



Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

**Desarrollo de un nuevo sistema de transferencia
génica basado en un gammaretrovirus humano**


M.C. Daniel Cervantes García

Como requisito final para obtener el grado de Doctor en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Mayo 2011

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y el Departamento de Inmunología, División de Enfermedades Infecciosas de la Escuela de Medicina de la Universidad de California, Irvine, bajo la dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez y la Co-Dirección del Dr. David Camerini, Dra. Rocío Ortiz López, Dr. Roberto Montes de Oca Luna y la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez.

Vo.Bo.



DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ

Director de Tesis

**"Desarrollo de un nuevo sistema de transferencia génica basado
en un gammaretrovirus humano"**

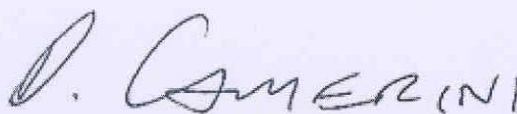
Aprobación de la Tesis:



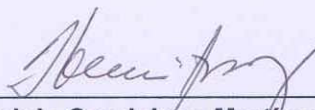
Dr. Augusto Rojas Martínez
Director de Tesis



Dr. C. Rocío Ortiz López
Co-director



Dr. David Camerini
Co-director



Dr. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Miembro de la Comisión



Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna
Miembro de la Comisión



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

Agradecimientos

Al Dr. Augusto Rojas Martínez por todos los años de dedicación, trabajo y superación...

To Dr. David Pamerini for share all knowledge, training, support and assistance as a good friend...

A mi comité de tesis Dra. Rocío Ortiz, Dra. Herminia Martínez y Dr. Roberto Montes de Oca...

To my friends in Irvine, Alvaro Garviz and Hugh Fisher...

A mis compañeros de laboratorio Gissela, Ali, Adelina, Sergio...

A mi familia por su apoyo y empuje para poder realizarme como profesional...

¡A todos ustedes... Muchas gracias!

Índice

	Página
Resumen	i
Lista de Figuras	ii
Abreviaturas	v
Capítulo I: Introducción	1
1.1. Biología de los Retrovirus	1
1.1.1. Organización del Genoma Retrovial	3
1.1.1.1. Genes Estructurales	5
1.1.1.2. Regiones de Acción en <i>cis</i>	6
A) R	6
B) U5	7
C) PBS	7
D) Tracto de polipurina	7
E) U3	7
1.1.2. Ciclo de vida retroviral	8
1.2. Vectores retrovirales	10
1.2.1. Diseño de vectores retrovirales	13
1.2.2. Pseudotipado de vectores retrovirales	14
1.3. Retrovirus y cáncer	15

1.3.1. Virus Xenotrópico parecido a los Virus de la Leucemia Murina, XMRV	16
1.3.2. El XMRV como vector de transducción	21
Capítulo II: Justificación	22
Capítulo III: Objetivos	23
3.1. Objetivo General	23
3.2. Objetivos específicos	23
Capítulo IV: Materiales y Métodos	24
4.1. Material Biológico	24
4.1.1. Líneas Celulares	24
4.1.2. Plásmidos	25
4.2. Materiales y Reactivos	26
4.3. Estrategia General	29
4.4. Determinación de la actividad promotora de U3	30
4.5. Generación de un vector retroviral derivado del XMRV	31
4.6. Determinación de la longitud mínima de señal de encapsidación	36
4.7. Genoma de vectores retrovirales bicistrónicos	37
4.8. Plásmidos de empaquetamiento	40
4.9. Establecimiento de línea productora de proteínas de la envoltura de XMRV	42
4.10. Establecimiento de una línea celular para la expresión de las proteínas gag-pol de XMRV	43
4.11. Generación de vectores retrovirales derivados del XMRV	44
4.12. Infección mediada por centrifugación	44

4.13.Citometría de flujo	45
4.14.Cuantificación de transcriptasa reversa	46
4.15.Western blot para la identificación de proteínas gag y env del XMRV	46
Capítulo V: Resultados	48
Capítulo VI: Discusión	67
Capítulo VII: Conclusiones	72
Capítulo VIII: Bibliografía	73

Desarrollo de un nuevo sistema de transferencia génica basado en un gammaretrovirus humano

