 80 y 180 kpb [2][1]. El genoma está contenido en una nucleocápside de alrededor de 300 nm, con forma de vara, que da lugar al nombre de la familia [2]. Se los subdivide en cuatro géneros: *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Deltabaculovirus* y *Gammabaculovirus* [3]. El género *Alphabaculovirus* es el más estudiado y dentro de él se encuentra el virus objeto de esta Tesis: AcMNPV, al cual haremos referencia de aquí en adelante.

Los baculovirus poseen un complejo ciclo de replicación bifásico en el que participan dos fenotipos, característica que parece ser única entre los virus eucariotas. Los dos tipos de viriones son: los virus brotados (BV, del inglés *budded virus*) y los virus derivados de los cuerpos de oclusión (ODV, del inglés *occlusion-derived virus*.) [1]. Los viriones de los dos fenotipos presentan el mismo contenido genómico y se dice que comparten la misma nucleocápside, formada mayoritariamente por VP39, aunque se han visto algunas diferencias menores entre ellas [4]. En los aspectos que más se diferencian los dos fenotipos virales son en la composición de sus envolturas, en los sitios de la célula en los que se producen y en los papeles que desempeñan en el ciclo de infección (Fig. I1).

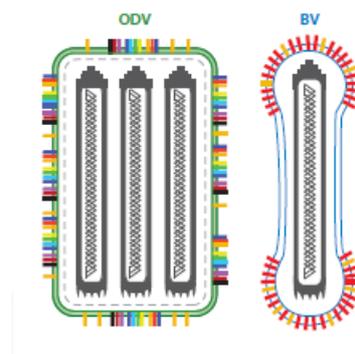


Figura I1: Comparación estructural de los dos fenotipos de viriones de AcMNPV: Virus derivados de los cuerpos de oclusión (ODV) y virus brotados (BV). Los viriones de los dos fenotipos presentan el mismo contenido genómico, pero son estructural y funcionalmente distintos. Adaptado de [4].

En el caso de los ODV, las nucleocápsides adquieren la envoltura dentro del núcleo y los viriones se ocluyen dentro de una matriz proteica, principalmente compuesta por la proteína poliedrina, para formar cuerpos de oclusión, estructuras que protegen físicamente

a los viriones en el ambiente [1]. Cada cuerpo de oclusión de AcMNPV contiene entre 10-30 viriones con entre 5-25 nucleocápsides cada uno [5]. Por lo tanto, un solo cuerpo de oclusión de AcMNPV puede transportar cientos de nucleocápsides. Los cuerpos de oclusión o poliedros son estables y sólo se disuelven en condiciones alcalinas del entorno. De esta manera, tras la ingesta y en el elevado pH del intestino medio de las larvas, se disuelven y liberan los ODV dando lugar a la infección primaria del insecto. Los viriones ingresan a las células epiteliales por reconocimiento de receptores y posterior fusión de membranas, procesos en los que participa un complejo viral conformado por al menos 9 proteínas [6]. Después de la infección de las células del intestino medio, los BV brotan de las superficies basales de las células epiteliales hacia la hemolinfa y transmiten la infección sistémicamente de célula a célula y de tejido a tejido dentro del animal infectado [1] (Fig. 12).

A diferencia de la envoltura de los ODV, la envoltura de los BV se adquiere de la membrana plasmática durante la brotación y contiene la glicoproteína GP64 como la proteína más abundante. GP64 es una proteína de fusión de clase III, que posee N-glicosilaciones adquiridas en su tránsito por el retículo endoplasmático y aparato de Golgi y es incorporada en los BV durante el proceso de brotado [1]. El brotado desde el citoplasma al medio extracelular, así como también la adhesión y la entrada de los BV a las células, se producen con la participación central de esta proteína, aunque hasta el momento su receptor asociado no se ha identificado [7][8][9]. Existen diversas hipótesis al respecto, como por ejemplo que GP64 se une a fosfolípidos en la membrana plasmática de la célula [10] y no a una proteína celular [11][12][13]. En este sentido se ha visto que los virus brotados de AcMNPV se unen a liposomas que no contienen proteínas y se ha demostrado que esta unión aumenta cuando las membranas de los liposomas contienen fosfolípidos, lo que sugiere que las interacciones de GP64 con las cabezas cargadas de fosfolípidos pueden ser un factor crítico para la unión de los BV a la célula hospedadora [10][14].

Después de unirse a la superficie celular, los BV ingresan a las células por endocitosis mediada por clatrina [8][15][16]. Poco se sabe sobre el tráfico endosómico que se produce inmediatamente después de la entrada desde la superficie celular, pero varios estudios han identificado que la formación de vesículas y el tráfico son procesos necesarios o importantes [17][18][19].

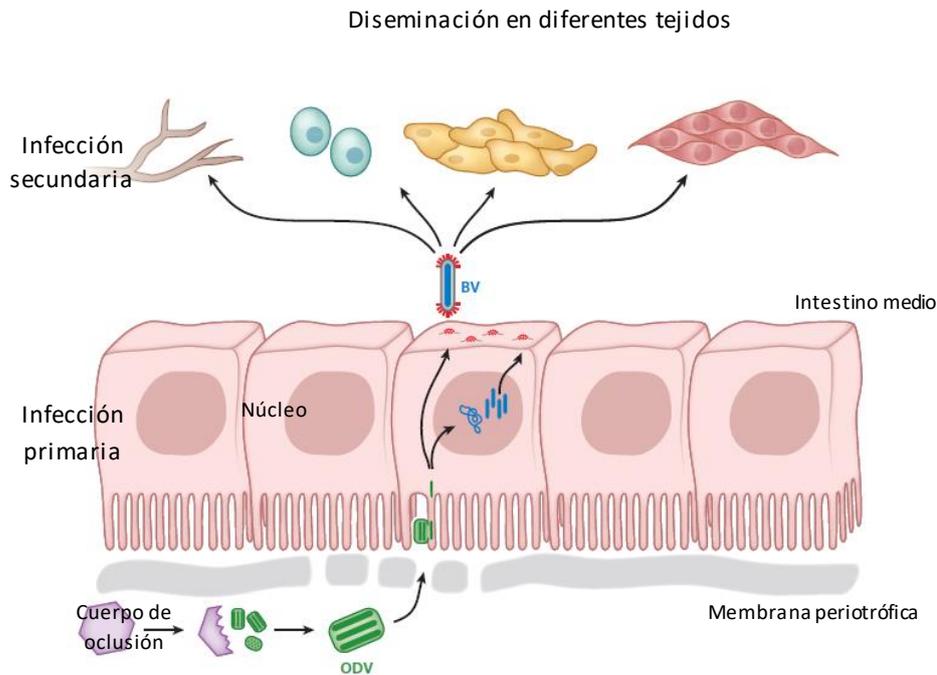


Figura 12: Papel de cada virión de AcMNPV. Los cuerpos de oclusión tras la ingesta son disueltos en el intestino medio de la larva, liberando a los ODV y dando lugar a la infección primaria. Los BV brotan de la superficie basal de las células epiteliales, dando lugar a la infección secundaria. Adaptado de [4].

CICLO DE INFECCIÓN EN LAS CÉLULAS DE INSECTO

Una vez dentro de las células, las nucleocápsides virales que se liberan de su envoltura migran al núcleo, donde son desensambladas y comienza la transcripción de genes tempranos involucrados en la replicación del virus. La expresión génica de los baculovirus tiene lugar en cuatro fases (Fig. 13) [20][21]. Éstas son las fases temprana inmediata, temprana retrasada, tardía y muy tardía. La fase temprana inmediata está asociada con la expresión de transreguladores virales y genes que no necesitan transreguladores para una transcripción efectiva. Los genes expresados están principalmente implicados en el establecimiento de la infección. La fase temprana retrasada se asocia con la expresión de genes asociados a la replicación del virus y a la manipulación de la célula infectada. Son genes que en general requieren la presencia de transreguladores virales para una transcripción eficiente. La fase tardía está asociada con la producción de nucleocápsides. La transición de la fase temprana a la fase tardía se caracteriza por la terminación de la replicación del DNA y la síntesis de las proteínas estructurales de ambos fenotipos. Se producen virus brotados y se disemina la infección en todo el organismo. En la fase muy tardía de la expresión génica, las proteínas poliedrina y P10 se producen en grandes cantidades, lo que da lugar a la oclusión de los viriones en el núcleo [20]. Mientras que la proteína poliedrina forma la matriz de los cuerpos de oclusión, el papel de P10 no está claro, aunque parece estar relacionado con la liberación de los poliedros del núcleo [20][22].

Las proteasas virales lisan la célula huésped y degradan el exoesqueleto quitinoso del insecto, de modo que el virus contenido en los cuerpos de oclusión se disperse en los alrededores para la transmisión horizontal.

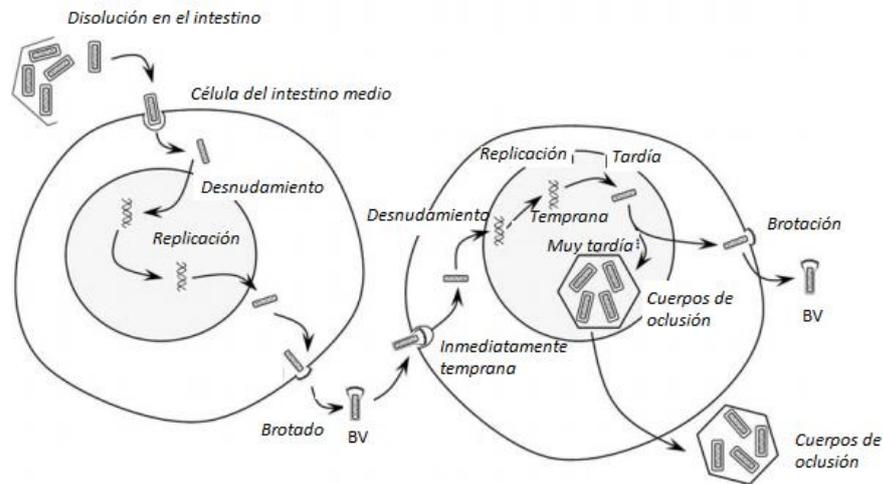


Figura 13: Ciclo de infección de *AcMNPV* en célula de insecto. Adaptado de [23].

APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS BACULOVIRUS

Una de las primeras aplicaciones de los baculovirus como herramienta biotecnológica fue su uso como controlador biológico de plagas en la industria agrícola [1][24]. Adicionalmente, el sistema de expresión baculovirus- células de insecto (BEVS, del inglés: *baculovirus expression vector system*) es ampliamente utilizado para la producción de proteínas recombinantes [21][25][26]. Una de las ventajas de este sistema es que las células de insecto realizan la mayoría de las modificaciones postraduccionales que ocurren en las células de mamífero [25], aunque las glicosilaciones en insectos son más uniformes y menos complejas [27][28]. Además, la construcción, propagación y manejo de baculovirus se pueden realizar fácilmente en laboratorios de Bioseguridad Nivel 1. Tanto poliedrina como P10 son proteínas involucradas en la transmisión horizontal en la población pero no son necesarias para la producción de viriones brotados [20]; esta característica permitió que los genes de ambas proteínas puedan ser reemplazados para la expresión de proteínas heterólogas en cultivo de células de insecto. Además, los promotores de ambos genes muy tardíos tienen la característica de ser fuertes y permiten lograr altas cantidades de proteínas recombinantes sólo en la etapa muy tardía de la infección [29][30].

Si bien tradicionalmente a los baculovirus se los ha utilizado y se los continúa estudiando y mejorando como sistema de expresión de proteínas y como biocontroladores de plagas de importancia agronómica, en los últimos años también están siendo explorados como herramientas biotecnológicas en mamíferos. Varios trabajos han demostrado la viabilidad de utilizar baculovirus recombinantes para inducir inmunidad tanto humoral como mediada por células contra diversos antígenos en diferentes modelos animales [31]. Para ello, se ha propuesto el *display* en la superficie [32][33] y en la cápside de los baculovirus [34], así como su utilización como vectores para dirigir la síntesis *de novo* de antígenos [35]. Un estudio reciente de nuestro grupo de trabajo comparó las diferentes estrategias utilizando OVA como antígeno y demostró que la localización determina en gran medida la calidad e intensidad de la respuesta adaptativa al antígeno heterólogo. La localización en la superficie favorece la respuesta humoral, mientras que la localización en la cápside favorece la respuesta citotóxica [36].

LOS BACULOVIRUS Y LAS CÉLULAS DE MAMÍFERO

Los baculovirus tienen un amplio tropismo que permite su entrada no sólo a las células de insecto sino también a varios tipos celulares de mamífero [37]. Se ha demostrado que baculovirus recombinantes de fenotipo brotado son capaces de transducir genes en células de mamífero bajo el control de promotores adecuados, con una eficiencia variable dependiendo del tipo celular. Sin embargo, no tienen la capacidad de replicar su genoma en este hospedador, dando lugar a un ciclo abortivo sin producción viral [38][39][37].

Aunque los receptores críticos requeridos para la entrada de los baculovirus en células de mamífero no han sido establecidos, se sabe que es a partir de interacciones que involucran a la proteína viral GP64 y que la unión de los virus a la superficie celular da lugar a su internalización a través de *lipid rafts* [40]. Sin embargo, la vía de entrada aún es controvertida y se especula que involucra endocitosis mediada por clatrina y/o macropinocitosis [16] [40][41], aunque también está descrita una entrada independiente de estos mecanismos, probablemente por fagocitosis [42].

Una vez dentro de la célula, está descrita la liberación de las nucleocápsides en el citoplasma, mediada por un descenso del pH que conduce a la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma y la migración de las nucleocápsides hacia al núcleo a través de un mecanismo dependiente de actina, que se especula que sería similar al que ocurre en la célula de insecto [43][44]. A las 4 horas postinfección se han visto las nucleocápsides alineadas con los poros nucleares de las células de mamífero [41][44].

Si bien los baculovirus en células de mamífero presentan un ciclo viral abortivo, se ha demostrado la transcripción de algunos genes baculovirales luego de la infección en estas

células, principalmente genes inmediatamente tempranos y tempranos [45][46][47]. El estudio del transcriptoma baculoviral en células HeLa14 y BHK-21 mostró la presencia de transcriptos en común entre las distintas líneas celulares y de algunos mRNA diferenciales para cada tipo de célula [45]. Además, se ha descrito el papel de la proteína viral IE-1 como transactivadora de la expresión de genes baculovirales en células Vero E6 y en células HEK293 [48][49].

BACULOVIRUS COMO VECTORES DE EXPRESIÓN EN MAMÍFEROS

El hecho de que el genoma de los baculovirus pueda ingresar al núcleo de células de mamífero, brindó la posibilidad de comenzar con el desarrollo de vectores baculovirales para el *delivery* de genes en vertebrados [38]. Los baculovirus no sólo presentan la ventaja de no diseminarse en células o tejidos no deseados, sino que además toleran la inserción de grandes secuencias génicas heterólogas ya que poseen una elevada flexibilidad en el tamaño del genoma viral empaquetado. Los métodos de obtención de virus recombinantes son relativamente sencillos, se producen cantidades detectables de proteínas recombinantes bajo promotores de mamíferos, los vertebrados no poseen inmunidad preexistente contra ellos, presentan una baja citotoxicidad y no resultan en la integración en el genoma celular [50][50][51][52].

Así, existen investigaciones orientadas a utilizar a los baculovirus en el campo de la terapia antitumoral [53], como vectores para la producción de proteínas en mamíferos [54], como vectores que portan factores de transcripción para la reprogramación celular [55] [56][57], también en el área de la ingeniería de tejidos [54] o para la edición del genoma de la célula huésped de una manera segura y eficiente [58] (Fig. 14).

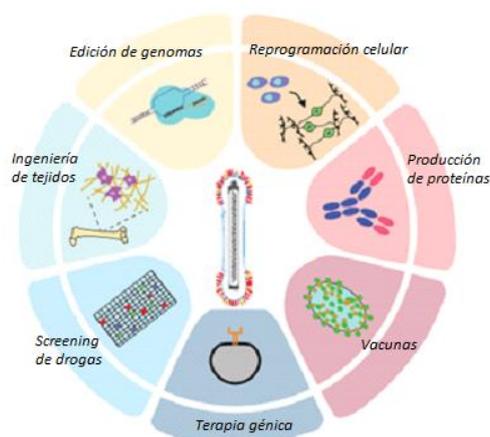


Figura 14: Aplicaciones de los baculovirus como vectores para el *delivery* de genes. Adaptado de [59]

Desde que se realizaron los primeros estudios de transducción con baculovirus y células de origen hepático [60][61], muchos trabajos se han llevado adelante explorando la posibilidad de transducir líneas celulares de diversos orígenes e intentando mejorar las eficiencias de expresión del transgén observadas. Así, se han transducido con éxito tanto cultivos primarios de células indiferenciadas o diferenciadas como líneas celulares establecidas [52]. Los baculovirus pueden expresar genes heterólogos en células de origen epitelial, hepáticas, células inmunes, del tejido nervioso y fibroblastos, de una gran variedad de especies animales [52]. Dada la heterogeneidad de las eficiencias observadas en cada caso, muchas veces se ha intentado potenciar la capacidad de transducción. La estrategia más difundida es la modificación de la envoltura de los baculovirus, por ejemplo a través del incremento de la cantidad de GP64 en la membrana [62] o la construcción de baculovirus recombinantes que porten una glicoproteína de envoltura derivada de otro virus. Se demostró que baculovirus que sobreexpresan GP64 pueden incorporar entre 1,5 a 2 veces la cantidad normal de esta proteína en los viriones brotados. Estos virus aumentan la transducción del gen reportero entre 10 a 100 veces en una variedad de líneas celulares [62]. Por otro lado, baculovirus pseudotipados con la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) completa o truncada (VSV-GED) tienen un tropismo más amplio y mayor eficiencia de expresión del transgén en células de mamífero [63][62][64][65]. La versión truncada de la proteína está compuesta por los dominios citoplásmicos y el ectodominio de G de 21 aminoácidos. Probablemente G-VSV aumente la proporción de cápsides que escapan de los endosomas a través de su actividad fusogénica, en lugar de mejorar la unión o la entrada de los virus a las células, lo que incrementa el transporte del genoma viral hacia el núcleo [60]. Además, se ha descrito que baculovirus pseudotipados con G-VSV son capaces, en células de insecto, de complementar la función de GP64 en su ausencia; sin embargo, la cinética de la infección se ve retrasada y los títulos virales se reducen entre 1 a 2 órdenes en comparación con los de tipo salvaje [66]. Adicionalmente, se ha descrito un aumento de entre 5 y 10 veces la expresión de un gen reportero *in vivo*, después de la inyección de baculovirus pseudotipados con G-VSV en ratones BALB/c y C57BL/6 [67]. Los virus pseudotipados proporcionan una resistencia mejorada a la inactivación del complemento en humanos, conejos, cobayos, hámsteres y ratones [63].

BACULOVIRUS COMO INMUNOMODULADORES Y ANTIVIRALES

Un aspecto que muchas veces es mencionado como una limitación para el uso de los baculovirus *in vivo* es la potente respuesta inmune innata que ellos despiertan en mamíferos; sin embargo, esta reacción también puede resultar beneficiosa. Dado que no son patógenos de vertebrados, no han sido sujetos a un proceso evolutivo junto con ellos,

por lo que no han desarrollado estrategias de evasión a la respuesta que despiertan. El estado antiviral que adquieren las células infectadas no productivamente con baculovirus y las células adyacentes puede ser utilizado como una estrategia antitumoral [68], para conferir resistencia a patógenos de un modo inespecífico [69][70] o para adyuvar la respuesta inmune contra antígenos coadministrados o vehiculizados por baculovirus recombinantes [34][36]. Así, está demostrado que su administración es capaz de conferir protección contra el virus de la encefalomiocarditis, el virus de la fiebre aftosa y el virus de influenza en ratones, y contra el virus de la bronquitis infecciosa en aves [71][70][69][72].

Dada la amplia gama de efectos que los baculovirus producen en diferentes tipos celulares de distintos mamíferos, conocer los cambios fenotípicos que sufren estas células de mamífero como consecuencia de su interacción con los baculovirus es de interés tanto para evaluar la seguridad de su utilización como vectores de genes como para sacar ventaja de sus propiedades en el desarrollo de respuestas inmunológicas innatas y adaptativas.

RESPUESTA INMUNE INNATA EN LAS INFECCIONES VIRALES: IMPACTO DE LOS BACULOVIRUS EN MAMÍFEROS

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra las enfermedades infecciosas y el daño tisular. Los macrófagos y las células dendríticas, así como algunas células no inmunes como las células epiteliales, las células endoteliales y los fibroblastos, desempeñan un papel importante en el reconocimiento de patógenos durante la respuesta inmune innata [73]. Las células reconocen estructuras denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Los diferentes PRR reaccionan con PAMP específicos, activan vías de señalización específicas e inducen respuestas inmunes innatas que inhiben varias etapas de la infección.

El ciclo de replicación de los virus incluye una fase citosólica de la amplificación del genoma y/o del procesamiento del mRNA y de la expresión de proteínas virales. El reconocimiento de los PAMP virales por los PRR induce la producción de interferones de tipo I (IFN I) y citoquinas proinflamatorias. Estas moléculas efectoras tienen actividad antiviral directa, inducen genes antivirales y/o mejoran la respuesta inmune adaptativa para controlar la infección viral [74][75].

Citoquinas

Las citoquinas son polipéptidos o glicoproteínas extracelulares cuya función principal es la de señalización celular. Son sintetizados por diferentes células, principalmente, por células T, neutrófilos y macrófagos, que son responsables de promover y regular la respuesta inmune a través de la diferenciación, proliferación y producción de células y otras citoquinas. Estos polipéptidos actúan sobre la señalización de moléculas y células, estimulándolos hacia sitios de inflamación e infecciones. Se han descubierto diferentes tipos de citoquinas, incluidas las quimiocinas, los interferones, las interleuquinas (IL) y el factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés: *Tumor necrosis factor*) [76][77][78][79].

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria producido por una gran variedad de células, principalmente macrófagos, en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo las infecciones virales. Tiene actividad antiviral y estimula la producción de otras citoquinas [80].

Las IL son un grupo de proteínas involucradas en la comunicación entre los leucocitos. Están íntimamente relacionadas con la activación y supresión del sistema inmunológico y la división celular. Son producidas principalmente por linfocitos T CD4 +, monocitos, macrófagos y células endoteliales [81][82]. En particular, las IL-1 β e IL-18 se producen en casi todas las células humanas y tienen formas precursoras que no son activas y requieren de un clivaje mediado por la caspasa-1 para convertirse en la forma activa [83][84]. La vía de señalización de IL-1 β se inicia con el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88 (del inglés: *myeloid differentiating factor 88*) y culmina con la translocación del factor nuclear kappa B (NF- κ B, del inglés: *nuclear factor-kappa B*) al núcleo y la expresión de genes inflamatorios [84][85].

Finalmente, las quimiocinas estimulan el movimiento de los leucocitos y regulan su migración de la sangre a los tejidos, en un proceso llamado quimiotaxis. Controlan las células inmunes homeostáticas, como los neutrófilos, las células B y los monocitos, y el tráfico entre la médula ósea, la sangre y los tejidos periféricos [86].

Interferones

Los interferones (IFN) son proteínas que distintos tipos celulares producen como respuesta a estímulos diversos, entre los que destacan las infecciones víricas. Los IFN se clasifican en tres tipos, I, II y III, según la estructura de sus receptores en la superficie de la membrana celular [87].

Los IFN I pueden ser producidos por todas las células nucleadas en respuesta a infecciones virales o microbianas. En mamíferos, los IFN I están compuestos por IFN α , β , ϵ ,

κ , ω , τ , δ , ζ y ν [88]. El IFN- α es producido principalmente por leucocitos, mientras que el IFN β se produce mayormente en fibroblastos [89].

Todos los IFN I se unen al mismo receptor heterodimérico IFN α/β (IFNAR) [88] (Fig. 15). IFNAR se expresa en casi todos los tipos de células y consta de las subunidades IFNAR1 e IFNAR2 que están asociadas con TYK2 (del inglés: *tyrosine kinase 2*) y JAK1 (del inglés: *Janus kinase 1*), respectivamente. La unión a IFNAR da como resultado la activación de TYK2 y JAK1 que fosforilan los residuos de tirosina en los dominios citoplasmáticos de IFNAR, creando así sitios de acoplamiento para STAT (del inglés: *signal transducers and activators of transcription*), que luego son blanco de JAK1 para la fosforilación. Los STAT fosforilados (pSTAT) forman homodímeros o heterodímeros y se translocan al núcleo [87]. El homodímero pSTAT1 se une a la región promotora de los ISG (del inglés: *interferon stimulated genes*) e inicia la transcripción de éstos, mientras que el homodímero formado por pSTAT3 activa la transcripción de genes con sitios de unión en el *enhancer*. STAT1 y STAT2 fosforilados forman un heterodímero que conduce al reclutamiento de IRF9 (del inglés: *interferon regulatory factor 9*) y a la formación del ISGF3 (del inglés: *IFN-stimulated gene factor 3*). Este complejo luego se transloca al núcleo y se une a ISRE (del inglés: *IFN-stimulated response elements*) en la región promotora de los genes ISG para iniciar la transcripción de genes que son fundamentales para la actividad antiviral. La activación de JAK también puede inducir varias vías de señalización alternativas, incluidas las vías PI3K, NF- κ B y MAPK, que amplifican aún más la intensidad y la magnitud de la señalización del IFN I. La activación de la vía JAK-STAT da lugar a la activación de los ISG y la subsiguiente formación de proteínas antivirales como OAS, PKR, ISG y Mx [90][91]. Además, las células dendríticas en respuesta a IFN I aumentan la expresión de las quimiocinas, reclutando a las células NK, linfocitos T y B al sitio de la infección, e IL-15. Todos estos efectos celulares intrínsecos y extrínsecos de los IFN I preparan al sistema inmune para montar una respuesta eficaz contra los patógenos intracelulares [92].

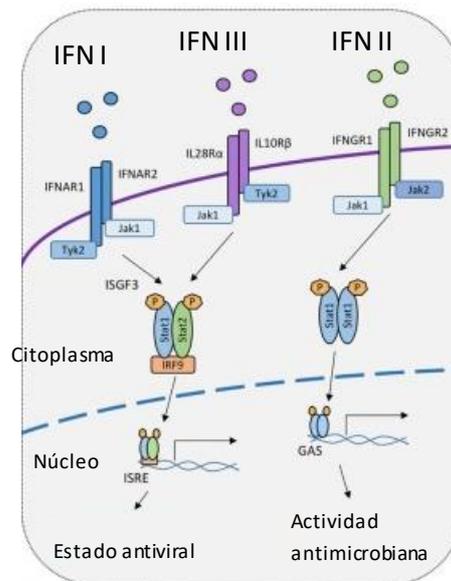


Figura 15: Esquema representativo de la vía de señalización JAK-STAT. Adaptado de [92].

Se ha visto que los baculovirus son capaces de inducir en su interacción con mamíferos la producción de IFN I y citoquinas proinflamatorias tanto *in vivo* como *in vitro* [70][93][69][94][95]. Ya en el año 1999, Gronowski y colaboradores demostraron la producción de IFN α y β luego del tratamiento con baculovirus en fibroblastos de embrión murino (MEF) empleando la línea de fibroblastos murinos CL.7, en la línea celular de fibroblastos humanos NHDF y en la línea de macrófagos RAW264.7, aún sin describir los mecanismos involucrados [69].

Mientras que los IFN I están diversificados en nueve variantes, los IFN II, tiene un solo representante, el IFN- γ . Esta citoquina juega un papel importante en la activación de macrófagos, tanto en respuestas inmunes innatas como adaptativas. Prácticamente todas las células expresan receptores de IFN γ , mientras que su producción está restringida a ciertos tipos de células, como células NK y linfocitos T [96]. A pesar de pertenecer a la familia de los interferones, el IFN- γ no produce un potente efecto antiviral, sino que principalmente actúa como un activador de las células efectoras del sistema inmune [96]. En la inmunidad adaptativa, el IFN- γ es producido por las células T en respuesta al reconocimiento de antígenos [96].

En particular, se ha demostrado que en el suero de ratones inyectados con el baculovirus AcMNPV es posible detectar elevados niveles de IFN γ a las 6 h postinyección, principalmente debido a la participación de células NK y NKT [34][97].

La familia de IFN III está formada por IFN λ 1, IFN λ 2, IFN λ 3 e IFN λ 4 [98]. En humanos, IFN λ 1 es la especie más y mejor estudiada, pero el homólogo en ratones es un pseudogen [99]. Los IFN III envían señales a través del receptor IFN λ (IFN λ R). Al igual que con IFNAR, la unión al IFN λ R produce la activación de la señalización de JAK/STAT, la expresión de ISG y

la inducción de un estado antiviral. Sin embargo, a diferencia del IFNAR, que se expresa en prácticamente todos los tipos de células, el IFN λ R sólo se expresa en tejidos de origen epitelial [100][101][102]. En consecuencia, los IFN III no pueden conferir protección contra infecciones sistémicas por virus, pero son más efectivos para controlar las infecciones virales en las superficies de las mucosas [103][104][105]. Al igual que los IFN I, los IFN III responden a la activación de PRR por virus con genomas de RNA [106][107][108]. Los IFN I y III están regulados diferencialmente a nivel transcripcional. El IFN I se induce por las acciones combinadas de los factores de transcripción AP-1, IRF3, IRF7 y NF- κ B. Los sitios de unión para cada conjunto de factores de transcripción se localizan muy próximos entre sí y la expresión de IFN β requiere la unión cooperativa de todos los activadores en el enhanceosoma [109]. La producción de IFN β requiere tanto NF- κ B como IRF3, mientras que IRF7 se requiere para la producción de IFN α [110]. El promotor de IFN λ 1 contiene sitios de unión para los mismos conjuntos de factores de transcripción; sin embargo, sólo se requieren IRF3, 7 y NF- κ B para la inducción de IFN III [108] [107]. Además, ambas familias de IFN contienen sitios de enlace para IRF1. Sin embargo, hay estudios que indican que IRF1 en ausencia de otros factores no induce IFN β [108], sino que controla la expresión de IFN III en respuesta a los virus de RNA [108] [111][112]. Por otro lado, se sabe que los IFN III son inducidos y protegen contra virus DNA; sin embargo, los mecanismos precisos que impulsan estos procesos aún no se han sido dilucidados [113][114][115].

Receptores de tipo Toll (TLR)

Los TLR son una familia de proteínas PRR localizados en las membranas plasmáticas o de los endosomas de la célula. Una vez activados, reclutan moléculas adaptadoras como MyD88, TRIF (del inglés: *TIR domain-containing adaptor inducing IFN β*) y TRAM (del inglés: *TRIF-related adaptor molecule*) que transducen la señal a través de la activación de la familia de factores de transcripción NF- κ B e IRF [116]. Esta respuesta desencadena la producción de citoquinas proinflamatorias e IFN I [117]. La proteína NF- κ B es necesaria para la producción de IL-6 y TNF. Estudios sobre los mecanismos de señalización de TLR han revelado que la activación de IRF3 e IRF7 inducida por TLR se inicia sólo desde el endosoma, mientras que activación de NF- κ B puede darse desde la membrana plasmática o endosoma [118]. Hasta el momento se han descrito cuatro TLR que desempeñan un papel crítico en el reconocimiento de los ácidos nucleicos virales, todos ellos ubicados en la membrana de los endosomas: TLR3 reconoce RNA doble cadena (dsRNA, del inglés: *double strand RNA*) y a través de TRIF activa el factor de transcripción IRF3. TLR7 y TLR8 reconocen RNA simple cadena (ssRNA, del inglés: *single strand RNA*) y TLR9 es estimulado por dsDNA que contiene motivos CpG no metilados. Para que la señalización de estos TLR se produzca,

se requiere la acidificación y maduración del endosoma. TLR9 activa MyD88 para iniciar la señalización que lleva a la activación de IRF7 y la subsecuente estimulación de genes proinflamatorios, incluyendo IFN I. Otros TLR ubicados en la membrana plasmática, TLR2 y TLR4, también están involucrados en el reconocimiento viral, pero a través de las glicoproteínas de la envoltura [119][120].

En el caso particular de los baculovirus, se ha demostrado que ni la glicoproteína GP64 recombinante purificada ni baculovirus inactivados del fenotipo brotado inducen respuestas antivirales [70][93][69][95]. Así, tomó relevancia la idea de que la actividad antiviral generada por los baculovirus es disparada por el DNA genómico, dado que es posible detectar en ellos un alto contenido de motivos CpG no metilados, comparable con los genomas de *E. coli* y HSV [121]. Se demostró que en células inmunes de ratón, como macrófagos o células dendríticas, tanto la transducción de DNA genómico como la infección con viriones brotados del baculovirus AcMNPV producen IFN I, citoquinas inflamatorias, quimiocinas inducibles por IFN y la activación de NF- κ B a través de la vía TLR9-MyD88 [121][93].

Sensores citosólicos

La mayoría de las células no inmunes de los mamíferos, como las células epiteliales y los fibroblastos que normalmente recubren la superficie de las mucosas y, por lo tanto, las más susceptibles a las infecciones, no expresan todos los TLR que detectan ácidos nucleicos. Sin embargo, estas células pueden generar respuestas inmunes innatas eficaces contra las infecciones. De esta manera, el sistema de defensa producido a través de los sensores citosólicos podría constituir un sistema intrínseco para defenderse de los patógenos que invaden tanto a las células inmunes como a las no inmunes [122]. Además de los mencionados TLR, los sensores citosólicos de ácidos nucleicos son otro tipo de PRR que reconocen dsDNA o dsRNA libres en citosol.

Abe y col., en el año 2009, mostraron que células inmunes en respuesta a los baculovirus producen IFN I por mecanismos dependientes e independientes de TLR-9/MyD88 y en células MEF la producción de IFN I a partir de la infección con baculovirus es TLR independiente e IRF3 dependiente [93]. Se ha sugerido entonces la participación de sensores de DNA citosólico involucrados en la producción de IFN I por baculovirus, aún sin haber sido demostrada la presencia de este ácido nucleico en dicho compartimento celular.

❖ *Sensores de RNA citosólico*

Los RLR (del inglés: *receptor like RIG-1*) son un tipo de PRR dentro del cual se encuentran las proteínas RIG-I (del inglés: *retinoic acid inducible gene 1*), MDA5 (del inglés: *melanoma differentiation-associated protein 5*) y LGP2 (del inglés: *laboratory of genetics and physiology 2*), todos ellos pertenecientes a la familia de helicasas DExD/H-box y que han sido hallados en el citoplasma de la mayor parte de las células estudiadas (Fig. 16). Estos receptores han sido descritos como esenciales para combatir las infecciones virales, principalmente a virus RNA, pero también de algunos virus con genomas de DNA [123][124][125][126]. RIG-I es necesario para la producción de IFN I en respuesta a virus tales como el virus de la enfermedad de Newcastle (WNV), el VSV, influenza y el virus de la encefalitis japonesa, entre otros. En contraste, la producción de IFN está dañada en células deficientes en MDA5, pero no en RIG-I infectadas con picornavirus. Algunos virus como el virus del Oeste del Nilo y el virus del dengue son reconocidos tanto por MDA5 como por RIG-1 [124][125][127][128][123][129][130].

El principal agonista de RIG-I es una molécula de RNA carente de estructura de cap, con un motivo trifosfato (5' PPP) y una región de extremos romos y bases apareadas de aproximadamente 20 nucleótidos en su extremo 5' [131]. Sin embargo, algunos RNA sin 5' PPP fueron descritos como agonistas de RIG-I, lo que sugiere que también podría reconocer ciertas estructuras de dsRNA independientemente de su extremo 5' [132][133].

Los agonistas de MDA5 aún no están dilucidados por completo. Probablemente esta proteína actúe como un simple detector de dsRNA. Se ha propuesto que se puede activar por grandes cantidades de dsRNA pequeños (aproximadamente 200 pb) y por cantidades menores de dsRNA largos (1-2 kpb) [134][135]. Los agonistas de MDA5 podrían ser el resultado de una transcripción convergente de virus DNA [123][135][136].

La señalización intracelular a partir de RIG-I o MDA5 ocurre a través de la proteína MAVS (del inglés: *mitochondrial antiviral-signaling protein*, también llamada IPS-1). MAVS se localiza principalmente en la membrana externa mitocondrial, aunque una pequeña proporción está localizada en los peroxisomas. Una vez activo, MAVS induce IFN I y citoquinas a través de la activación de IRF3 e IRF7, y de la activación de NF- κ B. Se ha descrito que la localización subcelular de MAVS determina qué especies de IFN se producen. Desde los peroxisomas, MAVS puede inducir ISG y controlar infecciones virales independientemente de los IFN I [137].

Además, RIG-I también se ha implicado en la activación del inflamasoma, cuya activación conduce al procesamiento proteolítico de la prointerleuquina 1b (proIL-1b) en IL-1b madura [138][139].

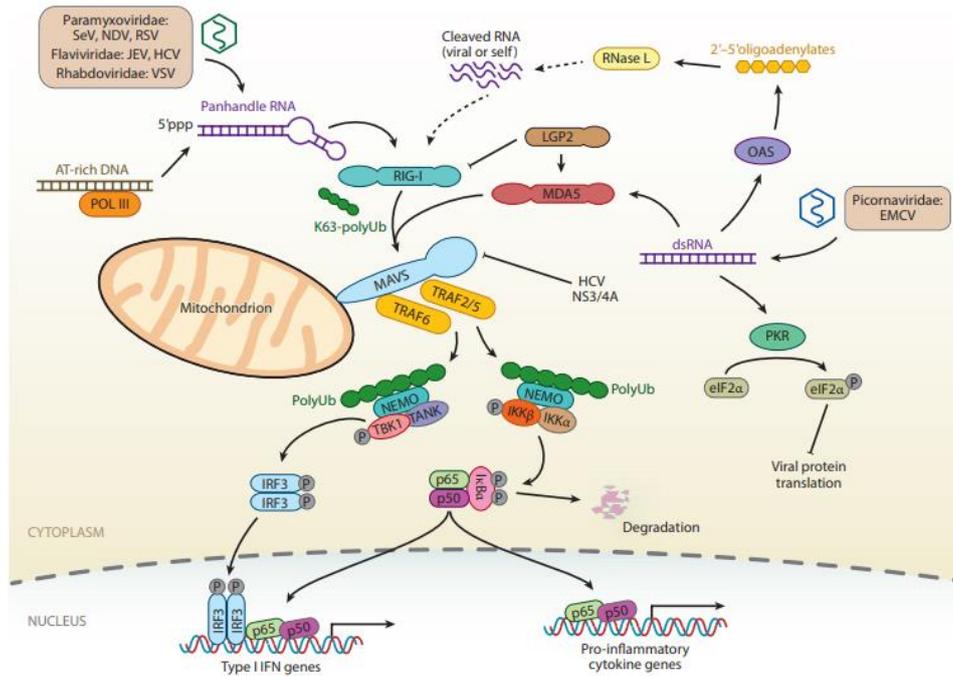


Figura 16: Esquema representativo de las vías de detección de RNA citosólico [122].

Estudios de infecciones con baculovirus de células inmunes derivadas de ratones deficientes en MAVS o RIG-I demostraron que en ausencia de estas moléculas se producen cantidades adecuadas de IFN I. Sin embargo, en MEF deficientes en MAVS la cantidad de IFN β e IL 6 es algo menor que en MEF de ratones control. Estos datos sugieren la existencia de otros mecanismos en la producción de estas citoquinas [93], pero no descartan algún tipo de participación de estos receptores. Así, en el año 2014 se describió la participación de MAVS en la atenuación de la expresión de un transgén vehiculizado por baculovirus en MEF y la disminución de la producción de IFN β en este sistema [140].

❖ *Sensores de DNA citosólico*

El reconocimiento de DNA citosólico da lugar a dos tipos de respuestas, una vinculada a la producción de IFN I y citoquinas inflamatorias y la otra, a la secreción de IL-1 β dependiente de caspasa I.

Existe una variedad de receptores de DNA en citoplasma cuya activación conduce a la producción de IFN I. Muchos de ellos convergen en una vía de señalización en la que juega un papel central la proteína STING (del inglés: *stimulator of interferon genes*) (Figura 17).

STING

STING es una proteína localizada en la cara citoplasmática del retículo endoplásmico que tiene la capacidad de unirse directamente a dinucleótidos cíclicos, que son moléculas de señalización que actúan como segundos mensajeros, comúnmente producidas por bacterias [141]. STING también se une y aún con mayor afinidad a cGAMP, un dinucleótido producido por cGAS (del inglés: *cyclic GMP-AMP synthase*). A partir de esta unión, se produce un cambio conformacional de STING asociado a su dimerización y la posterior activación de IRF3 [142]. Además, la función de STING está regulada por fosforilación, palmitoilación, sumoilación y poliubiquitinación en las lisinas K63, K48, K27 y K11 [143] [144][145]. Una vez activado, STING sufre una relocalización desde el retículo endoplásmico, atravesando el aparato de Golgi y dirigiéndose a la periferia nuclear y se ensambla en estructuras que contienen la proteína quinasa TBK1 (del inglés: *TANK-binding kinase 1*) [146][147][148]. Este proceso resulta en la fosforilación y activación de IRF3 y en menor medida, en la activación de NF- κ B [149][150]. La señalización intracelular culmina con la producción de IFN I, para la cual se requieren tanto IRF3 como NF- κ B. Aunque la translocación de STING requiere la presencia de genes relacionados con la autofagia, existe una comprensión limitada del papel de este proceso en la señalización dependiente de STING [148][151]. Distintos sensores de ácidos nucleicos que detectan secuencias inespecíficas de DNA confluyen en la activación de STING (Figura I7); sin embargo, ciertas secuencias específicas de DNA impactan más que otras en la vía STING-TBK1-IRF3. Se ha demostrado que las secuencias dsDNA denominadas VACV 70mer y HSV 60mer, correspondientes al virus vaccinia y HSV, respectivamente, son poderosos inductores de la vía STING-TBK1-IFN β [152]. Por su parte, *Plasmodium falciparum* contiene más de 6000 motivos ATTTTAC denominados "AT-rich" que de un modo secuencia específica y dependiente de la estructura secundaria, activan fuertemente la vía STING-TBK1-IRF3/IRF7 [153].

Alternativamente, se sugirió que STING podría funcionar como un sensor directo de DNA. De hecho, su dominio C-terminal puede asociarse con dsDNA sin la presencia de otras proteínas. Sin embargo, la afinidad de esta unión no es muy elevada [154].

También se ha documentado la activación de STING y posterior producción de IFN I por virus RNA envueltos, de un modo cGAS independiente, a través de su interacción con proteínas de fusión de membranas [155]. Además, estudios sobre mecanismos de detección viral independiente de ácidos nucleicos demostraron que partículas semejantes a virus o VLP (del inglés: *virus like particles*) de HSV-I con actividad fusogénica generan la traslocación de STING desde el retículo endoplásmico hacia la periferia nuclear y la producción de IFN I y CXCL10 [156].

Por otro lado, se ha descrito la regulación transcripcional y postraduccional de STING por diversos mecanismos mediados por proteínas virales y celulares [157]. En este sentido, se ha visto que la vía del sensor RIG-I puede modular la expresión de STING a través del IFN I producido, lo que propone a STING como un ISG [157][144].

Ono y colaboradores observaron en MEF la acumulación de STING endógeno en la zona perinuclear en respuesta a la infección con baculovirus y la disminución en la producción de IFN β en MEF deficientes en STING [140]. Recientemente, se ha descrito que el complejo RAB2B-GARIL5 participa en la activación de STING por diversos estímulos de DNA y que su depleción inhibe las expresiones de IFN β y CXCL10 inducidas por baculovirus en MEF [158]. Así, la proteína adaptadora STING parece ser una molécula relevante en la generación de IFN I por baculovirus en células no inmunes. Además, la presencia de STING es determinante para la producción de IFN I, por parte de las células dendríticas convencionales en ratones infectados con baculovirus. [97].

cGAS

En el 2013, el grupo del Dr. Chen identificaron el sensor de dsDNA citosólico, cGAS [159][160]. Este sensor reconoce el dsDNA y sintetiza el segundo mensajero 2'3'-cGAMP a partir de ATP y GTP [161][162][163][164]. cGAS contiene un motivo conservado de la familia de nucleotidiltransferasas (NTasa), que une directamente DNA [159]. Hasta el momento no hay estudios que demuestren un motivo consenso de reconocimiento; sin embargo, algunos trabajos demostraron que hay ciertas secuencias que impactan más que otras en este receptor [165] y una investigación reciente sugiere que el tamaño del DNA influye en la actividad enzimática de cGAS [166]. Tras la unión al dsDNA, cGAS experimenta un cambio conformacional significativo, haciendo que el bolsillo catalítico sea accesible para la generación de cGAMP [161][167][168][169]. El cGAMP (2'-3') producido puede pasar a través de uniones GAP y activar STING en células vecinas [170].

Además, se ha descrito la estimulación de la expresión de cGAS dada por IFN I en células inmunes, mediada por dos ISRE adyacentes en su región promotora, lo que sugiere un mecanismo de retroalimentación positiva en estas células [171].

Actualmente, se reconoce a cGAS como el receptor más importante de dsDNA y el principal activador de STING. Se ha demostrado la participación de cGAS en la respuesta de IFN frente a la infección de numerosos virus DNA como HSV-1, KSHV y vaccinia [172][173].

Si bien se ha sugerido que el eje de señalización cGAS-STING-TBK1-IRF3 contribuye a la respuesta antiviral en células no inmunes de mamífero tras la infección con baculovirus, hasta el momento no hay estudios que demuestren que cGAS es el sensor de reconocimiento del DNA de AcMNPV.

RNA Pol III

La función principal de la RNA Pol III es transcribir RNA 5S, tRNA y otros RNA pequeños a través de regiones promotoras específicas. En 2009, dos grupos describieron el mecanismo por el cual los virus con genomas de DNA activan la vía de RIG-I [174][175]. Ambos trabajos demostraron que moléculas de dsDNA lineales que contienen secuencias ricas en AT pueden ser transcritas de un modo independiente de promotor en el citoplasma por la RNA Pol III generando moléculas de RNA 5' PPP, agonistas de RIG-I. De esta manera, RIG-I funciona como un sensor indirecto de DNA en el citoplasma. Este último mecanismo se ha demostrado que participa en la producción de IFN β luego de la infección de diversos tipos celulares con HSV-1, adenovirus y el virus de Epstein-Barr [174][175]. Sin embargo, también se ha sugerido que este mecanismo podría ser redundante en células en las que otros sensores de DNA son funcionales [176].

La utilización de la vía de la RNA Pol III como un sensor de DNA permite potenciar la respuesta inmune innata a través de RIG-I-MAVS, permitiendo la defensa contra un mayor número de patógenos. Como se mencionó anteriormente, existe un aporte de MAVS en la producción de IFN I en MEF por baculovirus que podría deberse a la presencia de mRNA virales capaces de formar estructuras agonistas de estos receptores. Sin embargo, también es posible que la transcripción citoplasmática del DNA baculoviral, rico en AT, por la RNA Pol III, estimule esta vía de señalización.

Otros sensores de DNA citosólico

El sensor DAI (del inglés: *DNA-dependent activator of IRFs*), también conocido como ZBP1 fue el primer sensor de DNA que se describió como involucrado en la producción de IFN I [177]. Sin embargo, estudios posteriores en ratones con deficiencia de DAI y en MEF derivados de ratones DAI^{-/-} mostraron respuestas de IFN I normales a la estimulación de DNA [140]. Por lo tanto, DAI sería un sensor no indispensable o redundante para la detección del DNA citosólico.

MEF deficientes en este sensor infectados con baculovirus no mejoraron la transducción de un gen reportero aportado por el baculovirus recombinante, indicando que esta vía no sería la responsable de generar el estado antiviral que en este tipo de células puede modular la expresión del transgén [140].

IFI16 (del inglés: *interferon- γ inducible protein 16*) y su ortólogo en ratón, p204 son miembros de la familia de proteínas PYHIN que contienen un dominio de pirina y dos dominios de HIN de unión al DNA. Aunque predominantemente es una proteína nuclear, una pequeña fracción de IFI16 puede ser detectada en el citoplasma. La transferencia

dinámica de IFI16 entre el citoplasma y el núcleo se controla mediante la acetilación de la señal de localización nuclear (NLS), lo que permite que IFI16 funcione como un sensor de DNA nuclear y citosólico. Por otro lado, hay diversos estudios que demuestran que IFI16 coopera con cGAS durante la detección del DNA y que ambos sensores son necesarios para la activación completa de la respuesta inmune innata contra DNA exógeno y virus de DNA [178] [179]. Varios virus, incluido el HSV, KSHV, CMV, HIV y el virus vaccinia son detectados por IFI16 [152][180][181][182][183].

DX41 pertenece a la familia de helicasas DExD/H box. Se demostró que induce la respuesta de IFN β tras la estimulación con *poly (dA:dT)*, HSV-1 y adenovirus en macrófagos, así como en dendríticas mieloides [184][185]. La inducción de IFN β dado por este sensor se produce a través de la vía STING-TBK1-IRF3. Además, estudios bioquímicos indican que DDX41 se asocia con STING a través de uno de sus dominios. Por otro lado, también se encontró que DDX41 se une a dinucleótidos cíclicos y controla la respuesta de IFN [186].

DNA-PK (del inglés: *DNA-dependent protein kinase*) es un complejo heterotrimérico compuesto por: Ku70, Ku80 y la subunidad catalítica ADN-PKcs. Este complejo se identificó como un sensor de DNA inductor de IFN tipo III, principalmente el IFN $\lambda 1$ en células HEK293, de una manera dependiente de IRF1/IRF7 [187] Además, Sui y colaboradores demostraron que Ku70 endógena se localiza en el núcleo y luego se traslada al citoplasma tras un estímulo con DNA para formar un complejo con STING, siendo el dominio de unión al DNA de Ku70 esencial para la formación del complejo Ku70-STING [188]. En macrófagos humanos deficientes en STING, la capacidad para producir IFN $\lambda 1$ en respuesta a la transfección con DNA o a la infección con HSV-2, a través de Ku70, se ve inhibida. Juntos, estos datos sugieren que STING media la respuesta de IFN $\lambda 1$ por Ku70 en respuesta a DNA exógeno o a la infección de virus DNA [188]. Adicionalmente, Ferguson y colaboradores demostraron que el complejo DNA-PK desencadena respuestas inmunes innatas dependientes de IRF3, incluida la producción de IFN β en respuesta a virus DNA [189]. Se ha visto que Ku70 induce respuestas de IFN I a través de la vía de señalización dependiente de STING en infecciones con retrovirus y con HBV [190] [191]

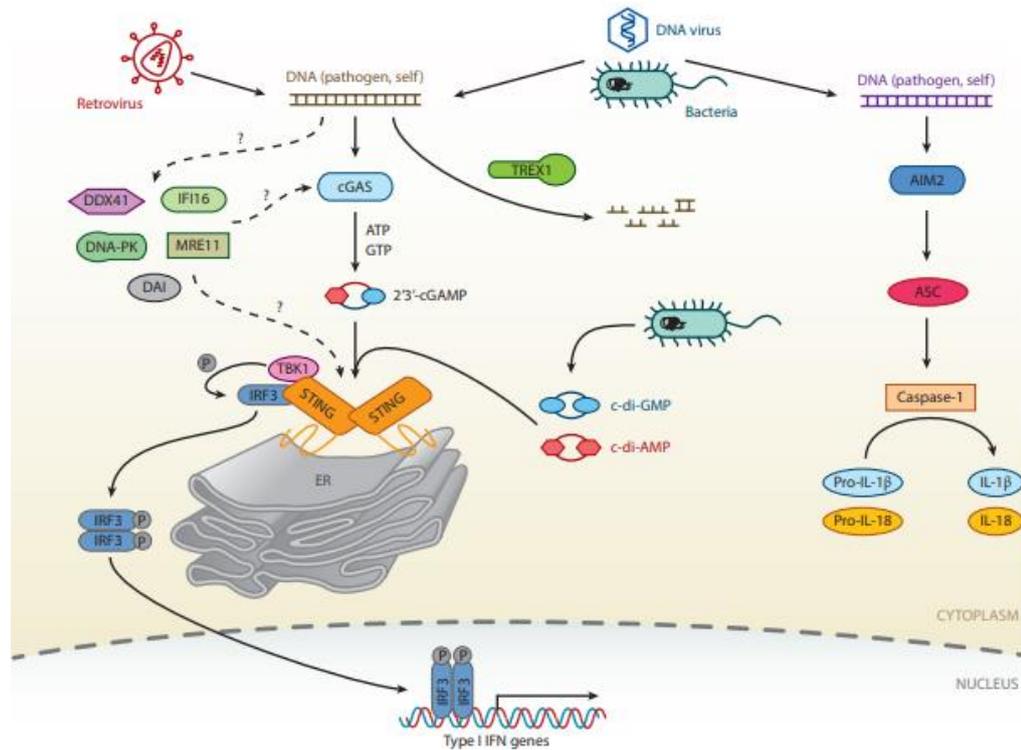


Figura 17: Esquema representativo de las vías de sensado de dsDNA citosólico [122].

En resumen, el baculovirus AcMNPV puede llevar a cabo infecciones no productivas en células de vertebrados que brindan la posibilidad del desarrollo de aplicaciones biotecnológicas en este sistema. La interacción de los baculovirus con células inmunes y no inmunes de mamífero despierta respuestas antivirales con la producción de IFN I en las que la detección citoplasmática de ácidos nucleicos virales parece ser determinante. El avance en el conocimiento de los mecanismos que subyacen a esta respuesta es relevante para la optimización del uso de los baculovirus como antivirales, inmunomoduladores o transportadores de genes heterólogos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La producción del estado antiviral generado por la infección no productiva del baculovirus AcMNPV en las células no inmunes de mamífero está dada por la interacción de los ácidos nucleicos virales con receptores citosólicos.

Objetivo general

Contribuir al estudio de la interacción de los baculovirus con células no inmunes de mamífero mediante la comprensión del papel del DNA viral en el establecimiento del estado antiviral y en la producción de interferones a partir de su detección por sensores de ácidos nucleicos citosólicos.

Objetivos específicos

1. Evaluar de la proporción de genomas de baculovirus que alcanzan el citoplasma y/o el núcleo de distintos tipos celulares no inmunes de mamífero.
2. Estudiar de la respuesta antiviral en células de mamífero no inmunes mediada por la infección con baculovirus de fenotipo brotado y derivados de los cuerpos de oclusión.
3. Diseñar, construir y evaluar baculovirus recombinantes que lleven en su genoma secuencias que modulen su interacción con las células de mamífero.
4. Estudiar las vías de detección de DNA citosólico en el contexto de una infección con baculovirus de fenotipo brotado en distintas células no inmunes de mamífero.

RESULTADOS

RESULTADOS

EVALUACIÓN DE LA PROPORCIÓN DE GENOMAS DE BACULOVIRUS EN EL CITOPLASMA Y/O EL NÚCLEO DE DISTINTOS TIPOS CELULARES DE MAMÍFERO

La infección no productiva de baculovirus en mamíferos da lugar a una sólida respuesta inmune innata en la que se ha propuesto la participación de sensores de DNA citosólicos. Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado fehacientemente la presencia de genomas baculovirales en el citoplasma de estas células tras infecciones no productivas. Por lo tanto, en primer lugar se diseñaron experimentos tendientes a demostrar la presencia de DNA viral en células no inmunes de mamífero a través de la utilización de dos estrategias diferentes.

Detección de genomas baculovirales accesibles en células de mamífero

Con el objeto de dilucidar el destino del DNA baculoviral tras la infección con viriones brotados, se utilizó la estrategia de evaluar la transcripción de genes reporteros en núcleo y citoplasma a partir de la transducción de varios tipos celulares no inmunes de mamífero.

Construcción del baculovirus recombinante Ac_{T7}Ch_{CAG}GFP

Como primer paso, se diseñó y construyó un baculovirus recombinante que transportaba en su genoma los genes reporteros *egfp*, bajo el control del promotor CAG (C: Enhancer temprano de CMV, A: Primer exón y primer intrón del promotor del gen *beta actina de pollo*; G: Sitio aceptor de *splicing* de *beta globina de conejo*), que es activo en el núcleo de las células de mamífero y *mcherry*, bajo la regulación del promotor reconocido por la enzima RNA polimerasa del bacteriófago T7, que es activo en el citoplasma de las células cuando se aporta en *trans* la enzima T7 RNA polimerasa.

Se utilizó el sistema *Bac-to-Bac*[®] *Baculovirus Expression System*, que se basa en la transposición sitio específica entre el vector de transferencia y un bÁcmido presente en la cepa de *E.coli* DH10Bac que contiene el genoma completo del baculovirus AcMNPV. El vector de transferencia, a partir del cual se obtuvo el bÁcmido Bac-_{T7}Ch_{CAG}GFP (Fig. R1) se construyó con la remoción de los promotores de *poliedrina* y *p10* del pFastBac[™] DUAL y clonado de los genes reporteros con sus respectivos promotores (Materiales y Métodos, sección 5.1.1). La figura R2 muestra la caracterización por PCR del bÁcmido (Materiales y

Métodos, sección 5.3). El b acmido correspondiente al clon #3 fue seleccionado para continuar con la construcción del virus recombinantes ya que no presentó contaminación con el b acmido parental y fue positivo para las PCR que corroboraban la inserción del *cassette* de interés. El virus $Ac_{T7}Ch_{CAG}GFP$ se obtuvo por transfección de células de insecto Sf9 y amplificación del *stock* viral (Materiales y Métodos, sección 4.2.1).

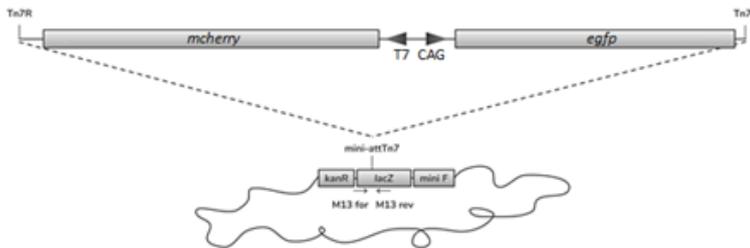


Figura R1: Esquema del b acmido $Bac_{T7}Ch_{CAG}GFP$.

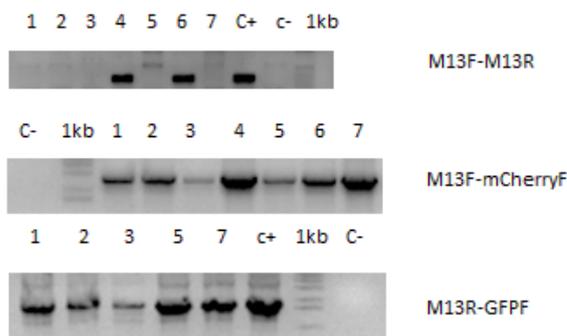


Figura R2: Caracterización del b acmido recombinante $Bac_{T7}Ch_{CAG}GFP$. PCR con los oligonucleótidos M13F-M13R: 300 pb, M13F-mCherryF: 2500 pb y M13R-GFPF: 1600 pb.

Ensayos de transducción

Para la realización los ensayos de transducción viral se utilizaron cinco líneas celulares (BHK-21: fibroblastos de ri n de hámster, NIH/3T3: fibroblastos de embrión murino, L929: fibroblastos de ratón adulto, HEK293 y HEK293 T: epiteliales derivadas de ri n de embrión de humano) y MEF (cultivo primario de fibroblastos de embrión murino).

En primer lugar, se establecieron las mejores condiciones metodológicas para la transducción utilizando el virus $Ac_{CAG}GFP$, disponible en nuestro laboratorio, que lleva el gen *egfp* bajo la regulación del promotor CAG, en células BHK-21. Se ensayaron diferentes temperaturas y relaciones de medio de cultivo de células de insecto:PBS y se observó que la mayor eficiencia de transducción correspondió a un tiempo de incubación de las células con

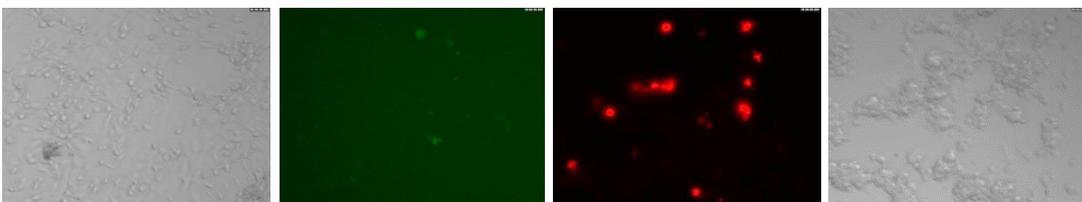
el virus de 4 h a 27 °C, en una relación 1:4 de medio de cultivo de células de insecto:PBS (resultado no mostrado).

Luego, a partir de ratones hembra C57BL/6 preñadas, de 12 días de gestación, se trabajó en la obtención del cultivo primario de fibroblastos de embrión. Se ensayaron distintos protocolos hasta obtener un cultivo homogéneo y adherente de fibroblastos (Materiales y Métodos, sección 1).

A continuación, se evaluó la frecuencia de genomas en núcleo y citoplasma mediante la infección con el baculovirus $Ac_{T7}Ch_{CAG}GFP$ a distintas MOI, en presencia o ausencia de coinfección con el virus vaccina recombinante VTF7-3, que aportaba la RNA polimerasa del fago T7. Para determinar la cantidad de células con expresión del transgén transcrito en núcleo, se observó al microscopio de fluorescencia y se cuantificaron las células con fluorescencia verde (*egfp* bajo el control del promotor CAG). Para determinar la cantidad y proporción de células con DNA baculoviral en condiciones de ser transcrito en el citoplasma, se infectó con VTF7-3 y se cuantificaron las células con fluorescencia roja (*mcherry* bajo el control del promotor T7). A fin de evitar una incorrecta interpretación de los resultados por infección de cada célula con más de una partícula viral y dado que en todos los casos la fluorescencia roja era más abundante que la fluorescencia verde, se redujo la MOI utilizada en cada tipo celular a la mínima en la que se observó alguna célula con fluorescencia verde. En la figura R3 se observa, la expresión de mCherry o eGFP a las 24 horas postinfección (hpi).

$Ac_{T7}Ch_{CAG}GFP$	+	+
VTF7-3	-	+

MEF



Act _{T7} Ch _{CAG} GFP	+	+
VTF7-3	-	+

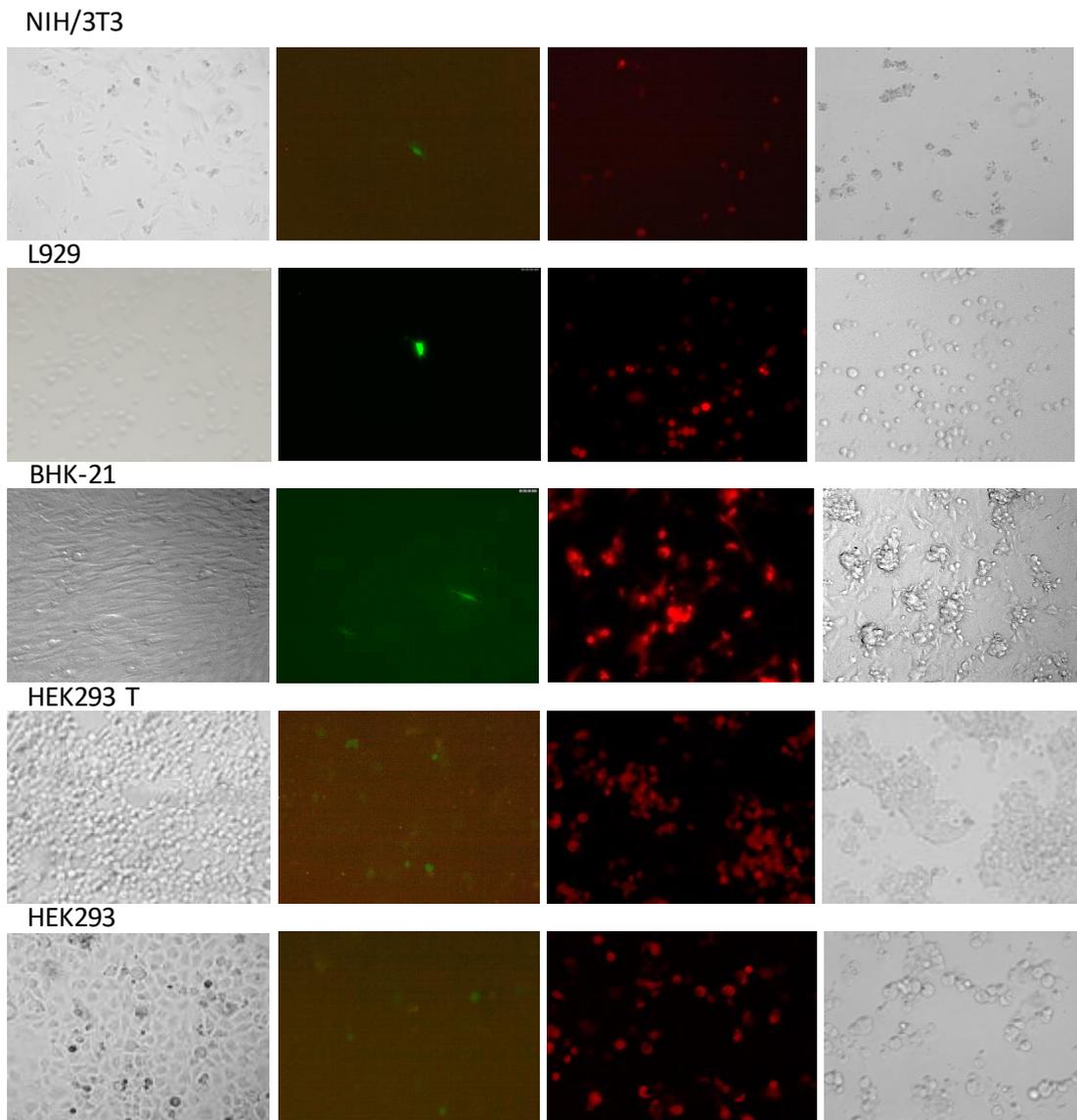


Figura R3: Transcripción nuclear y citoplasmática del baculovirus Act_{T7}Ch_{CAG}GFP en células de mamífero. La transcripción nuclear corresponde a la expresión de egfp bajo el promotor nuclear CAG; la transcripción citoplasmática corresponde a la expresión de mcherry bajo el promotor T7, reconocido por la T7 RNA pol, aportada en trans a través de VTF7-3. La MOI utilizada varió para cada tipo celular. MEF: MOI 15; NIH/3T3: MOI 100; L929: MOI 8; BHK-21: MOI 0,02; HEK293 T: MOI 0,1; HEK293: MOI 0,1. Dada la baja intensidad de GFP en algunas células, las fotos se muestran sobreexpuestas.

	MEF	NIH/3T3	L929	BHK-21	HEK293 T	HEK293
MOI utilizada	15,00	100,00	80,00	0,02	0,10	0,10
Transcripción nuclear	8,0	15,7	6,7	9,3	18,0	10,7
Transcripción citoplasmática	$1,4 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	764
Proporción citoplasma: núcleo	1750,0	1592,4	3731,3	161,3	66,7	71,4

Tabla R1: Cuantificación del ensayo de transducción del virus $Ac_{T7}Ch_{CAG}GFP$ en células de mamífero. Para la cuantificación se utilizó la mínima MOI en la que se observó fluorescencia verde.

Como se muestra en la figura R3, las MOI variaron desde 0,02 para las BHK-21, a 100 en las células NIH/3T3. Los resultados indican que el principal destino genómico en todos los tipos celulares es el citoplasma y no el núcleo. Tal como se muestra en la tabla R1, por cada célula de mamífero en la que se detecta algún genoma de baculovirus en el núcleo hubo al menos 66,7 células en las que se detectó en citoplasma. En las células de origen humano HEK293 T y HEK293, la proporción fue 66,7 y 71,4, respectivamente, y en BHK-21, 161,3. En los fibroblastos murinos, MEF, NIH/3T3 y L929, en la mínima MOI con la que fue posible observar transcripción nuclear se observó transcripción citoplasmática en todas las células del pocillo, por lo que la relación pudo estar subestimada y fue de al menos entre 1592,4 y 3731,3.

A pesar de que todas las células ensayadas fueron fibroblásticas o epiteliales de mamífero, la eficiencia de transducción de un gen en núcleo y la proporción de genomas transcribibles en núcleo y citoplasma resultaron variables. Estas diferencias podrían deberse, en parte, a distintas respuestas celulares luego de la infección que influyan en el transporte de nucleocápsides al núcleo, la eficiencia en el ensamblaje de las nucleocápsides y en la eficiencia de transcripción del gen.

Con el objeto de lograr independencia de la coinfección con VTF7-3 y evaluar la transcripción en citoplasma en células que no estén afectadas por este virus, se realizaron ensayos de transducción en la línea celular BSRT7/5. Esta línea fue construida a partir de células BHK-21 y expresa establemente la enzima RNA polimerasa del bacteriófago T7.

Construcción del baculovirus recombinante $Ac_{T7IRES}Ch_{CAG}GFP$

Para poder realizar los ensayos de transducción fue necesario construir el virus $Ac_{T7IRES}Ch_{CAG}GFP$, que permite la traducción cap-5 ' independiente del transcripto de *mcherry*, a partir de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus de la fiebre aftosa ubicado entre la secuencia de *mcherry* y el promotor T7 (Fig. R4). El virus vaccinia

replica en citoplasma y en el ensayo anterior no sólo aportaba la actividad de T7 RNA pol sino también el *capping* de los RNA mensajeros.

El baculovirus $Ac_{T7IRES}Ch_{CAG}GFP$ fue construido con el sistema *Bac-to-Bac* descrito anteriormente, a partir del plásmido de transferencia $pFBD_{T7IRES}Ch_{CAG}GFP$ (Materiales y Métodos sección 5.1.2). La caracterización por PCR del $Ba_{CT7IRES}Ch_{CAG}GFP$ se muestra en la figura R5. El clon #5 fue seleccionado para transfectar las células Sf9 y obtener el virus $Ac_{T7IRES}Ch_{CAG}GFP$.



Figura R4: Esquema de la secuencia de inserción $T7IRESCh_{CAG}GFP$.

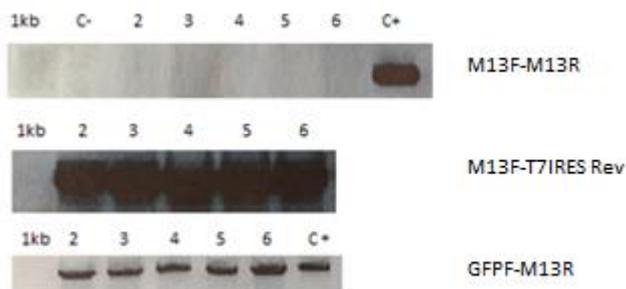
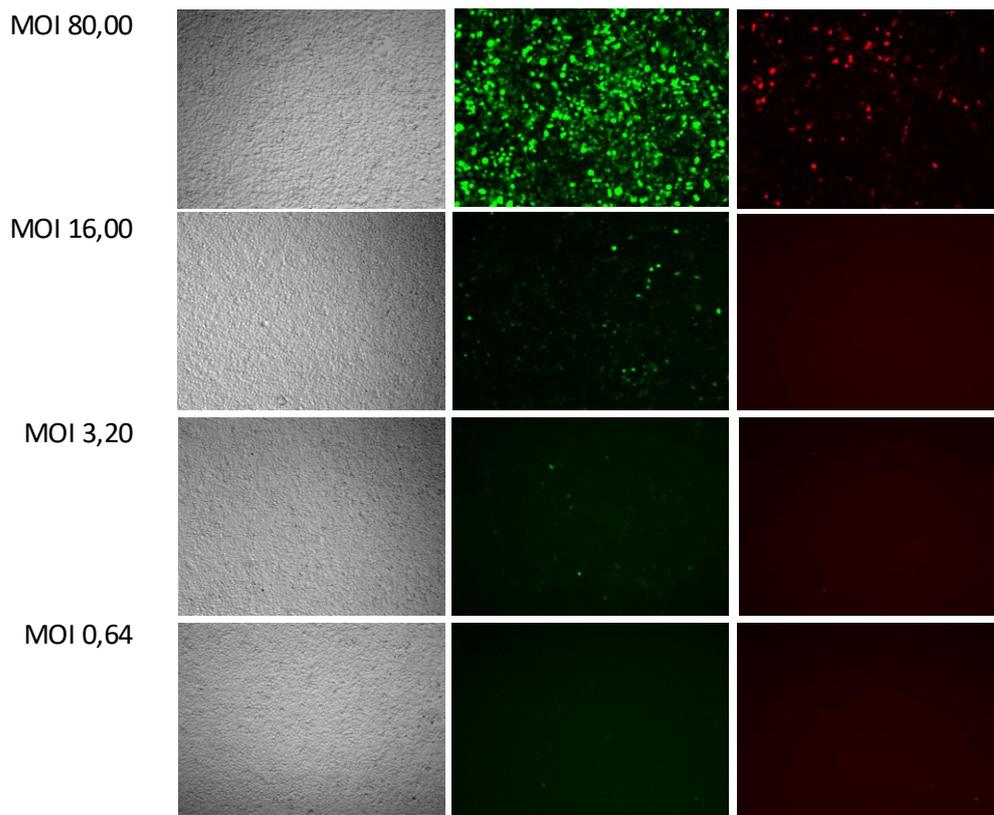


Figura R5: Caracterización del báculo recombinante $Ba_{CT7IRES}Ch_{CAG}GFP$. PCR con los oligonucleótidos $M13F-M13R$: 300 pb, $M13F-T7IRESRev$: 2300 pb y $GFPF-M13R$: 1600 pb.

Ensayos de transducción en BSRT7/5

Al igual que en el caso anterior, se infectaron las células de mamífero con el baculovirus recombinante a distintas MOI y luego de 24 h, se observaron al microscopio de fluorescencia a fin de cuantificar las células verdes (transcripción nuclear a partir del promotor CAG) y las células rojas (transcripción citoplasmática a partir del promotor T7).



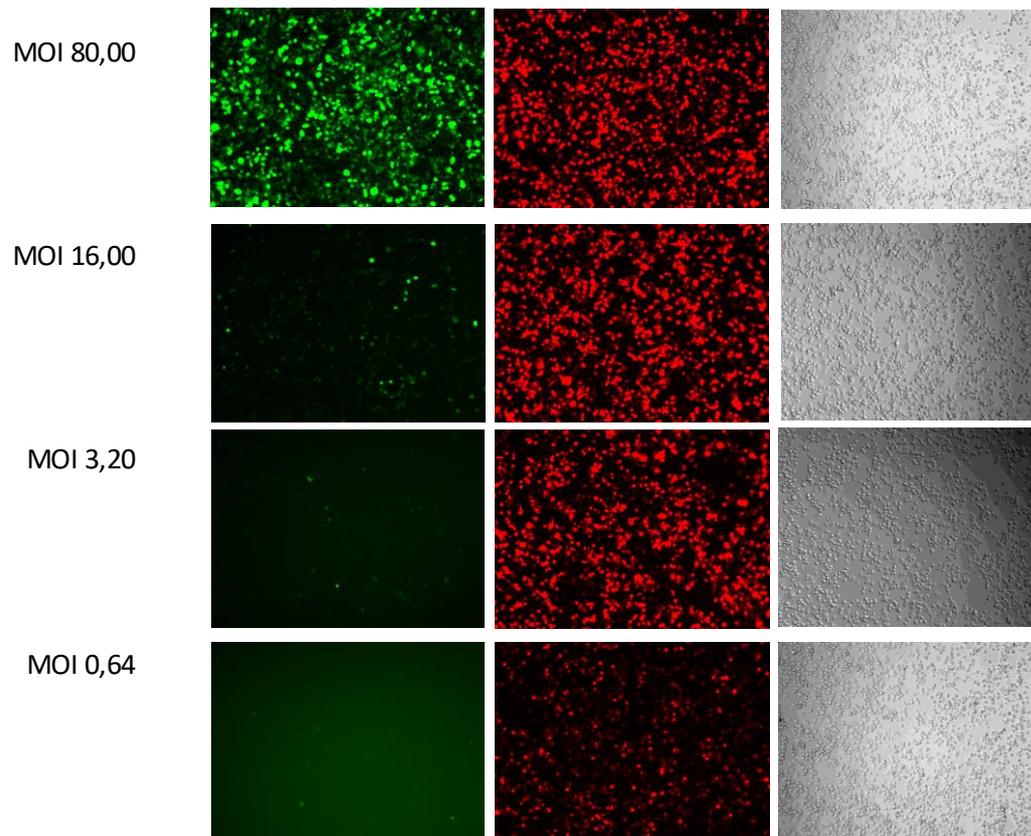
*Figura R6: Transducción nuclear y citoplasmática del baculovirus $AC_{T7IRES}Ch_{CAG}GFP$ en células BSR5/7. La transcripción nuclear corresponde a la expresión de *egfp* bajo el promotor nuclear CAG, la transcripción citoplasmática corresponde a la expresión de *mcherry* bajo el promotor T7, reconocido por la T7 RNA pol aportada por la línea celular.*

Como se observa en la figura R6, a una MOI de 80 se obtuvo transcripción citoplasmática; sin embargo, la cantidad de células con fluorescencia verde fue mayor a la cantidad de células con fluorescencia roja. Es decir, los resultados fueron disímiles a los observados en las distintas líneas celulares de mamífero coinfectadas con baculovirus y VTF7-3 (Fig. R3). Como fue mencionado, el virus vaccinia recombinante utilizado en el ensayo de la figura R3, no sólo aportaba en *trans* la T7 RNA pol, sino que también permitía la traducción de los transcritos mediante el aporte de la maquinaria de agregado de cap en citoplasma. Dado que la traducción cap independiente, a través de la secuencia IRES, podría ser menos eficiente que la que se lleva a cabo cuando los mensajeros son modificados con el cap-5', se coinfectaron las células BSRT7/5 con $AC_{T7IRES}Ch_{CAG}GFP$ y un virus vaccinia salvaje. Además, se realizó un ensayo de transfección con el plásmido pGemT- $T7IRESCh$ (Materiales y Métodos, sección 5.1.2; figura M5), en presencia o ausencia de infección con vaccinia salvaje.

A

Ac _{T7IRES} Ch _{CAG} GFP	+	+
--	---	---

Vaccinia	-	+
----------	---	---



B

pGemT-T _{7IRES} Ch	+	+
-----------------------------	---	---

vaccinia	-	+
----------	---	---

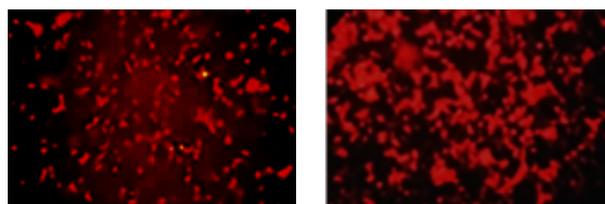


Figura R7: Transducción nuclear y citoplasmática del baculovirus Ac_{T7IRES}Ch_{CAG}GFP o del pGemT-T_{7IRES}Ch en coinfección con vaccinia salvaje en células BSR5/7. La transcripción citoplasmática corresponde a la expresión

de *mcherry* bajo el promotor T7, reconocido por la T7 RNA pol, aportada por la línea celular. A: infección con $Ac_{T7IRES}Ch_{CAG}GFP$. B: transfección con $pGemT-T7IRESmCh$.

La figura R7 A muestra que la coinfección con el virus vaccinia salvaje invirtió la proporción de células fluorescentes rojas y verdes de la figura anterior, obteniéndose resultados similares a los observados en los ensayos de transducción con $Ac_{T7}Ch_{CAG}GFP + VTF7-3$ (Fig. R3).

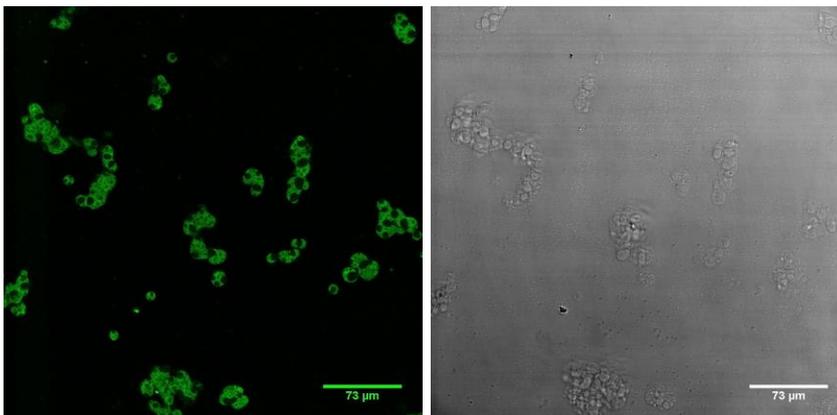
La expresión del gen *mcherry*, a partir del plásmido $pGemT-T7IRESCh$ transfectado (Fig. R7 B) también fue mayor cuando el ensayo se realizó en presencia de infección con virus vaccinia salvaje, lo que indica que el efecto observado es probablemente traduccional, y que el sistema de la línea celular BSRT7/5 no fue adecuado para determinar la relación entre los transcriptos citoplasmáticos y nucleares, ya que depende de la traducción ineficiente a partir del IRES.

Ensayo de hibridación fluorescente *in situ*

Con el fin de detectar la presencia y abundancia del DNA viral en el citoplasma de células de mamífero, independientemente de su accesibilidad para ser transcrito, utilizamos una sonda de 50 bases marcada con isotiocianato de fluoresceína, FITC. Esta sonda hibrida en el gen de la proteína baculoviral mayoritaria de cápside VP39.

Se infectaron células NIH/3T3 con un baculovirus salvaje a una MOI de 50 y luego de 6 hpi las células fueron fijadas y enfrentadas con la sonda VP39-FITC (Materiales y Métodos, sección 8).

A



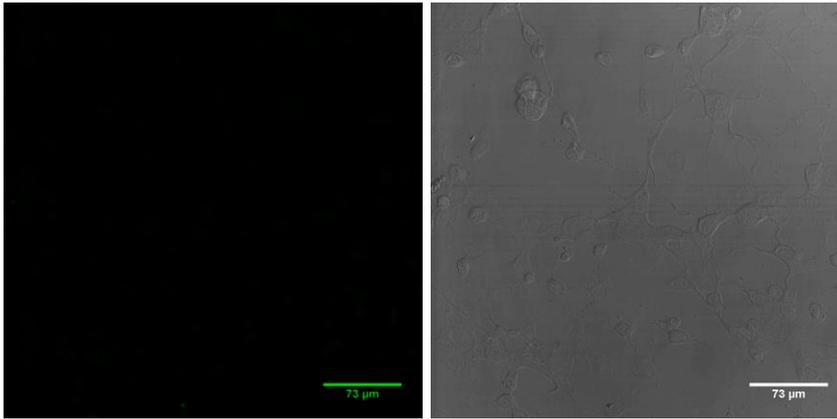


Figura R8: Ensayo de hibridación fluorescente in situ en células murinas infectadas con baculovirus. Células NIH/3T3 fueron infectadas (A) o no (B) con un baculovirus salvaje a una MOI de 50, a las 6 hpi las células fueron fijadas y tratadas con la sonda VP39-FITC.

La figura R8 muestra las imágenes obtenidas en el microscopio confocal de fluorescencia, donde se pudo observar una intensa señal de localización citoplasmática que indica la presencia mayoritaria del DNA viral en este compartimento.

En conjunto, estos resultados muestran que el DNA baculoviral se encuentra mayoritariamente accesible en el citoplasma de las células no inmunes, por lo que tiene el potencial de ser detectado por sensores celulares de DNA citosólicos.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA ANTIVIRAL EN CÉLULAS DE MAMÍFERO NO INMUNES MEDIADA POR LA INFECCIÓN CON BACULOVIRUS DE FENOTIPO BROTADO Y DERIVADOS DE LOS CUERPOS DE OCLUSIÓN

Con el fin de evaluar la respuesta que se produce al infectar con baculovirus células fibroblásticas de mamífero, se estudió la capacidad de generar un estado antiviral y la producción de IFN I en células MEF y en NIH/3T3. Los tipos celulares seleccionados son similares en su origen, pero los MEF son un cultivo primario y las NIH/3T3, una línea celular establecida. Por lo tanto, se decidió trabajar con ambos cultivos y determinar la concordancia o discordancia de los resultados.

Evaluación del estado antiviral generado luego de una infección con baculovirus brotados y derivados de los cuerpos de oclusión

Como se mencionó, los baculovirus poseen dos fenotipos diferentes, con grandes similitudes en sus nucleocápsides, identidad genómica pero diferencias marcadas en sus envolturas y en las proteínas de superficie. En primer lugar, se investigó la capacidad de los baculovirus de ambos fenotipos de generar un estado antiviral en las células no inmunes, capaz de conferir protección frente a una infección con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Para ello, células y virus se pusieron en contacto durante 4 h e inmediatamente o 20 h después, se infectaron con VSV. A las 16 hpi, las células se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y el efecto citopático se cuantificó por absorbancia a 495 nm (Materiales y Métodos, sección 11.1). Los ODV purificados no mostraron contaminación con virus brotados detectable por *Western blot* (Fig. R9 A), indicada por la ausencia de la glicoproteína GP64 (proteína de envoltura), presente únicamente en los virus brotados. La proteína de cápside VP39 fue detectada en las preparaciones de ambos fenotipos. La cantidad de ODV utilizada en los ensayos fue equivalente en masa a 2×10^7 TCID₅₀ BV, que correspondía a una MOI de BV de 33 (Materiales y Métodos, sección 4.4) (Fig. R9 B). A partir de los resultados que obtuvimos con los ODV en células NIH/3T3 después de 4 hpi (Fig. R10 A), decidimos no evaluarlos a las 24 hpi ni en MEF.

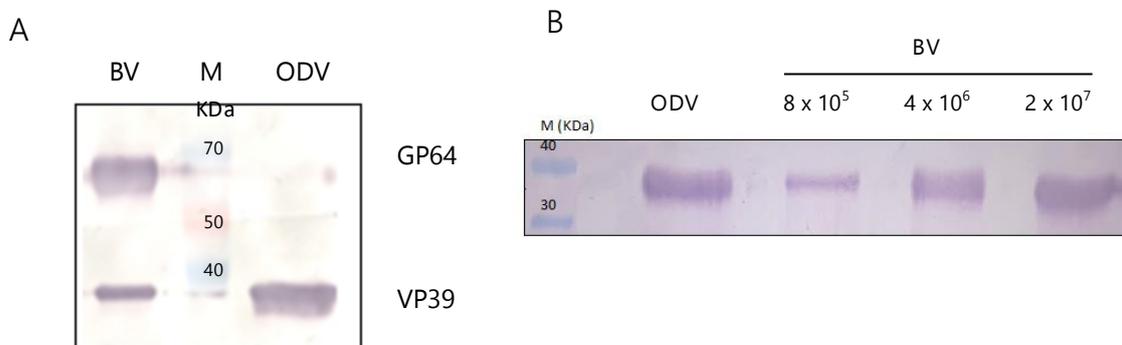


Figura R9: Purificación y cuantificación de los ODV. (A) Caracterización por *Western blot* de los BV y ODV (B) Inmunodetección de VP39 en la preparación de ODV en comparación con distintas cantidades de BV (TCID₅₀. M: Marcador de peso molecular.