RESUMEN

Los vectores retrovirales son ampliamente usados como herramientas de transducción en procedimiento estándar de investigación en Biología Molecular y más recientemente como vehículos de genes terapéuticos en terapia génica. La estructura genética de los retrovirus permite la separación de las regiones *cis*-reguladoras flanqueando un transgen y de los genes estructurales en plásmido de expresión en *trans* de manera que se puedan generar virus recombinantes que por ser deficientes de replicación únicamente cumplen con un solo ciclo de replicación. El XMRV es un gammaretrovirus descrito en el 2006 y se ha asociado a cáncer de próstata y al síndrome de la fatiga crónica, aunque reportes recientes ponen en duda su papel patológico. Estructuralmente, el XMRV tiene la misma configuración genética (LTR5-gag-pol-env-LTR3) que los retrovirus murinos empleados en ensayos de terapia génica. Inicialmente se determinó si las regiones *cis* eran funcionales, para lo cual se construyeron plásmidos de expresión en los cuales el promotor U3 y el potenciador U5 se encontraban dirigiendo la expresión de luciferasa. El resultado de la transfección y determinación de actividad de luciferasa en líneas celulares demostró que el promotor U3 puede alcanzar el mismo potencial que el promotor SV40, dependiendo de la línea celular. Se construyeron plásmidos vectores derivados del XMRV y plásmidos de empaquetamiento (gag-pol y env) a partir de DNA genómico de la línea celular 22Rv1 y de la clona VP-62 XMRV. Se demostró la presencia de actividad de RT por ELISA, de la proteína p30 (CA) del gen *gag* mediante Western blot, la expresión del gen *env* mediante QPCR y la presencia de la subunidad SU mediante citometría de flujo y Western blot de la proteína gp70. En el ensayo de transducción con los vectores XM se observó que la región mínima de empaquetamiento, es decir, la que no contiene una región de gag, era suficiente para dirigir los genomas de los vectores XM para ser empaquetados en la línea celular. Con el objetivo de mejorar la eficiencia de transducción se generó el vector XM-CMV-Luc-PPT, el cual demostró mejorar los niveles de expresión del transgen (Luc) y por lo tanto, de incrementar la eficiencia de transducción en una línea celular derivada de cáncer de próstata. Con lo anterior, este trabajo propone al vector XM como una nueva herramienta en procedimientos de transducción estable y con futuras aplicaciones en protocolos de terapia génica.

Dr. Augusto Rojas Martínez

Director de Tesis

Figuras

	Página
Figura 1. Estructura básica de un genoma retroviral.	5
Figura 2. Ciclo de vida de un retrovirus.	9
Figura 3. Sistemas de transducción retroviral.	14
Figura 4. Mapas de los plásmidos empleados para la generación de vectores retrovirales y de empaquetamiento.	26
Figura 5. Estrategia general.	29
Figura 6. Plásmidos de expresión para la evaluación de la actividad promotora de los elementos U3 y U5 de las LTRs del XMRV.	31
Figura 7. Plásmido con LTR 5', señal de empaquetamiento y un segmento de gag del XMRV.	32
Figura 8. Estrategia SOE-PCR para mutar el ATG→GTG de la región gag en el plásmido pCR2.1 U3RU5.	33
Figura 9. Plásmido pBS-U3RU5 para la generación de un esqueleto retroviral.	34
Figura 10. Esqueletos de genomas retrovirales derivados del XMRV.	35
Figura 11. Esqueletos de genomas retrovirales derivados del XMRV. En el vector XM-gag-GFP la expresión es dirigida por el promotor U3.	36
Figura 12. Esqueletos retrovirales con deleciones en la región gag (mutada).	37

Figura 13.	Estrategia para la generación de un bicistrón fusionado por la secuencia F2A.	39
Figura 14.	Plásmidos de empaquetamiento para la expresión de los genes estructurales gag-pol y env.	41
Figura 15.	PCR para amplificar la LTR5 de XMRV.	48
Figura 16.	PCR para amplificar la LTR3 de XMRV.	49
Figura 17.	Caracterización pGL-LTR5 por digestión con <i>EcoRI</i> .	50
Figura 18.	Caracterización pGL3-LTR3 por digestión con <i>EcoRI</i> y <i>XmaI</i> .	50
Figura 19.	Determinación de la potencia del promotor U3 de XMRV por medición de actividad de luciferasa.	52
Figura 20.	Actividad relativa del promotor U3 de XMRV.	53
Figura 21.	Esqueletos genómicos de vectores retrovirales derivados del XMRV.	54
Figura 22.	Plásmido de expresión de gag-pol de XMRV.	55
Figura 23.	Plásmido de expresión de env de XMRV.	56
Figura 24.	Cuantificación relativa mediante PCR en tiempo real de RNAm de env de XMRV.	57
Figura 25.	Citometría de flujo con suero de paciente XMRV-positivo.	58
Figura 26.	Cuantificación de actividad de transcriptasa reversa en sobrenadantes.	60
Figura 27.	Porcentaje de células GFP-positivas y ensayo de complementación genética de un vector derivado de MLV.	61

Figura 28.	Western Blot para la detección de la subunidad p30 (CA) en células LNCaP transfectadas con el plásmido de empaquetamiento pcDNA3.1Hygro GagPol.	62
Figura 29.	Western Blot para la detección de la subunidad gp70 (SU) en células LNCaP transfectadas con el plásmido de empaquetamiento pcDNA3.1Zeo-Env.	63
Figura 30.	Mapa del genoma retroviral pXM enhCMV Δ gag CMV-Luc PPT.	64
Figura 31.	Producción de partículas retrovirales XMRV a partir de la co-precipitación con calcio en células LNCaP, se muestra media \pm error estándar de ensayos triplicados.	65
Figura 32.	Transducción con el vector pXMenh CMV-Luc PPT en diferentes líneas celulares, se muestra media \pm error estándar de ensayos triplicados.	66

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µL	Microlitro
CaP	Cáncer de próstata
CFS	Síndrome de la fatiga crónica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FMVD	Virus de la fiebre aftosa
h	Horas
HHV	Herpesvirus humano
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HPLC	Cromatografía de líquido de alta resolución
HTLV-1	Virus linfotrópico de células T humanas
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
KS	Sarcoma de Kaposi
LTR	Repeticiones terminales largas
MFI	Intensidad media de fluorescencia
mL	Mililitro
MLV	Virus de la leucemia murina
Ng	Nanogramo
NHL	Linfoma no Hodgkin de alto grado
pb	Pares de bases
PBS	Sitio de unión a iniciador

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPT	Tracto central de polipurina
RCR	Retrovirus de replicación competente
RLU	Unidades relativas de luciferasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia humana
VSV-G	Proteína G del virus de la estomatitis vesicular
XMRV	Virus xenotrópico parecido a los virus de la leucemia murina
XPR-1	Receptor-1 de retrovirus xenotrópicos y politrópicos

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN

1.1. Biología de los Retrovirus

Ningún grupo de virus ha recibido tanta atención de los científicos en los últimos años como los retrovirus. Además de su importancia como patógenos de animales y humanos, han sido útiles para el descubrimiento de fenómenos biológicos centrales, como la transcripción reversa, la integración de material genético en los cromosomas, la transmisión horizontal de información hereditaria y sus consecuencias para la evolución de las especies, los oncogenes y sus mecanismos transformantes y su papel en la biología viral, entre otros fenómenos. Además, debido a la versatilidad biológica de estos virus, se han empleado ampliamente como vectores eficientes para transferencia de genes en biología molecular, como la transgénesis animal y la terapia génica. Todo lo anterior ha sido posible gracias al conocimiento profundo del genoma retroviral, de la estructura de este tipo de virus, de la filogenia y clases de retrovirus, de su ciclo de replicación viral y de las interacciones con sus huéspedes (Dudley, 2011); los cuales muestran un repertorio de actividades particulares y amplias que incluyen:

1. La existencia de un gran número de cepas de virus con muy variados efectos patogénicos.
2. Un amplio espectro de interacciones entre el virus y el huésped, que van desde infecciones benignas con virus endógenos heredados por línea germinal, hasta infecciones graves y letales, como es el caso del HIV (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) y de los retrovirus oncogénicos.
3. La habilidad de modificar el genoma nuclear del huésped por mecanismos que implican la inserción, la alteración de la expresión génica en las regiones circundantes a la transposición y la ganancia de material genético del huésped que puede transferirse de manera horizontal a las células vecinas y propiciar la transformación maligna.
4. La capacidad de insertarse en la línea germinal del huésped y transmitirse de manera vertical en la descendencia, lo que representa un mecanismo importante en la evolución de los vertebrados.
5. La habilidad de causar ciertos tipos de daño genético, tales como activación o inactivación de genes específicos cerca del sitio de integración de los provirus.
6. La habilidad de cambiar su genoma rápidamente por mutaciones o recombinaciones en respuesta a las presiones ambientales.
7. La capacidad de transducir genes ajenos insertados en el laboratorio y portar y expresar estos genes de manera predecible en una amplia variedad de células y organismos.