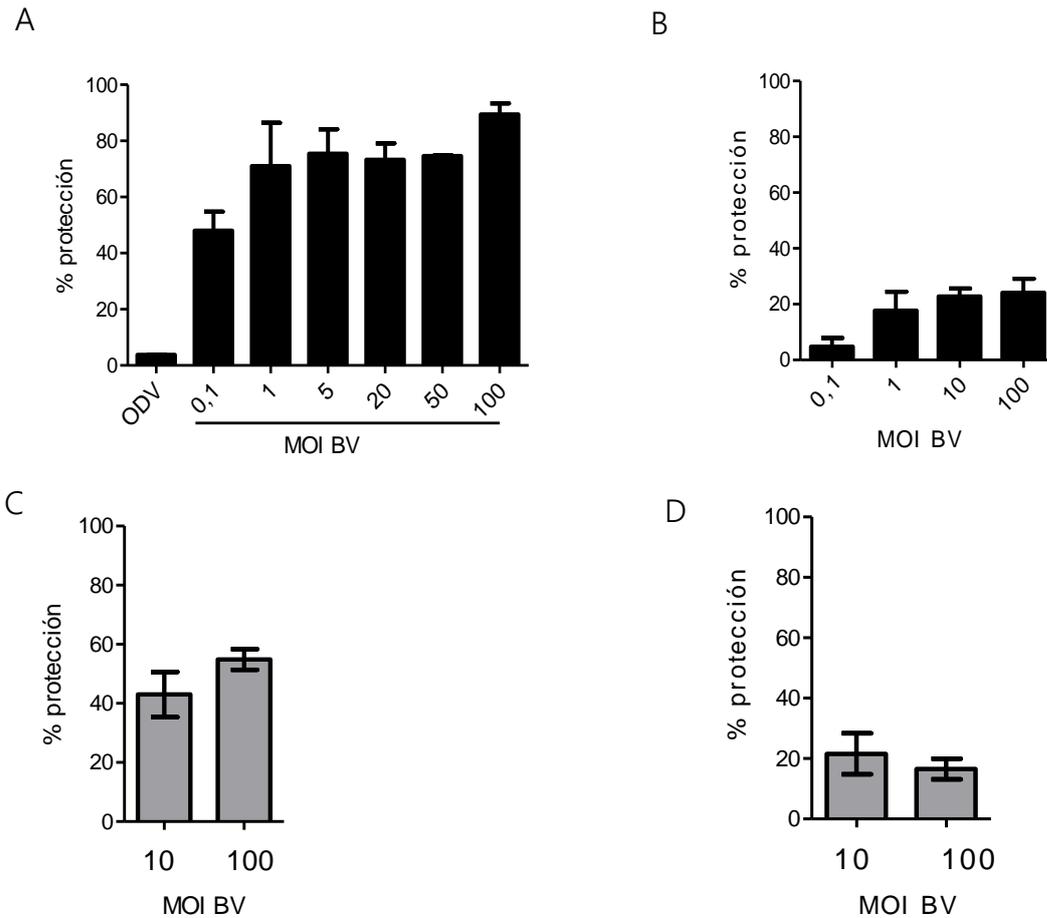


Figura R10: Efecto antiviral de los baculovirus en células NIH/3T3 y MEF. Las células fueron infectadas con baculovirus del fenotipo brotado (BV) o con virus derivados de los cuerpos de oclusión (ODV) durante 4 h e inmediatamente o a las 20 h infectadas con VSV a una MOI de 1 para NIH/3T3 o de 10 para MEF. A las 16 hpi las muestras fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Finalmente fueron resuspendidas y se cuantificó el efecto citopático por absorbancia a 495 nm. Los resultados se muestran como % de protección frente a VSV. (A) NIH/3T3 4 hpi (B) NIH/3T3 24 hpi (C) MEF 4 hpi (D) MEF 24 hpi.

En la figura R10 A se muestra que en NIH/3T3, luego de 4 hpi, únicamente los viriones del fenotipo brotado fueron capaces de generar un estado antiviral, que se reflejó como una protección frente a la infección con VSV del $48,02 \pm 6,80$ % a una MOI de baculovirus de 0,1 y una protección del $89,48 \pm 6,20$ % a una MOI de 100, respecto de las células sin infectar con baculovirus. Los virus derivados de los cuerpos de oclusión fueron capaces de brindar niveles de protección marginales de sólo el $3,82 \pm 0,06$ %. En la figura R10 B, se observa que a las 24 hpi el estado antiviral generado por los viriones del fenotipo brotado disminuyó, mostrando una protección frente a la infección con VSV del $4,77 \pm 3,00$ % a una MOI de baculovirus de 0,1 y una protección del $24,08 \pm 8,73$ % a una MOI de 100, respecto de las células sin infectar con baculovirus. En los MEF (Fig. R10 C), los niveles de actividad antiviral medidos luego de 4 hpi fueron menores, ($43,00 \pm 7,60$ % a MOI 10 y

54,89± 8,60 % a MOI 100), probablemente debido a la elevada MOI de VSV utilizada, causada por la resistencia intrínseca que detectamos en estas células a la infección con VSV. A las 24 hpi los valores en MEF disminuyeron al igual que en las células NIH/3T3 (Fig. R10 D).

Evaluación de la producción del mRNA de IFN β luego de una infección con baculovirus

Con el objetivo de medir la respuesta a la infección con baculovirus en células de mamífero no inmunes, se evaluaron los niveles del mRNA de IFN β por RT-qPCR a las 4 y 24 hpi. Para ello, se infectaron células NIH/3T3 o MEF con baculovirus brotados a distintas MOI o células NIH/3T3 con viriones derivados de los cuerpos de oclusión a una MOI equivalente a 33 de BV. A las 4 hpi se retiró el inóculo y se extrajo el RNA total o se agregó medio de cultivo hasta cumplir las 24 h y luego se realizó la extracción del RNA, únicamente en el caso de los BV. En todas las muestras se midió, por RT-qPCR la expresión relativa del mRNA de IFN β , respecto de células sin infectar (Materiales y Métodos, sección 12).

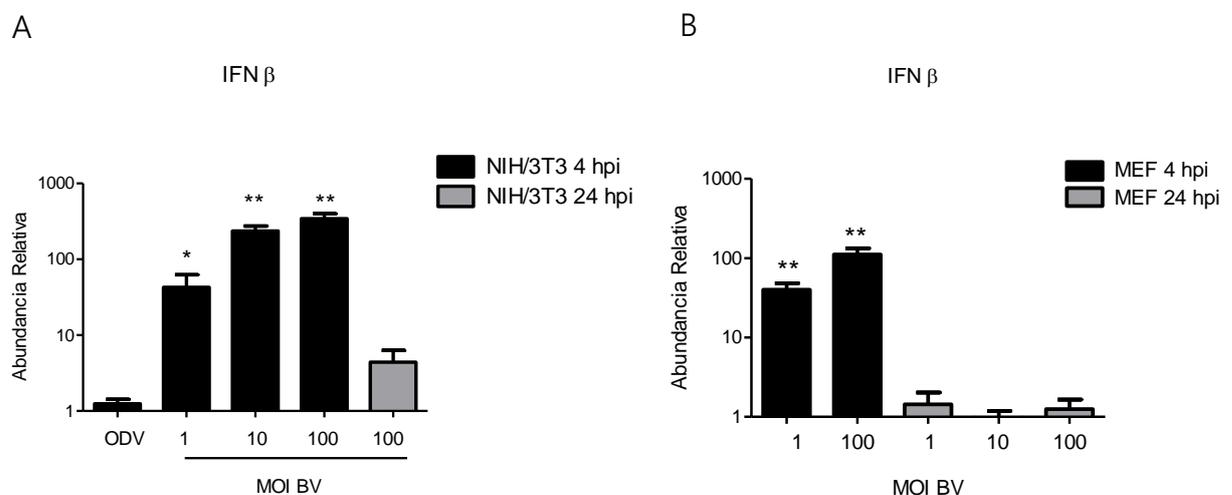


Figura R11: Niveles de expresión del mRNA de IFN β en células murinas luego de una infección con baculovirus. Abundancia relativa del mRNA de IFN β medida por RT-qPCR en células NIH/3T3 (A) y MEF (B) infectadas con baculovirus brotados (BV) o derivados de los cuerpos de oclusión (ODV) a las 4 y 24 hpi. Se muestra un ensayo representativo. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

Como se observa en las figuras R11 A y B, a las 4 hpi los baculovirus de fenotipo brotado generaron un aumento en los niveles del mRNA de IFN β dependiente de la multiplicidad de infección, tanto en MEF como en NIH/3T3. A una MOI de 100, en el cultivo

primario MEF se produjo un aumento de los niveles de mensajero de 111 ± 37 veces, respecto del control y en la línea celular NIH/3T3 de 344 ± 93 veces, respecto de las células sin infectar. A las 24 hpi, los niveles del mRNA de IFN β , en ambos tipos celulares, disminuyeron y llegaron a los niveles basales de las células sin infectar.

Por otra parte, la figura R11 A muestra que, en células NIH/3T3, los ODV no tuvieron la capacidad de generar un aumento del mRNA de IFN β a las 4 hpi.

Estos resultados, junto con la medición del estado antiviral, muestran que en los fibroblastos murinos los baculovirus únicamente de fenotipo brotado producen una potente y rápida respuesta antiviral, mediada al menos en parte por IFN I. Además, el efecto detectado en la línea celular NIH/3T3 fue incluso más potente que el del cultivo primario, lo que sugiere que estas células son aptas para evaluar su interacción con los baculovirus. Por lo tanto, se continuó la profundización del análisis utilizando células NIH/3T3.

Estudio de la producción relativa de los mRNA de distintos sensores de ácidos nucleicos

La producción de IFN I puede regular la expresión de varios genes, entre ellos los que codifican para sensores de ácidos nucleicos citosólicos. Así, nos propusimos determinar si el mRNA de STING y los de los sensores de ácidos nucleicos TLR9, cGAS y MAVS ven modificada su expresión debido a la infección con baculovirus en fibroblastos murinos. Para ello, se realizaron ensayos de RT-qPCR en células NIH/3T3 a las 4 o 24 hpi.

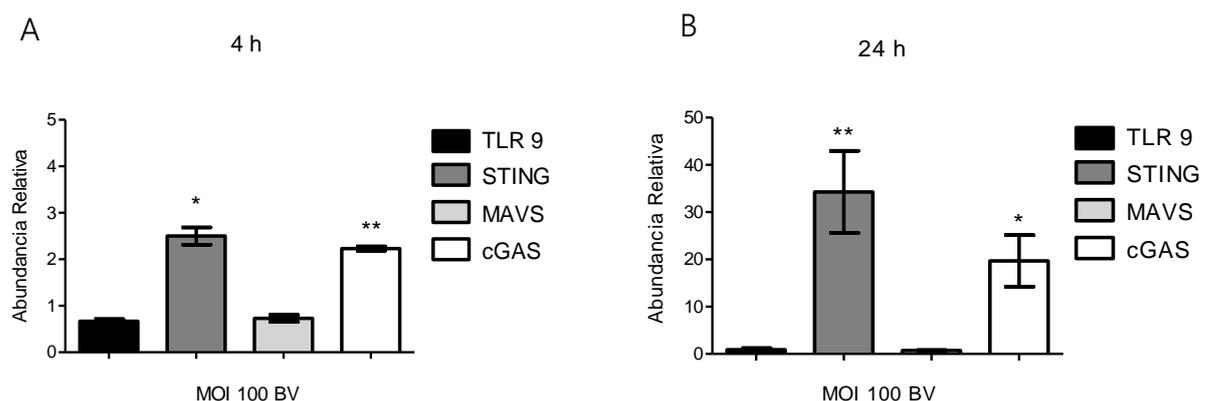


Figura R12: Expresión relativa de los mRNA de sensores citosólicos por RT-qPCR en NIH/3T3. Abundancia relativa de los mRNA medida por RT-qPCR en células NIH/3T3 infectadas con baculovirus a las 4 (A) y 24 hpi (B). Se muestra un ensayo representativo. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

En la figura R12 A se observa que los niveles relativos del mRNA de STING y cGAS se vieron incrementados en $2,50 \pm 0,32$ y $2,23 \pm 0,08$ veces, respectivamente, luego de una infección de 4 h con baculovirus. A las 24 hpi, los niveles de estos mensajeros sufrieron un mayor aumento. STING aumentó $34,29 \pm 15,08$ veces, mientras que para cGAS el aumento fue de $19,69 \pm 9,45$ veces. Estos resultados muestran cómo las células regulan positivamente sus niveles de moléculas involucradas en la detección citosólica de DNA en respuesta a la infección, probablemente mediante el estímulo de IFN I producido.

DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES QUE LLEVEN EN SU GENOMA SECUENCIAS PARA MODULAR LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Baculovirus pseudotipados con la glicoproteína G de VSV

Como se mencionó en la Introducción, los baculovirus pseudotipados con la glicoproteína G de VSV han mostrado una eficiencia mejorada para transducir genes en células de mamífero [63][62][64][65]. Por otra parte, también se ha sugerido que la fusión de membranas en la célula, mediada por proteínas de fusión virales, es capaz de provocar el aumento de IFN I a través del impacto en la molécula STING [155]. Por lo tanto, es incierto si el pseudotipado de los baculovirus con G de VSV incide aumentando (a través del impacto en STING) o disminuyendo (relacionado con su mejor performance de transducción) la capacidad de generar un estado antiviral.

Con el fin de esclarecer estos interrogantes, se construyó un baculovirus recombinante pseudotipado con la glicoproteína G de VSV y se evaluó su capacidad infectiva y de estimulación de IFN en células NIH/3T3.

Obtención y caracterización del baculovirus pseudotipado AcG-GFP

En primer lugar, se construyó un baculovirus recombinante, AcG-GFP, que expresa el gen de la glicoproteína G de VSV bajo el control del promotor viral *poliedrina* (*polh*) y el gen reportero *egfp* bajo el promotor viral *p10*. El baculovirus AcG-GFP fue construido empleando el sistema *Bac-to-Bac*, descrito previamente, a partir del plásmido de transferencia pFBD-G-VSV (Materiales y Métodos, sección 5.1.3). Todos los ensayos se realizaron comparando el virus AcG-GFP con el virus AcPhGFP, previamente construido en el laboratorio, enteramente similares con la excepción que AcPhGFP contiene el gen *poliedrina* en lugar del gen de la proteína G de VSV (Fig. R13).

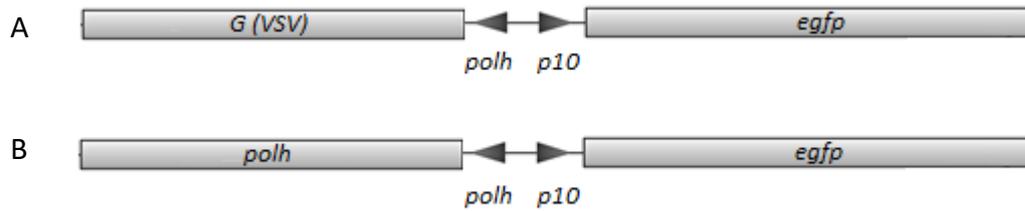


Figura R13: Esquema de la secuencia de inserción de AcG-GFP (A) o AcPhGFP (B).

La presencia de la glicoproteína G de VSV en el virus AcG-GFP se caracterizó por *Western blot*, en muestras de viriones brotados purificados por gradientes de sacarosa (Materiales y Métodos, sección 4.5) y resueltos en un SDS-PAGE.

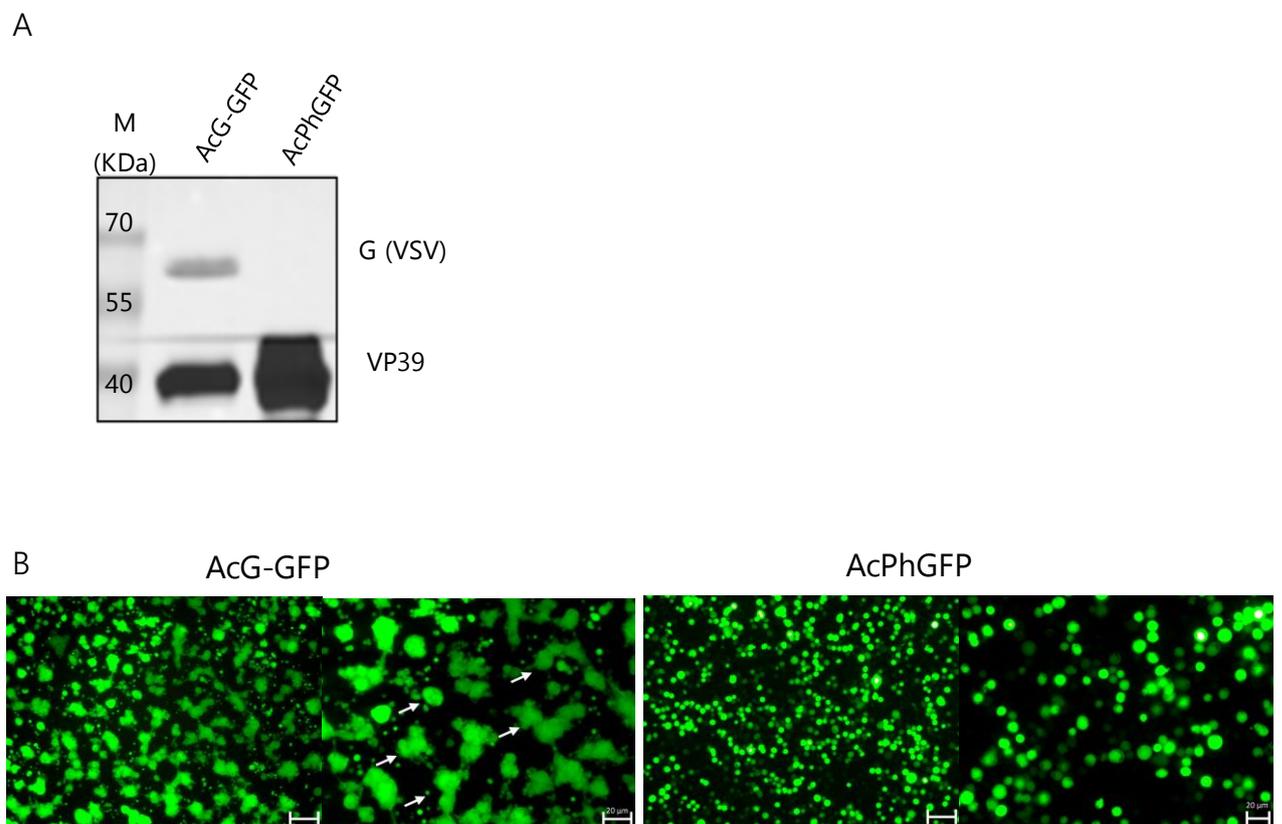


Figura R14: Expresión de la glicoproteína G (VSV) en baculovirus pseudotipados. A: *Western blot* de baculovirus brotados purificados AcG-GFP o AcPhGFP con anticuerpos específicos para VP39 y G (VSV). B: Microscopía de fluorescencia a los 6 dpi, en células Sf9 infectadas con el virus AcG-GFP o el virus AcPhGFP. Las flechas blancas indican la presencia de los sincicios.

La glicoproteína G de VSV fue inmunodetectada con un anticuerpo específico sólo en el virus AcG-GFP (Fig. R14 A), demostrando su presencia en la partícula viral. Además, células de insecto infectadas con el virus AcG-GFP a los 6 dpi mostraron al microscopio de

fluorescencia la formación de sincicios (Fig. R14 B), como indicio de la presencia de la proteína G de VSV en la membrana celular y de su capacidad fusogénica, incluso a pH 6,2, pH del medio de cultivo de células de insecto.

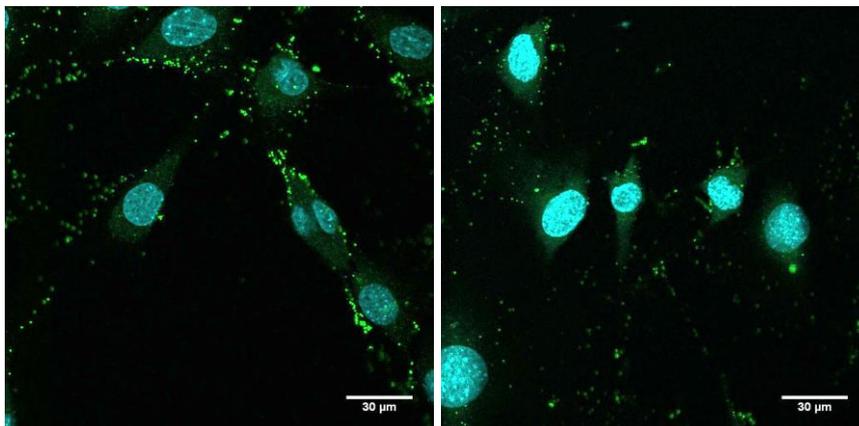
Evaluación de la entrada de baculovirus pseudotipados con la glicoproteína G de VSV en células no inmunes murinas

Con el objetivo de estudiar si el pseudotipado de baculovirus brotados con G de VSV modula la entrada del virus a los fibroblastos murinos, se realizaron ensayos de inmunomicroscopía de fluorescencia en células NIH/3T3 infectadas con AcG-GFP o AcPhGFP (Materiales y Métodos, sección 9). En ambos casos, las células fueron infectadas a una MOI de 50. A los 10 y 45 minutos postinfección, las células fueron lavadas, fijadas y enfrentadas a un anticuerpo anti VP39 y luego a un anticuerpo secundario anti ratón conjugado al fluoróforo Alexa 488. Los preparados se observaron al microscopio confocal (Fig. R15 A) y se cuantificaron los viriones dentro de las células, utilizando el *software Image J* (Fig. R15 B).

A

AcG-GFP

AcPhGFP

10
min

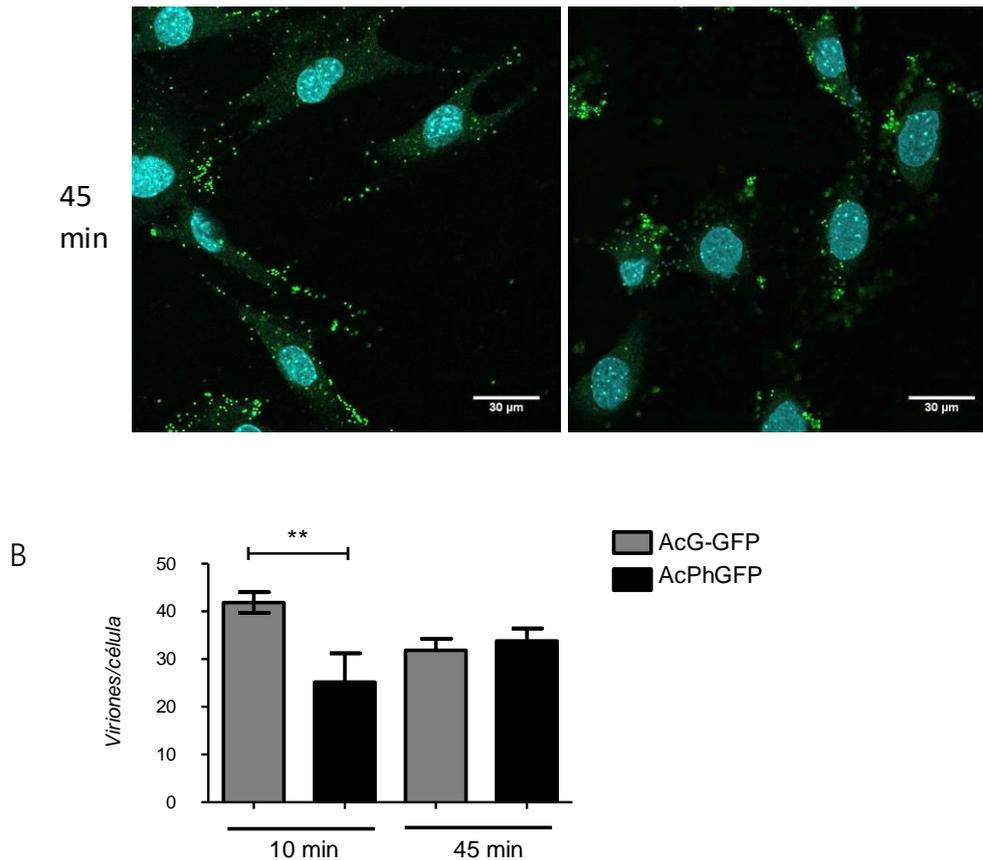


Figura R15: Entrada de los baculovirus AcG-GFP en fibroblastos murinos. (A) Caracterización por microscopía de fluorescencia de células NIH/3T3 a los 10 y 45 minutos, cada punto verde representa la presencia de al menos un virion. (B) Cuantificación del ingreso de los viriones AcG-GFP y AcPhGFP en células NIH/3T3 a los 10 y 45 minutos a través del software Image J. Cada barra corresponde al promedio de 10 campos diferentes. ** $p < 0,01$.

A los 10 minutos postinfección se observó una mayor cantidad del virus pseudotipado con G de VSV que del virus control en las células de mamífero; sin embargo, a los 45 minutos postinfección la cantidad de viriones en las células murinas fue similar para ambos virus. Es decir, la entrada de los virus pseudotipados con G de VSV fue mas eficiente y las nucleocápsides no se acumularon dentro de la célula, sugiriendo una mayor velocidad en el escape de los endosomas y el transporte al núcleo o su degradación. En base a estos resultados, se evaluó pertinente proceder con la medición de la producción de IFN β a tiempos cortos en estas células.

Evaluación de la producción de IFN β dada por la infección en células no inmunes murinas con un baculovirus pseudotipado con la proteína G de VSV

Con el objetivo de medir la respuesta a la infección con baculovirus pseudotipados en células NIH/3T3, se realizaron infecciones a una MOI de 1 y se evaluaron los niveles del mRNA de IFN β por RT-qPCR a las 2 y 4 hpi. La elección de la MOI estuvo basada en la intención de no medir una respuesta demasiado potente como para poder detectar pequeños cambios.

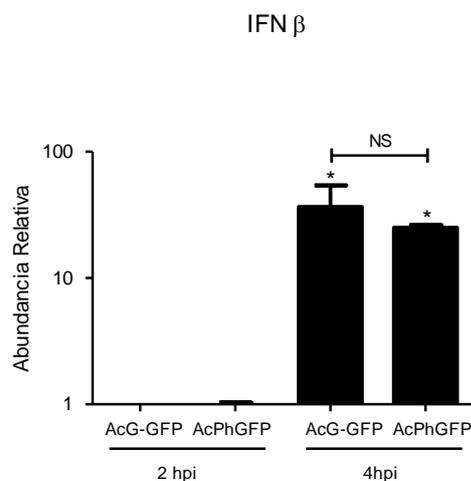


Figura R16: Caracterización de baculovirus pseudotipados por RT-qPCR en células murinas. Niveles de mRNA de IFN β medidos por RT-qPCR a las 2 o 4 hpi en células NIH/3T3 luego de una infección con el baculovirus AcG-GFP o AcPhGFP a MOI de 1. Se muestra un ensayo representativo. * $p < 0,05$; NS: no significativo.

Los resultados de la figura R16 muestran que las células NIH/3T3 no produjeron IFN β a las 2 hpi en ninguno de los casos. A las 4 hpi se observó un aumento significativo del mRNA de IFN β , respecto de células sin infectar, $36,00 \pm 17,58$ veces en células infectadas con el virus AcG-GFP y $25,07 \pm 2,07$ en las que fueron infectadas con el virus Ac-PhGFP. Esta diferencia no resultó estadísticamente significativa. Así, a pesar de que la entrada de ambos virus a las células fue diferente, el pseudotipado con G de VSV no modificó la respuesta que se produce en las células infectadas.

Incorporación en el genoma viral de la secuencia VACV 70mer

Dado que los resultados previos demostraron que en células fibroblásticas de mamífero los genomas baculovirales permanecen mayoritariamente en el citoplasma, con el objetivo de modular la producción de IFN I en estas células, se construyó un baculovirus recombinante conteniendo secuencias de probado impacto en las vías de detección de DNA citosólico.

Como se mencionó en la Introducción, la secuencia VACV 70mer, correspondiente a un extremo repetido no codificante del genoma de vaccinia, produce el aumento de la expresión del mRNA de IFN β en células MEF a través de la vía de STING-TBK1-IRF-3 [152]. Así, a fin de incorporar esta región en el genoma baculoviral, se evaluó en primer lugar si la secuencia seguía siendo capaz de producir esta respuesta inserta en un esqueleto de DNA circular. Para ello, a partir del virus vaccinia se obtuvieron por PCR fragmentos con distinto número de repeticiones de VAVC 70mer que fueron clonados en el plásmido pGEM[®]-T Easy Vector (Materiales y Métodos, sección 6.1). Tras el clonado, se seleccionó el clon pGemT-VAVC 70mer #3 conteniendo un inserto de 350 pb correspondiente a 5 repeticiones de VAVC 70mer, visualizado a partir de la digestión con la enzima EcoRI (Fig. R17).



Figura R17: Caracterización por digestión de los fragmentos VACV 70mer clonados. Gel de agarosa 2% con los distintos clones obtenidos digeridos con EcoRI.

El plásmido pGemT-VAVC 70mer #3 fue transfectado en células NIH/3T3 y a las 4 horas postransfección se cuantificaron los niveles del mRNA de IFN β por RT-qPCR

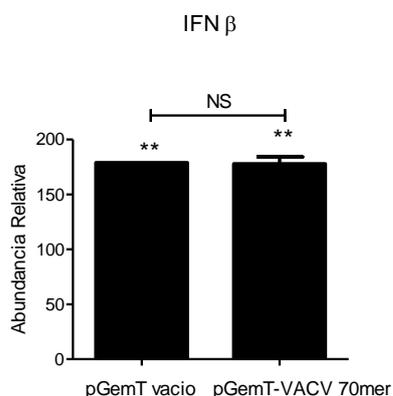


Figura R18: Caracterización de la secuencia VACV 70mer por RT-qPCR en células murinas. Niveles del mRNA de IFN β medidos por RT-qPCR a las 4 h postransfección con el vector pGemT-VAVC 70mer o pGemT vacío en células NIH/3T3. Se muestra un ensayo representativo. ** $p < 0,01$, NS: no significativo.

Como se observa en la figura R18, no hubo diferencias significativas en la producción del mRNA de IFN β entre los plásmidos con ($178,92 \pm 0,02$) y sin la secuencia VACV 70mer ($178,00 \pm 10,90$). La producción del mRNA de IFN β se vio estimulada por la transfección de un DNA exógeno y la incorporación de la secuencia VACV 70mer en el contexto de un dsDNA circular de 3000 pb no modificó los resultados, por lo que es probable que su incorporación en un genoma baculoviral de alrededor de 45 veces mayor tamaño (135 kpb) respecto del plásmido ensayado rinda resultados similares. Así, dada la incapacidad experimental de medir el aporte de la secuencia VACV 70mer, se descartó su inclusión como estrategia para aumentar el potencial antiviral de los baculovirus.

ESTUDIO DE LAS VÍAS DE DETECCIÓN DE DNA CITOSÓLICO EN EL CONTEXTO DE UNA INFECCIÓN CON BACULOVIRUS DE FENOTIPO BROTADO EN DISTINTAS CÉLULAS NO INMUNES DE MAMÍFERO

Evaluación de la vía de la RNA Pol III en la producción de la actividad antiviral dada por la infección en células no inmunes con baculovirus

Como fue mencionado en la Introducción, está descrito un mecanismo mediante el cual DNA citosólico, rico en *dAdT* induce la producción de IFN β en líneas celulares humanas y de ratón [174][175]. Se ha demostrado que el *poly (dA:dT)* sirve como templado para la síntesis *de novo* de RNA a partir de la transcripción citoplasmática de la RNA Pol III, que impacta en el sensor de RNA, RIG-I.

Dado que el genoma de AcMNPV posee un contenido de A-T elevado, del 59,3 % [192], nos propusimos estudiar si dicho mecanismo está involucrado en su detección. Así, se evaluó la participación de la RNA Pol III en el estado antiviral y en la producción del mRNA de IFN β luego de una infección con baculovirus en fibroblastos murinos. Para ello, en primer lugar, se utilizó *poly (dA:dT)* para determinar en células NIH/3T3 la concentración y tiempo óptimos de inhibición del ML60-218, un inhibidor químico de la RNA Pol III (resultados no mostrados). Luego, se realizaron los ensayos de protección frente a VSV y de RT-qPCR previamente descritos, en infecciones con baculovirus de fenotipo brotado en presencia o ausencia de pretratamiento con ML60-218 20 μ M durante 2 h. Se decidió realizar los ensayos utilizando una MOI de 1 de baculovirus, de modo de no obtener una respuesta celular tan potente que nos impidiera visualizar efectos inhibitorios parciales.

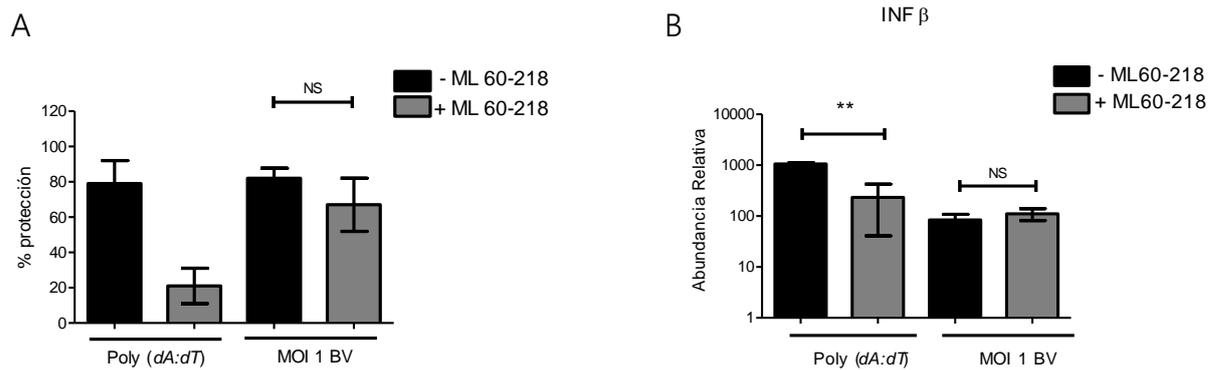


Figura R19: Estudio de la participación de la RNA Pol III en la respuesta antiviral luego de una infección con baculovirus. (A) Efecto antiviral contra VSV en células NIH/3T3 infectadas con baculovirus por 4 h en ausencia (barras negras) o presencia (barras grises) de pretratamiento con ML60-218 20 μM por 2 h. (B) Niveles del mRNA de IFN β en células NIH/3T3 infectadas con baculovirus por 4 h, en ausencia (barras negras) o presencia (barras grises) de pretratamiento con ML60-218 20 μM por 2 h. Se muestra un ensayo representativo. ** p<0,01, NS: no significativo. En ambos casos se utilizó poly (dA:dT) 1 ug/ml como control positivo de la inhibición.

Los resultados obtenidos mostraron que en células NIH/3T3 infectadas con baculovirus a una MOI de 1, la actividad antiviral no se modificó cuando se trató con ML60-218 (Fig. R19 A). Asimismo, los niveles del mRNA de IFN β fueron similares en ambas condiciones (Fig. R19 B). El *poly (dA:dT)* se ha visto que produce IFN β y un estado antiviral en las células a partir de su detección por la RNA Pol III; en el caso de células con otras vías funcionales, también participan otros receptores de DNA, por lo que es esperable que ML60-218 no inhiba por completo su efecto. Así, la detección de los genomas virales por la RNA Pol III para producir IFN I y un efecto antiviral a través de los sensores de dsRNA no parece ser un mecanismo relevante en la interacción de los baculovirus con los fibroblastos murinos.

Estudio de la participación de STING y cGAS en el estado antiviral despertado por la infección de células no inmunes con baculovirus

STING cumple un papel central en la detección de DNA citosólico de diversos orígenes y tal como se mencionó en la Introducción de esta Tesis, existen múltiples activadores de STING a partir de la detección de estos ácidos nucleicos. En el contexto de una infección viral, pareciera ser cGAS el detector de dsDNA más importante; sin embargo, no existen antecedentes de la participación de cGAS en el contexto de la infección por baculovirus. Así, con el objetivo de estudiar la vía cGAS-STING en la infección de células no inmunes de mamífero, se realizaron ensayos en células humanas y células murinas.

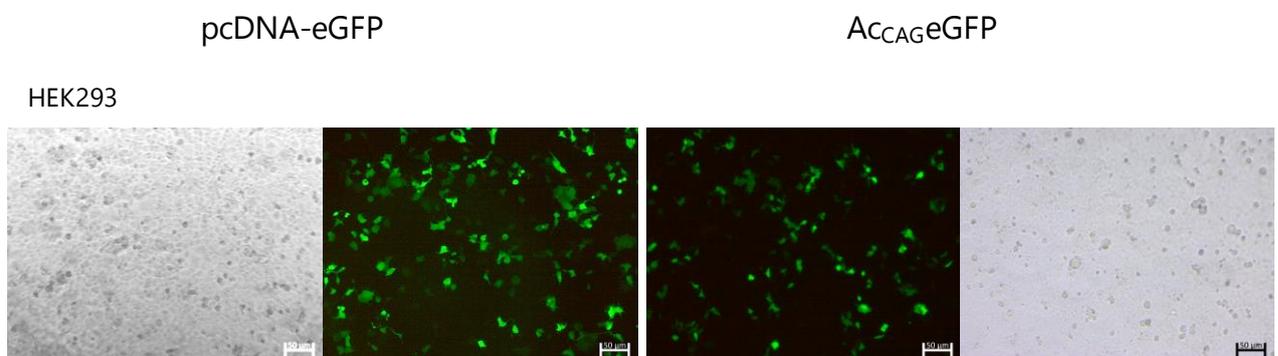
Los baculovirus y su interacción con células epiteliales humanas HEK293 y HEK293 T

El uso de los baculovirus como vectores virales en células humanas ha tomado relevancia en el campo de la terapia génica por las ventajas que poseen los baculovirus sobre otro tipo de vectores. La estrecha relación que pareciera existir entre la eficiencia de transducción de un transgén y el estado antiviral que produce la célula en respuesta al DNA resalta la importancia de estudiar las vías involucradas que desencadenan dicha respuesta. Así, con el objetivo de estudiar si la vía cGAS-STING está involucrada en la detección de los baculovirus en células humanas, se utilizaron las líneas de epitelio de riñón humano HEK293 y HEK293 T para los siguientes ensayos. La elección de estas células se basó en que las HEK293 no presentan niveles detectables de cGAS, mientras que las células HEK293 T no presentan niveles detectables de cGAS ni de STING [193].

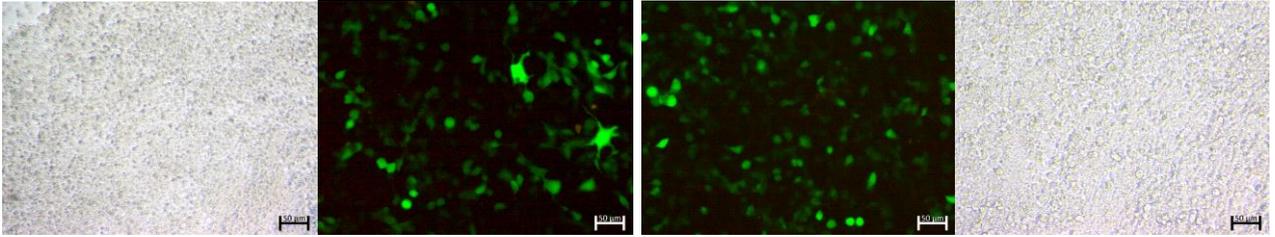
Ensayos de transducción

En los ensayos de transducción en células HEK293 y HEK293 T mostrados en la figura R3 se hizo evidente que en HEK293, la expresión del transgén transcripto en núcleo era menor que en HEK293 T. Con el objetivo de estudiar si esta diferencia se relaciona con la infección con baculovirus, se realizaron infecciones con el virus $AC_{CAGE}GFP$ en paralelo con transfecciones con el plásmido pcDNAeGFP, que expresa *egfp* bajo el control del promotor CMV (Materiales y Métodos, sección 7).

A



HEK293 T



B

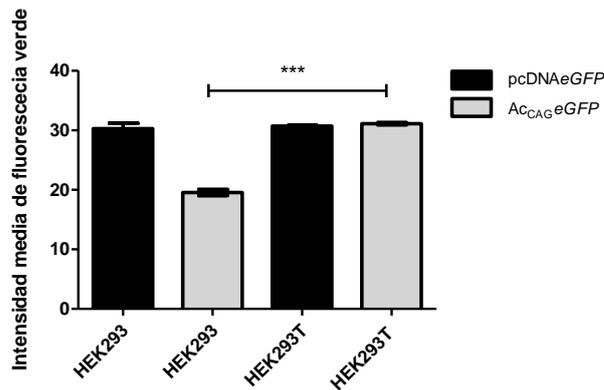


Figura R20: Transducción en células HEK293 o HEK293 T. (A) Observación al microscopio de fluorescencia a las 24 h luego de una transfección con el plásmido pcDNAeGFP (izquierda) o infección con el baculovirus AcCAGeGFP (derecha) (B) Cuantificación de la intensidad de eGFP en las células HEK293 y HEK293 T con la utilización del software ZENblue. Se promediaron 6 áreas de 3 fotos en cada condición. *** $p < 0,001$.

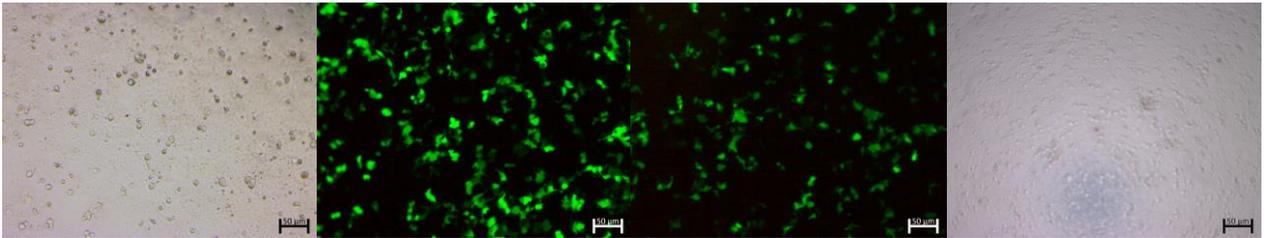
A las 24 h se observó que las células HEK293 y HEK293 T expresaban de igual manera el transgén aportado por el plásmido, mientras que cuando el transgén fue aportado por el baculovirus, en las células HEK293 los niveles de expresión eran menores que en las células HEK293 T (Fig. R20 A). Estos resultados observados al microscopio de fluorescencia fueron cuantificados y confirmados midiendo la intensidad de fluorescencia en los pocillos (Materiales y Métodos, sección 10) (Fig. R20 B).

Dado que en las construcciones génicas utilizadas el gen reportero se encontraba bajo la regulación de diferentes promotores y con el objetivo de confirmar que la expresión del transgén en las células HEK293 se modula por la respuesta celular al baculovirus, se realizó un ensayo de infección con un baculovirus salvaje seguida de transfección con el plásmido pcDNAeGFP. Para ello, se infectaron células HEK293 o HEK293 T durante 4 h y luego se realizaron transfecciones con el plásmido pcDNAeGFP. A las 24 h se observó al microscopio de fluorescencia para determinar la cantidad de células verdes.

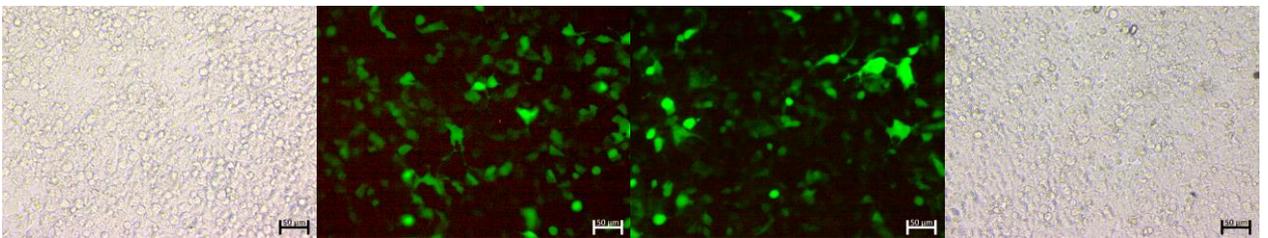
A

Infección BV salvaje	-	+
Transfección pcDNA-eGFP	+	+

HEK293



HEK293 T



B

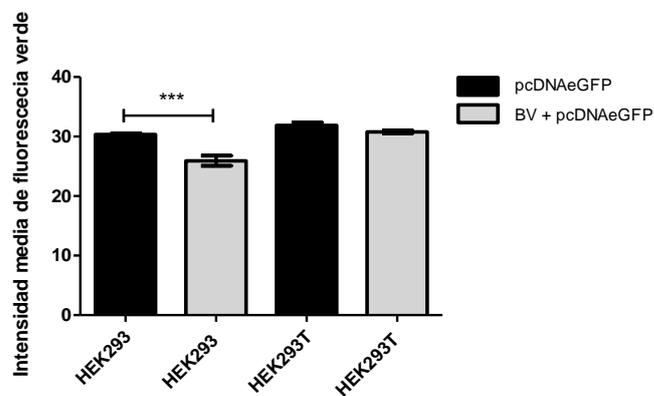


Figura R21: Expresión de eGFP en células HEK293 o HEK293 T. (A) Observación al microscopio de fluorescencia a las 24 h luego de una transfección con el plásmido pcDNAeGFP (izquierda) o infección con BV salvaje y transfección con el plásmido pcDNAeGFP (iderecha). (B) Cuantificación de la intensidad de eGFP en las células HEK293 y HEK293 T con la utilización del software ZENblue. Se promediaron 6 áreas de 3 fotos en cada condición. *** $p < 0,001$.

En la figura R21 A se puede observar que luego de una infección de 4 h con un baculovirus salvaje, la expresión del transgén *egfp* aportado por el vector pcDNAeGFP

disminuyó sólo en las células HEK293. La cuantificación de la fluorescencia (Fig. R21 B) muestra que la disminución observada es estadísticamente significativa. Dado que la expresión de STING está afectada en la línea HEK293 T, nuestros resultados sugieren la participación de esta molécula en un probable estado antiviral generado por los baculovirus en las células epiteliales humanas, que afecta la expresión de un transgén.

Evaluación del estado antiviral

Con el fin de estudiar el estado antiviral inducido por baculovirus en células HEK293 y HEK293 T, se realizaron infecciones con BV y a las 4 h o 24 h se enfrentaron a las células con VSV. Luego de 16 h, se cuantificaron las producciones virales obtenidas en cada caso en células Vero (Materiales y Métodos, sección 11.2).

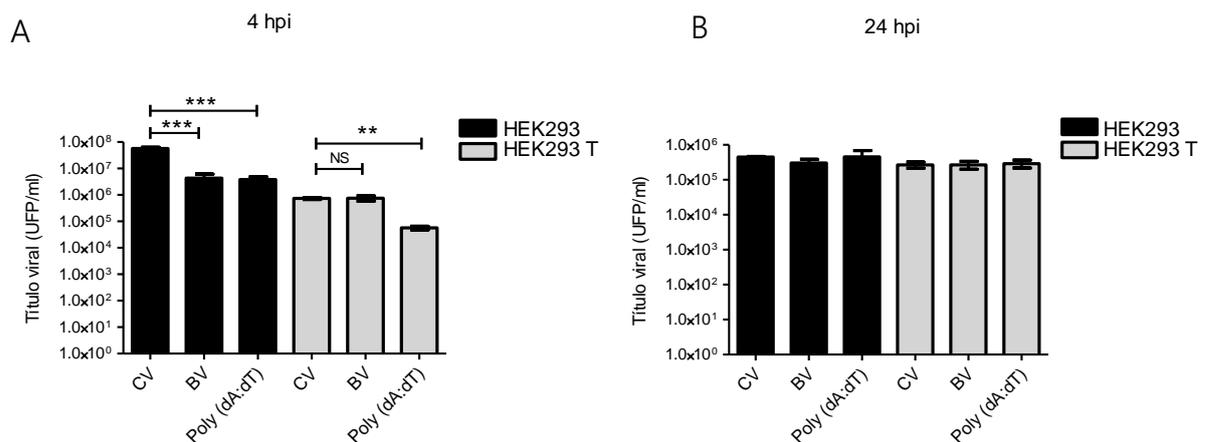


Figura R22: Actividad antiviral en células HEK293 y HEK293 T. Cuantificación de la actividad antiviral dada por BV a una MOI de 100 a las 4 hpi (A) o 24 hpi (B), medida como el título de VSV (UFP/ml) producido en HEK293 (barras negras) o en HEK293 T (barras grises). CV: control virus, producción de VSV en células sin pretratamiento, BV: producción de VSV en células con infección previa con baculovirus, poly (dA:dT): producción de VSV en células transfectadas previamente con $1 \mu\text{g/ml}$ de poly (dA:dT) ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, NS: no significativo.

La figura R22 A muestra que únicamente en las células HEK293, luego de una infección con baculovirus brotados durante 4 h el título viral de VSV obtenido disminuyó alrededor de 15 veces respecto del control de virus. La transfección con *poly (dA:dT)* redujo el título viral de VSV tanto en HEK293 como en HEK293 T. A las 24 hpi u horas postranfección (hpt) (Fig. R22 B), las células no mantuvieron el estado antiviral inducido por

los BV o por *poly (dA:dT)* respectivamente, medido como una reducción en el título de VSV producido. El *poly (dA:dT)* puede generar un estado antiviral independiente de cGAS y STING en ambos tipos celulares a través de la vía RNA Pol III-RIG I. Estos resultados indican que los baculovirus en células epiteliales humanas inducen un estado antiviral que dependería de la adecuada expresión de STING pero no de la expresión del receptor cGAS, ya que ambos tipos celulares son deficientes en los niveles de este sensor.

Producción de IFN β , IFN λ e IL-1 β

Con el fin de avanzar en la comprensión del estado antiviral observado en células HEK293 infectadas con baculovirus, se evaluaron por RT-qPCR la producción de IFN I, a partir de la cuantificación de los niveles del mRNA de IFN β , la producción de IFN III, a partir de la cuantificación de los niveles del mRNA de IFN $\lambda 1$ y la producción de la citoquina proinflamatoria IL-1 β . Para ello, fueron infectadas células HEK293 o HEK293 T con baculovirus del fenotipo brotado durante 4 h y se realizaron las cuantificaciones relativas de los mensajeros por la metodología ya descrita.

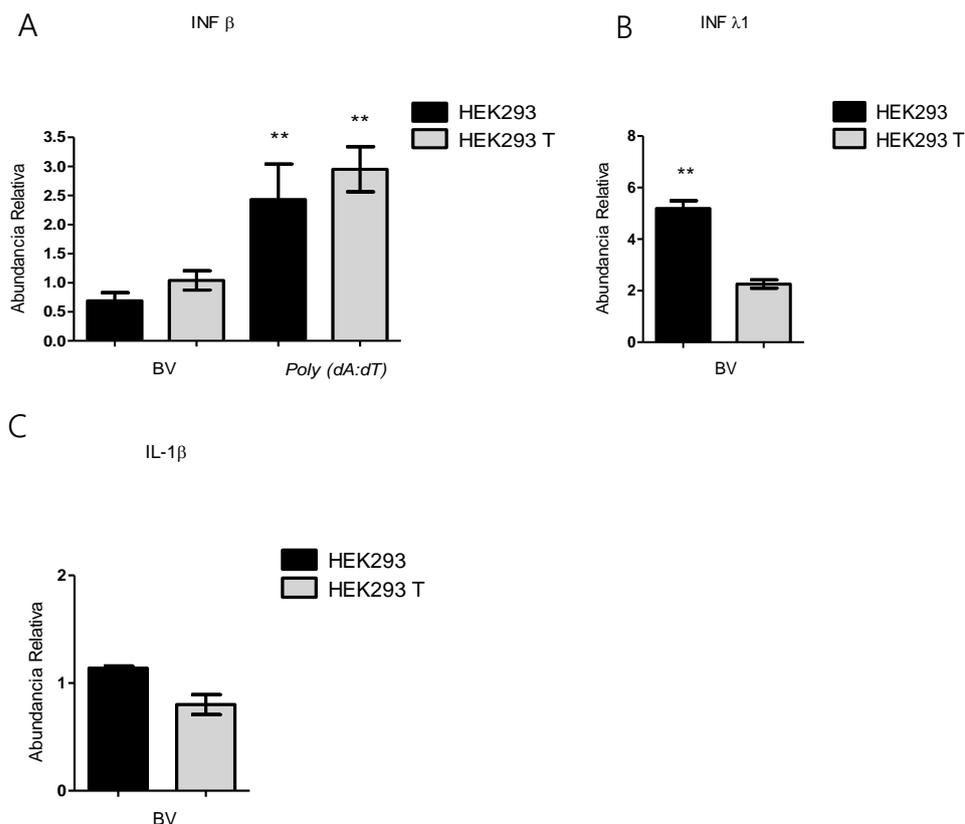
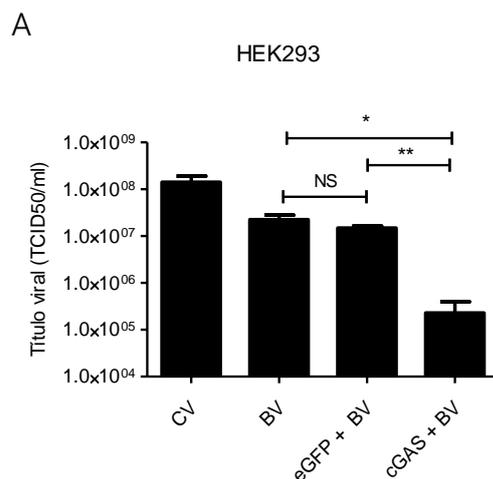


Figura R23: Expresión relativa de IFN I, IFN III e IL-1 β luego de infección por 4 h con baculovirus en células epiteliales humanas. La MOI de baculovirus utilizada fue 100. Los niveles relativos de mRNA fueron medidos por RT-qPCR. (A) IFN β . (B) IFN $\lambda 1$. (C) IL-1 β . Se muestra un ensayo representativo. ** $p < 0,01$.

Los resultados mostraron que, en coincidencia con el estado antiviral observado, los baculovirus produjeron sólo en células HEK293 un aumento del mRNA de IFN λ 1 de $5,19 \pm 0,30$ veces respecto de las células sin infectar (Fig. R23 B). Los niveles de IFN β , probablemente dependientes de la vía cGAS-STING, y los de IL-1 β no se vieron modificados por la infección en ningún caso (Fig. R23 A y C).

Ensayo de transcomplementación de cGAS y STING

Para estudiar en mayor profundidad la participación cGAS y STING en el efecto producido por los baculovirus en células humanas, se construyó un plásmido con la secuencia codificante de STING humano bajo la regulación del promotor CMV, denominado pcDNA-hSTING (Materiales y Métodos, sección 6.2) y se adquirió otro plásmido que contiene la secuencia codificante de cGAS humano bajo la regulación del promotor CMV, el vector pTRIP-CMV-Puro-2A-cGAS (Materiales y Métodos, sección 2). Las células HEK293 y HEK293 T se transfectaron con ambos vectores y a las 48 hpt se infectaron con baculovirus a una MOI de 100 durante 4 h. Finalmente, se infectaron con VSV y se cuantificaron los títulos virales por el método de titulación a punto final en células Vero se extrajeron los RNA totales por la metodología ya descrita para cuantificar niveles de expresión de distintos mensajeros. Como control, se utilizó el plásmido pcDNAeGFP (Materiales y Métodos, sección 14.1).



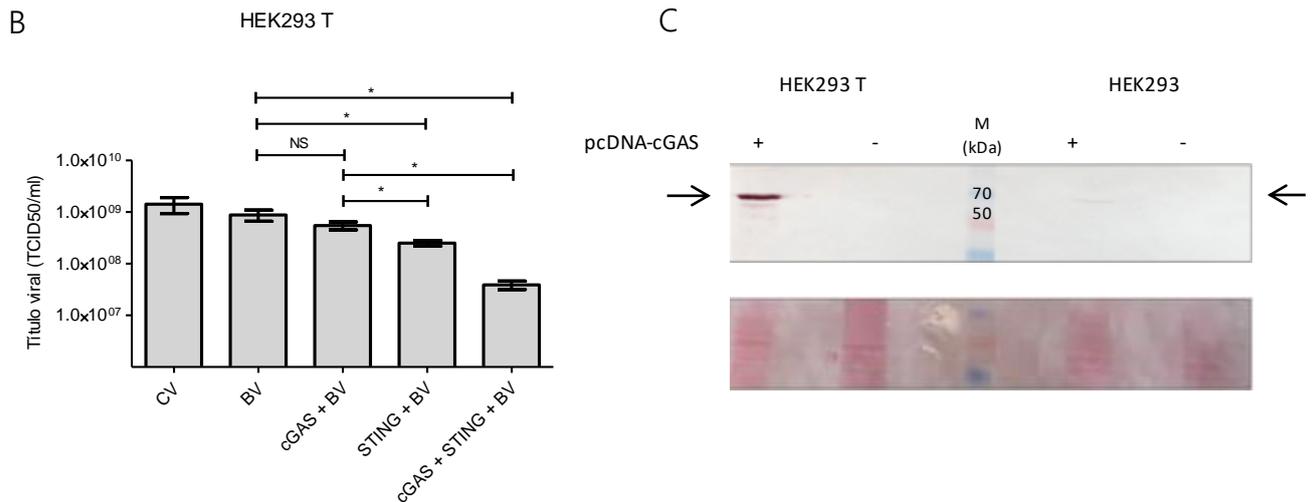


Figura R24: Actividad antiviral en células HEK293 y HEK293 T transcomplementadas con STING y/o cGAS. Cuantificación del título de VSV, luego de una infección por 4 h con baculovirus a una MOI de 100. (A) Células HEK293. (B) Células HEK293 T. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (C) Caracterización de la proteína cGAS por Western blot con un anticuerpo anti cGAS. Se muestra la tinción previa de la membrana con Rojo Ponceau como control de carga de las muestras.

En la figura R24 A se observa que en células HEK293, la transfección con el plásmido de expresión de cGAS seguida de infección con baculovirus produjo una disminución estadísticamente significativa del título de VSV de alrededor de 100 veces, respecto de cuando las células se infectaron únicamente con baculovirus. Por el contrario, cuando se transfectó con pcDNAeGFP y se infectó con baculovirus, no se modificó el título viral respecto del obtenido en las células sólo infectadas con baculovirus. Estos datos sugieren la participación del sensor cGAS en la detección del DNA baculoviral.

En células HEK293 T, como se observa en la figura R24 B, la transfección con el plásmido de expresión de STING, pero no con el plásmido de expresión de cGAS, seguida por la infección con baculovirus, provocó la disminución estadísticamente significativa del título de VSV, respecto del de las células sólo infectadas con baculovirus, del mismo modo que ocurrió en las células HEK293 sin transfectar de la figura R22 A. La transfección con ambos plásmidos de expresión (cGAS y STING), previa a la infección con baculovirus inhibió de un modo más abrupto la replicación del virus VSV.

En la figura R24 C se muestra la inmunodetección de cGAS por *Western blot*. Fue posible visualizar una banda de aproximadamente 58 kDa, tamaño esperado para esta proteína, únicamente en las células transfectadas.

Así, los resultados en ambas líneas celulares mostraron la producción de un estado antiviral disparado por la infección con baculovirus brotantes, dependiente de STING e independiente de cGAS. Además la vía cGAS-STING mostró ser una vía responsable de mediar una potente actividad antiviral por los baculovirus en estas células.

Una vez probada la dependencia de STING en el establecimiento de un estado antiviral en ambos tipos celulares, se evaluaron los niveles de los mRNA de IFN β , IL-1 β e IFN λ 1 luego de una infección con baculovirus en células HEK293 y HEK293 T previamente transfectadas con los vectores de expresión de cGAS y/o STING.

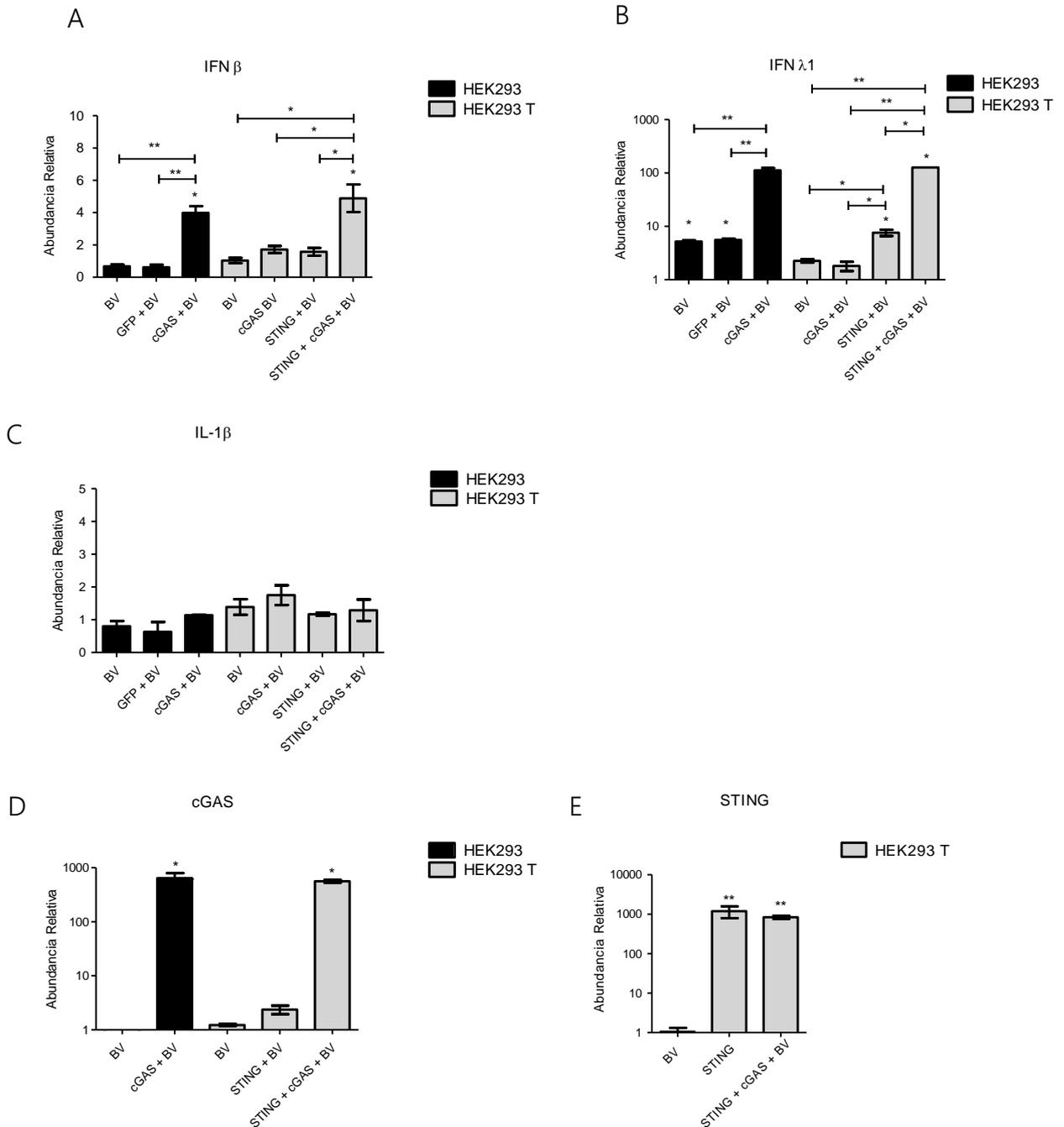


Figura R25: Expresión de IFN I, IFN III e IL1 β luego de una infección de 4 h con baculovirus en células epiteliales humanas complementadas con STING y cGAS. Las células HEK293 (barras negras) o las células HEK293 T (barras grises) fueron transfectadas con plásmidos de expresión de STING o cGAS. A las 48 h fueron infectadas con BV a una MOI de 100. Los mRNA fueron medidos por RT-qPCR. (A) IFN β . (B) IFN λ 1. (C) IL-1 β . (D) cGAS (E) STING. Se muestra un ensayo representativo. * p < 0,05, ** p < 0,01.

Los resultados obtenidos, graficados en las figuras R25 A y B mostraron que en células HEK293 transcomplementadas con cGAS e infectadas con baculovirus hubo un aumento de la expresión relativa de IFN β de $3,30 \pm 0,93$ veces y un aumento de IFN $\lambda 1$ de $21,54 \pm 5,85$ veces respecto de células sólo infectadas con baculovirus. Adicionalmente, en células HEK293 T transcomplementadas con cGAS y STING y luego infectadas con BV, los niveles de IFN β aumentaron $4,67 \pm 1,67$ veces y los niveles de IFN $\lambda 1$, $55,88 \pm 22,6$ veces respecto de las células sólo infectadas con baculovirus. Es decir que la funcionalidad de la vía cGAS-STING en células epiteliales de riñón humano permitió la producción de IFN β y potenció la producción de IFN $\lambda 1$ frente a la infección con baculovirus. Además, las células HEK293 T transcomplementadas sólo con STING fueron capaces de producir en respuesta a la infección un aumento de IFN $\lambda 1$ ($3,36 \pm 0,82$ veces respecto de las células sólo infectadas con baculovirus), a pesar de la deficiencia en cGAS, tal como fue medido en las células HEK293 (Fig. R23 B). En la figura R25 C se muestra que los baculovirus no estimularon la producción de IL-1 β en estas células, independientemente de la presencia de cGAS o STING. En las figuras R25 D y E se caracterizaron los niveles de los mRNA de cGAS y STING por RT-qPCR a las 48 hpt, mostrando que en todas las transfecciones se obtuvieron aumentos del mRNA de cGAS superiores a 500 veces respecto de las células sin transfectar y de aproximadamente 1000 veces para el caso del mRNA de STING en las transfecciones correspondientes.

Estos resultados mostraron cómo la infección con baculovirus en estas células provoca un leve aumento de IFN III, independientemente de cGAS y para el cual STING es necesario, y un mayor aumento de este tipo de IFN, junto con la producción de IFN I, en el que el receptor cGAS está involucrado.

Importancia de vía cGAS-STING en fibroblastos murinos frente a la infección con baculovirus

En los últimos años, el surgimiento de tecnologías altamente versátiles de edición de genomas ha brindado la posibilidad de introducir modificaciones específicas de secuencia de forma rápida y económica en los genomas de un amplio espectro de tipos de células y organismos. En particular, en células murinas estas tecnologías han llevado al descubrimiento de la participación de STING y de distintos sensores citosólicos en el reconocimiento del ácido nucleico viral, ya sea a través del uso de MEF provenientes de ratones *knockout* o a través de líneas celulares editadas.

Edición génica de células NIH/3T3

Con el objetivo de estudiar la vía de detección de ácidos nucleicos citosólico cGAS-STING en células murinas, se editaron células NIH/3T3 a través de la metodología CRISPR-Cas9. Este método permite manipular con precisión cualquier secuencia génica de manera específica a través de un segmento de 20 bases de RNA guía (sgRNA: del inglés *single guide RNA*). El mecanismo de edición génica mediada por CRISPR-Cas9 requiere para el reconocimiento de la secuencia blanco la presencia de un corto protoespaciador adyacente (PAM, del inglés: *protospacer adjacent motif*) que flanquea el sitio blanco y la formación subsiguiente de un bucle R debido a la hibridación de bases complementarias entre el RNA guía y el DNA blanco. Luego se produce un corte de doble cadena (DSB, del inglés: *double-strand break*) en el DNA genómico seleccionado. El DSB es generado por los dos dominios de la nucleasa Cas9 que se repara mediante mecanismos de reparación del DNA de la célula. De esta manera, en ausencia de un templado de reparación, el mecanismo que opera es el NHEJ (del inglés: *nonhomologous end joining*) que es propenso a errores, generando inserciones y deleciones (indels) o incluso sustituciones en el sitio de DSB, lo que a menudo produce la interrupción de la función del gen debido al corrimiento del marco de lectura de la proteína (Fig. R26). En este trabajo de Tesis se utilizó un vector que contiene la secuencia de la endonucleasa Cas9 bajo la regulación del promotor CMV: pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 (Materiales y Métodos, sección 2). Esta secuencia de Cas9 genera un doble *nick* en la hebra del DNA a editar.

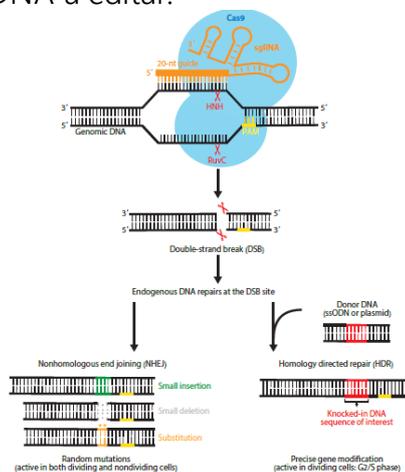


Figura R26: Esquema del mecanismo de acción de CRISPR-Cas9. [194].

Evaluación de off targets

Dado que una secuencia de 20 nucleótidos puede estar representada varias veces en un genoma, se estudiaron los posibles *off targets* de los sgRNA utilizados con el *software CCTop - CRISPR/Cas9 target online predictor* [195]. Este programa permitió realizar una evaluación *in silico* identificando y clasificando los posibles sitios blanco de sgRNA. Para cada sitio fuera de la secuencia blanco de cada sgRNA se calculó una puntuación que combina el número de sitios fuera del sitio blanco y la distribución de los *mismatch*, dado que la probabilidad de que la unión sgRNA/DNA sea estable disminuye, según pruebas experimentales, cuanto más cerca se encuentra el *mismatch* del PAM.

A

Legend for off-target site positon: **E** = exonic, **I** = intronic, **-** = intergenic
 Legend for the CRISPRater score: **LOW efficacy (score<0.56)**, **MEDIUM efficacy (0.56<=score<=0.74)**, **HIGH efficacy (score>0.74)**

Sequence: **AAAGATGAGGGCTACATATTTGG**
 Efficacy score by CRISPRater: **0.66 MEDIUM**
 Oligo pair with 5' extension fwd: TAggAAAGATGAGGGCTACATATT rev: AAACAATATGTAGCCCTCATCTTT
 Oligo pair with 5' substitution fwd: TAggAGATGAGGGCTACATATT rev: AAACAATATGTAGCCCTCATCT

Top 20 offtarget sites out of 76 (including on target; for full list see xls file)

Coordinates	strand	MM	target seq	PAM	distance	gene name	gene id
chr18:35739503-35739525	+	0	AAAGATGA [GGGCTACATATT]	TGG	0	E Tmem173	ENSMUSG00000024349
chr2:155147393-155147415	+	3	ACAGGTGA [GTGCTACATATT]	TGG	8104	I Itch	ENSMUSG00000027598
chr4:68622035-68622057	+	3	TAAGATGG [TGGCTACATATT]	TGG	NA	- NA	NA
chr3:50924962-50924984	-	4	ACAAATGC [AGGCTACATATT]	AGG	3437	- Gm37843	ENSMUSG000000102614
chr15:63174715-63174737	+	4	ATATATTA [GTGCTACATATT]	AGG	NA	- NA	NA
chr7:63726974-63726996	-	4	AGACAGGA [GGACTACATATT]	TGG	422	I Otud7a	ENSMUSG00000033510
chr15:37963597-37963619	+	4	GGAGAGGA [GGGTACATATT]	TGG	2279	- Rrm2b	ENSMUSG00000022292
chr12:36965752-36965774	-	3	AAAGAGGA [AGCCTACATATT]	GGG	36065	- CT010456.1	ENSMUSG000000105215
chr2:11879622-11879644	+	4	AAAAAGGC [GGTCTACATATT]	GGG	20438	- Gm34768	ENSMUSG000000103542
chr9:68079837-68079859	-	4	ATACATGA [GTCTACATATT]	GGG	84203	- Vps13c	ENSMUSG00000035284
chr19:12207389-12207411	-	4	AAAGCAGA [AGCCTACATATT]	TGG	2157	- Olfr1431	ENSMUSG000000094133
chr2:147132616-147132638	-	4	ACAGATGT [TGTCTACATATT]	AGG	13770	- Gm14116	ENSMUSG000000082158
chr17:85662484-85662506	+	4	AGAGATCA [GAGGTACATATT]	AGG	21771	- Six2	ENSMUSG00000024134
chr1:41770137-41770159	+	4	AAATTTGA [AGGCAACATATT]	TGG	11649	- Gm29260	ENSMUSG000000100832
chr13:36464134-36464156	+	4	AAGAATTA [GGGCTAATATT]	AGG	53904	I Fars2	ENSMUSG00000021420
chr13:41044626-41044648	+	2	AAAGATGA [GGTCTACATATT]	AGG	1371	I Mak	ENSMUSG00000021363
chr6:110185305-110185327	+	4	GGAGATGA [GAGCTAGATATT]	AGG	NA	- NA	NA
chr11:14283417-14283439	-	4	AAAGATTA [GGACTCCATATT]	TGG	NA	- NA	NA
chr1:47494509-47494531	+	3	AAACATGA [GGGACGATATT]	GGG	14311	- Gm18117	ENSMUSG000000100530

B

Legend for off-target site positon: **E** = exonic, **I** = intronic, **-** = intergenic
 Legend for the CRISPRater score: **LOW efficacy (score<0.56)**, **MEDIUM efficacy (0.56<=score<=0.74)**, **HIGH efficacy (score>0.74)**

Sequence: **CGGCTGGGGCTCCCGTACGGCGG**
 Efficacy score by CRISPRater: **0.86 HIGH**
 Oligo pair with 5' extension fwd: TAggCGGCTGGGGCTCCCGTACGG rev: AAACCCGTACGGGAGCCCCAGCCG
 Oligo pair with 5' substitution fwd: TAggGCTGGGGCTCCCGTACGG rev: AAACCCGTACGGGAGCCCCAGC

Coordinates	strand	MM	target seq	PAM	distance	gene name	gene id
chr9:78442743-78442765	+	0	CGGCTGGG [GCTCCCGTACGG]	CGG	0	E Mb21d1	ENSMUSG000000032344
chr6:120294140-120294162	+	3	AGGCTGTG [GCTCCCGTACGG]	TGG	202	I D330020A13Rik	ENSMUSG000000097481
chr2:39137597-39137619	-	4	TGGCTGAG [GCCCCGACTG]	AGG	4511	I Scai	ENSMUSG000000053236
chr10:105322779-105322801	+	4	CTGCTGTG [GCTCCAGTAAAG]	AGG	61	I Tmtc2	ENSMUSG000000036019
chr13:46502095-46502117	+	4	CGACTCGG [GCTCCCGTACAG]	GGG	0	E Cap2	ENSMUSG000000021373

Figura R27: Análisis de off targets para los sgRNA STING y cGAS. Score asignado para los sgRNA de STING (A) y cGAS (B) utilizando el software CCTop - CRISPR/Cas9 target online predictor.

En el caso del gRNA STING se obtuvo un *score* medio (0,66), encontrando 76 secuencias blanco con dos o más *mismatch* (Fig. R27 A) y en el caso del gRNA cGAS un *score* alto (0,86) encontrando 4 secuencias blanco con 3 o más *mismatch* (Fig. R27 B). Estos resultados dieron lugar a continuar con el siguiente paso experimental.

Obtención de las líneas NIH/3T3 sting^{-/-} y NIH/3T3 cgas^{-/-}

Para obtener células derivadas de la línea NIH/3T3 deficientes en STING o cGAS, en primer lugar se realizó el clonado de la secuencia guía STING o cGAS en el vector pSPgRNA (Materiales y Métodos, sección 13.1 a 13.3). Luego, se establecieron las condiciones óptimas de transfección de las células NIH/3T3 (Materiales y Métodos, sección 13.4). Primero, se evaluó la transfección de pcDNAeGFP con distintos lípidos catiónicos. Se ensayaron dos condiciones de densidad celular y distintas relaciones de DNA/lípidos catiónicos. En la tabla R2 se muestra, para cada reactivo, la condición que presentó el mayor número de células positivas (cantidad de células verdes) observadas al microscopio de fluorescencia a las 24 y 48 h.

Reactivos	Células positivas a las 24 hpt	Células positivas a las 48 hpt
<i>Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent</i>	48	15
<i>Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent</i>	37	22
<i>DMRIE-C Reagent</i>	0	0
<i>X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent</i>	4	8
<i>K2- Transfection system</i>	9	18

Tabla R2: Eficiencia de transfección con distintos reactivos en células NIH/3T3.

La eficiencia que se obtuvo fue menor o igual al 0,068 %, lo que es inapropiado para llevar a cabo la edición génica en estas células. Por lo tanto, se evaluó si era posible obtener mejores resultados empleando la técnica de electroporación. Se ensayaron distintos *buffers* (PBS o HBS) y distintas condiciones de pulso eléctrico (Materiales y Métodos, tabla M3). Así, se determinó que la utilización de HBS y un pulso eléctrico de 180 V, 2000 μ F, ∞ R eran las

mejores condiciones para realizar las transfecciones. En la figura R28 se muestran las fotografías de algunas de las condiciones evaluadas.

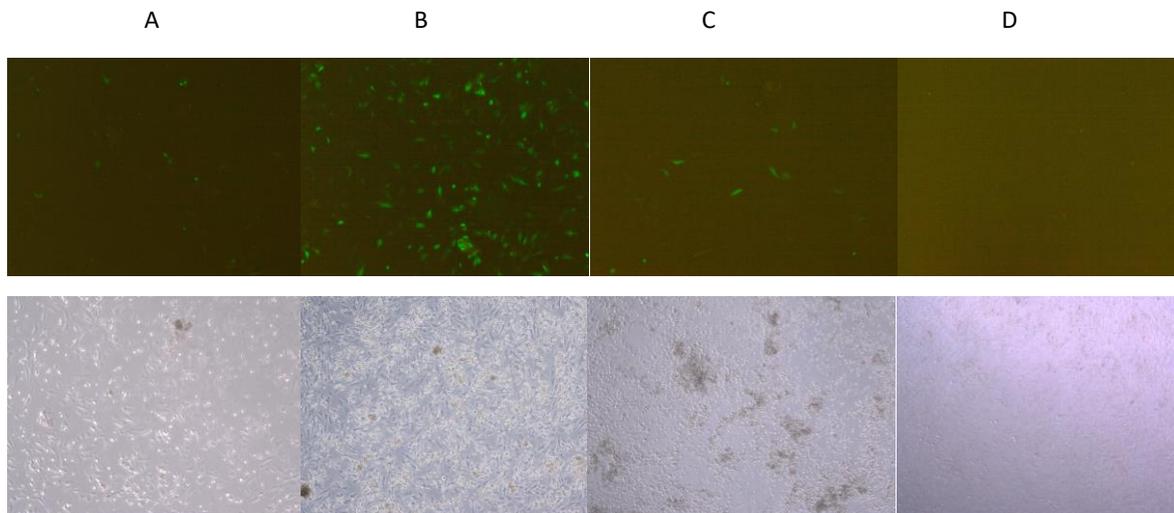


Figura R28: Puesta a punto del método de transfección por electroporación en células NIH/3T3. Fotografías tomadas en microscopio de fluorescencia a las 24 hpt de las distintas condiciones de electroporación A: 160 V, 2000 μ F; ∞ R. B: 180 V, 2000 μ F; ∞ R. C: 200 V, 2000 μ F; ∞ R. D: 50 V, 3000 μ F; ∞ R. A= 10X.

Así, se determinó que la utilización de HBS y un pulso eléctrico de 180 V, 2000 μ F, ∞ R eran las mejores condiciones para realizar las transfecciones.

A continuación, dado que el plásmido pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 posee como marcador de selección el antibiótico blasticidina, se realizó una curva con este antibiótico en células NIH/3T3 para establecer la concentración óptima a utilizarse (Materiales y Métodos, sección 13.5).

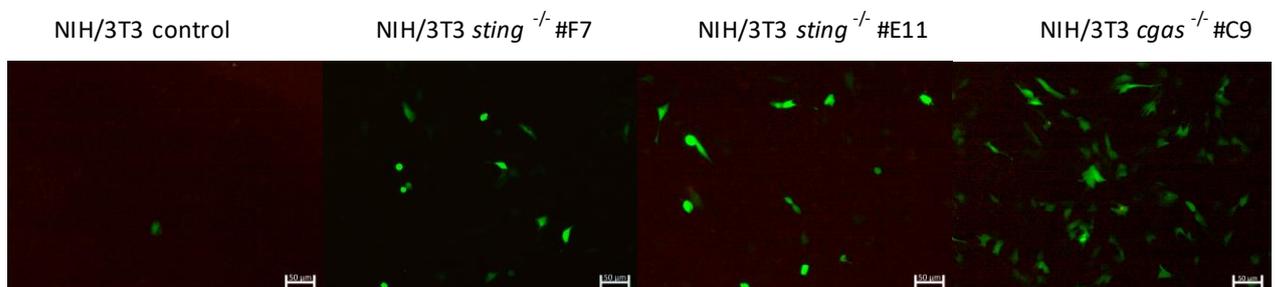
Día Concentración	1	2	3	5	7	8
2,5	80	100	0			
1,25	50	70	80	100		
0,625	0	20	50	60	95	100
0,3125	0	0	0	40	90	100
0,15625	0	0	0	20	40	90
0	0	0	0	0	0	0

Tabla R3: Curva de blasticidina en células NIH/3T3. Se indican los porcentajes de muerte de las células a lo largo del tiempo para distintas concentraciones de blasticidina.

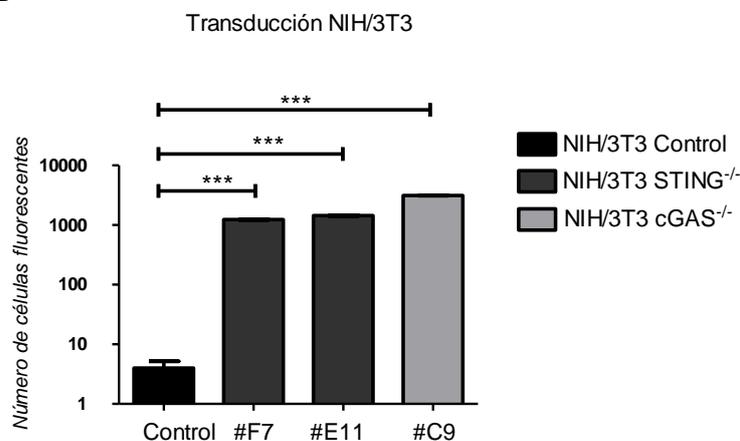
Se determinó que 2,5 $\mu\text{g/ml}$ era la concentración óptima, ya que era la mínima concentración de blasticidina capaz de provocar la muerte de entre un 80 y 100 % de las células al segundo día.

Una vez puestas a punto todas las condiciones del ensayo, las células NIH/3T3 se electroporaron con los plásmidos SPgRNA-cGAS y pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 o SPgRNA-STING y pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 (Materiales y Métodos, sección 13.6). Para realizar la línea celular control, se electroporaron células NIH/3T3 con el plásmido pSPgRNA vacío y el plásmido pST1374-NLS-flag-linker-Cas9. A las 24 h se seleccionaron las células con blasticidina, se dejaron crecer y se realizó una ronda de clonado por dilución límite. A los 10 días se obtuvo crecimiento en 105 pocillos de la línea NIH/3T3 *sting*^{-/-} y 22 pocillos de la línea NIH/3T3 *cgas*^{-/-}. Dados los resultados obtenidos con las transducciones de las células humanas HEK293 y HEK293 T (Fig. R20) y sus capacidades de generar un estado antiviral (Fig. R22), y apoyado en datos bibliográficos que sugieren una estrecha relación entre la eficiencia de expresión de un transgén y el estado antiviral que se genera en una población celular por la infección, se realizó a modo de *screening* un ensayo de transducción con el baculovirus AcCAGGFP para seleccionar los pocillos que mostraran mejores eficiencias de transducción. Así, se continuó con dos aislamientos de la línea NIH/3T3 *sting*^{-/-} (#E11 y #F7) y uno de la línea NIH/3T3 *cgas*^{-/-} (#C9), cuyos resultados de eficiencia de transducción se muestran a continuación (Fig. R29).

A



B



*Figura R29: Ensayo de transducción con el baculovirus Ac_{CAG}GFP en las líneas NIH/3T3 editadas. (A) Observación al microscopio de fluorescencia a las 24 hpi. (B) Cuantificación de células verdes con el software Image J. *** $p < 0,001$.*

Como se observa en la figura R29A, en las tres muestras hubo un aumento en la eficiencia de expresión del transgén aportado por el baculovirus Ac_{CAG}GFP respecto de las células control. En la figura R29 B se muestra la cuantificación de las células eGFP positivas: mientras que en la línea control $4,0 \pm 1,2$ células de un total de 8×10^4 resultaron positivas, en las células NIH/3T3 *sting*^{-/-}#F7 y #E11, 1234 ± 37 y 1436 ± 25 fueron positivas, respectivamente. Por otro lado, en la muestra NIH/3T3 *cgas*^{-/-}#C9, 3127 ± 49 células mostraron fluorescencia.

Evaluación de la edición génica

Con el objetivo de comprobar la correcta edición de los genes blanco en la población celular, se realizó en primer lugar un ensayo de T7 endonucleasa I. Este tratamiento se basa en el reconocimiento por esta enzima del DNA no complementario, generando una escisión en la doble hebra. Para ello, se extrajo el DNA celular de las muestras y del control (Materiales y Métodos, sección 3.10) y se realizaron reacciones de PCR a fin de amplificar regiones de aproximadamente 800 pb que contuvieran las secuencias genómicas blanco. En el caso del gen que codifica para cGAS, a pesar de realizar la reacción con tres pares de oligonucleótidos diferentes, no fue posible obtener un único producto de PCR del tamaño esperado, ni con el rendimiento necesario como para poder continuar con la reacción luego de purificarlo. Por lo tanto, se siguió adelante con la evaluación de la edición del gen que codifica para STING. Los productos de PCR purificados se desnaturalizaron y rehibridaron de manera controlada, previamente a ser digeridos con la enzima T7 endonucleasa I (Materiales y Métodos, sección 13.6). Finalmente, los productos de PCR con y sin el tratamiento de la enzima se sembraron en un gel de agarosa para ser visualizados. El producto de amplificación esperado para esta reacción corresponde a 812 pb, mientras que los productos esperados por la digestión con la T7 endonucleasa I corresponden a 692 pb y 120 pb aproximadamente, dado que la digestión de los heteroduplex debería producirse en el sitio de ocurrencia de los indels, donde la enzima Cas9 genera el doble *nick*, es decir a 3 pb río arriba de la secuencia PAM elegida. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R30.

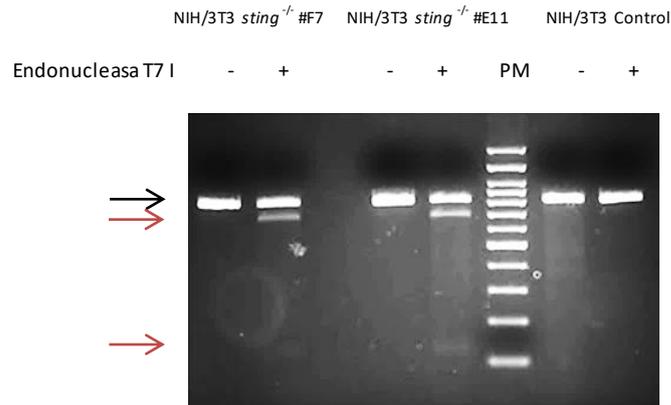


Figura R30: Ensayo de T7 endonucleasa I para evaluar la edición en las muestras. Gel de agarosa 2 % con los productos del ensayo de la T7 endonucleasa I de las células NIH/3T3 *STING*^{-/-} #F7 y #E11. PM: 100 bp (PB-L). La flecha negra indica el tamaño de la banda correspondiente a los homoduplex (fragmento sin digerir) y las flechas rojas a los productos de la digestión (heteroduplex).

Como se observa en la figura R30, los productos de PCR de NIH/3T3 *sting*^{-/-} #F7 y #E11 fueron parcialmente digeridos por la T7 endonucleasa I, resultando en la obtención de los fragmentos esperados y del producto sin digerir, lo que indica la presencia de heteroduplex y sugiere la ocurrencia de la edición génica de *sting*. La banda sin digerir muestra la presencia de homoduplex, dados por la rehibridación de dos moléculas con la secuencia original o con las secuencias editadas en el mismo sitio. Estos resultados, indican que ambas poblaciones celulares están editadas, que son líneas oligoclonales y que no son homocigotas para cada mutación.

A partir de este resultado y para confirmar la edición, se secuenciaron los productos de PCR por el método de Sanger. Las secuencias obtenidas de las células editadas y control fueron analizadas con el algoritmo del *software* TIDE, que reconstruye con precisión el espectro de los indels detectados a partir de las secuencias de las muestras e informa sus identidades y sus frecuencias. La muestra control sirvió como templado para informar los indels en las muestras (Materiales y Métodos, sección 13.7).

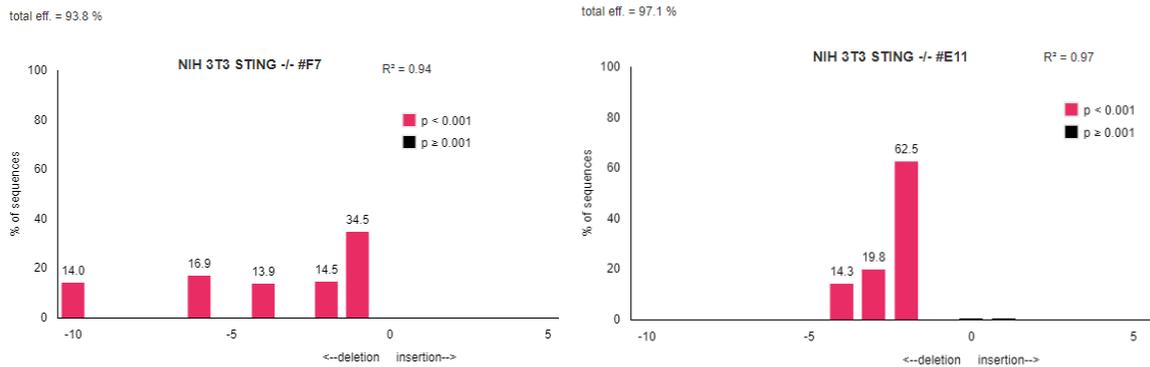


Figura R31: Análisis de las células editadas NIH/3T3 *sting*^{-/-} #F7 y # E11 con el software TIDE. Las barras indican el tipo de indel hallado (valores positivos corresponden a inserciones y valores negativos corresponden a deleciones) y su frecuencia.