La familia *Retroviridae* comprende un familia muy grande de virus, principalmente de vertebrados, aunque ha habido unos pocos reportados en otros animales (Pearson y Rohrmann, 2006). Su superficie presenta una proteína de estructura sencilla, un trímero de dos subunidades, productos del gen *env* (Delamarre *et al.*, 1996; Lindemann y Goepfert, 2003). La nucleocápside interna, o core, casi esférica o de estructura cónica, está construida de tres o cuatro productos del gen *gag* (Freed, 1998; Zabransky *et al.*, 2005; Zabransky *et al.*, 2009). En el core también se encuentran varias proteínas que tienen papeles catalíticos importantes durante la replicación. Estos incluyen una proteasa y dos productos del gen *pol*: la transcriptasa reversa cuyas actividades catalíticas ayudan a convertir la información genética de un RNA de cadena sencilla a una doble cadena de DNA y una integrasa, necesaria para realizar la unión covalente del DNA viral y el DNA celular y formar el provirus (Hill *et al.*, 2005).

1.1.1. Organización del Genoma Retroviral

El genoma retroviral consiste de dos moléculas de RNA de cadena positiva sencilla (usualmente idénticas) que varían desde 7 a 10 kb, modificado de manera que recuerdan las modificaciones de los RNA mensajeros (RNAm), incluyendo la inclusión de caperuza en el extremo 5' y la poliadenilación en el extremo 3'. El orden de los genes codificantes permanece invariable: gag-pol-env. Otros grupos de retrovirus también se pueden encontrar genes involucrados

en la regulación de la expresión. El ciclo de replicación consta de dos fases. La primera incluye: (a) entrada del core del virión al citoplasma, (b) síntesis de DNA de doble hebra empleando el genoma de RNA de cadena sencilla como templado, (c) transferencia de la estructura al núcleo, e (d) integración del DNA en el genoma huésped. Estos pasos están mediados por proteínas encontradas en el virión sin ser requerida la expresión de genes virales. La segunda fase incluye (a) síntesis y (b) procesamiento de genomas virales, RNAm y proteínas usando los mecanismos de la célula huésped, como lo es el caso de la RNA polimerasa (Pereira *et al.*, 2000), y otras veces empleando la presencia de productos virales específicos, como Tat y Rev en el HIV, (He *et al.*, 2010; Blissenbach *et al.*, 2010). El ensamblaje del virion procede por la encapsidación del genoma por las proteínas de fusión gag y gag-pol, su procesamiento para generar los productos finales, la asociación de la nucleocápside con la membrana celular y la liberación del virión por gemación.

En la figura 1 se muestran las características físicas comunes a todos los genomas retrovirales. Éstas invariablemente incluyen: modificaciones del RNA impuestas por la maquinaria celular responsable de su síntesis y procesamiento y arreglos no covalentes impuestos en el genoma durante el ensamblaje del virión.