En la figura R31 se observa que en ambas muestras no se detectó la secuencia de *sting* sin editar. La muestra NIH/3T3 *sting*^{-/-}#F7 resultó tener un 93,8 % de indels en la población celular que en todos los casos consistió de deleciones. La deleción más frecuente fue de un nucleótido, representando el 34,5 % de la población. En el caso de NIH/3T3 *sting*^{-/-}#E11 hubo un 97,1 % de indels en la población celular y también fueron deleciones. La más frecuente representó el 62,5 % de la población y fue una deleción de dos nucleótidos. Estos resultados indican que las muestras fueron editadas en la región seleccionada y que en ambas muestras se detectan diferentes indels, es decir que son heterogéneas y que no representan a una línea monoclonal, lo que es esperable dado que provienen de una única ronda de dilución límite. Así, la edición génica nos permitió contar con líneas celulares murinas de gran utilidad para estudiar la funcionalidad de STING en el contexto de la infección por baculovirus.

A pesar de no haber podido realizar los ensayos para corroborar la edición de *cgas* en las células NIH/3T3 *cgas*^{-/-}#C9, los resultados de la eficiencia de transducción en estas células nos alentaron a continuar con la evaluación del fenotipo obtenido.

Estudio del fenotipo de las células NIH/3T3 sting^{-/-} y NIH/3T3 *cgas*^{-/-}

A fin de evaluar si los fibroblastos murinos editados en el gen *sting* tenían alterada su capacidad de generar un estado antiviral frente a la infección con baculovirus y para determinar si el aumento observado en la expresión de eGFP en las células NIH/3T3 *sting*^{-/-} #F7 y #E11 y en las células NIH/3T3 *cgas*^{-/-}#C9 (Fig. R29) se correlaciona con el estado antiviral frente al virus VSV, se realizó un ensayo de medición de actividad antiviral en iguales condiciones a las ya descritas.

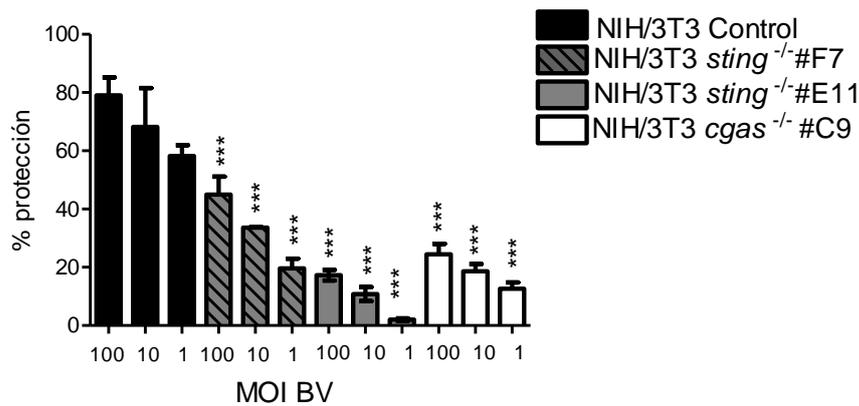


Figura R32: Actividad antiviral en las líneas NIH/3T3 editadas. Ensayo de protección frente a VSV luego de una infección de 4 h con baculovirus en las células NIH/3T3 control (barras negras), NIH/3T3 *STING*^{-/-} #F7 (barras grises rayadas), NIH/3T3 *sting*^{-/-} #E11 (barras grises) y NIH/3T3 *cGAS*^{-/-} #C9 (barra blancas). Los asteriscos corresponde al nivel de significancia del análisis estadístico que surge de la comparación entre el porcentaje de protección de la muestra respecto de NIH/3T3 control para la misma MOI de baculovirus. *** $p < 0,001$.

Los resultados obtenidos demostraron que la edición de ambos genes resultó en una disminución en el porcentaje de protección frente a VSV respecto de la línea control, como se muestra en la figura R32. A una MOI de 100 de baculovirus, el porcentaje de protección frente a VSV en las líneas NIH/3T3 *sting*^{-/-} #F7, NIH/3T3 *sting*^{-/-} #E11, y NIH3T3 *cgas*^{-/-} #C9 se redujo en un 43 %, 78 % y 69 %, respectivamente. Cuando las infecciones se realizaron con con MOI de 10 y de 1, la reducción en los porcentajes de protección fue del 51 % y 66 % para las células NIH/3T3 *sting*^{-/-} #F7; 84 % y 97 % para las células NIH/3T3 *sting*^{-/-} #E11, y 73 % y 78 % para las células NIH3T3 *cgas*^{-/-} #C9.

Así, los resultados indican que en los fibroblastos murinos, tanto STING como cGAS parecen jugar un papel importante en la producción de un estado antiviral por baculovirus. Además, fue posible observar que en todos los casos, la mayor capacidad de expresar un transgén portado en el genoma del baculovirus, comparada con la de las células control, coincidió con una disminución de la respuesta antiviral producida. Sin embargo, no hubo una exacta correlación entre los resultados, ya que las células NIH/3T3 *sting*^{-/-} #F7 y #E11 mostraron eficiencias de transducción similares y las células NIH3T3 *cgas*^{-/-} #C9 una eficiencia mayor.

A fin de determinar si la disminución en la actividad antiviral de las líneas editadas en STING y cGAS se relaciona con una producción deficiente de IFN I, se evaluaron los niveles del mRNA de IFN β por RT-qPCR luego de una infección de 4 h con baculovirus en las células NIH/3T3 *sting*^{-/-}, NIH/3T3 *cgas*^{-/-} y NIH/3T3 Control.

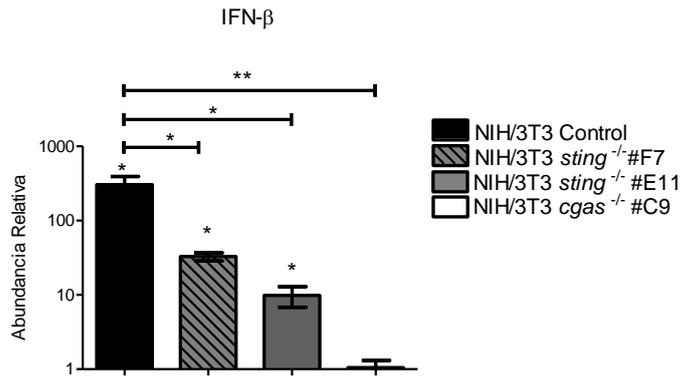


Figura R33: Expresión de IFN β en las líneas NIH/3T3 editadas. Expresión del mRNA medido por RT-qPCR a las 4 h luego de una infección con baculovirus en células NIH /3T3 Control (barras negras), NIH/3T3 *sting*^{-/-} #F7 (barras grises rayadas), NIH/3T3 *sting*^{-/-} #E11 (barras grises) y NIH/3T3 *cgas*^{-/-} #C9 (barra blanca). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Se muestra un ensayo representativo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Como se muestra en la figura R33, los niveles relativos del mRNA de IFN β en respuesta a la infección en las células deficientes en STING aumentaron significativamente respecto del de las células sin infectar ($32,8 \pm 8,27$ para #F7 y $9,87 \pm 3,06$ para #E11), aunque este aumento fue significativamente menor que el observado en las células control, no editadas ($303,79 \pm 89$ veces). Estos datos muestran la importancia de STING en la producción de IFN β mediada por baculovirus en estas células y sugieren que aún bajos niveles de este adaptador, dados posiblemente por secuencias editadas que puedan generar una proteína aún funcional, dan un incremento medible del mensajero de IFN β . Además, el mayor aumento del mRNA de IFN β en las células #F7 respecto del de las células #E11 se correlaciona con la mayor actividad antiviral obtenida. En las células NIH/3T3 *cgas*^{-/-} #C9, los niveles del mRNA de IFN β fueron similares a los de las células sin infectar, es decir, la infección con baculovirus no provocó un aumento de IFN β , sugiriendo la esencialidad del detector de DNA cGAS para producir esta respuesta. El estado antiviral residual medido en estas células (Fig. R32), puede indicar la participación de un mecanismo alternativo y no una falla en la eliminación de cGAS.

Transcomplementación con los genes cGAS y STING de las células editadas

Para confirmar que el efecto de la edición se relacionaba directamente con la función génica y no con un efecto colateral, se realizaron ensayos de transcomplementación de STING y cGAS en las células NIH/3T3 *sting*^{-/-} #E11 y NIH/3T3 *cgas*^{-/-} #C9. Para ello, en primer lugar, se construyó el plásmido pcDNA-mSTING (Materiales y Métodos, sección 6.3). Con este

vector y/o con el plásmido pcDNA3.1-Hygro(+)-mscGAS (Materiales y Métodos, sección 2), se transfetaron las células y a las 48 h se infectaron con baculovirus a una MOI de 100 por 4 h (Materiales y Métodos, sección 14.2). Se realizaron ensayos de actividad antiviral frente a VSV (Fig. R34) y se midió la expresión relativa del IFN β por RT-qPCR (Fig. R35).

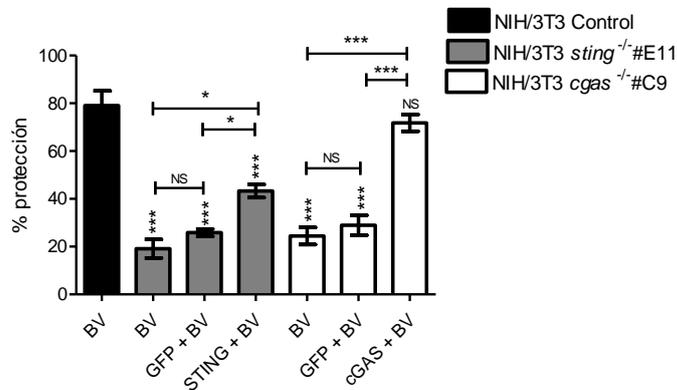


Figura R34: Actividad antiviral en las células NIH/3T3 editadas y transcomplementadas. Las líneas NIH/3T3 Control (barras negras) NIH/3T3 *sting*^{-/-} #E11 (barras grises) y NIH/3T3 *cgas*^{-/-} #C9 (barra blancas) fueron transfetadas con el plásmido de expresión de STING o cGAS por 48 h, luego infectadas con baculovirus a una MOI de 100 por 4 h y finalmente infectadas con VSV. Los resultados se muestran como % de protección frente a VSV. Los asteriscos encima de las barras corresponden al análisis estadístico que surge de la comparación entre el porcentaje de protección de la muestra respecto de NIH/3T3 Control. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, NS: no significativo.

En la figura R34 se observa que en las células NIH/3T3 *sting*^{-/-} #E11 transcomplementadas con el plásmido de expresión de STING se obtuvo un porcentaje de protección frente a VSV del $43,26 \pm 11,71$ %, valor significativamente mayor que el de las mismas células sin transfectar. Las células transfetadas con un plásmido control mostraron valores de protección similares a los de las células sin transfectar. Por otra parte, las células NIH/3T3 *cgas*^{-/-} #C9 complementadas con el plásmido de expresión de cGAS e infectadas resultaron protegidas frente a VSV en un $71,80 \pm 10,47$ %, alcanzando así valores similares a los de las células control infectadas. La transcomplementación fue más efectiva en el caso de cGAS, demostrando que la reducción de la actividad antiviral observada se debió a deficiencias en la actividad de este sensor.

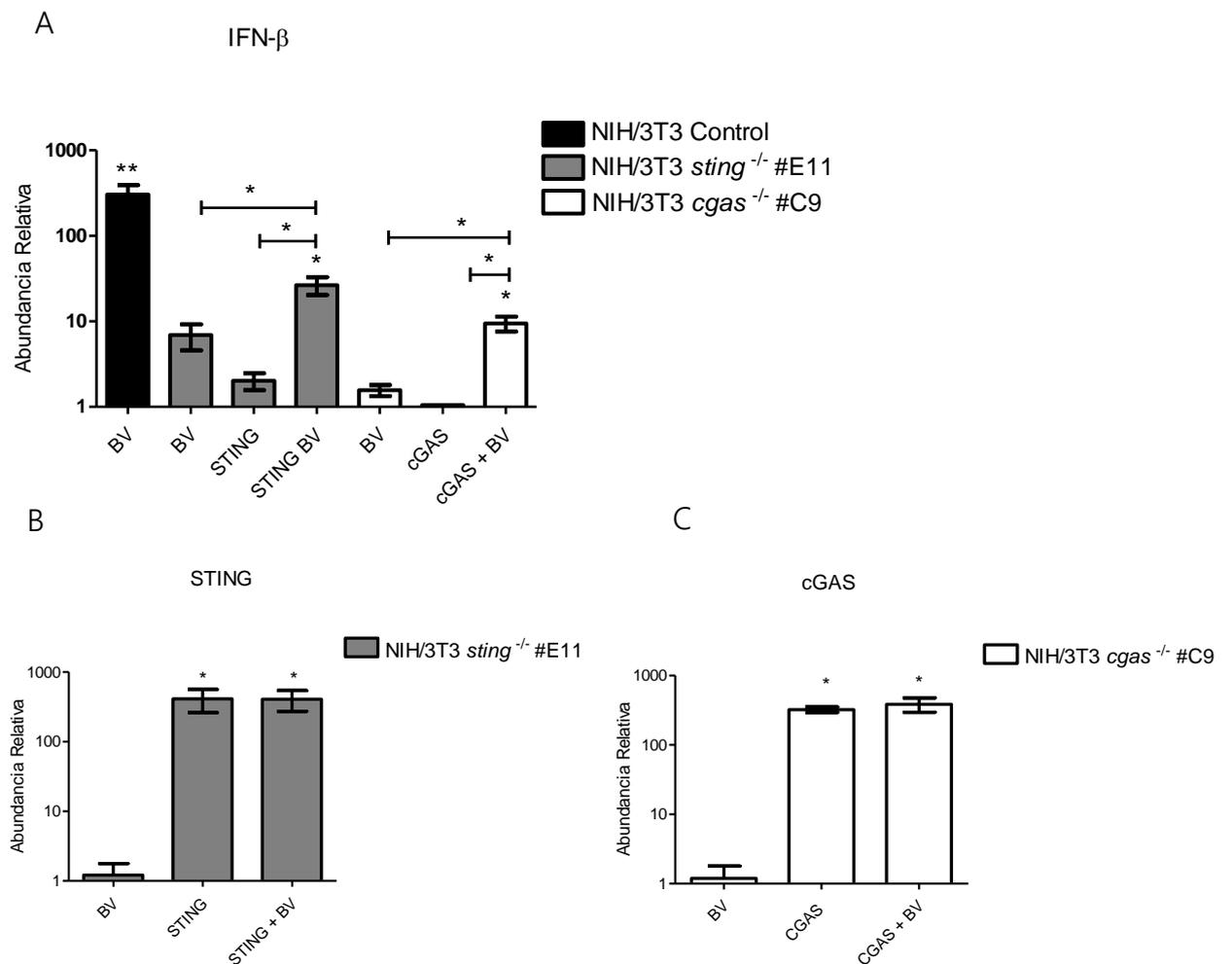


Figura R35: Expresión relativa de IFN β en las líneas NIH/3T3 editadas y transcomplementadas. Expresión del mRNA medido por RT-qPCR a las 4 h luego de una infección con baculovirus en células NIH /3T3 Control (barras negras), NIH/3T3 *sting*^{-/-} #E11 (barras grises) y NIH/3T3 *cgas*^{-/-} #C9 (barras blancas). (A) mRNA de IFN β . (B) mRNA de STING. (C) mRNA de cGAS. Se muestra un ensayo representativo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

En cuanto a la producción de IFN β en las células NIH/3T3 *sting*^{-/-} #E11 complementadas, hubo un aumento de $26,54 \pm 10,00$ veces en respuesta a la infección, que fue significativamente mayor al de las células que fueron únicamente infectadas con baculovirus. Las células NIH/3T3 *cgas*^{-/-} #C9 sólo produjeron IFN β en respuesta a la infección cuando fueron transfectadas con el plásmido de expresión de cGAS ($9,48 \pm 3,27$ veces) (Fig. R35 A). Si bien la transcomplementación de cGAS restableció por completo el estado antiviral de las células editadas (Fig. R34) y les devolvió su capacidad para producir IFN β luego de una infección con baculovirus, no fue suficiente para alcanzar los niveles que se produjeron en las células control.

Las figuras R35 B y C muestran los niveles de los mRNA de STING y cGAS en las transfecciones correspondientes.

Como fue mencionado en la Introducción, se ha determinado que en células murinas y humanas la molécula cGAMP sintetizada por cGAS puede propagarse desde células productoras a células vecinas (no productoras) a través de uniones *gap*, produciendo la activación de STING. Por lo tanto, a fin de comprobar que el DNA baculoviral detectado por células que expresan cGAS producen el segundo mensajero que luego impacta en la molécula STING de otras células para desencadenar la respuesta antiviral y la producción de IFN I, se desarrolló un ensayo en el que las células editadas para cada una de las moléculas se complementen entre sí (Fig. R36).

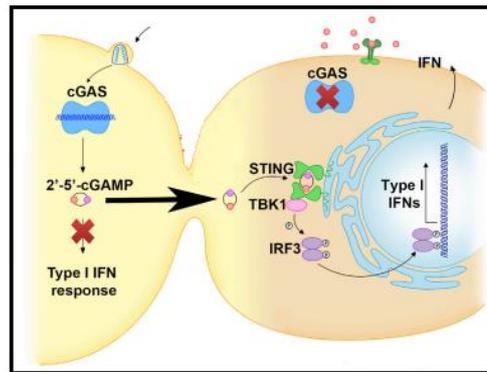
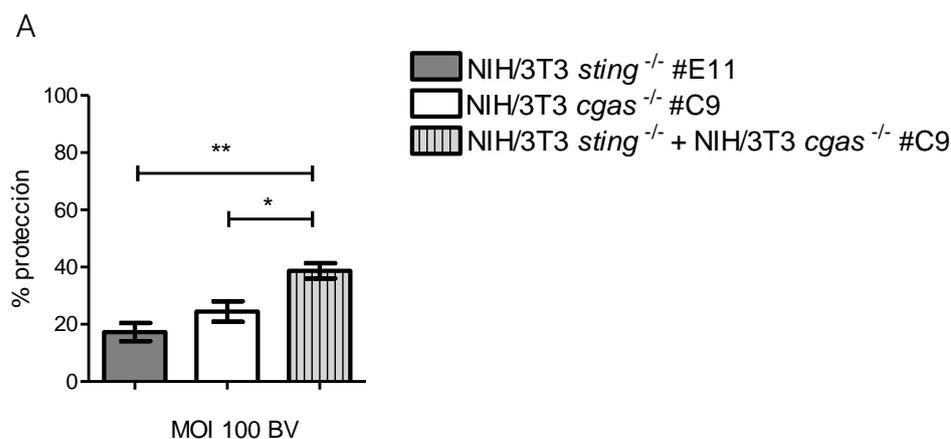


Figura R36: Esquema representativo de la complementación entre las células NIH/3T3 *sting*^{-/-} y NIH/3T3 *cgas*^{-/-}. Adaptado de [196].

Así, se sembraron en un mismo pocillo la misma cantidad de células NIH/3T3 *sting*^{-/-} #E11 y NIH/3T3 *cgas*^{-/-} #C9 y se infectaron con baculovirus a una MOI de 100 durante 4 h (Materiales y Métodos, sección 11.1). Se evaluaron tanto la respuesta de protección frente a VSV como los niveles del mRNA de IFN β en la mezcla, en comparación con cada tipo celular por separado. Los resultados se muestran en la figura R37.



B

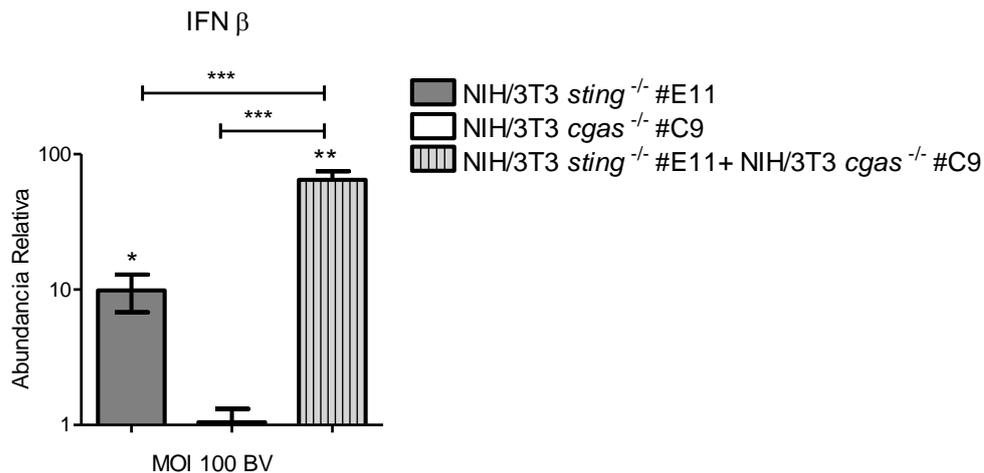


Figura R37: Ensayos de complementación entre las células NIH/3T3 *sting*^{-/-} y NIH/3T3 *cgas*^{-/-}. Células NIH/3T3 *sting*^{-/-} #E11 y NIH/3T3 *cgas*^{-/-} #C9 fueron sembradas juntas en iguales cantidades y se infectaron con baculovirus a una MOI de 100 durante 4 h para realizar un ensayo de protección frente a VSV (A) o de expresión de IFN β medido por RT-qPCR (B). NIH/3T3 *sting*^{-/-} #E11 (barras grises), NIH/3T3 *cgas*^{-/-} #C9 (barras blancas) y NIH/3T3 *sting*^{-/-} #E11 + NIH/3T3 *cgas*^{-/-} #C9 (barras grises rayadas). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Los resultados obtenidos (Fig. R37) muestran que al estar en contacto los dos tipos celulares, se produjo un estado antiviral en las células capaz de protegerlas frente a VSV que fue significativamente mayor a los de cada uno por separado, aunque menor al de la línea control. El porcentaje de protección en la mezcla alcanzó niveles del $38,7 \pm 6,5$ %.

La producción del mRNA de IFN β en respuesta a la infección por baculovirus tampoco alcanzó a la de la línea celular control, pero fue notoriamente más elevada que las de las células editadas por separado. Al estar en contacto los dos tipos celulares hubo un aumento relativo de $64,7 \pm 17,4$ veces respecto de las células sin infectar.

Aunque con la complementación entre células no se logró compensar las deficiencias de cada tipo celular, en principio porque la expresión global de cada molécula probablemente fue menor que en las células salvajes, estos datos sugieren que la línea NIH/3T3 *sting*^{-/-} es capaz de producir cGAMP que al propagarse activa a STING presente en la línea NIH/3T3 *cgas*^{-/-}, generando la producción de IFN β y un estado antiviral.

En su conjunto, los resultados en las células no inmunes humanas y murinas ponen de manifiesto la relevancia de la vía de detección cGAS-STING en la respuesta celular a los baculovirus y la participación accesoria de mecanismos independientes de cGAS en los que STING cumple un papel central.

En síntesis, la infección no productiva de células no inmunes de mamífero con el fenotipo brotado del baculovirus AcMNPV resulta en una acumulación de su genoma en citoplasma. El dsDNA viral es capaz de despertar un estado antiviral en fibroblastos murinos y células epiteliales humanas, principalmente a través de la vía de detección de ácidos nucleicos cGAS-STING que da lugar a una potente producción de IFN β , y en menor medida por medio de un mecanismo STING dependiente, en el que el sensor cGAS no está involucrado, sin la producción de IFN β . Además, en las células humanas de origen epitelial, el estado antiviral generado por los baculovirus a través de ambas vías se relaciona con la producción de IFN λ .

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El uso de los baculovirus como herramienta biotecnológica comenzó con su empleo como control biológico de plagas y como herramienta para la producción de proteínas recombinantes en célula de insecto [26]. Actualmente, las aplicaciones biotecnológicas de los baculovirus en mamíferos se han multiplicado y estos virus tienen hoy un gran protagonismo. Así, se destacan su uso como vector para el desarrollo de vacunas, para el *delivery* de genes y como inmunomoduladores. Este trabajo de Tesis se focalizó en entender algunos de los procesos que ocurren en la interacción baculovirus-célula de mamífero, en particular aquellos que se observan en células no inmunes. Los baculovirus naturalmente infectan artrópodos, principalmente insectos y hasta el momento, no se ha encontrado que estos virus generen patologías fuera del *phylum Arthropoda* [197]. En un principio se creía que la incapacidad de estos virus de infectar otros organismos estaba limitado por la capacidad de unión al receptor o para internalizarse. Esto fue refutado por Miller y colaboradores en 1985, cuando demostraron que la incapacidad de los baculovirus de generar una infección en células DL-1, línea celular derivada de *Drosophila melanogaster*, no está dada por su imposibilidad de entrar a la célula sino por la falta de transcripción de genes bajo promotores baculovirales [198]. Los primeros trabajos en demostrar la capacidad de los baculovirus de transducir células de mamífero fueron los de Sandig y colaboradores y los de Barsoum y colaboradores [61][60]. Estos autores demostraron la expresión de β galactosidasa bajo el promotor de CMV en HepG2 y en la línea de carcinoma humano Huh7, y la expresión de β galactosidasa bajo el promotor del virus RSV en HepG2 y en cultivo primario de hepatocitos de rata. Actualmente, está perfectamente demostrado que los baculovirus pueden transducir una amplia variedad de células que incluyen cultivos primarios y *stem cells*, aunque no todas con la misma eficiencia [52][25]. Además, no sólo se toma provecho de esta característica, utilizando a los baculovirus como vectores virales, sino que se sabe que aunque no replican y tienen baja toxicidad en mamíferos, despiertan una potente respuesta inmune innata que puede ser beneficiosa o perjudicial, según el fin que se esté persiguiendo. Se ha demostrado que la infección con baculovirus produce un incremento de IFN α , IFN β e IL-12 en células inmunes murinas [93]. Debido a la alta cantidad de motivos CpG contenidos en el genoma de los baculovirus [121], la vía mayormente estudiada ha sido la de TLR9/MyD88. Estudios *in vivo* demostraron que la producción de IFN γ e IL-12 se encuentran parcialmente disminuida en ratones MyD88^{-/-} y que la producción de IFN α e IFN β es totalmente independiente de TLR9 y parcialmente dependiente de MyD88 [93] [97]. Así, se iniciaron estudios orientados a estudiar otro tipo de PRR en los que se ha descrito a la proteína STING como molécula central para la producción sistémica de IFN I [97], aún sin describir cuál es el mecanismo de activación. Algunas células no inmunes como los fibroblastos juegan un papel importante en

la producción de IFN I en respuesta a virus en general, produciendo particularmente elevadas cantidades de IFN β . Se ha visto que cuando los baculovirus infectan MEF, estimulan la síntesis de IFN I [93][124] y que en MEF provenientes de ratones deficientes en STING, la producción de IFN β estimulada por baculovirus se encuentra afectada [140]. También se ha descrito en células de mamífero la expresión de algunos genes baculovirales inmediatamente tempranos [45][46][47] y se ha mencionado la posibilidad de que los mRNA formen estructuras detectadas por sensores de RNA citosólicos [140]. De esta manera, nos propusimos estudiar la presencia de los ácidos nucleicos baculovirales en el citoplasma de células no inmunes y la generación de un estado antiviral. En primer lugar, pretendimos esclarecer si, tras infecciones no productivas, los genomas baculovirales podrían estar disponibles en el citoplasma para ser detectados, y en qué proporción respecto de los genomas que alcanzan el núcleo. Así, utilizamos en primer lugar la estrategia de detectar genomas en ambos compartimentos a partir de su capacidad de ser transcritos.

En 2005 Matilainen y colaboradores describieron la cinética transduccional en células HepG2 utilizando un baculovirus AcCMVeGFP. Estos autores observaron que a partir de las 6 hpi hay un 3 % de células que expresan GFP, alcanzando un pico a las 22 hpi [41]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en la primera parte de esta Tesis evaluamos los destinos genómicos tras la transducción con baculovirus a las 24 hpi y la transcripción diferencial a partir de promotores nucleares o citoplasmáticos. Así, observamos que en todas las células evaluadas hubo transcripción nuclear y citoplasmática y siempre la transcripción citoplasmática fue mayor que la nuclear. En nuestros ensayos, la transcripción citoplasmática implica la presencia de DNA baculoviral libre en citosol y la actividad de la enzima RNA polimerasa del bacteriófago T7 del VTF7-3 sobre él. La cantidad de células en la que fue posible detectar transcripción de algún tipo fue más alta que la esperada en base a las MOI utilizadas. Esta diferencia se puede explicar por el método de cuantificación viral empleado (virus infectivos en células de insecto) y la elevada proporción de partículas defectivas que se sabe que forman parte de las poblaciones baculovirales [199]. Así, algunas de estas partículas, incapaces de generar progenie en su hospedador natural, podrían conservar su capacidad para entrar a las células de mamífero, desenvolverse, liberar el genoma de las nucleocápsides y ser templado para la transcripción de los genes reporteros. Incluso, la transcripción citoplasmática no requiere que la partícula pueda llegar al núcleo a través de los filamentos de actina. La relación entre las células en las que ocurrió transcripción citoplasmática y las células en las que hubo transcripción nuclear fue de aproximadamente 70:1 en las células epiteliales humanas, 160:1 en células BHK-21 y por encima de 1590:1 en fibroblastos murinos. Estos datos indican que el DNA de los baculovirus se encuentra disponible principalmente en el citoplasma de las células, aunque no podemos descartar que los resultados sean influidos por distintas eficiencias transcripcionales debido al uso de promotores y RNA polimerasas diferentes. En el año 2005, Salminen y colaboradores describieron que al infectar células

HepG2 con baculovirus a una alta MOI, a las 6 hpi sólo una pequeña cantidad de nucleocápsides se encuentran en el citoplasma o en el núcleo [44]. Los autores mencionan que este dato se podría deber a un desensamblado muy rápido de las cápsides en núcleo, pero la posibilidad de que haya una gran cantidad de partículas virales que se desarman en citoplasma también explicaría lo observado y apoya nuestros resultados. El virus vaccinia utilizado en los ensayos se sabe que produce el desarreglo de membranas internas y de los microfilamentos de actina [200][201], por lo que se podrían liberar viriones baculovirales de los endosomas e interrumpir su tráfico natural. Sin embargo, es poco probable que esto explique enteramente los resultados obtenidos en las condiciones experimentales utilizadas, ya que el virus vaccinia recombinante fue puesto en contacto con las células infectadas con baculovirus a las 4 hpi, cuando el tráfico endosomal ya está en la etapa final (endolisosomas) o ha culminado. Se ha descrito que en células HepG2 las nucleocápsides dejan de colocalizar con endosomas tempranos entre las 0,5 y 1,5 hpi y no hay una colocalización con endosomas tardíos a las 4 hpi [202][41]. De todos modos, la realización del ensayo infectando con VTF7-3 a tiempos posteriores a los utilizados podría evitar una eventual interrupción del tráfico de las nucleocápsides y brindar resultados adicionales. La cuantificación de la transducción nuclear se realizó en ausencia de VTF7-3, por lo que la entrada de las nucleocápsides al núcleo no pudo ser alterada y la expresión de eGFP no fue subestimada. Adicionalmente, se realizó el ensayo de transducción con el virus $ACT_{T7IRES}mCherry_{CAGE}GFP$, de manera independiente de VTF7-3, en las células BSRT7/5 que expresan la T7 RNA Pol de modo constitutivo. Este sistema no resultó una herramienta útil para comparar la transducción citoplasmática respecto de la nuclear debido a las diferentes eficiencias celulares para traducir los mensajeros "capeados" o a través de un IRES [203]. A pesar de esto, el ensayo, resultó de utilidad para corroborar la presencia del DNA baculoviral libre para ser transcrito en citoplasma en ausencia de virus vaccinia. La determinación de las cantidades absolutas de los mensajeros de *mcherry* o *egfp* por RT-qPCR en las células BSRT7/5 infectadas podría servir como estrategia para ganar independencia de la traducción.

La detección del DNA baculoviral también se realizó por hibridación fluorescente *in situ*, con una sonda marcada con FITC que hibrida con parte de la secuencia de un gen viral. En este ensayo se evitaron los usualmente utilizados tratamientos con proteasas, de modo de no desintegrar las nucleocleocápsides y detectar mayoritariamente el DNA libre. Los resultados apoyan los obtenidos por transducción y muestran que a las 6 hpi, el DNA viral se encuentran principalmente en el citoplasma de las células fibroblásticas, en coincidencia con lo observado previamente en la bibliografía en células epiteliales de riñón de cerdo, PK1 [37] y en condrocitos de rata a las 4 hpi por qPCR [204].

En síntesis, los resultados obtenidos muestran que el principal destino genómico de los baculovirus en células no inmunes de mamífero es el citoplasma y que además el DNA viral se encuentra accesible como para ser transcrito en ese compartimento. En

consecuencia, es probable que los sensores de DNA, más que los de RNA citosólicos tengan un papel protagónico en la respuesta antiviral desencadenada por baculovirus en mamíferos.

Los ensayos de transducción nuclear en las distintas células de mamífero también permitieron comprobar la variada eficiencia entre diferentes tipos celulares, en coincidencia con los antecedentes bibliográficos [52]. Cuando un vector viral infecta una célula de mamífero, la misma responde por diversos mecanismos, siendo uno de ellos la represión de la transcripción viral a través de la unión de proteínas celulares al DNA del virus que conlleva a la heterocromatinización y a la disminución de la transcripción del transgén [205]. Existen también evidencias que sugieren que la producción celular de IFN I obstaculiza la captación y el tráfico de un virus por alteración del contenido de la membrana plasmática [206], aumenta el pH intracelular [207], regula negativamente la expresión del mRNA de actina [208] inhibe el reordenamiento de actina [209] o produce cambios en la restricción transcripcional de genes debido a la interferencia de la unión de factores de transcripción y de la elongación por la RNA Pol II [210][211]. Todas estas respuestas celulares producidas por los IFN influyen directamente en la expresión de un transgén aportado por un virus. Aunque algunos trabajos sugieren que el escape de los endosomas es el paso limitante para la transducción de algunas células de mamíferos por baculovirus [60][212][213], también se ha visto que el bloqueo tiene lugar durante el tráfico citoplasmático o la importación de las cápsides virales al núcleo [202]. La infección con un baculovirus previa a la infección con otro baculovirus que transduce un gen reportero se ha visto que altera la traducción y no la transcripción del gen en cuestión [204]. En células poco eficientes para la transducción de genes aportados por baculovirus como EAHY, NHO y MG63, estas últimas potentes productoras de IFN [214], los virus ingresan y escapan de los endosomas pero no entran al núcleo de manera eficiente, mientras que en células HepG2, que tienen dificultades para la producción de IFN [215], las eficiencias de transducción alcanzan el 30-35 % y se observan las nucleocápsides virales en el núcleo a partir de las 4 hpi. En este trabajo de Tesis, la línea BHK-21 fue una de las líneas en las que se vio mayor transducción y se sabe que esta línea celular no tiene la capacidad de producir IFN [216]. Se ha descrito la relación entre la eficiencia de expresión de un transgén vehiculizado por baculovirus y la producción de IFN β estimulada por estos virus en experimentos de supertransducción [204]. En nuestro trabajo evaluamos la actividad antiviral inducida por baculovirus y observamos, tal como lo observaron anteriormente otros autores [140], que tiene relación con la capacidad de expresión de un transgén codificado por el mismo baculovirus generador de esta respuesta. La actividad antiviral fue evaluada en cuatro tipos celulares distintos: la línea celular murina NIH/3T3, MEF y las líneas epiteliales humanas HEK293 y HEK293 T. Los resultados de los ensayos antivirales mostraron que luego de una incubación de 4 h con baculovirus, las células NIH/3T3 y MEF produjeron un alto porcentaje de protección frente a VSV, dependiente de la MOI de baculovirus utilizada, mientras que en el caso de las líneas epiteliales humanas, las células HEK293 mostraron protección frente a

una infección con VSV mientras que las células HEK293 T no se protegieron. Los distintos estados antivirales medidos en las células coincidieron con las diferentes eficiencias de transducción. Así, vimos que la menor eficiencia de transducción de las NIH/3T3, comparada con la de MEF, tuvo su correlato en las actividades antivirales generadas por baculovirus en estos dos tipos de células. No es posible comparar los resultados del estado antiviral generado en las células humanas respecto del de las células murinas, debido a las diferentes metodologías de cuantificación empleadas, pero sí podemos mencionar que las células NIH/3T3, al igual que las MEF, no tienen defectos conocidos en la señalización o producción de IFN I [217] y que las células HEK293 y HEK293 T tienen deficiencias en cGAS y STING-cGAS, respectivamente, lo que podría explicar las eficiencias de transducción observadas. En las líneas epiteliales humanas, el estado antiviral obtenido en HEK293 se correlaciona con su mejor eficiencia de transducción, comparada con la de HEK293 T y con la deficiencia más severa de ésta última en una de las vías de producción de IFN. Además, el *delivery* del transgén en un plásmido de expresión en estas células nos permitió corroborar que la respuesta celular al baculovirus era responsable de la disminución de la expresión del gen reportero. Las células HEK293 y HEK293 T expresaron de igual manera el transgén aportado por un plásmido y además, luego de una infección de 4 h con un baculovirus salvaje, la expresión del eGFP aportado por el vector pcDNA-eGFP disminuyó sólo en las células HEK293.

En todas las células evaluadas, el estado antiviral generado por baculovirus disminuyó a las 24 hpi, llegando a niveles indetectables en el caso de las líneas celulares humanas. Es posible que, dado que en nuestros ensayos el inóculo de baculovirus se retiró siempre a las 4 hpi, la respuesta no haya sido tan potente como para perdurar al quitar el estímulo. Otros autores han descrito que MEF inmortalizadas e infectadas con baculovirus generan una protección frente a VSV a las 24 hpi, cuando el contacto entre las células y el virus se mantiene durante toda la incubación [69], lo que generaría una estimulación constante. Además, a diferencia de los ensayos realizados en otros trabajos, en esta Tesis todas las incubaciones de 4 h se realizaron con los baculovirus concentrados y resuspendidos en medio de cultivo de células de insecto:PBS en una relación 1:4 a 27 °C, condición que favoreció la eficiencia de transducción pero que podría no ser la óptima para medir la respuesta antiviral.

Una de las principales moléculas vinculadas al estado antiviral luego de una infección con baculovirus en células murinas es el IFN β [69][93][218][140][204]. De esta manera, realizamos ensayos para medir el mRNA de IFN β por RT-qPCR a las 4 hpi y a las 24 hpi. A las 4 hpi, los niveles relativos del mRNA de IFN β en las líneas murinas aumentó conforme aumentó la MOI empleada. El aumento fue mayor en la línea NIH/3T3 que en MEF, en coincidencia con el estado antiviral y la eficiencia de transducción. A las 24 hpi, los niveles de transcripción de IFN β fueron semejantes a los basales, lo que correlaciona con los resultados

del ensayo de actividad antiviral. Lee y colaboradores en el año 2009 mostraron que condrocitos de rata infectadas con un baculovirus durante 4 h producen un aumento del mRNA de IFN β a las 24 hpi aunque menor al que se obtiene al mantener el contacto con el virus por 8 h [204], haciendo evidente que los tiempos de incubación con el baculovirus es determinante para la producción de IFN β . La diferencia con nuestros resultados podría explicarse por la cinética transcripcional propia con la que responde cada tipo celular.

La producción de IFN β y la producción del estado antiviral también fueron medidos en células NIH/3T3 puestas en contacto con el fenotipo derivado de los cuerpos de oclusión de los baculovirus. La interacción entre los ODV y las células de mamífero ha sido poco estudiada. Los ODV de AcMNPV poseen la ventaja de contener en una misma partícula viral varias nucleocápsides. Su envoltura proviene de la membrana nuclear y, a diferencia de otros virus envueltos, carecen de una proteína de fusión característica y la proteína clave que media el evento de fusión aún no se ha identificado. Estas características hacen del mecanismo de entrada de los ODV algo excepcional entre los virus envueltos [219][220]. Se ha demostrado que en células humanas HepG2 y A549 los ODV son capaces de unirse eficientemente a la membrana de manera semejante a los BV y de internalizarse entre los 30–45 min postinfección. También se han detectado nucleocápsides virales provenientes de ODV en el citoplasma; sin embargo, no son capaces de transducir genes [221]. Se ha sugerido que el mayor bloqueo se lleva a cabo acumulando los viriones en la periferia del citoplasma [221]. En células dendríticas los ODV también son capaces de ingresar, pero el tráfico endosomal y las vesículas ácidas que alcanzan no son las mismas que en caso de los BV [222]. Nuestros resultados indican que contrariamente a los BV, los ODV no son capaces de generar un estado antiviral en células fibroblásticas murinas ni de generar un aumento en la transcripción de IFN β . Así, dado que su contenido genómico es el mismo que el de los BV y en consecuencia poseen los mismos PAMP, las diferencias en el impacto de la respuesta podría estar relacionada con el mecanismo de entrada y el tráfico vesicular de cada fenotipo, que implique en el caso de los ODV la ausencia de genoma viral libre en citoplasma. Esta hipótesis puede ser fácilmente contrastada, a partir de experimentos de transducción citoplasmática, similares a los realizados con los BV. Las proteínas de superficie virales son las proteínas responsables de las interacciones con los receptores celulares que inician una cascada de eventos que modulan el destino del virión [223]. La ausencia de la glicoproteína GP64 en la envoltura viral de los ODV podría explicar el tráfico diferencial entre ambos fenotipos, dado que se ha descrito que GP64 es necesaria para generar una respuesta inmune innata luego de una infección con BV [121]. Nuestros resultados coinciden con los antecedentes en células dendríticas en los que los ODV no fueron capaces de promover la producción de citoquinas inflamatorias ni producir su maduración [222].

Las células humanas epiteliales infectadas con baculovirus brotados no produjeron un incremento del IFN β en respuesta a los baculovirus. Sin embargo, las células HEK293, a

diferencia de HEK293 T, ambas deficientes en el sensor de dsDNA cGAS, fueron capaces de adquirir un estado antiviral frente a la infección. Estos resultados sugieren un papel determinante de la molécula STING (presente en niveles adecuados en HEK293, pero no en HEK293 T) en esta respuesta IFN β independiente. La actividad antiviral detectada en HEK293 T tras complementadas con STING e infectadas con baculovirus dan soporte a esta hipótesis. Además, en células HEK293, pero no en células HEK293 T, los baculovirus produjeron un aumento de IFN λ 1, indicando que STING no sólo sería la responsable de generar la actividad antiviral independiente del detector citosólico cGAS y de la producción de IFN β , sino que los IFN III podrían estar vinculados a esa respuesta. La incapacidad de las células HEK293 T para producir el aumento del mRNA de IFN λ 1 en respuesta a los baculovirus también se revirtió mediante la transcomplementación de STING, lo que demuestra la necesidad de esta molécula para su producción. Los mecanismos responsables de la inducción diferencial entre IFN I y III son actualmente desconocidos. Se cree que la clave está en la utilización de diferentes moléculas de señalización o factores de transcripción [224]. Los promotores de IFN λ 1 e IFN λ 3 contienen sitios de unión para IRF1, IRF3, IRF7 y NF- κ B [225]. De todos modos, a diferencia de lo que ocurre con los IFN I, que requieren la participación conjunta de varios factores de transcripción, se ha sugerido que la transcripción de IFN λ depende principalmente de IRF1 e IRF7 y levemente de NF- κ B [226][187]. Nuestros resultados se correlacionan con los resultados descritos por Sui y colaboradores en los que células HEK293 producen IFN λ y no IFN I en respuesta al dsDNA a través del detector citosólico Ku 70. Además, estos autores describen que frente al estímulo hay un incremento en las cantidades de IRF1 e IRF7 pero no de IRF3, que depende de la presencia de STING [188] [187]. Es probable que este mecanismo sea el que esté operando también en respuesta a la infección con baculovirus. En nuestro trabajo y en otros reportados anteriormente [175][174], se mostró que la transfección de células HEK293 y HEK293 T con *poly dA:dT*, un dsDNA, elevó los niveles de transcripción de IFN β ; esto puede ser explicado a partir de la vía de reconocimiento de la RNA pol III-RIG sobre la molécula de *poly dA:dT*, independiente de cGAS y STING, funcional en ambos tipos celulares.