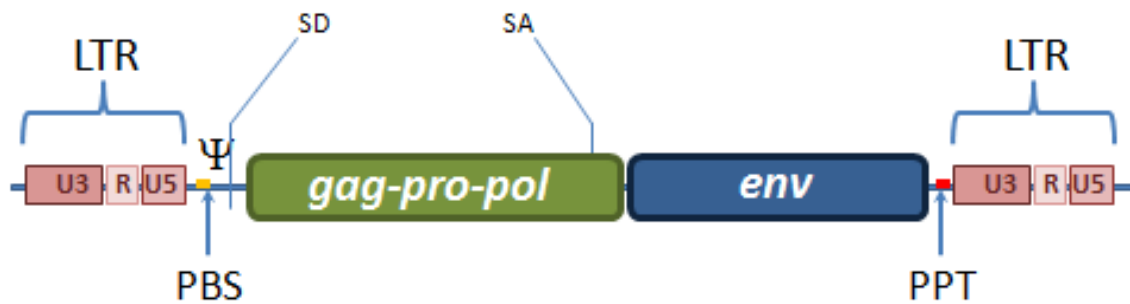


Figura 1. Estructura básica de un genoma retroviral. LTR (Long Terminal Repeats), son el centro de control para la expresión génica ya que aquí se encuentran todas las señales requeridas para la expresión génica: potenciador, promotor, inicio de la transcripción, terminador de la transcripción, sitio de inserción del provirus y señal de poliadenilación. La señal de encapsidación (Ψ) contiene estructuras secundarias compuestas de dos a cuatro bucles llamados SL1 a SL4 (SL, Stem-loop), además del sitio de unión de iniciador (PBS, primer binding site) y sitio de corte y empalme donador (SD, splicing donator). Los ORFs estructurales para la poliproteína *gag-pro-pol* y *env* se encuentran flanqueados por las regiones LTR.

1.1.1.1. Genes Estructurales

Los genes *gag*, *pro*, *pol* y *env* ocupan el cuerpo estructural del genoma retroviral. Para muchos retrovirus, estos genes son los únicos. El gen *gag* codifica la proteína estructural interna del virus (Gag, proviene del nombre original “group-specific antigen”) y es procesada proteolíticamente en las proteínas maduras MA (matriz), CA (cápside) y NC (nucleocápside) (Scarlata y Carter, 2003; Mateu, 2009). El gen *pol* codifica las enzimas transcriptasa reversa (RT), la cual contiene las funciones de DNA polimerasa y RNasa H, e integrasa (IN), la cual media la replicación del genoma (Coté y Roth, 2008; Schultz y Champoux, 2008).

El gen *pro* codifica la proteasa viral (PR), la cual actúa al final del ensamblaje de la partícula viral para procesar proteolíticamente las proteínas codificadas por *gag*, *pro* y *pol*, y algunas veces *env* (Flügel y Pfrepper, 2003). El gen *env* codifica la glicoproteína de superficie (SU) y la proteína transmembrana (TM) del virión, las cuales forman un complejo que interactúa específicamente con el receptor celular. Esta interacción lleva a la fusión de la membrana viral la membrana celular (Colman y Lawrence, 2003; Lucas *et al.*, 2010).

1.1.1.2. Regiones de Acción en *Cis*

Los genomas retrovirales están dispuestos de tal manera que todas (o casi todas) las secuencias no codificantes que contienen señales importantes de reconocimiento para la síntesis de DNA, RNA y procesamiento se encuentran localizadas en las regiones terminales. La organización general de la secuencia de un genoma de un retrovirus típico se muestra en la figura 1. Desde el extremo 5', las características no-codificantes comunes en todos los retrovirus son como sigue:

a) R. Todos los genomas retrovirales son redundantes en sus extremos terminales, contienen secuencias idénticas en los extremos 5', adyacentes al grupo m7G5'ppp5'Gmp e inmediatamente precediendo el tracto poli(A). Estas secuencias juegan un papel importante durante la transcripción reversa. En el

extremo 3' del genoma, entre U3 y la secuencia de poli(A), está la otra copia de la región R, la cual algunas veces contiene la señal para la adición de poli(A).

b) U5. Esta región está definida por sus secuencias flanqueantes R y sitio de unión a iniciador (PBS). U5 es la primera región copiada a DNA durante la transcripción reversa y llega a formar parte del extremo 3' de la LTR. Algunas secuencias U5 son esenciales para el inicio de la transcripción reversa. El extremo 3' contiene sitios *att* necesarios para la integración y hay evidencia importante del papel de esta región para el empaquetamiento del RNA viral.

c) PBS. Los 18 nucleótidos que forman el PBS son perfectamente complementarios a los nucleótidos del extremo 3' del iniciador RNAt. La longitud de la región PBS está definida por la posición de un residuo m¹A en el RNAt.

d) Tracto de polipurina. Todos los genomas de retrovirus contienen una secuencia característica de al menos nueve residuos de A y G, inmediatamente precediendo al inicio de U3. Esta secuencia contiene el sitio de inicio para la síntesis de la cadena del DNA viral. Aparentemente esta secuencia provee un sitio de rompimiento para una actividad endonucleolítica asociada a la transcriptasa reversa.

e) U3. La región U3 está definida como una región entre el inicio de la síntesis de la cadena positiva de DNA y el inicio de R. Forma la porción 5' de la LTR y,

en la forma de DNA, contiene un número de señales de acción en *cis* necesarias para la replicación viral. La secuencia en el extremo 3' de U3 es una señal reconocida por la maquinaria de integración y es una copia invertida de la señal de apareamiento en U5. Debido a que U3 termina en el extremo 5' del provirus, ésta también contiene señales que son reconocidas por la maquinaria de transcripción celular y que son responsables del control transcripcional. Cercano a su extremo 3' se encuentran otras señales transcripcionalmente importantes, las secuencias consenso canónicas, que marcan muchos promotores eucarióticos.