La participación de STING en células murinas fue estudiada a través de la edición génica de la línea NIH/3T3 por la metodología de CRISPR-Cas9. La elección de estas células sobre los MEF se basó principalmente en la potente respuesta que detectamos en ellas a partir de la infección con baculovirus y en la facilidad metodológica para la realización de un mayor número de pasajes celulares. Esta técnica fue elegida por sobre la técnica del uso de iRNA debido a que existen estudios que muestran que genes estimulados por IFN, son detectadas a las 12 h postestímulo a pesar de haber sido silenciados [227] y nuestros resultados indican que en células NIH/3T3 hay una sobreexpresión de *sting* y *cgas* por la infección con baculovirus. Mediante esta técnica se lograron obtener dos poblaciones celulares editadas en el gen *sting*, lo que fue corroborado por el ensayo de T7 endonuclease I

y el análisis de la secuencia a través del *software* TIDE. En ambos casos, se demostró la ausencia de la secuencia salvaje y la presencia de una mezcla de células con diferentes indels en ambos alelos del gen. Los ensayos de transducción con un baculovirus que portaba un gen reportero bajo el promotor CAG, los ensayos de actividad antiviral y los ensayos de producción del mRNA del IFN β en respuesta a la infección de 4 h con baculovirus, confirman una disminución en la funcionalidad de STING en ambas poblaciones celulares y corroboran los antecedentes en MEF que indican la participación de STING en la producción de estos efectos [140]. Se ha visto que en MEF provenientes de ratones *sting*^{-/-} se aumenta la expresión de un transgén aportado por un baculovirus y decaen los niveles de IFN β inducidos por el virus [140]. Además, también se ha descrito la translocación de STING hacia la zona perinuclear luego de una infección con baculovirus. Por su parte, Takahama y colaboradores, mostraron que los niveles de IFN β disminuyen cuando células MEF infectadas con baculovirus son tratadas con iRNA para RAB2 y GARIL5, proteínas que modulan la fosforilación de IRF3 a partir de la vía de STING-TBK1 [227]. Tal como vimos en células sin editar, nuestros resultados indican que la mayor capacidad que tienen las células deficientes en STING de expresar un transgén portado en el genoma del baculovirus coincide con la disminución de la respuesta antiviral producida; sin embargo, no hay una exacta correlación entre los resultados, ya que las células NIH/3T3 *sting*^{-/-} #F7 y #E11 mostraron eficiencias de transducción similares y valores de actividad antiviral diferentes. La transcomplementación de las células editadas con STING, acercó los valores de actividad antiviral y producción de IFN β a los de las células control, pero no fue suficiente para reestablecerlos, posiblemente por no alcanzar niveles adecuados de la proteína, a pesar de lograr un aumento importante en el mRNA de STING. La mayor producción de IFN β en las células #F7, respecto de la de las células #E11, se correlaciona con la mayor actividad antiviral obtenida, aunque en ambos clones detectamos una actividad antiviral residual y transcripción del mRNA de IFN β , en respuesta a la infección. Al analizar la secuencia de *sting*, se mostró que ambas poblaciones celulares mostraron una delección minoritaria (de 6 nucleótidos en el 16,9 % de la población #F7 y de 3 nucleótidos en el 19,8 % de la población #E11) que generan la delección de 1 o 2 aminoácidos en cada caso y no el corrimiento del marco de lectura de la proteína. Con anterioridad han sido descritos los sitios determinantes para la funcionalidad de STING [228]. La secuencia guía utilizada en este trabajo de Tesis está incluida en la secuencia que codifica para el dominio transmembrana de STING (aa18-25), el cual hasta el momento no se ha descrito que esté involucrado en la dimerización de la molécula ni en la unión de STING con TBK1. Además, Tanaka y colaboradores mostraron que la región C-terminal de STING (aa341-379) es necesaria y suficiente para las interacciones con TBK1 e IRF3, que facilitan su activación [147][228]. De esta manera, si bien estas delecciones modifican parte del dominio transmembrana y podrían estar afectando la funcionalidad de STING, los sitios de la

activación de la vía STING-TBK1-IRF3 podrían seguir siendo funcionales, producir la actividad antiviral y la transcripción de IFN β observada en las líneas editadas.

Si bien algunos autores han considerado que la participación de STING en la respuesta de células murinas a los baculovirus implica la detección del genoma por cGAS como ocurre con otros virus dsDNA [160][142][159], hasta el momento no hay experimentos que lo demuestren, ya que no está dilucidado qué sensor de DNA lo activa. En este trabajo de Tesis, para estudiar la participación de cGAS en el contexto de una infección con baculovirus en células murinas se realizó edición génica de cGAS. En el caso de las células epiteliales humanas HEK293 y HEK293 T se hizo uso de la falta de expresión de cGAS en ambas líneas.

La transcomplementación de HEK293 y HEK293 T con cGAS o cGAS-STING respectivamente previa a la infección con baculovirus generó un aumento en la transcripción de IFN β y potenció la transcripción del mRNA de IFN λ 1, probablemente a partir de reestablecer la vía de activación de IRF3. Si bien la producción de IFN λ 1 puede ser independiente del aumento de IRF3, se ha visto que una inducción robusta requiere de una mayor variedad de factores de transcripción [226][187]. En células HEK293 T, la transcomplementación únicamente con cGAS previa a la infección con baculovirus no fue suficiente para promover la transcripción del mRNA de IFN β , tal como fue descrito por Ma y colaboradores en respuesta al CMV y por Zhang y colaboradores en respuesta a *Chlamydia trachomatis* [193]. En el caso de los fibroblastos murinos, no nos fue posible corroborar la edición génica en la población NIH/3T3 *cgas*^{-/-}, por problemas metodológicos. Sin embargo, al determinar que la eficiencia de transducción se encuentra asociada con el estado antiviral generado por el baculovirus, se decidió continuar los experimentos con las células *cgas*^{-/-}#C9, ya que mostraron un importante aumento en la transducción del baculovirus recombinante. Además, el sgRNA utilizado para la edición génica presentó un número de *off targets* bajo y una alta especificidad de hibridación a la secuencia blanco respecto de la de hibridación a los *off targets*. En estas células, en respuesta a la infección, el porcentaje de protección frente a VSV sufrió una importante reducción y la producción del mRNA de IFN β fue anulada. El estado antiviral residual medido en las células NIH/3T3 *cgas*^{-/-} en ausencia de la producción de IFN β sugiere que no es la falta de una edición efectiva en este gen la responsable, sino que podría existir, al igual que observamos en células HEK293, un mecanismo de generación de estado antiviral alternativo al de la vía cGAS-STING, posiblemente a través otras citoquinas producidas en respuesta a un sensor de DNA diferente a cGAS. En células NIH/3T3 salvajes infectadas con baculovirus, la inhibición química de la enzima RNA Pol III no afectó el estado antiviral ni los niveles de transcripción de IFN β . Estos datos concuerdan con la incapacidad observada en las células HEK293 y HEK293 T, en las que esta vía es funcional, de producir IFN β frente a la infección. La leve disminución de los niveles de IFN β descrita en la infección con baculovirus de MEF provenientes de ratones

deficientes en MAVS [93] y el aumento en estas células de la transducción de un transgén aportado por un baculovirus [52] no coinciden con nuestros resultados. Una vez descartada la participación de RNA Pol III, el otro mecanismo por el que MAVS (molécula activada por el sensor RIG-I) podría activarse frente a un virus DNA es a partir de la detección de estructuras de dsRNA generadas por algún transcripto viral. De ser así, las células HEK293 y HEK293 T también hubieran producido un aumento de IFN β en respuesta a la infección.

Las células NIH/3T3 *cgas*^{-/-} transcomplementadas con cGAS murino e infectadas con baculovirus lograron recuperar el estado antiviral de las células control, mostrando que la disminución de la respuesta observada se debía a la falta de esta molécula. Las células transcomplementadas con cGAS también recuperaron su capacidad para producir IFN β , lo que destaca la esencialidad de este sensor para la respuesta de IFN I, también en células murinas. Los niveles transcripcionales de IFN β de las células complementadas fueron inferiores a los de la línea control; esto demuestra que aún niveles inferiores de cGAS a los que posee una célula sin editar pueden disparar los mismos niveles de respuesta antiviral frente a los baculovirus y que llegado a determinados valores, incrementos en la cantidad de IFN β no se acompañan de aumentos en la actividad antiviral. La transducción con un baculovirus que llevaba un gen reportero de expresión nuclear en las células NIH/3T3 *cgas*^{-/-} no sólo fue notablemente superior al de las NIH/3T3 Control, sino que además fue mayor al de las células NIH/3T3 *sting*^{-/-}, a pesar de que el estado antiviral detectado arrojó menores resultados. Estos datos indican que no hay un único mecanismo que regule la eficiencia de transducción nuclear y que dentro de los factores que aportan a generar un estado antiviral que la module, la producción de IFN β , menor en nuestras células NIH/3T3 *cgas*^{-/-} que en las NIH/3T3 *sting*^{-/-}, pareciera tener un papel muy relevante.

Nuestros resultados en todas las células no inmunes de mamífero evaluadas indican que el origen de la activación de STING es determinante en la vía de señalización que se genera. STING está sujeto a múltiples modificaciones postraduccionales, donde la función molecular precisa de cada una de ellas aún no se ha dilucidado [229]. Varias modificaciones postraduccionales de STING actúan juntas para ajustar su actividad y permitir una respuesta apropiada y transitoria [229]. Los resultados de esta Tesis sugieren que los baculovirus producen un estado antiviral por dos mecanismos, ambos dependientes de STING. Uno de ellos, independiente de cGAS, lleva en el caso de las células epiteliales humanas a la producción de IFN III y el otro, depende de una vía de detección de ácidos nucleicos cGAS-STING activa y genera una respuesta más potente a través de la producción de IFN I e IFN III.

Adicionalmente, a fin de demostrar que la infección con baculovirus en los fibroblastos murinos genera la producción de cGAMP por parte de cGAS y esta molécula activa STING para generar las respuestas observadas, realizamos un ensayo de complementación entre las células editadas. Cuando la población mezcla se infectó con baculovirus, se produjeron niveles de IFN β y de actividad antiviral superiores a los de cada

línea por separado. Esto se explica por la detección del DNA baculoviral a través de la presencia de la proteína cGAS en la línea NIH/3T3 *sting*^{-/-}, que fue capaz de generar cGAMP y de transmitirse hacia las células adyacentes por uniones de tipo *gap*. La activación de STING presente en las células NIH/3T3 *cgas*^{-/-} generó un estado antiviral y la transcripción del mRNA de IFN β . Los niveles alcanzados de IFN β no fueron semejantes a los de la línea control, dado que la complementación entre células no logra compensar las deficiencias de cada tipo celular, probablemente porque la expresión de cada molécula en el conjunto de células siempre será menor que en las células salvajes. Además, es posible que la medición de la respuesta a un tiempo posterior de incubación hubiese arrojado resultados más contundentes, debido a que la activación de STING a través del cGAMP producido en células vecinas requeriría tiempos más prolongados que cuando todo ocurre en la misma célula.

Se ha descrito que otro mecanismo que regula negativamente la transducción por baculovirus es la autofagia. Adicionalmente, a los 90 min postinfección se vio en células HeLa colocalización entre los baculovirus y los autofagosomas [230]. Por otra parte, un estudio reciente demostró que en células HeLa el estímulo con ciertos DNA induce autofagia dependiente de STING a través de promover su unión con LC3 y que ULK1, una proteína quinasa clave para el inicio de la autofagia, fosforila a STING promoviendo su degradación luego de la activación de TBK1 [231]. Además, se ha visto que la interacción entre cGAS y Beclin-1, una proteína relacionada con la maduración de los autofagosomas, modula la producción de cGAS y la autofagia [172]. Teniendo en cuenta todos los resultados de esta Tesis, a partir de las células NIH/3T3 editadas en ambos genes, sería de interés estudiar la relación entre STING, cGAS, la autofagia y el tráfico de los viriones baculovirales en las células no inmunes.

El conocimiento de las vías involucradas en la detección de DNA baculoviral es un primer paso para el desarrollo de estrategias para potenciar el uso de los baculovirus como ayjuvantes o modular la función de las moléculas involucradas en el estado antiviral para su uso en terapia génica. En esta Tesis evaluamos el uso de baculovirus pseudotipados con la glicoproteína G-VSV. Aunque no lo hemos estudiado en nuestro trabajo, estudios anteriores muestran que baculovirus pseudotipados con G-VSV aumentan la eficiencia de transducción [63][62][64][65]. Por otra parte, hay trabajos que muestran que STING se activa por fusión de membranas dada por la presencia de proteínas virales fusogénicas [156]. Si los baculovirus pseudotipados con G-VSV pueden activar STING a través de la capacidad fusogénica de G, sería esperable que haya una mayor producción de IFN I y que la respuesta antiviral producida lleve a una disminución de la expresión del transgén. Dado que ese efecto no es el que se informa en la bibliografía, quisimos evaluar si la potenciación de la respuesta antiviral en los virus pseudotipados no ocurría o si la actividad antiviral producida se incrementaba pero su efecto en la transducción era superado por la mejorada eficiencia de estos virus para entrar a las células o para llegar al núcleo. Una tercera posibilidad era que los baculovirus

pseudotipados, a partir de un cambio en su entrada o tráfico endosomal y por algún mecanismo no descrito, produzcan una menor respuesta antiviral que dé como resultado su mejor capacidad de transducir las células. En primer lugar se evaluó la entrada de los virus pseudotipados por inmunofluorescencia en células NIH/3T3 y se observó que a los 10 min postinfección la cantidad de virus en las células era mayor que la detectada para los virus salvajes. Sin embargo, a los 45 min la cantidad de nucleocápsides en citoplasma provenientes de virus pseudotipados era menor que a los 10 min y similar entre ambos virus. Así, los virus con G-VSV en su membrana no sólo entrarían con mayor eficiencia en los fibroblastos, sino que además los virus que dejan de detectarse a los 45 min pueden indicar el desensamble en núcleo o citoplasma por una vehiculización acelerada por el tráfico endosomal. La medición de la producción del mRNA de IFN β mostró que a las 4 hpi no hay diferencias significativas entre los virus salvajes y pseudotipados y que esta mayor entrada y rápida vehiculización viral no genera la producción de IFN β a tiempos más tempranos que los descriptos. De esta manera, es probable que la presencia de la glicoproteína G-VSV aumente la cantidad de virus que internalizan las células y además de algún modo aumente la velocidad y la cantidad de partículas virales que alcanzan el núcleo. La presencia de G-VSV en la membrana viral parece no provocar un estímulo adicional en STING. En este caso en particular, un aumento en la transducción no se correlacionó con una menor producción de IFN I, dado que los mecanismos que llevan a la mejorada capacidad de transducción con esta estrategia, parecen no estar relacionados con despertar una menor respuesta antiviral sino con aumentar la eficiencia de otros procesos.

En los ensayos de transducción y en las mediciones de respuesta antiviral, se observó que a pesar de la pobre eficiencia de transcripción nuclear en algunas células, aún a baja MOI se detectan grandes cantidades de DNA viral en citoplasma y la generación de un potente estado antiviral que se relaciona con este resultado. Esto demuestra que los BV tienen una elevada eficiencia para entrar a las células de mamífero no inmunes y una alto potencial como vectores virales. Así, el desarrollo de baculovirus recombinantes diseñados para aplacar la respuesta celular que provocan es un área aún no explorada que podría lograr la optimización de estos virus como vectores transportadores de genes. Tal como se realiza en los vectores virales basados a en adenovirus, en los que se ha logrado un eficiencia de transducción mayor a partir de la eliminación de genes virales involucrados en despertar fuertes respuestas inmunes en el hospedador o a través de a la incorporación de secuencias que promueven la unión a la célula mediante un mecanismo no involucrado en la entrada natural del virus [232], es posible manipular el genoma baculoviral con el fin de modular la respuesta inmune innata. Se ha descrito que numerosos genes de otros virus son capaces de interrumpir la principal vía de detección de DNA baculoviral cGAS-STING. Por ejemplo, se ha visto que la proteína NS2 del virus del dengue degrada STING humano [233], las proteínas de HSV-1 US3, ICP0, VP16, UL42, UL24 y UL36USP inhiben la producción de IFN I y la

activación de NF- κ B, mientras que VP22 interactúa con cGAS inhibiendo su actividad enzimática [234]. Por su parte, la proteína vIRF1 del virus KSHV, inhibe la señalización del IFN β por múltiples mecanismos, interactuando con STING e impidiendo su activación e interacción con TBK1 [235]. La ingeniería de los baculovirus para lograr la incorporación de alguna de estas proteínas en la partícula viral es una estrategia promisorio para potenciar su uso para el *delivery* de genes.

Adicionalmente, conocer las vías de detección del DNA baculoviral y generación de la respuesta antiviral también permitirá el estudio de su potenciación para la utilización de baculovirus como adyuvantes o inmunomoduladores. Esto se podría lograr a partir de la incorporación en su genoma de secuencias con reconocido impacto en las vías de reconocimiento de ácidos nucleicos. En este trabajo de Tesis se evaluó la secuencia VACV 70mer que ha sido reportada como una secuencia que produce una fuerte activación de la vía STING-TBK1 [152]. Aunque los antecedentes indican que el largo de la secuencia es clave para lograr su efecto, también es esperable que sea naturalmente funcional en el genoma de vaccinia, del cual proviene. En esta Tesis probamos que un fragmento de DNA que contiene cinco repeticiones de esta secuencia, inserto en un vector plasmídico, no fue capaz de incrementar la respuesta generada por el vector en sí mismo. Es probable que su condición de dsDNA lineal sea un requisito para lograr el efecto o que la respuesta que se genera no es medible en un entorno en el que ya existe un potente estímulo, como el plásmido o el baculovirus. Alternativamente, hay descritas otras secuencias que pueden ser ensayadas en el futuro, como secuencias de DNA con repeticiones dAdT que puedan ser reconocidas por la enzima RNA Pol III y así se active la vía de RIG-I o secuencias como la denominada AT-Rich de *Plasmodium falciparum* [153].

En conclusión, los resultados de esta Tesis muestran en el contexto de la infección no productiva de células no inmunes de mamífero con el baculovirus AcMNPV de fenotipo brotado, el papel relevante que desempeña su genoma, disponible en alta proporciones en el citoplasma, en el establecimiento de un estado antiviral y en la producción de IFN I y III a través del impacto en la vía de reconocimiento de ácidos nucleicos cGAS-STING.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Este trabajo de Tesis permitió estudiar las interacciones entre los baculovirus AcMNPV con las células no inmunes de mamífero a través de la participación de los receptores de ácidos nucleicos celulares. Las conclusiones que se desprenden se detallan a continuación:

- En células no inmunes de mamífero, el genoma de los baculovirus AcMNPV se encuentra mayoritariamente en el citoplasma, accesible para su interacción con sensores de ácidos nucleicos.
- La infección no productiva de fibroblastos murinos con baculovirus de fenotipo brotado, pero no con los virus derivados de los cuerpos de oclusión, genera un potente estado antiviral vinculado al aumento de los niveles transcripcionales de IFN β .
- Los baculovirus pseudotipados con la glicoproteína G-VSV ingresan a las células de mamífero de un modo más eficiente que los baculovirus salvajes, sin generar cambios en la respuesta de IFN β producida.
- La secuencia VACV 70mer, inductora de la activación de la vía STING-TBK1-IRF3, no produce un aumento en la producción de IFN β en fibroblastos murinos cuando se encuentra contenida en un vector dsDNA circular.
- Hay múltiples factores que modulan la expresión de un transgén aportado por los baculovirus. El estado antiviral y en particular la producción de IFN β generados por la célula frente a los baculovirus reduce la eficiencia de transcripción de un gen.
- La enzima RNA Pol III citoplasmática no participa en el establecimiento del estado antiviral, a pesar de que el baculovirus AcMNPV presenta en su genoma un alto contenido AT.
- La activación de STING en células no inmunes de mamífero es necesaria para el establecimiento del estado antiviral producido por baculovirus.
- Al menos dos vías de señalización distintas impactan en STING y contribuyen al estado antiviral por baculovirus. La detección del genoma viral por el sensor cGAS induce la respuesta celular más potente y es necesaria para la producción de IFN β . La activación de STING, de un modo cGAS independiente, da lugar a un estado antiviral en el cual, en células epiteliales humanas, participa la producción de IFN $\lambda 1$.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Células de insecto y mamífero, cepas bacterianas y virus

Se utilizaron células de insecto de la línea Sf9 (ATCC), un clon aislado de la línea IPLBSF21-AE, derivada de tejido ovárico del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*. Se crecieron a 27 °C en monocapa en medio de cultivo TNM-FH (Sigma) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Internegocios-SA) 10 % y antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U/ml, estreptomicina 10 mg/ml, anfotericina B 25 pg/ml, Gibco-BRL).

Las células NIH-3T3 (ATCC), HEK293 (ATCC), HEK293 T (ATCC), Vero (ATCC), L929 (ATCC), BSRT7/5 [236] y BHK-21 (ATCC) se crecieron en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (MEM-D) (Invitrogen) suplementado con SFB 10 % y antibiótico-antimicótico.

Las células BSRT7/5 fueron gentilmente cedidas por Dr. Conzelmann, Departamento de Virología Clínica, Centro Federal de Investigación de Enfermedades de Virus Animales, Tübingen, Alemania. Cada dos pasajes el medio de cultivo se suplementó con 1 mg/ml de Geneticin[®] (Gibco).

Los fibroblastos de embrión murino, MEF, fueron obtenidos siguiendo el protocolo descrito por Jozefczuk [237]. Brevemente, ratones hembras C57BL/6 preñadas con 12 días de gestación fueron sacrificadas por inhalación de CO₂ y se removieron los cuerpos uterinos y la placenta en esterilidad. Los embriones fueron lavados con PBS (NaCl 0,37 M, KCl 0,0027 M, Na₂HPO₄ 0,01 M, KH₂PO₄ 0,0018 M, pH 7,2) y disgregados de forma mecánica con hojas de bisturí y mediante tratamiento enzimático con tripsina (0,25 %). Luego, por decantación, se eliminaron los trozos de tejidos, mientras que el sobrenadante fue centrifugado, resuspendido en MEM-D suplementado con SFB 10 % y colocado en botellas de cultivo para permitir la adherencia de las células obtenidas. Los MEF se repicaron hasta un máximo de 7 veces.

Todas las células de mamífero se crecieron en forma de monocapa a 37 °C en estufa gaseada con 5 % de CO₂.

Para las estrategias de clonado molecular se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, cuyo genotipo es supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ (lacIZYA-argF) U169 deoR (ϕ 80dlac Δ lacZ) M15.

Para la generación de b λ cmidos recombinantes se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH10Bac, cuyo genotipo es: F⁻ mcrA Δ (mrr-hsd RMS-mcr BC) ϕ 80 d lac ZDM15 Δ lacx74 deo R recA1 end A1 araD139 Δ (ara, leu) 7697 gal U gal K λ ⁻¹ rps LnupG.

El baculovirus AcMNPV salvaje utilizado en este trabajo fue obtenido de Pharmingen (BD Biosciences). El virus de la estomatis vesicular, VSV, cepa Indiana, el virus vaccinia salvaje,

cepa Western Reserve y el virus vaccinia recombinante VTF7-3 [238] utilizados en este trabajo se encontraban disponibles en el laboratorio.

2. Reactivos y plásmidos

ML-60218 *Cayman chemical*, ítem N° 15397. Inhibidor químico de la RNA Pol III.

poly dA:dT (InvivoGen) (#86828-69-5). dsDNA forma B.

Plásmidos adquiridos por Addgene:

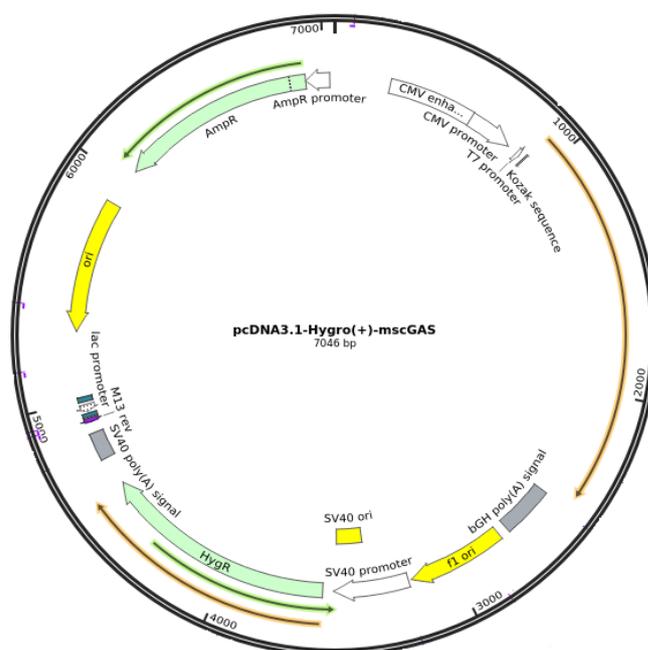
pcDNA3.1-Hygro(+)-mscGAS fue gentilmente cedido por Nicolas Manel (#102607; <http://n2t.net/addgene:102607>; RRID:Addgene_102607). Expresa la proteína cGAS murina bajo el promotor CMV (Fig. M1 A) [239].

pTRIP-CMV-Puro-2A-cGAS fue gentilmente cedido por Nicolas Manel (#102612; <http://n2t.net/addgene:102612>; RRID:Addgene_102612). Expresa la proteína cGAS humana bajo el promotor CMV (Fig. M1 B) [239].

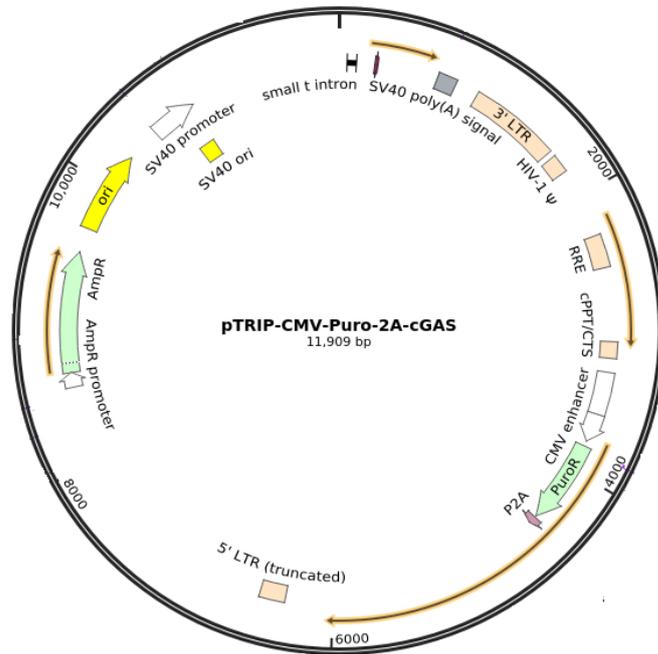
pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 fue gentilmente cedido por Xingxu Huang (#44758; <http://n2t.net/addgene:44758>; RRID:Addgene_44758). Expresa la proteína Cas9 bajo el promotor de CMV (Fig. M1 C) [240].

pSPgRNA fue gentilmente cedido por Charles Gersbach (# 47108 ; <http://n2t.net/addgene:47108>; RRID:Addgene_47108). Vector que permite la inserción de la secuencia guía necesaria para el sistema de edición génica CRISPR-Cas9 (Fig. M1 D) [241].

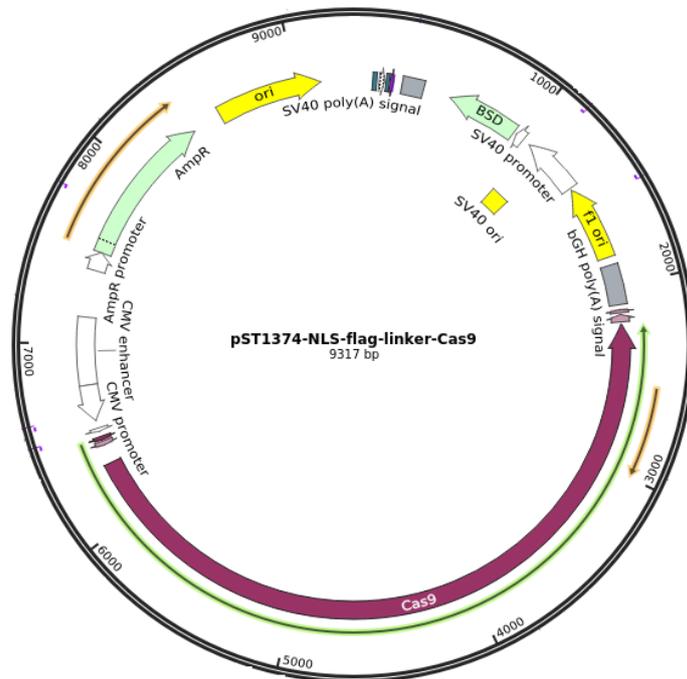
A



B



C



D

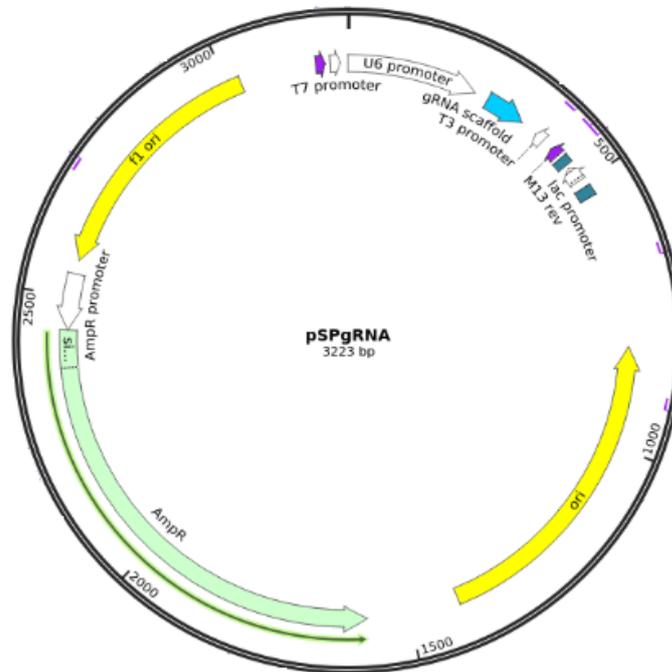


Figura M1: Vectores adquiridos por Addgene. A: pcDNA3.1-Hygro(+)-mscGAS (#102607). B: pTRIP-CMV-Puro-2A-cGAS (#102612); C: pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 (#44758); D: pSPgRNA (#47108).

Otros plásmidos utilizados:

- pCMVGFP, disponible en el laboratorio.

3. Técnicas de biología molecular y clonado generales

3.1 Transformación de bacterias

Las bacterias *E. coli* DH5 α y *E. coli* DH10Bac competentes se obtuvieron por el método de Hanahan [242]. Las transformaciones se realizaron por choque térmico a 42 °C por 90 s y las transformantes se seleccionaron en medio LB (triptona 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7 con NaOH)-agar 1,5 g/100 ml, con el antibiótico de selección correspondiente. En el caso de las *E. coli* DH10Bac, la recuperación se realizó en medio SOC (del inglés: *Super Optimal broth with Catabolite repression*, triptona 2 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl

10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM) por 4 h con agitación suave.

3.2 Cultivos bacterianos

Los cultivos bacterianos líquidos se realizaron en medio LB, en tubos con un volumen no mayor al 10 % de su capacidad total, con agitación constante de 200 rpm a 37 °C.

3.3 Minipreparaciones de DNA

Se utilizó el método de Birnboim y Doly [243] con ligeras modificaciones. Se partió de 3 ml de cultivo de bacterias en medio LB/antibiótico crecido toda la noche a 37 °C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10000 x g y se resuspendieron en 200 µl de Solución I (Tris-HCl 125 mM pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM). Luego, se agregaron 200 µl de Solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1 %) se mezcló suavemente por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente (TA). Finalmente, se agregaron 200 µl de Solución III (acetato de potasio 3 M) y se mezcló por inversión. Se centrifugó el floculado a 10000 x g durante 10 min. Se tomó el sobrenadante y se traspasó a un tubo de microcentrífuga limpio, donde se precipitó el DNA plasmídico por el agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol y centrifugación a 10000 x g durante 20 min. Al precipitado se le realizó un lavado con etanol 70 %, se secó bajo vacío y se resuspendió en 50 µl de H₂O conteniendo RNasa (100 µg/ml).

Para verificar la presencia, integridad y orientación de los diferentes insertos en cada estrategia de clonado, se digirieron de 2 a 6 µl de esta solución con las enzimas de restricción apropiadas.

Para la obtención de DNA plasmídico de alta calidad se utilizó el kit comercial QLAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las concentraciones típicas obtenidas fueron de 300 a 500 ng/ µl.

3.4 PCR de alta fidelidad

Todas las reacciones de amplificación de DNA para obtener secuencias que posteriormente formaran parte de algún vector fueron realizadas utilizando la enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante y utilizando como volumen final de reacción 25 µl. En todos los casos se utilizaron aproximadamente 50 ng de templado y la T de *annealing* seleccionada fue de 2 °C por

debajo de la menor T de *melting* (T_m). Se realizaron 35 ciclos de reacción y se analizaron 10 µl del producto por electroforesis en gel de agarosa. El DNA restante fue conservado a -20 °C hasta su utilización.

Los oligonucleótidos utilizados en todas las PCR de punto final de este trabajo están detallados en la tabla M1.

Nombre	Primer Forward 5' 3'	T _m	Primer Reverse 5' 3'	T _m
T7IRES For T7IRES Rev	GCGCATGCTTAATACGACTCACTATAG	58	GCCCATGGAGGGTCATTAATTGTAA	56
mCherry MF mCherry XRV	AAGCTTATGGTTAGTAAAGGAGAAG	62	TCTAGATTACCTGGATCCGGTGGATCCC	73
M13 F M13 R	GTA AACGACGGCCAG	60	AACAGCTATGACCATG	55
GFP For	GCTCGAGATGGT GAGCAAGGGCGAG	63		
VAVC70 mer F VAVC70 mer R	GAAAGATCGATCGCTTTATAGAGA	53	AATATTAACCTCTTTCTGATGG	49
hSTING Eco hSTING xba	GCGAATTCATGCCTCATTCCAGCC	59	CGTCTAGATTAAGAGAAATCCGTGC	56
mSTING Eco mSTING Xba	GCGAATTCATGCCATACTCCAACC	58	CGTCTAGATTTAGATGAGGTCAGTG	56
STING guía For STING guía Rev	CACCGAAGATGAGGGCTACATATT	56	AAACAATATGTAGCCCTCATCTTC	53
cGAS guía For cGAS guía Rev	CACCGGGCTGGGGCTCCCGTACGG	69	AAACCCGTACGGGAGCCCAGCCC	66
cGAS KO For 1 cGAS KO Rev 1	CACTGAGCTACCAAAGAT	49	CGGTGGAGCGCGGCCCC	64
cGAS KO For 2 cGAS KO Rev 2	CCGAGATATCTTTGCGTTTC	50	CCCAACTGGTGAAAAAGTTC	49
cGAS KO For 3 cGAS KO Rev 3	CCGCCTCCGAGATATCTTTGCGT	59	GGTAAAGGAGAGGTTTCCCGG	56
STING KO For 1 STING KO Rev 1	CAACAGTAGTCCAAGTTCGTG	53	CTCAGACCTGTTTATGGAGGC	57

Tabla M1: Oligonucleótidos utilizados en el trabajo de tesis.

3.5 Digestión con enzimas de restricción

Para las digestiones de los diferentes plásmidos se utilizaron enzimas de restricción NEB (New England Biolabs). Cantidades del orden de los 500 ng de DNA fueron digeridas en un volumen final de 20 μ l siguiendo las especificaciones para cada enzima.

3.6 Defosforilación de los extremos 5' fosfato

La reacción de remoción de los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos digeridos se realizó utilizando la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP, New England Biolabs) agregada directamente al volumen de reacción de digestión. Se utilizaron 5 U por μ g de DNA y la reacción se incubó por 30 min a 37 °C.

3.7 Electroforesis en geles de agarosa

Las diferentes moléculas de DNA se resolvieron en geles de agarosa de 1 % o 2 % con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 μ g/ml empleando *buffer* TAE (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM) a 5-10 V/cm a TA. Para sembrar las muestras se utilizó un *buffer* de siembra de concentración 10 X (glicerol 50 %, TAE 10X, azul de bromo fenol 1 %). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron 50 pb, 100 pb, 1 kb y 1 kb Plus (Invitrogen, NEB o PBL). Los geles fueron fotografiados utilizando el equipo G:Box Chemi-XX6, Syngene, Reino Unido.

3.8 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Las bandas de DNA resueltas mediante geles de agarosa se escindieron del gel mediante el uso de bisturí y se purificaron utilizando el kit QIAEXII *purification system* (QIAGEN). El DNA obtenido se resuspendió en una solución de Tris-HCl 10 mM pH 8 siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.9 Reacciones de ligado molecular

Para el ligado molecular de los diferentes insertos a los plásmidos correspondientes, se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Scientific), siguiendo las especificaciones del fabricante. Se

utilizaron entre 50 y 100 ng de vector, empleando relaciones molares vector: inserto (1:3). Se incluyó además un control de vector sin inserto. La ligación de extremos cohesivos se realizó por incubación a TA durante 1 h.

3.10 Extracción de DNA

1×10^7 células se centrifugaron a $500 \times g$ por 5 min. El *pellet* se resuspendió en 500 μ l de buffer PK (Tris-Cl 0,1 M, pH 8.0; EDTA 0,05 M, pH 8.0 y SDS 0,5 %) con el agregado de 500 μ g/ml de proteinasa K. Se dejó durante 2 h a 55 °C. Luego, se agregaron 500 μ l de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) (Invitrogen) y se centrifugó a $13000 \times g$ durante 5 min. Se separó la fase acuosa, se agregaron 500 μ l de éter etílico (Carlo Erba) y se centrifugó a $13000 \times g$ durante 5 min. Se descartó el éter etílico y se dejó evaporar durante 20 min. Luego, se agregaron 50 μ l de acetato de sodio 3 M y 1 ml de alcohol etílico absoluto (Carlo Erba). Las muestras se dejaron a -80 °C durante 1 h y luego se centrifugaron a $13000 \times g$ a 4°C durante 30 min. El *pellet* fue lavado con etanol 70 %, se dejó secar y luego se resuspendió en 100 μ l de ddH₂O.

3.11 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó con el reactivo TRIzol[®] (Invitrogen) a partir de muestras de cultivo celular, según instrucciones del fabricante. El *pellet* que contenía el RNA se resuspendió en 25 μ l de agua tratada con DEPC. Para confirmar la calidad del RNA a partir de la integridad de los RNA ribosomales de las subunidades 40S y 60S, se sembraron 3 μ l de cada muestra en un gel de agarosa 1 % libre de RNasas con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 μ g/ml empleando *buffer* TAE a 5-10 V/cm a TA. Para sembrar las muestras se utilizó un *buffer* de siembra de concentración 10X (glicerol 50 %, TAE 10X, azul de bromo fenol 1 %).

3.12 Síntesis de cDNA

Por cada 1 μ g de RNA a utilizar se agregó 1 μ l de DNase I, Amplification Grade (1 U/ μ l, Invitrogen) y 1 μ l de buffer 10 X, llevando a 10 μ l con agua libre de RNasas. Se incubó durante 30 min a 37 °C y se inactivó por el agregado de EDTA y por calor a 65 °C durante 10 min. Se tomó 1 μ l para utilizar como control de la PCR, el resto de la solución se sometió a la reacción de retrotranscripción con el agrado de 150 ng/ μ l de *random primers* (Promega). Se incubó a 70 °C durante 5 min e inmediatamente se colocó en hielo y se le agregó 5 μ l de Buffer 5X,

1,25 μ l de dNTPs 10 mM, 1 μ l de la enzima M-MLV (200 U/ μ l, Promega), 0,5 μ l de RNase OUT (20 U/ μ l, Invitrogen) y agua hasta 25 μ l. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

Como control para corroborar la acción de la DNasa se realizó una PCR a punto final con oligonucleótidos para el *housekeeping GAPDH* o β - *Actina*, y se continuó adelante únicamente en el caso de observarse fragmento amplificado sólo en las calles que sufrieron la reacción de retrotranscripción.

3.13 Cuantificación de DNA

Se utilizó el equipo *Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies Inc.) para cuantificar el DNA obtenido a partir de *kits* comerciales.

3.14 Secuenciación de DNA

Se realizó en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología mediante secuenciación automática utilizando el equipo Genetic Analyzer 3130x1 (Applied Biosystems).

3.15 Metodología para la determinación de proteínas

3.15.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida de concentraciones 12 % y 15 %, dependiendo del tamaño de la proteína a ser visualizada en cada caso. El grado de entrecruzamiento acrilamida:bisacrilamida utilizado fue 29:1. Se utilizaron minigeles (6 x 9 cm, Miniprotean III, Biorad), los que se corrieron a una corriente constante de 100 V en *buffer* Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1 %).

3.15.2 Electrotransferencia

Luego de efectuada la electroforesis, los geles de poliacrilamida se equilibraron durante 2 min con *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, metanol 20 %). Se hidrataron rectángulos de nitrocelulosa (S&S BA 0,45 pm, Schleicher & Schuell) de tamaño algo mayor que el del gel durante 5 min. Para cada gel se armó un *cassette* de transferencia con una esponja del tipo *Scotch Brite* (Bio-Rad), un papel de filtro *Whatmann* de 3 mm, el gel de poliacrilamida, el filtro de nitrocelulosa, un papel de filtro *Whatmann* y una esponja del

tipo *Scotch Brite*. Se montó el *cassette* dentro de la cuba de transferencia (Bio-Rad) y se transfirió aplicando una corriente constante de 200 mA por 1,5 h.

3.15.3 Identificación de proteínas mediante Western blot

Se bloquearon los filtros 1 h a TA en *buffer* TBS-Tween-leche 5 % (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 m, Tween 20 0,005 %, leche descremada 5 %). Luego, se lavaron con *buffer* TBS-Tween y se incubaron con diluciones apropiadas de los anticuerpos específicos [1:2000 para el monoclonal anti-VP39 [244]; 1:2000 para el monoclonal AcV5 anti-GP64 SIGMA; 1:1000 para el monoclonal anti-GVSV SIGMA; 1:300 para el policlonal anti-cGAS (C6orf150, Invitrogen)] en TBS-Tween-leche descremada 3 %. Tras 1 h de incubación a TA con agitación suave, se lavaron los filtros 3 veces con solución de lavado TBS-Tween por 10 min y se incubaron con el segundo anticuerpo en TBS-Tween-leche 3 % (1:1000 para el anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina, SIGMA; 1:5000 para el anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con la enzima fosfatasa alcalina, SIGMA). Tras 1 h de incubación a TA con agitación suave, se lavaron los filtros 3 veces con solución de lavado por 10 min. Luego, se realizó un lavado final con el *buffer* de revelado de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM) por 10 min y se agregaron 5 ml de solución de revelado [10 ml de buffer de revelado, 66 µl de Nitro bluetetrazolium (NBT, 50 mg/ml en dimetilformamida 70 %, Promega) y 33 µl de bromo-cloro-indoil-fosfato (BCIP, 50 mg/ml en dimetilformamida 100 %, Promega)]. Se incubó con agitación suave por 3 a 15 min con luz tenue, hasta visualizar las bandas de interés. La reacción de revelado se detuvo por lavados con agua y los filtros se secaron al aire y se resguardaron de la luz.