1.1.2. Ciclo de vida retroviral

El conocimiento del ciclo viral fue crucial para desarrollar vectores retrovirales (Figura 2). Luego de la infección en la célula, el RNA genómico es transcrito de manera reversa en un DNA de doble cadena por la transcriptasa del virión. La transcripción reversa involucra dos saltos de la enzima transcriptasa reversa, del extremo 5' al extremo 3' del templado viral, causando una duplicación de secuencias localizadas en los extremos del RNA viral. Así, el DNA viral es significativamente más largo que el genoma viral en los extremos 5' y 3'. Las repeticiones en tandem resultantes en el DNA viral son denominadas repeticiones terminales largas (LTRs). La transcripción reversa toma lugar en el citoplasma y el DNA viral es translocado al núcleo.

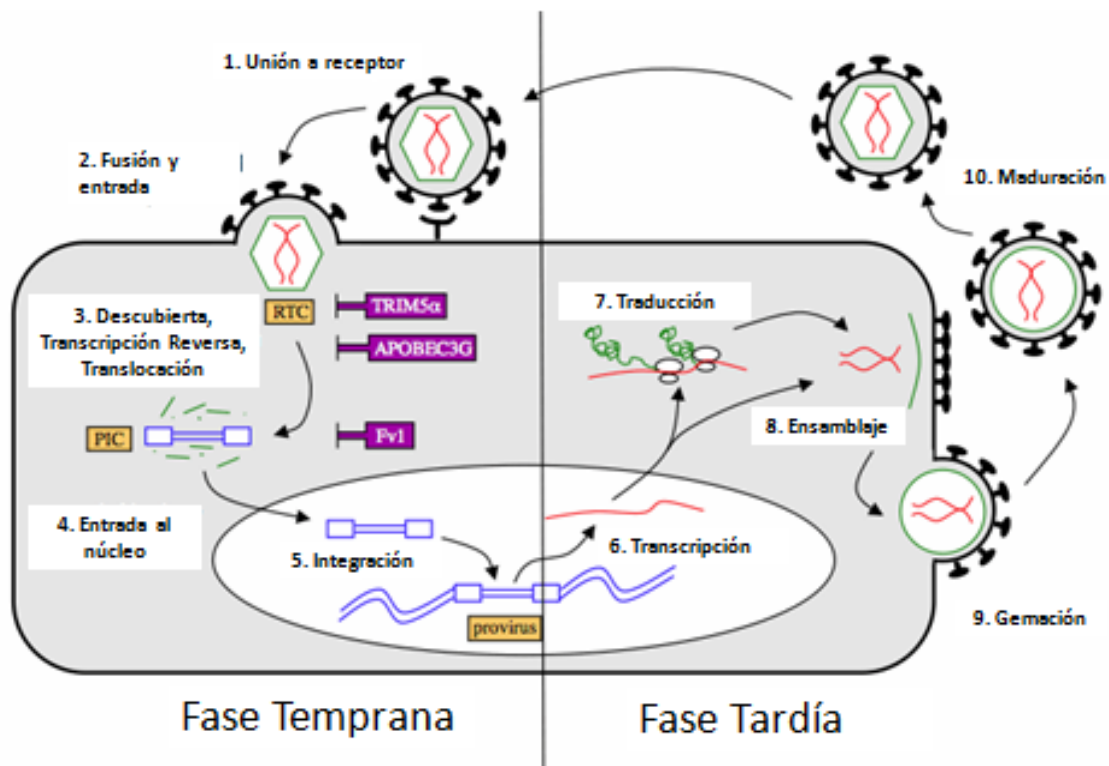


Figura 2. Ciclo de vida de un retrovirus. El ciclo de vida de un retrovirus se encuentra arbitrariamente dividido en dos fases, temprana y tardía. Las interacciones entre los factores virales y del huésped ocurren a cada paso del ciclo de vida retroviral, aunque muchas otras siguen siendo poco entendidas. Se indican los pasos inhibidos por tres factores de restricción TRIM5 α , APOBEC3G y Fv1 (RTC, complejo de transcripción reversa; PIC, complejo de pre-integración).