4. Técnicas virológicas

4.1 Transfecciones de células de insecto para la obtención de los baculovirus recombinantes

Los baculovirus recombinantes se obtuvieron por transfección con Cellfectin II[®] (Invitrogen). Brevemente, se mezclaron 1 µg de DNA de bácmido recombinante diluido en 100 µl de medio de cultivo TNM-FH sin suplementar y sin antibiótico con 100 µl del mismo medio conteniendo 8 µl de Cellfectin II[®]. La mezcla se incubó 30 min a TA. Luego, se agregaron 800 µl de medio y la mezcla se volcó sobre monocapas de células Sf9 sembradas en placas de seis pocillos a una densidad de 1×10^6 células/pocillo. Las placas se incubaron por 4 h a 27 °C, se removió el medio de transfección y se agregaron 3 ml de medio TNM-FH suplementado

con SFB 10 % y antibiótico-antimicótico. Las células fueron incubadas a 27 °C y observadas al microscopio óptico a partir del tercer día postransfección. Tras 4-5 días de incubación se cosecharon los sobrenadantes en forma estéril, se clarificaron por centrifugación a 1000 x g a 4 °C y se conservaron a 4 °C al resguardo de la luz hasta su uso.

4.2 Amplificaciones de los *stocks* virales

4.2.1 Infección de células de insecto para la obtención de *stocks* de baculovirus recombinante

La multiplicación de los baculovirus se realizó en células Sf9 crecidas en forma de monocapa a 27 °C. Se infectaron las células a una baja multiplicidad de infección (MOI 0,01). Luego de una hora de adsorción a 27 °C, se retiró el inóculo y se agregó medio de cultivo. A los 3-4 días postinfección (dpi) se cosecharon los sobrenadantes virales y se clarificaron por centrifugación a 1000 x g a 4 °C. Los *stocks* se titularon y se conservaron a 4 °C al resguardo de la luz hasta su uso. Los virus utilizados poseían un máximo de 3 pasajes.

4.2.2 Infección de células Vero para la obtención del *stock* de VSV

El medio de cultivo utilizado fue MEM-D/E suplementado con SFB 2,5 % y antibiótico-antimicótico. Las infecciones se realizaron a baja multiplicidad de infección (MOI 0,1 - 0,01). Luego de 1 h de adsorción a 37 °C, se retiró el inóculo y se agregó medio de cultivo. A las 48 hpi se observó el efecto citopático producido por la infección y se cosechó el sobrenadante. Finalmente se clarificó y se alicuotó en tubos que fueron almacenados a -80 °C.

4.2.3 Infección de células BHK-21 para la obtención de los *stocks* de VACV y VTF-3

El medio de cultivo utilizado fue MEM-D suplementado con SFB 2,5 % y antibiótico-antimicótico. Las infecciones se realizaron a baja multiplicidad de infección (MOI 0,1 - 0,01). Luego de 1 h de adsorción a 37 °C, se retiró el inóculo y se agregó medio de cultivo. A las 72 hpi se observó el efecto citopático producido por la infección y se cosecharon el sobrenadante y las células. Se centrifugó a 1000 x g 5 minutos y el *pellet* fue resuspendido en 2 ml de medio de cultivo. A continuación se realizaron 3 ciclos de congelado a -80 °C por 20 min y descongelado a 37 °C por 10 min. Luego, se sonicó en sonicador de baño *Elmasonic S* (Elma) 1 min al máximo en agua-hielo. Se centrifugó a 1000 x g 5 min y se guardó el

sobrenadante. Al *pellet* se le realizó otro ciclo de sonicado. El sobrenadante se juntó con el anterior. Finalmente se alicuotó en tubos que fueron almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3 Titulación se de los stocks virales

4.3.1 Técnica de punto final

- Baculovirus brotados

La titulación de los baculovirus se realizó mediante el método de dilución a punto final utilizando la línea Sf9GFP, una línea Sf9 modificada, previamente generada en el laboratorio, que posee el gen de GFP bajo el promotor de poliedrina, inducible por infección. Brevemente, se agregaron $100\text{ }\mu\text{l}$ de diluciones desde 10^{-4} a 10^{-9} de los *stocks* virales realizadas en medio sin suplementar a $900\text{ }\mu\text{l}$ de células Sf9 a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/ml de medio suplementado. $100\text{ }\mu\text{l}$ de cada una de estas suspensiones fueron sembrados en 12 pocillos de una placa de 96 pocillos. Como control negativo, se sembraron células mezcladas con $100\text{ }\mu\text{l}$ de medio. La placa se incubó por 5 a 7 días en cámara húmeda a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se contaron pocillos infectados por visualización al microscopio de fluorescencia (Axio Vert.A1 de Zeiss, Alemania). El título viral se calculó como TCID_{50} , según lo descrito originalmente por Reed y Muench en 1938 [245].

- VSV

Se realizó utilizando células Vero. $100\text{ }\mu\text{l}$ de diluciones desde 10^{-4} a 10^{-9} de los *stocks* virales se agregaron a una placa de 96 pocillos con las células (sembradas el día anterior a una densidad de 5×10^4 células/pocillo). Como control negativo se sembraron $100\text{ }\mu\text{l}$ de medio. La placa se incubó por 48 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ CO_2 5 % y se contaron pocillos infectados por visualización del efecto citopático al microscopio óptico. El título viral se calculó como TCID_{50} según lo descrito originalmente por Reed y Muench en 1938.

4.3.2 Técnica de unidades formadoras de placas

- VSV

Monocapas de células Vero con una densidad de 1×10^5 células/pocillo fueron infectadas con diluciones seriadas desde 10^{-4} a 10^{-9} de la suspensión viral. Se dejaron 1 h a 37 °C, se retiró el inóculo y se agregó 500 μ l de una solución 50% MEM-D 2X y 50% metilcelulosa 1,4 %. Las células se dejaron inmobilizadas a 37 °C CO₂ 5 %. Pasadas 72 h, se agregaron 500 μ l de una solución de formol 10 % por 10 min. Luego, se descartó el medio y se realizaron dos lavados con H₂O para finalmente teñir con una solución de cristal violeta 0,5 % durante 10 min. Se calculó el título viral en la dilución que permitió contar un número de placas entre 50 y 150. El título viral se expresó en UFP/ml.

- VACV y VTF7-3

Monocapas de células BHK-21 con una densidad de 1×10^5 células/pocillo fueron infectadas con diluciones seriadas desde 10^{-5} a 10^{-9} de la suspensión viral. Se dejaron 1 h a 37 °C, se retiró el inóculo y se agregó 500 μ l de una solución MEM-D SFB 5%. Las células se dejaron inmobilizadas a 37 °C en la estufa con 5% de CO₂. Pasadas 72 h se agregaron 500 μ l de una solución de formol 10 % por 10 min. Luego, se descartó el medio y se realizaron dos lavados con H₂O para finalmente teñir con una solución de cristal violeta 0,5 % durante 10 min. Se contaron las placas y se calculó el título viral en la dilución que permitió contar un número de placas entre 50 y 150. El título viral se expresó en UFP/ml.

4.4 Producción de poliedros y purificación de ODV

Se infectaron células Sf9 con baculovirus a una MOI de 5. Luego de 1 hora de adsorción a 27 °C, se retiró el inóculo y se agregó medio de cultivo. La purificación de poliedros se realizó a partir de células cosechadas a los 7 dpi. En primer lugar, se realizó una centrifugación a 500 x g 5 min a TA. El *pellet* de células se resuspendió en dodecilsulfato de sodio (SDS) 0,5 % (10 ml de SDS 0,5 % cada 2×10^8 células). La muestra se trató con una jeringa con aguja de tuberculina hasta eliminar la viscosidad, luego se centrifugó a 5000 x g 10 min y el *pellet* se resuspendió en el mismo volumen de NaCl 0,5 M. Se volvió a centrifugar a 5000 x g 10 minutos y el *pellet* se resuspendió en el mismo volumen de ddH₂O.

A continuación, para disolver los poliedros, se agregó NaCO_3 0,1 M (concentración final) y se incubó durante 30 min. Luego, se agregó Tris HCl pH 7,6 0,1 M (concentración final) para cortar la reacción. Finalmente, se centrifugó a $7000 \times g$ 10 min. Se descartó el *pellet* y los ODV fueron purificados por ultracentrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa (25 %-65 %).

- Cuantificación de ODV

La cuantificación de ODV se realizó mediante la inmunodetección de VP39 y comparación con BV. En un gel de poliacrilamida 12 % se sembró una muestra de ODV equivalente a las muestras utilizadas en los ensayos antivirales o de qPCR y diluciones seriadas 1:5 de BV partiendo de 2×10^7 TCID₅₀.

4.5 Purificación de baculovirus brotados

Se concentraron 10 ml de un sobrenadante de infección con 1×10^8 UFP/ml a $80000 \times g$ 90 min a 4 °C. El *pellet* fue resuspendido en 2 ml de PBS. Por otro lado, se armó un gradiente de sacarosa continuo 25 % - 60 % ON a 4 °C. Al día siguiente, se sembró el virus concentrado en el gradiente de sacarosa y se centrifugó a $96000 \times g$ durante 3 h a 4 °C. Se colectó la banda blanca en el mínimo volumen posible y se llevó a 12 ml con PBS en un nuevo tubo. A continuación se centrifugó a $80000 \times g$ por 90 min a 4 °C y se resuspendió en 50 μ l de *cracking buffer* 1 X.

5. BV recombinantes

5.1 Construcción de los plásmidos de transferencia

Todos los baculovirus utilizados en esta tesis fueron obtenidos mediante el sistema Bac-to-Bac[®] (Invitrogen). Este sistema requiere el clonado de la secuencia de interés en un vector de transferencia compatible con el sistema. En esta tesis se utilizó el plásmido pFastBac[™]Dual (Invitrogen).

5.1.1 Clonado del vector de transferencia pFBD_{T7}ChCAGGFP

A partir de los oligonucleótidos mCherry MF y mCherry XRV se amplificó por PCR el gen *mcherry*, usando como templado un vector disponible en el laboratorio. La banda de 730 pb se clonó en el pGEM[®]-T Easy (Promega), para obtener el pGemTmCherry. Luego, la secuencia de *mcherry* se clonó bajo el promotor T7 en el vector pIC-Luc con la enzima EcoRI. El vector resultante se llamó pIC_{T7}mCherry (Fig. M2). El vector pIC-Luc fue gentilmente cedido por Dra. Encarnación Martínez-Salas, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), España.

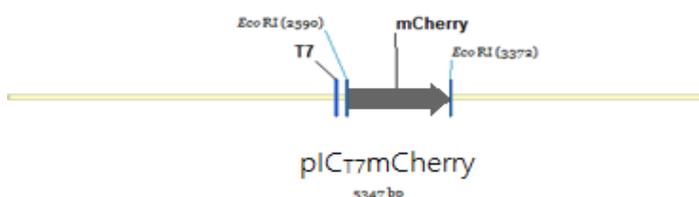


Figura M2 Vector pIC_{T7}mCherry

Para obtener el fragmento T7mCherry en el vector definitivo, se digirieron los vectores pFastBac[™]Dual y pIC_{T7}mCherry con las enzimas PvuII y SphI, y se obtuvo el vector pFBD_{T7}Ch (Fig. M3)

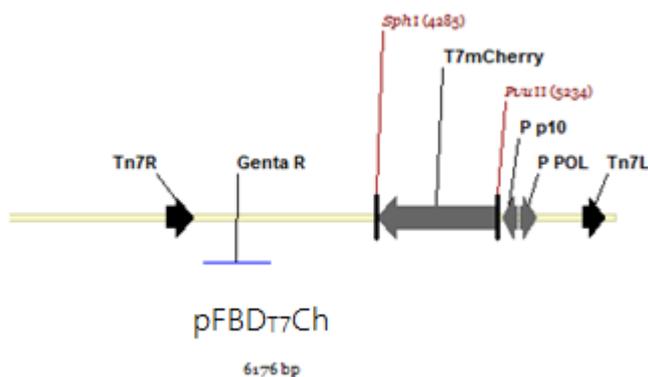


Figura M3: Vector pFBD_{T7}Ch

Finalmente, el vector de transferencia pFBD_{T7}mCherry_{CAGE}GFP se obtuvo a través de las digestiones del vector disponible en el laboratorio pCXeGFP y del pFBD_{T7}mCherry con las enzimas Sall y PstI, seguido de una reacción de ligación (Fig. M4).

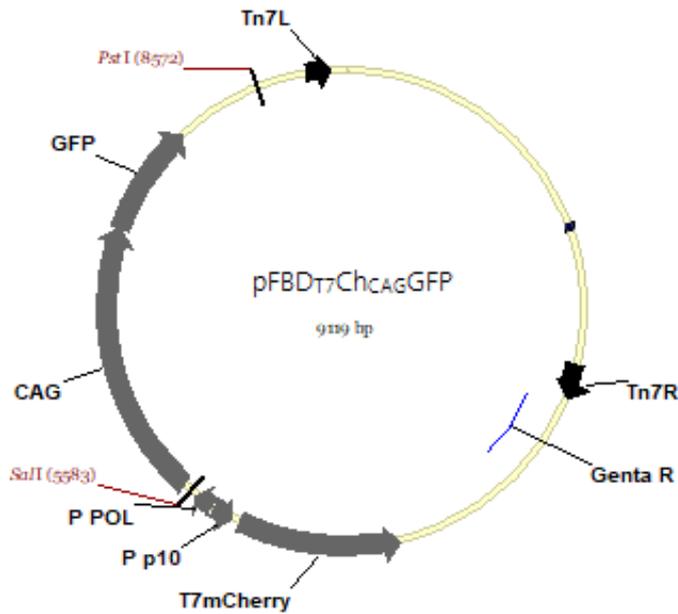


Figura M4: Vector de transferencia $pFBD_{T7}Ch_{CAG}GFP$

5.1.2 Clonado del vector de transferencia $pFBD_{T7}IRESCh_{CAG}GFP$

El vector pIC-IRES, disponible en el laboratorio, contiene la secuencia IRES del virus de la fiebre aftosa (VFA). Este vector se utilizó como templado para obtener por PCR un fragmento de 679 pb con los oligonucleótidos T7IRES For y T7IRES Rev, que fue clonado en el vector pGEM[®]-T Easy. Luego, el fragmento T7IRES se clonó con las enzimas SphI y NcoI en el vector pGemT_{T7}Ch y se obtuvo el vector pGemT_{T7}Ch (Fig. M5).

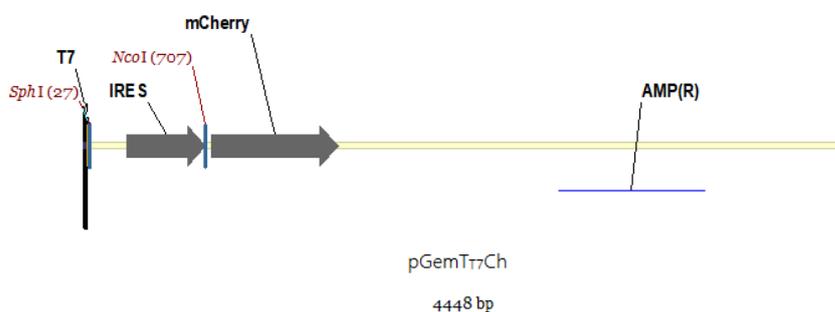


Figura M5: Vector $pGem_{T7}IRESCh$

Finalmente, el fragmento T7IRESmCherry se clonó en el vector pFBD_{Cag}GFPT7mCherry con las enzimas PvuII y SphI. El vector resultante se llamó pFBD_{T7}Ch_{CAG}GFP (Fig. M6).

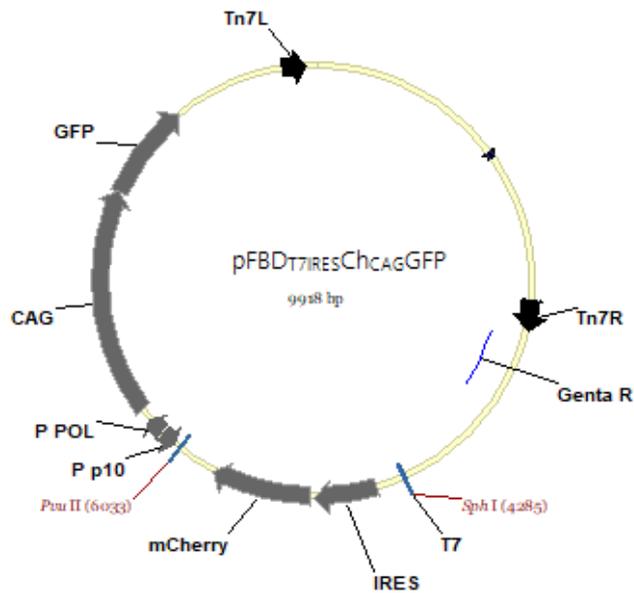


Figura M6: Vector de transferencia *pFBD_{T7IRES}Ch_{CAG}GFP*

5.1.3 Clonado del vector de transferencia *pFBD-G-VSV*

La secuencia codificante de la proteína G-VSV se obtuvo por digestión con EcoR I a partir del plásmido pCMV-VSV-G (Cell biolabs) y se clonó en el vector pFBD-PHGFP (Fig. M7).

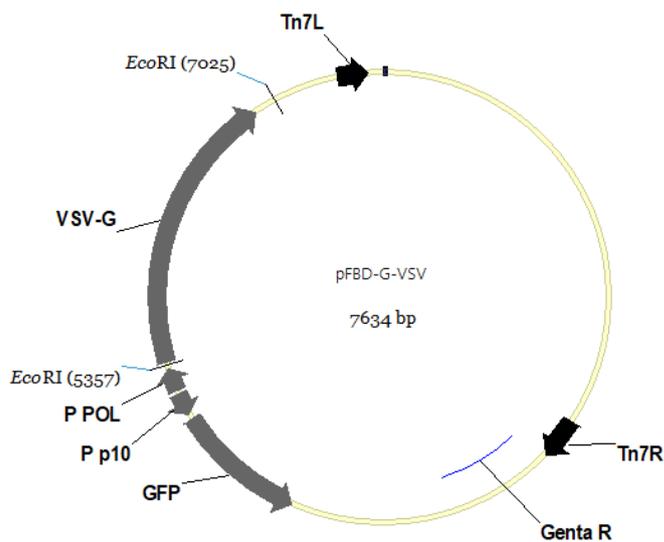


Figura M7: Vector de transferencia *pFBD-G-VSV*.

5.2 Generación de los bácmidos recombinantes por el método Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System

Se transformaron 50 µl de bacterias *E. coli* DH10Bac con aproximadamente 100 ng de cada vector de transferencia. La selección de las bacterias que incorporaron el plásmido se realizó en placas LB-agar con los antibióticos kanamicina, tetraciclina y gentamicina en concentraciones finales de 50 µg/ml, 10 µg/ml y 7 µg/ml, respectivamente. El evento de transposición fue seleccionado por el color de la colonia (fenotipo blanco), en presencia de IPTG 40 µg/ml y Bluo-gal 100 µg/ml. Se seleccionaron varias colonias blancas que se crecieron en LB líquido en presencia de los tres antibióticos y los bácmidos se extrajeron con el protocolo de minipreparaciones de DNA, teniendo en cuenta el tamaño del mismo. Posteriormente, se confirmó la presencia del *cassette* transpuesto en el bácmido recombinante mediante PCR con los oligonucleótidos específicos universales M13For y M13Rev que hibridan por fuera de los sitios de transposición, y oligonucleótidos internos que hibridan en secuencias específicas del *cassette*.

5.3 Caracterización de los bácmidos recombinantes

Se realizó PCR a punto final. Para descartar aquellos bácmidos recombinantes contaminados con el bácmido parental se utilizó el par de oligonucleótidos M13F y M13R (producto de amplificación de aproximadamente 300 pb) y para determinar la identidad del bácmido, se realizaron otra dos PCR, cada una con el oligonucleótido M13Fo M13R y otro que hibrida en la secuencia insertada. La PCR se realizó utilizando la enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante y utilizando como volumen final de reacción 15 µl. 1 µl de una dilución 1 en 10 de la minipreparación de DNA fue utilizado como templado y la T de *annealing* seleccionada fue de 2 °C por debajo de la menor T_m. Se realizaron 35 ciclos de reacción y el producto fue analizado por gel de agarosa. El tiempo de extensión fue de 30 s cada 500 pb a amplificar.

Una vez confirmada la identidad de los bácmidos recombinantes, los mismos fueron empleados para transfectar células Sf9 y obtener el *stock* viral.

6. Construcción de otros plásmidos

6.1 pGemT-VAV70mer

A partir de la extracción de DNA de vaccinia WR, se realizó una PCR a punto final con los oligonucleótidos VAC 70mer For y VAC 70mer Rev (Tabla M1). El oligonucleótido *reverse* hibrida con parte de la secuencia VAVC 70mer de vaccinia, mientras que el oligonucleótido *forward* hibrida río arriba de la secuencia VAVC 70mer. Los productos de PCR fueron purificados y clonados en el vector pGEM[®]-T Easy.

6.2 pcDNAhSTING

Se realizó una PCR a punto final con los oligonucleótidos hSTING-Eco y hSTING-Xba (Tabla M1) utilizando como templado DNA de células HeLa. El producto de PCR fue purificado y clonado en el vector pCR 2.1-TOPO TA (Invitrogen), obteniendo el vector TOPO-hSTING. Finalmente, el vector pcDNA-hSTING se obtuvo a través de la digestión de los vectores TOPO-hSTING y pcDNAeGFP con las enzimas EcoRI y XbaI, seguida de una reacción de ligación (Fig. M8).

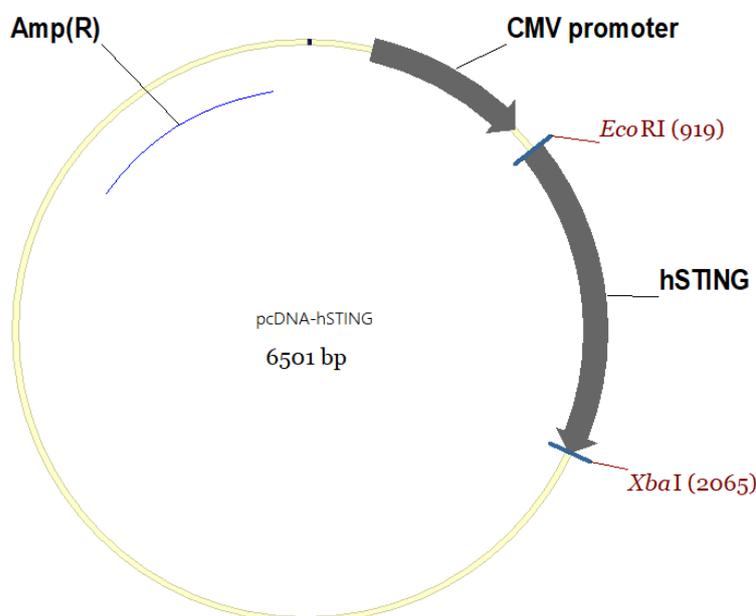


Figura M8: Vector pcDNA-hSTING.

6.3 pcDNA-mSTING

Se realizó una PCR a punto final con los oligonucleótidos mSTING-Eco y mSTING-Xba utilizando como templado DNA de las células NIH/3T3. El producto de PCR fue purificado y clonado en el vector pCR 2.1-TOPO TA, obteniendo el vector TOPO-mSTING. Finalmente, el vector pcDNA-mSTING se obtuvo a través de la digestión del vector TOPO-mSTING y pcDNAeGFP con las enzimas EcoRI y Xba, seguido de una reacción de ligación (Fig. M9).

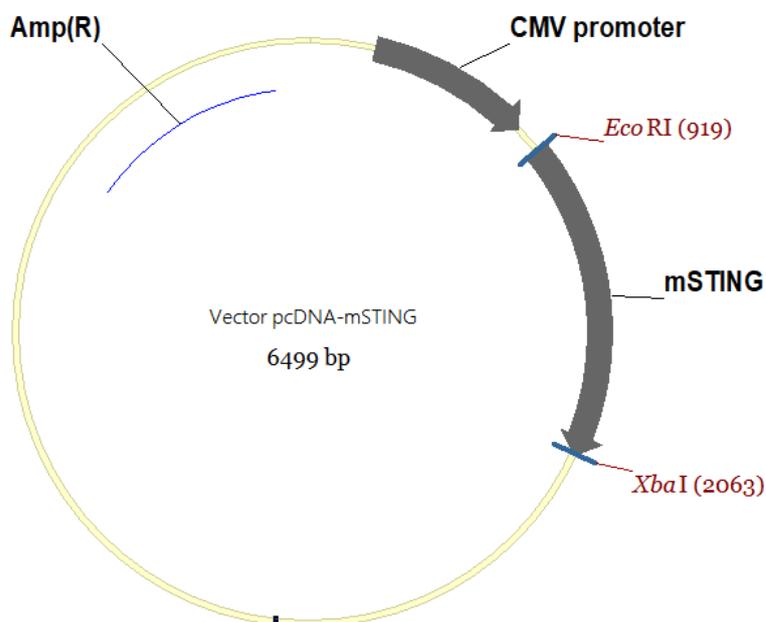


Figura M9: Vector pcDNA-mSTING.

7. Ensayos de transducción

Los distintos tipos celulares se sembraron en placas de 96 pocillos, de acuerdo a la densidad deseada y se dejaron ON en MED-D SFB 10 %. Al día siguiente, los baculovirus recombinantes se concentraron por centrifugación durante 1 h a 12000 x g y luego resuspendidos en TNM-FH:PBS (1:4). Las células se pusieron en contacto con 100 µl del virus concentrado durante 4 h a 27 °C. Finalmente, para los ensayos de transducción nuclear se retiró el inóculo y se agregó MEM-D SFB 5 %. Para los ensayos de transducción citoplasmática, se retiró el inóculo y se infectó con VTF7-3 ó vaccinia salvaje a una MOI de 1 durante 1 h a 37°C. Luego, se retiró el inóculo, se agregó MEMD-D SFB 5 % y se dejó ON a

37 °C con 5 % de CO₂. Al día siguiente, se observaron los pocillos positivos por visualización de la fluorescencia al microscopio óptico.

Los ensayos de transducción por transfección con el plásmido pcDNA-eGFP se realizaron en una placa de 24 pocillos con densidad celular de $3,2 \times 10^5$ células /pocillo y utilizando 500 ng de vector utilizando Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent como reactivo de transfección. Se dejaron las células con la mezcla del DNA con los lípidos catiónicos durante 2 h sin SFB, que luego fue agregado en una concentración final de 10 %.

Los ensayos de infección - transfección fueron semejantes al ensayo de transducción con baculovirus seguido del ensayo de transducción por transfección con el plásmido pcDNA-GFP.

8. Hibridación fluorescente *in situ*

Las células NIH/3T3 se sembraron en placas de 8 pocillos (Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide System, Thermo Fisher Scientific) a una densidad de 2×10^5 células/pocillo. Luego, se infectaron a una MOI de 50 con el baculovirus salvaje durante 1 h en hielo. A continuación, se retiró el inoculo, se realizaron 3 lavados con PBS y se agregó medio MEM-D con SFB 2,5 % y se incubó en la estufa a 27 °C durante 6 h. Las células se fijaron con una solución de EtOH 95 % - 5% Ac. Acético, durante 5 min a -20 °C. Luego, se descartó la solución de fijación y se realizaron 3 lavados con PBS. A continuación, se incubaron durante 10 min con una solución de 0,2 % glicina (SIGMA) en PBS, se realizaron 3 lavados con H₂O libre de nucleasas (Thermo Fisher Scientific) y se agregó la solución de hibridación ULTRAhyb™ Ultrasensitive Hybridization Buffer (Thermo Fisher Scientific) durante 30 min a 37 °C. En paralelo se incubaron a 92 °C durante 2 min la placa de 8 pocillos y la sonda VP39-FITC (Inbio Highway) previamente diluida (5 ng/μl) en la solución de hibridación, pasados los 2 min se retiró la solución de hibridación de la placa de 8 pocillos, se agregó la solución con la sonda y se incubó a 37 °C O.N. Finalmente, se realizaron 2 lavados con 2xSSC (NaCl 300mM, NaC₆H₅O₇ 30 mM, pH 7) durante 5 min a 42 °C, un lavado con PBS, un lavado con H₂O libre de nucleasas y se cubrieron con una solución de montaje (50% glicerol – 50% PBS). Las imágenes fluorescentes se obtuvieron con un microscopio Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

Secuencia de la sonda que hibrida con parte de la secuencia de VP39: 5' ACGCTACTCTGGG CGGCGGCGCAGTGGCAGGTCCTGCGCCTGGTGTGCA 3'.

9. Inmunomicroscopía de fluorescencia

Las células NIH/3T3 se sembraron en placas de 8 pocillos a una densidad de 2×10^5 células/pocillo. Luego, se infectaron a una MOI de 50 con el baculovirus AcG-GFP o AcPhGFP durante 1 h en hielo. A continuación, se retiró el inoculo, se realizaron 3 lavados con PBS, se agregó medio MEM-D con SFB 2,5 % y se incubó en la estufa a 27 °C durante 10 o 45 min. Las células se lavaron con PBS y se fijaron durante 15 min con una solución de paraformaldehído (SIGMA) 4 % en PBS. Luego, las células fueron permeabilizadas con una solución de Triton™ X-100 (SIGMA) 0,2 % durante 30 min y lavadas con PBS-T (PBS, TWEEN® 20, SIGMA 0,1 %). Luego se realizó un bloqueo durante 1 h con una solución de BSA (Thermo Fisher Scientific) 1% en PBS. La marcación con el anticuerpo primario se realizó durante 1 h utilizando un anticuerpo α VP39 (1:50). Luego se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS-T. La incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 488 (Invitrogen) se realizó a una dilución 1:800 durante 1 h a TA. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS-T y se agregó TO-PRO™-3 Iodide (Invitrogen) con una dilución 1:150 durante 15 min, se realizaron 3 lavados con PBS-T, uno con ddH₂O y se cubrieron con una solución de montaje (50% glicerol – 50% PBS). Las imágenes fluorescentes se obtuvieron con un microscopio Leica TCS.

10. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia

La cuantificación de la fluorescencia en células HEK293 y HEK293 T se realizó con el *software* ZEN 2.3. Cada imagen tomada fue tomada sobre pocillos con igual número de células, y con las mismas condiciones predeterminadas por el *software*. Luego de tomar la imagen, se calcularon las intensidades de fluorescencia de 6 áreas al azar de $33 \mu\text{m}^2$, en cada una de 3 fotos para cada tratamiento. El ensayo fue repetido 2 veces.

11. Ensayo de actividad antiviral

11.1 Células NIH/3T3 y MEF

Se sembraron placas de 96 pocillos con una densidad celular de 1×10^5 células/pocillo en medio MEM-D SFB 5 %; en el caso de la mezcla de los dos tipos celulares editados, se sembraron 5×10^4 células de cada tipo. Al día siguiente, se pusieron en contacto las células con los baculovirus previamente concentrados (1 h 10000 x g 4 °C) y resuspendidos en TNM-

FH: PBS (1:4) durante 4 h a 27 °C e inmediatamente o a las 20 h, se infectaron con VSV a la MOI correspondiente (MOI de 1 para células NIH/3T3; MOI de 10 para MEF). A las 24 h se observó el efecto citopático. En primer lugar, se fijaron las células con una solución de formol 10 %, se realizaron dos lavados con H₂O y finalmente se tiñeron las células con una solución de cristal violeta 0,5 %. Se retiró la solución de teñido, se lavaron las células 3 veces con H₂O y se dejaron secar. Una vez secas, el colorante se resuspendió en una solución alcohol etílico 50 %, ácido acético 0,1 % y se dejaron en agitación durante 1 h. Finalmente, se midió la absorbancia a 595 nm, utilizando el espectrofotómetro de placa *multiskan* (Thermo scientific, EEUU).

En el caso del ensayo de transfección con *poly dA:dT*, se utilizó Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) como reactivo de transfección, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizó 1 µg/ml de concentración final.

Los resultados se expresaron como % de protección, teniendo las siguientes consideraciones: 100 % protección, células que recibieron únicamente el tratamiento con PBS, 0 % de protección, aquellas células que recibieron únicamente el tratamiento con VSV.

Cada ensayo tuvo 6 réplicas técnicas y se repitió al menos 3 veces.

11.2 Células HEK293 y HEK293 T

Se sembraron placas de 48 pocillos con una densidad celular de $1,6 \times 10^5$ células/pocillo en medio MEM-D SFB 5 %. Al día siguiente, se pusieron en contacto las células con los baculovirus previamente concentrados (1h 10000 x g, 4°C) y resuspendidos en TNM-FH:PBS (1:4) durante 4 h a 27 °C e inmediatamente o a las 20 h se infectaron con VSV a una MOI de 0,01. A las 24 h se observó el efecto citopático y se cosecharon los sobrenadantes que fueron clarificados y titulados por la técnica de unidades formadoras de placas o por la técnica de punto final. Los resultados se expresaron como UFP/ml o TCID₅₀/ml.

En el caso de transfección con *poly dA:dT*, se utilizó Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent como reactivo de transfección, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizó 1 µg/ml de concentración final.

Cada ensayo tuvo 3 réplicas técnicas y se repitió al menos 3 veces.

12. Medición de la abundancia relativa de mRNA por RT-qPCR

Los ensayos de RT-qPCR se realizaron en una placa de 48 pocillos. Las células HEK293 y HEK293 T fueron sembradas con una densidad celular de $1,6 \times 10^5$ células/pocillo, mientras que las células NIH/3T3 fueron sembradas con una densidad celular de 2×10^5 células/pocillo.

Al día siguiente, se pusieron en contacto las células con los baculovirus previamente concentrados (1h 10000 x g, 4°C) y resuspendidos en TNM-FH:PBS (1:4) durante 4 h a 27 °C. Inmediatamente o a las 24 h se extrajo el RNA total y se realizó las síntesis de cDNA para finalmente realizar la qPCR.

12.1 Puesta a punto de la concentración de oligonucleótidos

En todos los casos, para el diseño de los oligonucleótidos se tuvieron los siguientes criterios: que el fragmento amplificado no supere los 250 pb, que no formen estructuras secundarias, que el contenido de GC no supere el 55 % y que tanto el contenido de GC como la Tm sean similares en el par de oligonucleótidos.

Para poner a punto la concentración, se utilizó como templado la mezcla de cDNA provenientes de distintos tratamientos del mismo ensayo. Se realizó la qPCR con concentraciones de 100 nM, 200 nM y 300 nM para cada par de oligonucleótidos. Se seleccionó la máxima concentración que no presentara formación de dímeros de oligonucleótidos en la curva de *melting*. Los oligonucleótidos utilizados en cada caso se muestran en la tabla M2.

Nombre	Primer Forward 5' 3'	Tm	Primer Reverse 5' 3'	Tm	Concentración utilizada (nM)
β - actina Humana	TGACGGGGTCACCCACACTG	58	AAGCTGTAGCCGCGCTCGGT	58	300
cGAS Humano	CCCAAGCATGCAAAGGAAGG	54	ACAATCTTTCTGCAACATTCT	50	200
STING Humano	CACCTGTGCTCTGGAGTACG	56	CATCTGCAGTTCTGGTAGG	56	200
IFN β Humano	CGCCGCATTGACCATCTA	50	GACATTAGCCAGGAGTTCTCA	55	200
IL - 1 β	GCTGAGGAAGATGCTGGTTC	54	TCCATATCTGTCCCTGGAG	54	300
IFN λ 1	CGCCTTGAAGAGTCACTCA	54	GAAGCCTCAGGTCCCAATTC	54	300
GAPDH murino	GCCTTCCGTGTTCTACCC	55	TGCCTGCTTCACCACCTTCT	53	300
IFN β murino	ACACCAGCCTGGCTTCCATC	56	TTGGAGCTGGAGCTGCTTATAGTTG	58	200
STING murino	CTTCAGAGCTTGACTCCAGC	54	TGTACAGTCTTCGGCTCCCT	54	200
cGAS murino	AAGGCAGCTGGCTATTAGT	52	CGCCAGGTCTCTCCTTGAAA	54	200
MAVs murino	CCTCCGGGGACCTCACTCCG	62	TGGGGACTCTGGTGGCTGGG	60	200
TLR9 murino	CCATCTCCCAACATGGTTCTCCGT	59	TGCTGCCGAGAGAAACGGG	58	200

Tabla M2: Lista de oligonucleótidos utilizados para los ensayos de RT-qPCR.

12.2 qPCR

Se realizaron con el equipo StepOne Plus (Applied Biosystems). En los ensayos con células murinas el gen normalizador fue el gen celular *gliceraldehido 3 fosfato* deshidrogenasa (GAPDH), mientras que para los ensayos con células humanas se utilizó β - *Actina*. Se utilizó el *software* *Lingred* [246] para calcular la eficiencia de cada pocillo y se consideraron aceptables valores mayores o iguales a 1,8.

El análisis de abundancia relativa de los mRNA se realizó con el programa Infostat (Di Rienzo 2002). El mismo permiten el cálculo de los resultados de expresión relativa de varios genes a la vez y posibilita la inclusión de los valores de eficiencia estudiados previamente para cada par de oligonucleótidos, de esta forma también se corrigen las variaciones dadas por los diferencias que puedan existir entre las eficiencias de amplificación de los genes de interés y los genes de referencia.

La fórmula empleada en el cálculo fue la siguiente:

R (fold change) = E (referencia) Δ Ct referencia (Ct control - Ct muestra) / E (target) Δ Ct target (Ct control - Ct muestra), donde E es el valor de eficiencia obtenido con el programa *Lingred*, target el gen de interés y R la variación entre las dos condiciones comparadas (*fold change*).

Los resultados se expresaron como un aumento de la expresión del mRNA del gen de interés normalizado a la expresión de GAPDH, en el caso de células murinas, o β - *Actina*, para las células de origen humano.

13. Edición de las células NIH/3T3

13.1 Selección de la secuencia guía

La selección de los RNA guías (gRNA) fue realizada en base a la bibliografía [247] y las secuencias se muestran a continuación:

sting 5' GAAGATGAGGGCTACATATT 3'

cgas 5' GGGCTGGGGCTCCCGTACGG 3'

13.2 Diseño de los oligonucleótidos

Para clonar las secuencias de los guías en el vector pSPgRNA, la estrategia fue hibridar dos oligonucleótidos de manera de que queden extremos compatibles con el corte en el vector con la enzima BbsI.

sting (STING guíaFor) 5' **CACC** GAAGATGAGGGCTACATATT 3'
 (STING guía Rev) 3' CTT CTACT CCCGATGTATAA **CAA** 5'

cgas (cGAS guía For) 5' **CACC** GGGCTGGGGCTCCCGTACGG 3'
 (cGAS guía Rev) 3' CCCGACCCCGAGGGCATGCC **CAA** 5'

En negro están representados los 20 nucleótidos correspondientes a la secuencia guía de *sting* o *cgas*, mientras que en celeste está representado la secuencia compatible con la digestión con la enzima BbsI.

13.3 Construcción de SPgRNA-STING y SPgRNA-cGAS

1 µg del plásmido pSPgRNA Fig. M1 D) fue digerido con la enzima BbsI. El mismo fue purificado y defosforilado. Por otro lado, 100 µM de cada uno de los oligonucleótidos de STING (STING guía For; STING guía Rev) o cGAS (cGAS guía For; cGAS guía Rev) (Vf = 10 µl) fueron desnaturalizados a 95 °C durante 5 min y luego llevados a TA en mesada. La reacción de ligación, con 100 ng de pSPgRNA purificado y una dilución 1/250 de los oligonucleótidos, se realizó a 16 °C ON con la enzima T4 DNA ligasa. Finalmente, el producto se transformó en *E.coli* DH5α y se seleccionó con ampicilina. No fue posible seleccionar los clones positivos por patrón de restricción dado que el tamaño del inserto era de 20 pb. La confirmación se realizó por secuenciación con el oligonucleótido M13Rev.

13.4 Puesta a punto de la transfección

- Lípidos catiónicos

Se realizaron transfecciones con: Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Invitrogen), Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen), DMRIE-C Transfection Reagent (Invitrogen), X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche), K2® Transfection System (Biontex). Para cada reactivo se siguieron las recomendaciones del proveedor y en todos los ensayos se utilizó el plásmido pcDNAeGFP. Se utilizaron placas de 96 pocillos, se probaron dos condiciones de densidad celular $3,5 \times 10^4$ y $7,0 \times 10^4$ células/pocillo y distintas relaciones de DNA/lípidos catiónicos.

- Electroporación

Cada condición ensayada se realizó a partir de 2×10^7 células. Las células fueron tripsinizadas (0,25 %) y centrifugadas a $500 \times g$ durante 7 min. Luego, se realizó un lavado con *buffer* PBS pH 7 o HBS (Hepes 20 mM; NaCl 150 mM; Ficoll 400 0,5%, pH 7,2) y fueron nuevamente centrifugadas a $500 \times g$ durante 7 min. El *pellet* fue resuspendido en PBS o HBS, de modo tal que por tratamiento haya una densidad celular de 2×10^7 células/200 μ l. Se utilizaron cubetas de electroporación de 4 mm (BioRad). En una primera etapa, se agregaron los 200 μ l con las células y luego 10 μ g del plásmido pcDNAeGFP. Una vez realizado el pulso eléctrico (se ensayaron las condiciones presentadas en la tabla M3), las células se dejaron 1 min en reposo y se sembraron en una placa de 6 pocillos con 3 ml de medio de cultivo (2,7 ml de MEM-D SFB 10 %; 0,3 ml de medio condicionado filtrado). Se dejaron 15 min a TA y finalmente se llevaron a la estufa de 37 °C. A las 24 h se observaron al microscopio de fluorescencia.

Resistencia	Capacitancia (μF)	Voltaje (V)	PBS/HBS
∞	950	200	PBS
∞	950	200	HBS
∞	2000	150	HBS
∞	2000	160	HBS
∞	2000	180	HBS
∞	2000	200	HBS
∞	3000	50	HBS
∞	3000	200	HBS

Tabla M3 Condiciones ensayadas para la puesta a punto de los ensayos de electroporación en células NIH/3T3.

13.5 Curva de blasticidina

Se realizó una curva con blasticidina (Gibco) para establecer las condiciones óptimas de selección en NIH/3T3. Para ello, se sembraron en una placa de 96 pocillos $7,5 \times 10^4$ células/pocillo. Al día siguiente, se agregó el antibiótico en distintas concentraciones y a las 24 h se observó el efecto citotóxico producido por el antibiótico. Para ello, las células fueron tripsinizadas y luego resuspendidas en MEM-D con 10 % SFB y una alícuota fue diluida al medio con una solución de azul tripán 2X. La viabilidad celular fue cuantificada en cámara de *Neubauer*.

13.6 Generación de las líneas NIH/3T3 control, NIH/3T3 sting^{-/-} y NIH/3T3 cgas^{-/-}

Las células NIH/3T3 fueron electroporadas con 10 μg del plásmido sgRNA-STING, o sgRNA-cGAS o pSPgRNA y 7 μg del plásmido pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 (Fig. M1 C) en HBS. Se realizó el *shock* eléctrico con las condiciones 180 V, 2000 μF , ∞R . A las 24 h postelectroporación se cambió el medio y se agregó blasticidina 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a cada pocillo. A las 48 h se reemplazó el medio por medio sin antibiótico, después de 4-6 días las células llegaron a confluencia y se realizó una dilución límite. Para ello, se tripsinizaron las células y se contaron en cámara de *Neubauer*. Se realizó una dilución de modo que queden 50 células en 10 ml y se sembraron 100 μl por cada pocillo en una placa de 96 pocillos.

13.7 Análisis de las secuencias editadas

Se realizó una extracción de DNA de las células editadas y control y se realizó una PCR a punto final. En el caso de las línea NIH/3T3 *cgas*^{-/-} y NIH/3T3 Control se utilizaron los pares de oligonucleótidos, cGAS KO for – cGAS KO rev; cGAS KO for2 – cGAS KO rev2 y cGAS KO for3 – cGAS KO rev3, mientras que para la líneas NIH/3T3 *sting*^{-/-} y NIH/3T3 Control se utilizaron los oligonucleótidos STING KO for - STING KO rev (Tabla M1). Los productos de PCR fueron sembrados en un gel de agarosa 2 % con bromuro de etidio. La banda correspondiente a un tamaño de 804 pb fue purificada y cuantificada en Nano Drop. Este fragmento fue utilizado para el ensayo de T7 endonucleasa I y para el análisis con el software TIDE.

- Ensayo de T7 endonucleasa I

A 200 ng de los productos purificados se les agregó 2 µl del *buffer* NEB 2 10X (New England Biolabs) y ddH₂O a un volumen final 19 µl. A continuación, se los desnaturizó y rehibridó en las siguientes condiciones:

Desnaturalización	95 °C	5 min
Hibridación	95°C -85°C	↓2°C / segundo
	85°C -25°C	↓0,1 °C / segundo

Al finalizar, las muestras se pusieron en hielo y se les agregó 1 µl de la enzima T7 endonucleasa I (New England Biolabs). Se incubó a 37 °C durante 20 min y los productos fueron visualizados en un gel de agarosa 2 % con bromuro de etidio.

- TIDE

30 ng de los productos purificados fueron secuenciados con el oligonucleótido STING KO rev. El archivo de secuencia con el formato .ab1 de cada una de la muestras fue comparado con el de la muestra control. Para el análisis se utilizaron los siguientes parámetros:

Nucleasa: SpCas9

Secuencia guía: GAAGATGAGGGCTACATATT

Ventana de alineamiento (pb): 1-70

Ventana de decomposición (pb): 75-680

Rango de tamaño de Indel: 0-10

P-value threshold: 0.001

14. Ensayos de transcomplementación

14.1 HEK293 y HEK293 T

Los ensayos antivirales y de RT-qPCR se realizaron en una placa de 24 pocillos, con una densidad celular de $3,2 \times 10^5$ células/pocillo. Las células se transfectaron con 500 ng del plásmido correspondiente utilizando Lipofectamine[®] 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. A las 48 hpt, las células se pusieron en contacto con los baculovirus previamente concentrados (1 h, 10000 x g, 4 °C) y resuspendidos en TNM-FH:PBS (1:4) a una MOI de 100, durante 4 h a 27 °C. Inmediatamente después, se extrajo el RNA total o se infectaron con VSV. En el caso de transfectar con dos vectores juntos, se utilizó 500 ng de cada uno.

Cada ensayo tuvo 3 réplicas técnicas y se repitió al menos en 3 oportunidades.

14.2 NIH/3T3; NIH/3T3 sting^{-/-}; NIH/3T3 cgas^{-/-}

El ensayo antiviral se realizó en una placa de 96 pocillos con una densidad de 1×10^5 células/pocillo. El ensayo de RT-qPCR se realizó en una placa de 24 pocillos a una densidad de 4×10^5 células/pocillo. Las células se transfectaron con 125 ng (antiviral) o 500 ng (RT-qPCR) del plásmido correspondiente utilizando Lipofectamine 2000 Transfection Reagent y el ensayo continuó del mismo modo que el descrito para las células HEK293 y HEK293 T.

15. Análisis estadístico

Los ensayos de RT-qPCR se analizaron con el *fg statistical software* (di Rienzo et al., 2013] que utiliza el *test* de permutación *random* descrito por Pfaffl et al. [2002]. Para el resto de los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software). Para comparar dos poblaciones se realizó el test t-Student y para comparar 3 o más poblaciones se realizó un test de ANOVA y un test post ANOVA por el método de Bonferroni.

BIBLIOGRAFÍA

BIBIOGRAFÍA

- [1] G. F. Rohrmann, "Baculovirus Molecular Biology, 3rd edn. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information." 2013.
- [2] T. O. Ihalainen, J. P. Laakkonen, O. Paloheimo, S. Ylä-Herttuala, K. J. Airene, and M. Vihinen-Ranta, "Morphological characterization of baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus," *Virus Res.*, 2010.
- [3] J. A. Jehle *et al.*, "On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision," *Archives of Virology.* 2006.
- [4] G. W. Blissard and D. A. Theilmann, "Baculovirus Entry and Egress from Insect Cells," *Annu. Rev. Virol.*, vol. 5, no. 1, pp. 113–139, 2018.
- [5] I. L. Yu, D. Bray, Y. C. Lin, and O. Lung, "Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus ORF 23 null mutant produces occlusion-derived virions with fewernucleocapsids," *J. Gen. Virol.*, 2009.
- [6] X. Wang *et al.*, "Baculovirus *per os* Infectivity Factor Complex: Components and Assembly," *J. Virol.*, 2019.
- [7] G. W. Blissard, J. R. Wenz, and B. Thompson, "Baculovirus gp64 Envelope Glycoprotein Is Sufficient To Mediate pH-Dependent Membrane Fusion," 1992.
- [8] K. L. Hefferon, A. G. P. Oomens, S. A. Monsma, C. M. Finnerty, and G. W. Blissard, "Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry," *Virology*, 1999.
- [9] A. G. P. Oomens and G. W. Blissard, "Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus," *Virology*, 1999.
- [10] S. Dong and G. W. Blissard, "Functional Analysis of the *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus GP64 Terminal Fusion Loops and Interactions with Membranes," *J. Virol.*, 2012.
- [11] T. J. Wickham, R. R. Granados, H. A. Wood, D. A. Hammer, and M. L. Shuler, "General analysis of receptor-mediated viral attachment to cell surfaces," *Biophys. J.*, 1990.
- [12] P. Wang, D. A. Hammer, and R. R. Granados, "Binding and fusion of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus to cultured insect cells," *J. Gen. Virol.*, 1997.
- [13] T. J. Wickham, M. L. Shuler, D. A. Hammer, R. R. Granados, and H. A. Wood, "Equilibrium and kinetic analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus attachment to different insect cell lines," 1992.
- [14] K. Kamiya, J. Kobayashi, T. Yoshimura, and K. Tsumoto, "Confocal microscopic observation of fusion between baculovirus budded virus envelopes and single giant unilamellar vesicles," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 2010.
- [15] L. E. Volkman and P. A. Goldsmith, "Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis," *Virology*, 1985.
- [16] G. Long, X. Pan, R. Kormelink, and J. M. Vlak, "Functional Entry of Baculovirus into Insect and Mammalian Cells Is Dependent on Clathrin-Mediated Endocytosis," *J. Virol.*, 2006.
- [17] Q. Yue *et al.*, "Distinct Roles of Cellular ESCRT-I and ESCRT-III Proteins in Efficient Entry and Egress of Budded Virions of *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus VIRUS-CELL INTERACTIONS crossm," vol. 92, pp. 1636–1653, 2018.
- [18] Y. Guo *et al.*, "Roles of Cellular NSF Protein in Entry and Nuclear Egress of Budded Virions of *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus VIRUS-CELL INTERACTIONS crossm," vol. 91, pp. 1111–1128, 2017.
- [19] Z. Li and G. W. Blissard, "Cellular VPS4 Is Required for Efficient Entry and Egress of Budded Virions of *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus," *J. Virol.*, 2012.
- [20] M. M. van Oers, "Opportunities and challenges for the baculovirus expression system,"

- Journal of Invertebrate Pathology*. 2011.
- [21] D. L. Jarvis, "Chapter 14 Baculovirus-Insect Cell Expression Systems," *Methods in Enzymology*. 2009.
- [22] D. C. J. Carpentier and L. A. King, "The long road to understanding the baculovirus P10 protein," *Virology*, 2009.
- [23] A. Contreras-Gómez, A. Sánchez-Mirón, F. García-Camacho, E. Molina-Grima, and Y. Chisti, "Protein production using the baculovirus-insect cell expression system," *Biotechnol. Prog.*, 2014.
- [24] M. M. Van Oers, G. P. Pijlman, and J. M. Vlak, "Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: From dark horse to mainstream technology," *Journal of General Virology*. 2015.
- [25] T. A. Kost, J. P. Condreay, and D. L. Jarvis, "Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells," *Nature Biotechnology*. 2005.
- [26] M. D. Summers, "Milestones Leading to the Genetic Engineering of Baculoviruses as Expression Vector Systems and Viral Pesticides," *Advances in Virus Research*. 2006.
- [27] R. L. Harrison and D. L. Jarvis, "Protein N-Glycosylation in the Baculovirus-Insect Cell Expression System and Engineering of Insect Cells to Produce 'Mammalianized' Recombinant Glycoproteins," *Advances in Virus Research*. 2006.
- [28] D. L. Harrison, R. L. & Jarvis, "Transforming lepidopteran insect cells for improved protein processing. *Methods Mol Biol* 388, 341–356." 2007.
- [29] D. L. Jarvis, C. Weinkauff, and L. A. Guarino, "Immediate-early baculovirus vectors for foreign gene expression in transformed or infected insect cells," *Protein Expr. Purif.*, 1996.
- [30] J. J. Aumiller, H. Mabashi-Asazuma, A. Hillar, X. Shi, and D. L. Jarvis, "A new glycoengineered insect cell line with an inducibly mammalianized protein N-glycosylation pathway," *Glycobiology*, 2012.
- [31] S. Madhan, M. Prabakaran, and J. Kwang, "Baculovirus as Vaccine Vectors," 2010.
- [32] C. Tami, A. Peralta, R. Barbieri, A. Berinstein, E. Carrillo, and O. Taboga, "Immunological properties of FMDV-gP64 fusion proteins expressed on SF9 cell and baculovirus surfaces," *Vaccine*, 2004.
- [33] A. Peralta, P. Molinari, D. Conte-Grand, G. Calamante, and O. Taboga, "A chimeric baculovirus displaying bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D on its surface and their immunological properties," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007.
- [34] P. Molinari, M. I. Crespo, M. J. Gravisaco, O. Taboga, and G. Morón, "Baculovirus capsid display potentiates OVA cytotoxic and innate immune responses," *PLoS One*, 2011.
- [35] H. Huang *et al.*, "Construction and immunogenicity of a recombinant pseudotype baculovirus expressing the glycoprotein of rabies virus in mice," *Arch. Virol.*, 2011.
- [36] E. Tavarone, G. N. Molina, S. Amalfi, A. Peralta, P. Molinari, and O. Taboga, "The localization of a heterologous displayed antigen in the baculovirus-budded virion determines the type and strength of induced adaptive immune response," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017.
- [37] N.-D. van Loo, E. Fortunati, E. Ehlert, M. Rabelink, F. Grosveld, and B. J. Scholte, "Baculovirus Infection of Nondividing Mammalian Cells: Mechanisms of Entry and Nuclear Transport of Capsids," *J. Virol.*, 2001.
- [38] T. A. Kost and J. P. Condreay, "Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors," *Trends in Biotechnology*. 2002.
- [39] C. Y. Chen, C. Y. Lin, G. Y. Chen, and Y. C. Hu, "Baculovirus as a gene delivery vector: Recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications," *Biotechnology Advances*. 2011.
- [40] C. Kataoka *et al.*, "Baculovirus GP64-Mediated Entry into Mammalian Cells," *J. Virol.*, 2012.
- [41] H. Matilainen, J. Rinne, L. Gilbert, V. Marjomäki, H. Reunanen, and C. Oker-Blom, "Baculovirus Entry into Human Hepatoma Cells," *J. Virol.*, vol. 79, no. 24, pp. 15452–15459, 2005.
- [42] J. P. Laakkonen *et al.*, "Baculovirus-mediated immediate-early gene expression and nuclear reorganization in human cells," *Cell. Microbiol.*, 2008.

- [43] L. M. Lanier and L. E. Volkman, "Actin Binding and Nucleation by Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus," 1998.
- [44] M. Salminen *et al.*, "Improvement in Nuclear Entry and Transgene Expression of Baculoviruses by Disintegration of Microtubules in Human Hepatocytes," *J. Virol.*, vol. 79, no. 5, pp. 2720–2728, 2005.
- [45] R. Fujita, T. Matsuyama, J. Yamagishi, K. Sahara, S. Asano, and H. Bando, "Expression of Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus Genes in Mammalian Cells and Upregulation of the Host-Actin Gene," *J. Virol.*, vol. 80, no. 5, pp. 2390–2395, 2006.
- [46] C. Kenoutis *et al.*, "Baculovirus-Mediated Gene Delivery into Mammalian Cells Does Not Alter Their Transcriptional and Differentiating Potential but Is Accompanied by Early Viral Gene Expression," *J. Virol.*, 2006.
- [47] M. Kitajima, H. Hamazaki, N. Miyano-Kurosaki, and H. Takaku, "Characterization of baculovirus Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mammalian cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006.
- [48] R. Efrose, L. Swevers, and K. Iatrou, "Baculoviruses deficient in ie1 gene function abrogate viral gene expression in transduced mammalian cells," *Virology*, 2010.
- [49] C. Y. Y. Liu, C. H. Wang, J. C. Wang, and Y. C. Chao, "Stimulation of baculovirus transcriptome expression in mammalian cells by baculoviral transcriptional activators," *J. Gen. Virol.*, 2007.
- [50] S. Ghosh, M. K. Parvez, K. Banerjee, S. K. Sarin, and S. E. Hasnain, "Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: An emerging strategy," *Molecular Therapy*. 2002.
- [51] Y. C. Hu, "Baculovirus Vectors for Gene Therapy," *Advances in Virus Research*. 2006.
- [52] K. J. Airene *et al.*, "Baculovirus: An insect-derived vector for diverse gene transfer applications," *Molecular Therapy*. 2013.
- [53] S. Wang and G. Balasundaram, "Potential Cancer Gene Therapy by Baculoviral Transduction," 2010.
- [54] C. Yen-Yen Liu, H.-Z. Chen, and Y.-C. Chao, "Maximizing Baculovirus-Mediated Foreign Proteins Expression in Mammalian Cells," 2010.
- [55] Y. Shi, H. Inoue, J. C. Wu, and S. Yamanaka, "Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress," *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017.
- [56] K. Takahashi and S. Yamanaka, "A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016.
- [57] L. Shao and W.-S. Wu, "Gene-delivery systems for iPS cell generation," *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2010.
- [58] Y. Lei *et al.*, "Gene editing of human embryonic stem cells via an engineered baculoviral vector carrying zinc-finger nucleases," *Mol. Ther.*, 2011.
- [59] M. Mansouri and P. Berger, "Baculovirus for gene delivery to mammalian cells: Past, present and future," *Plasmid*. 2018.
- [60] J. Barsoum, R. Brown, M. McKee, and F. M. Boyce, "Efficient Transduction of Mammalian Cells by a Recombinant Baculovirus Having the Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein," *Hum. Gene Ther.*, 1997.
- [61] V. Sandig, C. Hofmann, S. Steinert, G. Jennings, P. Schlag, and M. Strauss, "Gene Transfer into Hepatocytes and Human Liver Tissue by Baculovirus Vectors," *Hum. Gene Ther.*, 1996.
- [62] H. Tani, M. Nishijima, H. Ushijima, T. Miyamura, and Y. Matsuura, "Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection," *Virology*, 2001.
- [63] H. Tani *et al.*, "In Vitro and In Vivo Gene Delivery by Recombinant Baculoviruses," *J. Virol.*, 2003.
- [64] M. U. Kaikkonen, J. K. Rätty, K. J. Airene, T. Wirth, T. Heikura, and S. Ylä-Herttuala, "Truncated vesicular stomatitis virus G protein improves baculovirus transduction efficiency in vitro and in vivo," *Gene Ther.*, 2006.
- [65] J. Zhou and G. W. Blissard, "Display of Heterologous Proteins on gp64null Baculovirus

- Virions and Enhanced Budding Mediated by a Vesicular Stomatitis Virus G-Stem Construct," *J. Virol.*, 2008.
- [66] J. T. Mangor, S. A. Monsma, M. C. Johnson, and G. W. Blissard, "A GP64-Null Baculovirus Pseudotyped with Vesicular Stomatitis Virus G Protein," *J. Virol.*, 2001.
- [67] L. Pieroni, D. Maione, and N. La Monica, "In Vivo Gene Transfer in Mouse Skeletal Muscle Mediated by Baculovirus Vectors," *Hum. Gene Ther.*, 2001.
- [68] M. Kitajima and H. Takaku, "Induction of antitumor acquired immunity by baculovirus Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mice," *Clin. Vaccine Immunol.*, 2008.
- [69] A. M. Gronowski, D. M. Hilbert, K. C. F. Sheehan, G. Garotta, † And, and R. D. Schreiber, "Baculovirus Stimulates Antiviral Effects in Mammalian Cells," 1999.
- [70] T. Abe, H. Takahashi, H. Hamazaki, N. Miyano-Kurosaki, Y. Matsuura, and H. Takaku, "Baculovirus Induces an Innate Immune Response and Confers Protection from Lethal Influenza Virus Infection in Mice," *J. Immunol.*, 2003.
- [71] P. Molinari, S. García-Nuñez, M. J. Gravisaco, E. Carrillo, A. Berinstein, and O. Taboga, "Baculovirus treatment fully protects mice against a lethal challenge of FMDV," *Antiviral Res.*, 2010.
- [72] M. Niu, Y. Han, and W. Li, "Baculovirus up-regulates antiviral systems and induces protection against infectious bronchitis virus challenge in neonatal chicken," *Int. Immunopharmacol.*, 2008.
- [73] S. Uematsu and S. Akira, "Pathogen recognition by innate immunity," *Skin Research*. 2008.
- [74] M. Yoneyama and T. Fujita, "RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors," *Immunological Reviews*. 2009.
- [75] Y. Lei *et al.*, "MAVS-Mediated Apoptosis and Its Inhibition by Viral Proteins," *PLoS One*, 2009.
- [76] J.-M. Zhang and J. An, "Cytokines, Inflammation, and Pain," *Int. Anesthesiol. Clin.*, 2007.
- [77] C. A. Dinarello, "Historical insights into cytokines," *European Journal of Immunology*. 2007.
- [78] M. D. Turner, B. Nedjai, T. Hurst, and D. J. Pennington, "Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2014.
- [79] J. J. O'Shea, A. Ma, and P. Lipsky, "Cytokines and autoimmunity," *Nature Reviews Immunology*. 2002.
- [80] D. Brenner, H. Blaser, and T. W. Mak, "Regulation of tumour necrosis factor signalling: Live or let die," *Nature Reviews Immunology*. 2015.
- [81] M. Akdis *et al.*, "Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011.
- [82] J. E. Sims and D. E. Smith, "The IL-1 family: Regulators of immunity," *Nature Reviews Immunology*. 2010.
- [83] D. Novick, S. Kim, G. Kaplanski, and C. A. Dinarello, "Interleukin-18, more than a Th1 cytokine," *Seminars in Immunology*. 2013.
- [84] C. A. Dinarello, "Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases," *Blood*, 2011.
- [85] C. Garlanda, C. A. Dinarello, and A. Mantovani, "The Interleukin-1 Family: Back to the Future," *Immunity*. 2013.
- [86] J. W. Griffith, C. L. Sokol, and A. D. Luster, "Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity," *Annu. Rev. Immunol.*, 2014.
- [87] V. L. Ferreira, H. H. L. Borba, A. D. F. Bonetti, L. P. Leonart, and R. Pontarolo, "Provisional chapter Cytokines and Interferons: Types and Functions," 2016.
- [88] L. C. Plataniias, "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling," *Nature Reviews Immunology*. 2005.
- [89] J. Shao *et al.*, "Type I Interferons: Distinct Biological Activities and Current Applications for Viral Infection," *Cell. Physiol. Biochem.*, 2018.

- [90] A. Boasso, "Type I Interferon at the Interface of Antiviral Immunity and Immune Regulation: The Curious Case of HIV-1," *Scientifica (Cairo)*, 2013.
- [91] D. B. Stetson and R. Medzhitov, "Type I Interferons in Host Defense," *Immunity*. 2006.
- [92] A. Majoros, E. Platanitis, E. Kernbauer-Hölzl, F. Rosebrock, M. Müller, and T. Decker, "Canonical and non-canonical aspects of JAK-STAT signaling: Lessons from interferons for cytokine responses," *Frontiers in Immunology*. 2017.
- [93] T. Abe *et al.*, "Baculovirus Induces Type I Interferon Production through Toll-Like Receptor-Dependent and -Independent Pathways in a Cell-Type-Specific Manner," *J. Virol.*, 2009.
- [94] S. Hervas-Stubbs, P. Rueda, L. Lopez, and C. Leclerc, "Insect Baculoviruses Strongly Potentiate Adaptive Immune Responses by Inducing Type I IFN," *J. Immunol.*, 2007.
- [95] N. B. Beck, J. S. Sidhu, and C. J. Omiecinski, "Baculovirus vectors repress phenobarbital-mediated gene induction and stimulate cytokine expression in primary cultures of rat hepatocytes," *Gene Ther.*, 2000.
- [96] K. Schroder, "Interferon- : an overview of signals, mechanisms and functions," *J. Leukoc. Biol.*, 2003.
- [97] S. Hervas-Stubbs *et al.*, "Conventional but Not Plasmacytoid Dendritic Cells Foster the Systemic Virus-Induced Type I IFN Response Needed for Efficient CD8 T Cell Priming," *J. Immunol.*, 2014.
- [98] M. Syedbasha and A. Egli, "Interferon Lambda: Modulating immunity in infectious diseases," *Frontiers in Immunology*. 2017.
- [99] A. Lasfar *et al.*, "Characterization of the mouse IFN- λ ligand-receptor system: IFN- λ s exhibit antitumor activity against B16 melanoma," *Cancer Res.*, 2006.
- [100] M. Mordstein *et al.*, "Lambda Interferon Renders Epithelial Cells of the Respiratory and Gastrointestinal Tracts Resistant to Viral Infections," *J. Virol.*, 2010.
- [101] Z. Zhou, O. J. Hamming, N. Ank, S. R. Paludan, A. L. Nielsen, and R. Hartmann, "Type III Interferon (IFN) Induces a Type I IFN-Like Response in a Restricted Subset of Cells through Signaling Pathways Involving both the Jak-STAT Pathway and the Mitogen-Activated Protein Kinases," *J. Virol.*, 2007.
- [102] C. Sommereyns, S. Paul, P. Staeheli, and T. Michiels, "IFN-lambda (IFN- λ) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo," *PLoS Pathog.*, 2008.
- [103] T. Okabayashi *et al.*, "Type-III interferon, not type-I, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells," *Virus Res.*, 2011.
- [104] J. Pott *et al.*, "IFN- determines the intestinal epithelial antiviral host defense," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011.
- [105] N. A. Jewell *et al.*, "Lambda Interferon Is the Predominant Interferon Induced by Influenza A Virus Infection In Vivo," *J. Virol.*, 2010.
- [106] K. Onoguchi *et al.*, "Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism," *J. Biol. Chem.*, 2007.
- [107] M. Okamoto, H. Oshiumi, M. Azuma, N. Kato, M. Matsumoto, and T. Seya, "IPS-1 Is Essential for Type III IFN Production by Hepatocytes and Dendritic Cells in Response to Hepatitis C Virus Infection," *J. Immunol.*, 2014.
- [108] C. Odendall *et al.*, "Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes," *Nat. Immunol.*, 2014.
- [109] D. Thanos and T. Maniatis, "Virus induction of human IFN β gene expression requires the assembly of an enhanceosome," *Cell*, 1995.
- [110] O. Takeuchi and S. Akira, "Innate immunity to virus infection," *Immunological Reviews*. 2009.
- [111] R. Siegel, J. Eskdale, and G. Gallagher, "Regulation of IFN- 1 Promoter Activity (IFN- 1/IL-29) in Human Airway Epithelial Cells," *J. Immunol.*, 2011.
- [112] I. F. Ueki *et al.*, "Respiratory virus-induced EGFR activation suppresses IRF1-dependent interferon λ and antiviral defense in airway epithelium," *J. Exp. Med.*, 2013.
- [113] J. Melchjorsen, J. Sirén, I. Julkunen, S. R. Paludan, and S. Matikainen, "Induction of cytokine expression by herpes simplex virus in human monocyte-derived macrophages and dendritic

- cells is dependent on virus replication and is counteracted by ICP27 targeting NF- κ B and IRF-3," *J. Gen. Virol.*, 2006.
- [114] J. Li *et al.*, "Interferon lambda inhibits herpes simplex virus type I infection of human astrocytes and neurons," *Glia*, 2011.
- [115] H. Sui, M. Zhou, Q. Chen, H. C. Lane, and T. Imamichi, "SiRNA enhances DNA-mediated interferon lambda-1 response through crosstalk between RIG-I and IFI16 signalling pathway," *Nucleic Acids Res.*, 2014.
- [116] M. Carty, R. Goodbody, M. Schröder, J. Stack, P. N. Moynagh, and A. G. Bowie, "The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling," *Nat. Immunol.*, 2006.
- [117] L. A. J. O'Neill and A. G. Bowie, "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling," *Nature Reviews Immunology*. 2007.
- [118] G. M. Barton and J. C. Kagan, "A cell biological view of toll-like receptor function: Regulation through compartmentalization," *Nature Reviews Immunology*. 2009.
- [119] S. N. Lester and K. Li, "Toll-like receptors in antiviral innate immunity," *Journal of Molecular Biology*. 2014.
- [120] S. T. Pedraza, J. G. Betancur, and S. Urcuqui-Inchima, "Viral recognition by the innate immune system: The role of pattern recognition receptors," *Colomb. Med.*, 2010.
- [121] T. Abe *et al.*, "Involvement of the Toll-Like Receptor 9 Signaling Pathway in the Induction of Innate Immunity by Baculovirus \dagger ," *J. Virol.*, vol. 79, no. 5, pp. 2847–2858, 2005.
- [122] Jiayi Wu and Zhijian J. Chen, "Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids." 2014.
- [123] Q. Feng *et al.*, "MDA5 Detects the Double-Stranded RNA Replicative Form in Picornavirus-Infected Cells," *Cell Rep.*, 2012.
- [124] H. Kato *et al.*, "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response," *Immunity*, 2005.
- [125] H. Kato *et al.*, "Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5," *J. Exp. Med.*, 2008.
- [126] J. W. Schoggins *et al.*, "A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response," *Nature*, 2011.
- [127] Y.-M. Loo *et al.*, "Distinct RIG-I and MDA5 Signaling by RNA Viruses in Innate Immunity," *J. Virol.*, 2008.
- [128] M. Yoneyama *et al.*, "Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity," *J. Immunol.*, 2005.
- [129] L. Gitlin *et al.*, "Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006.
- [130] H. Kato *et al.*, "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses," *Nature*, 2006.
- [131] A. Schmidt *et al.*, "5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2009.
- [132] M. Binder *et al.*, "Molecular mechanism of signal perception and integration by the innate immune sensor retinoic acid-inducible gene-i (RIG-I)," *J. Biol. Chem.*, 2011.
- [133] K. Malathi, T. Saito, N. Crochet, D. J. Barton, M. Gale, and R. H. Silverman, "RNase L releases a small RNA from HCV RNA that refolds into a potent PAMP," *RNA*, 2010.
- [134] I. C. Berke and Y. Modis, "MDA5 cooperatively forms dimers and ATP-sensitive filaments upon binding double-stranded RNA," *EMBO J.*, 2012.
- [135] A. Pichlmair *et al.*, "Activation of MDA5 Requires Higher-Order RNA Structures Generated during Virus Infection," *J. Virol.*, 2009.
- [136] K. Triantafyllou, E. Vakakis, S. Kar, E. Richer, G. L. Evans, and M. Triantafyllou, "Visualisation of direct interaction of MDA5 and the dsRNA replicative intermediate form of positive strand RNA viruses," *J. Cell Sci.*, 2012.

- [137] E. Dixit *et al.*, "Peroxisomes Are Signaling Platforms for Antiviral Innate Immunity," *Cell*, 2010.
- [138] Z. Abdullah *et al.*, "RIG-I detects infection with live *Listeria* by sensing secreted bacterial nucleic acids," *EMBO J.*, 2012.
- [139] H. Poeck *et al.*, "Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1B production," *Nat. Immunol.*, 2010.
- [140] C. Ono *et al.*, "Innate Immune Response Induced by Baculovirus Attenuates Transgene Expression in Mammalian Cells," *J. Virol.*, 2014.
- [141] D. L. Burdette *et al.*, "STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP," *Nature*, 2011.
- [142] D. Gao *et al.*, "Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses," *Science (80-.)*, 2013.
- [143] K. Mukai *et al.*, "Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi," *Nat. Commun.*, 2016.
- [144] M. M. Hu *et al.*, "Sumoylation Promotes the Stability of the DNA Sensor cGAS and the Adaptor STING to Regulate the Kinetics of Response to DNA Virus," *Immunity*, 2016.
- [145] C. Chiang and M. U. Gack, "Post-translational Control of Intracellular Pathogen Sensing Pathways," *Trends in Immunology*. 2017.
- [146] H. Ishikawa, Z. Ma, and G. N. Barber, "STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity," *Nature*, 2009.
- [147] Y. Tanaka and Z. J. Chen, "STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway," *Sci. Signal.*, 2012.
- [148] T. Saitoh *et al.*, "Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2009.
- [149] N. Dobbs, N. Burnaevskiy, D. Chen, V. K. Gonugunta, N. M. Alto, and N. Yan, "STING activation by translocation from the ER is associated with infection and autoinflammatory disease," *Cell Host Microbe*, 2015.
- [150] T. Abe and G. N. Barber, "Cytosolic-DNA-Mediated, STING-Dependent Proinflammatory Gene Induction Necessitates Canonical NF- κ B Activation through TBK1," *J. Virol.*, 2014.
- [151] H. Konno, K. Konno, and G. N. Barber, "XCyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling," *Cell*, 2013.
- [152] L. Unterholzner *et al.*, "IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA," *Nat. Immunol.*, 2010.
- [153] S. Sharma *et al.*, "Innate Immune Recognition of an AT-Rich Stem-Loop DNA Motif in the *Plasmodium falciparum* Genome," *Immunity*, 2011.
- [154] T. Abe *et al.*, "STING Recognition of Cytoplasmic DNA Instigates Cellular Defense," *Mol. Cell*, 2013.
- [155] C. K. Holm *et al.*, "Influenza A virus targets a cGAS-independent STING pathway that controls enveloped RNA viruses," *Nat. Commun.*, 2016.
- [156] C. K. Holm *et al.*, "Virus-cell fusion as a trigger of innate immunity dependent on the adaptor STING," *Nat. Immunol.*, 2012.
- [157] T. Deschamps and M. Kalamvoki, "Evasion of the STING DNA-Sensing Pathway by VP11/12 of Herpes Simplex Virus 1," 2017.
- [158] M. Takahama *et al.*, "The RAB2B-GARIL5 Complex Promotes Cytosolic DNA-Induced Innate Immune Responses," *Cell Rep.*, 2017.
- [159] L. Sun, J. Wu, F. Du, X. Chen, and Z. J. Chen, "Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway," *Science (80-.)*, 2013.
- [160] X. D. Li, J. Wu, D. Gao, H. Wang, L. Sun, and Z. J. Chen, "Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects," *Science (80-.)*, 2013.
- [161] P. Gao *et al.*, "Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase," *Cell*, 2013.
- [162] A. Ablasser *et al.*, "cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that

- activates STING," *Nature*, 2013.
- [163] E. J. Diner *et al.*, "The Innate Immune DNA Sensor cGAS Produces a Noncanonical Cyclic Dinucleotide that Activates Human STING," *Cell Rep.*, 2013.
- [164] J. Wu *et al.*, "Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA," *Science (80-.)*, 2013.
- [165] A. M. Herzner *et al.*, "Sequence-specific activation of the DNA sensor cGAS by Y-form DNA structures as found in primary HIV-1 cDNA," *Nat. Immunol.*, 2015.
- [166] M. Du and Z. J. Chen, "DNA-induced liquid phase condensation of cGAS activates innate immune signaling," *Science (80-.)*, 2018.
- [167] F. Civril *et al.*, "Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS," *Nature*, 2013.
- [168] X. Li *et al.*, "Cyclic GMP-AMP Synthase Is Activated by Double-Stranded DNA-Induced Oligomerization," *Immunity*, 2013.
- [169] X. Zhang *et al.*, "The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop," *Cell Rep.*, 2014.
- [170] A. Ablasser *et al.*, "Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP," *Nature*, 2013.
- [171] F. Ma *et al.*, "Positive Feedback Regulation of Type I IFN Production by the IFN-Inducible DNA Sensor cGAS," *J. Immunol.*, 2015.
- [172] Q. Liang *et al.*, "Crosstalk between the cGAS DNA sensor and beclin-1 autophagy protein shapes innate antimicrobial immune responses," *Cell Host Microbe*, 2014.
- [173] G. J. Seo *et al.*, "Akt Kinase-Mediated Checkpoint of cGAS DNA Sensing Pathway," *Cell Rep.*, 2015.
- [174] A. Ablasser, F. Bauernfeind, G. Hartmann, E. Latz, K. A. Fitzgerald, and V. Hornung, "RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate," *Nat. Immunol.*, 2009.
- [175] Y. H. Chiu, J. B. MacMillan, and Z. J. Chen, "RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway," *Cell*, 2009.
- [176] P. E. Merkl, M. H. Orzalli, and D. M. Knipe, "Mechanisms of Host IFI16, PML, and Daxx Protein Restriction of Herpes Simplex Virus 1 Replication," *J. Virol.*, 2018.
- [177] A. Takaoka *et al.*, "DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response," *Nature*, 2007.
- [178] M. A. Ansari *et al.*, "Herpesvirus Genome Recognition Induced Acetylation of Nuclear IFI16 Is Essential for Its Cytoplasmic Translocation, Inflammasome and IFN- β Responses," *PLoS Pathog.*, 2015.
- [179] T. Li, B. A. Diner, J. Chen, and I. M. Cristea, "Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012.
- [180] G. R. Gariano *et al.*, "The intracellular DNA sensor IFI16 gene acts as restriction factor for human Cytomegalovirus replication," *PLoS Pathog.*, 2012.
- [181] K. M. Monroe *et al.*, "IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV," *Science (80-.)*, 2014.
- [182] N. Kerur *et al.*, "IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection," *Cell Host Microbe*, 2011.
- [183] M. R. Jakobsen *et al.*, "PNAS Plus: From the Cover: IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013.
- [184] Z. Zhang, B. Yuan, M. Bao, N. Lu, T. Kim, and Y. J. Liu, "The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells," *Nat. Immunol.*, 2011.
- [185] S. C. Stein and E. Falck-Pedersen, "Sensing Adenovirus Infection: Activation of Interferon Regulatory Factor 3 in RAW 264.7 Cells," *J. Virol.*, 2012.
- [186] K. Parvatiyar *et al.*, "The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response," *Nat. Immunol.*, 2012.
- [187] X. Zhang *et al.*, "Cutting Edge: Ku70 Is a Novel Cytosolic DNA Sensor That Induces Type III

- Rather Than Type I IFN," *J. Immunol.*, 2011.
- [188] H. Sui *et al.*, "STING is an essential mediator of the Ku70-mediated production of IFN- γ 1 in response to exogenous DNA," *Sci. Signal.*, 2017.
- [189] B. J. Ferguson, D. S. Mansur, N. E. Peters, H. Ren, and G. L. Smith, "DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity," *Elife*, 2012.
- [190] J. Wang *et al.*, "Ku70 Senses HTLV-1 DNA and Modulates HTLV-1 Replication," *J. Immunol.*, 2017.
- [191] Y. Li *et al.*, "Cytoplasm-translocated Ku70/80 complex sensing of HBV DNA induces hepatitis-associated chemokine secretion," *Front. Immunol.*, 2016.
- [192] M. M. Van Oers and J. M. Vlak, "Baculovirus Genomics," *Curr. Drug Targets*, vol. 8, 2007.
- [193] Y. Zhang *et al.*, "The DNA Sensor, Cyclic GMP-AMP Synthase, Is Essential for Induction of IFN- β during *Chlamydia trachomatis* Infection," *J. Immunol.*, 2014.
- [194] F. Jiang and J. A. Doudna, "CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms."
- [195] M. del Sol Keyer, J. Wittbrodt, J. L. Mateo, T. Thumberger, and M. Stemmer, "CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool," *PLoS One*, 2015.
- [196] S. Xu *et al.*, "cGAS-Mediated Innate Immunity Spreads Intercellularly through HIV-1 Env-Induced Membrane Fusion Sites," *Cell Host Microbe*, 2016.
- [197] T. A. Kost and J. P. Condreay, "Innovations—Biotechnology: Baculovirus Vectors as Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells: Biosafety Considerations," *Appl. Biosaf.*, 2016.
- [198] L. F. Carbonell, M. J. Klowden, and L. K. Miller, "Baculovirus-Mediated Expression of Bacterial Genes in Dipteran and Mammalian Cells," 1985.
- [199] M. Kool, J. W. Voncken, F. L. J. Van Lier, J. Tramper, and J. M. Vlak, "Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties," *Virology*, 1991.
- [200] J.-C. Hsiao *et al.*, "Intracellular Transport of Vaccinia Virus in HeLa Cells Requires WASH-VPEF/FAM21-Retromer Complexes and Recycling Molecules Rab11 and Rab22," *J. Virol.*, 2015.
- [201] R. K. Meyer, M. M. Burger, R. Tscharner, and R. Scitfer, "Archives of Virology Actin Filament Bundles in Vaccinia Virus Infected Fibroblasts," 1981.
- [202] S. P. Kukkonen *et al.*, "Baculovirus capsid display: A novel tool for transduction imaging," *Mol. Ther.*, 2003.
- [203] W. C. Merrick, "Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems," *Gene*. 2004.
- [204] H. P. Lee *et al.*, "Baculovirus transduction of chondrocytes elicits interferon- α / β and suppresses transgene expression," *J. Gene Med.*, 2009.
- [205] P. M. Lieberman, "Chromatin organization and virus gene expression," *Journal of Cellular Physiology*. 2008.
- [206] Robert M, "Antiviral Activity of Interferons," American Society for Microbiology, 1977.
- [207] R. K. Maheshwari, G. S. Sidhu, D. Bhartiya, and R. M. Friedman, "Primary amines enhance the antiviral activity of interferon against a membrane virus: Role of intracellular pH," *J. Gen. Virol.*, 1991.
- [208] G. A. Nedelec B, Shen YJ, "The effect of interferon alpha 2b on the expression of cytoskeletal proteins in an in vitro model of wound contraction. *J Lab Clin Med* 1995; 126: 474-484." 1995.
- [209] G. Duménil *et al.*, "Interferon Inhibits a Src-mediated Pathway Necessary for Shigella-induced Cytoskeletal Rearrangements in Epithelial Cells," 1998.
- [210] O. Bell, V. K. Tiwari, N. H. Thomä, and D. Schübeler, "Determinants and dynamics of genome accessibility," *Nature Reviews Genetics*. 2011.
- [211] S. T. Smale, "Selective Transcription in Response to an Inflammatory Stimulus," *Cell*. 2010.
- [212] Y. Zhu, Y. Qi, Z. Liu, and G. Xiao, "Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells," *Sci. China, Ser. C Life Sci.*, 1998.
- [213] T.-G. Kim, S.-K. Yoon, H.-K. Lee, S.-Y. Paik, and S.-W. Park, "Hepatocyte-Specific Gene

- Expression by Baculovirus Pseudotyped with Vesicular Stomatitis Virus Envelope Glycoprotein," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002.
- [214] V. G. Edy *et al.*, "Human Interferon: Mass Production in a Newly Established Cell Line, MG-63," *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012.
- [215] H. Dansako *et al.*, "The cyclic GMP-AMP synthetase-STING signaling pathway is required for both the innate immune response against HBV and the suppression of HBV assembly," *FEBS J.*, 2016.
- [216] J. Taylor-Papadimitriou, M. G. P. Stoker, and P. Riddle, "Further manifestations of abortive transformation of bhk 21 cells by polyoma virus," *Int. J. Cancer*, 1971.
- [217] S. Atasheva, I. Frolov, M. Akhrymuk, E. I. Frolova, and I. Akhrymuk, "Early Events in Alphavirus Replication Determine the Outcome of Infection," *J. Virol.*, 2012.
- [218] H. P. Lee *et al.*, "Baculovirus transduction of chondrocytes elicits interferon- α/β and suppresses transgene expression," *J. Gene Med.*, vol. 11, no. 4, pp. 302–312, 2009.
- [219] E. J. Haas-Stapleton, J. O. Washburn, and L. E. Volkman, "P74 Mediates Specific Binding of Autographa californica M Nucleopolyhedrovirus Occlusion-Derived Virus to Primary Cellular Targets in the Midgut Epithelia of Heliothis virescens Larvae," *J. Virol.*, 2004.
- [220] E. Sid, L. E. Volkman, T. Ohkawa, R. Sitapara, and J. O. Washburn, "Specific Binding of Autographa californica M Nucleopolyhedrovirus Occlusion-Derived Virus to Midgut Cells of Heliothis virescens Larvae Is Mediated by Products of pif Genes Ac119 and Ac022 but Not by Ac115," *J. Virol.*, 2005.
- [221] A. R. Mäkelä, J. E. Tuusa, L. E. Volkman, and C. Oker-Blom, "Occlusion-derived baculovirus: Interaction with human cells and evaluation of the envelope protein P74 as a surface display platform," *J. Biotechnol.*, 2008.
- [222] G. N. Molina, E. Tavarone, O. Taboga, and P. Molinari, "Two distinctive phenotypes of AcMNPV display different immune abilities and intracellular destiny," *PLoS One*, 2016.
- [223] Á. Vázquez-Calvo, J. C. Saiz, K. C. McCullough, F. Sobrino, and M. A. Martín-Acebes, "Acid-dependent viral entry," *Virus Research*. 2012.
- [224] E. A. Hemann, M. Gale, and R. Savan, "Interferon lambda genetics and biology in regulation of viral control," *Front. Immunol.*, 2017.
- [225] P. I. Osterlund, T. E. Pietila, V. Veckman, S. V. Kotenko, and I. Julkunen, "IFN Regulatory Factor Family Members Differentially Regulate the Expression of Type III IFN (IFN- λ) Genes," *J. Immunol.*, 2007.
- [226] S. J. P. Thomson *et al.*, "The role of transposable elements in the regulation of IFN- λ 1 gene expression," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2009.
- [227] M. Takahama *et al.*, "The RAB2B-GARIL5 Complex Promotes Cytosolic DNA-Induced Innate Immune Responses," *Cell Rep.*, 2017.
- [228] S. R. Paludan, "Activation and Regulation of DNA-Driven Immune Responses," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2015.
- [229] G. Dunphy *et al.*, "Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF- κ B Signaling after Nuclear DNA Damage," *Mol. Cell*, 2018.
- [230] Y. Liu, K. Il Joo, Y. Lei, and P. Wang, "Visualization of intracellular pathways of engineered baculovirus in mammalian cells," *Virus Res.*, 2014.
- [231] D. Liu *et al.*, "STING directly activates autophagy to tune the innate immune response," *Cell Death and Differentiation*, 2018.
- [232] C. S. Lee *et al.*, "Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine," *Genes and Diseases*. 2017.
- [233] A. C. Stabell *et al.*, "Dengue viruses cleave STING in humans but not in nonhuman primates, their presumed natural reservoir," *Elife*, 2018.
- [234] H. You, J. Huang, Y. Li, C. Zheng, S. Chen, and C. Su, "Herpes Simplex Virus 1 Tegument Protein VP22 Abrogates cGAS/STING-Mediated Antiviral Innate Immunity," *J. Virol.*, 2018.
- [235] D. P. Dittmer *et al.*, "Modulation of the cGAS-STING DNA sensing pathway by gammaherpesviruses," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2015.

- [236] U. J. Buchholz, S. Finke, and K.-K. Conzelmann, "Generation of Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 Is Not Essential for Virus Replication in Tissue Culture, and the Human RSV Leader Region Acts as a Functional BRSV Genome Promoter," 1999.
- [237] J. Jozefczuk, K. Drews, and J. Adjaye, "Preparation of Mouse Embryonic Fibroblast Cells Suitable for Culturing Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells," *J. Vis. Exp.*, 2012.
- [238] T. R. Fuerst, E. G. Nilis, F. W. Studier, and B. Moss, "Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986.
- [239] M. Gentili *et al.*, "Transmission of innate immune signaling by packaging of cGAMP in viral particles," *Science (80-.)*, 2015.
- [240] J. Wang *et al.*, "Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting," *Cell Res.*, 2013.
- [241] K. A. Glass *et al.*, "RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors," *Nat. Methods*, 2013.
- [242] D. Hanahan, J. Jessee, and F. R. Bloom, "[4] PLASMID TRANSFORMATION 63 [4] Plasmid Transformation of Escherichia coli and Other Bacteria," 1991.
- [243] H. C. Birnboim+ and J. Doly, "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA," 1979.
- [244] M. A. Whitt and J. S. Manning, "A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body," *Virology*, 1988.
- [245] L. J. Reed and H. Muench, "A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS I ' 2," 1938.
- [246] J. M. Ruijter *et al.*, "Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data," *Nucleic Acids Res.*, 2009.
- [247] A. Doi, K. Iijima, S. Kano, and Y. Ishizaka, "Viral protein R of HIV type-1 induces retrotransposition and upregulates glutamate synthesis by the signal transducer and activator of transcription 1 signaling pathway," *Microbiol. Immunol.*, 2015.