Los retrovirus simples y complejos entran al núcleo de la célula huésped por dos diferentes mecanismos. La entrada al núcleo de los retrovirus simples sólo puede ocurrir cuando la membrana nuclear es desensamblada, y por lo tanto es dependiente de la mitosis. En contraste, los lentivirus pueden acceder al núcleo de las células quiescentes a través del poro nuclear. Lo anterior tiene

implicaciones prácticas para el espectro de blancos celulares que pueden ser transducidos por vectores virales derivados de retrovirus simples y complejos. Después de entrar al núcleo, el DNA viral se integra en el genoma huésped formando un provirus. La formación de un provirus es una estrategia única. El DNA de etapa intermedia mimetiza a un gen celular y emplea la maquinaria de la célula huésped para la expresión génica. Por lo tanto, el provirus requiere elementos activos en *cis* que controlen la maquinaria transcripcional del huésped. Muchos de estos elementos están situados en las regiones LTRs provirales.

Las LTRs regulan el inicio de la transcripción por la RNA polimerasa II. Además, las secuencias inmediatas al extremo 5' de la región U3 contienen los sitios llamados *att* que son necesarios para la integración. Esta secuencia motif es también encontrada en la LTR 3': El extremo 3' de la región U5 contiene una copia invertida del sitio *att*. Además, la LTR 3' contiene elementos *cis* activos involucrados en el procesamiento post-transcripcional del extremo 3' del RNA viral (poliadenilación).

1.2. Vectores Retrovirales

Los vectores retrovirales se han usado frecuentemente para la transducción de genes heterólogos de reemplazo en ensayos clínicos de terapia génica para enfermedades monogénicas o para añadir genes citotóxicos en ensayos

antineoplásicos (Temin, 1990). El vector retroviral libre de virus contaminantes es empleado para infectar células de médula ósea del paciente. Luego de la selección de células infectadas eficientemente, éstas pueden ser transplantadas de regreso al paciente (Anderson, 1984; Anderson, 1985). Todas las terapias únicamente consideran células somáticas y no células de línea germinal. Sin embargo, el diseño genético de línea germinal con vectores retrovirales ha sido probado en pollos, ratones, ovejas, monos, etc. (Porada *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2005; Porada *et al.*, 2005; Kalina *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). El prototipo de vector retroviral para terapia génica es el Virus de la Leucemia Murina de Moloney (MLV).

El MLV es un retrovirus simple que porta sólo un pequeño juego de información genética, mientras que los retrovirus complejos como los lentiviruses (HIV) adicionalmente contienen genes accesorios y reguladores. Inicialmente, los vectores de terapia génica fueron desarrollados de retrovirus simples (Hansen y Pedersen, 2002). Las lecciones aprendidas de los vectores retrovirales simples proporcionaron una base invaluable para el desarrollo de vectores derivados de retrovirus complejos. Cada uno de estos vectores tiene ventajas específicas y grandes limitantes. A continuación se enlistan algunas características que cumpliría un vector ideal:

1. Producción fácil y eficiente: las preparaciones de altos títulos de partículas virales deben ser reproducibles y fácilmente realizables.

2. Con respecto a la seguridad: el vector no debe ser tóxico, ni inducir efectos indeseables a las células blanco; incluyendo reacciones inmunológicas contra el vector viral o su transgen.
3. Expresión regulada y sostenida del transgen: el gen dirigido por el vector viral tiene que ser expresado de manera adecuada.
4. Vectores virales dirigidos: Es deseable lograr la transducción exclusiva o preferencial de tipos celulares específicos.
5. Infección de células en división o quiescentes: debido a que la mayoría de las células en un adulto humano se encuentran en un estado postmitótico, sin división celular; es necesario que los vectores virales sean capaces de transducir estas células.
6. Integración sitio-específica: integración en el genoma huésped en sitios específicos que podrían ser capaces de reparar defectos genéticos, tales como mutaciones o deleciones mediante inserción en secuencias correctas.

Para generar vectores retrovirales, todas las secuencias codificantes de proteínas son removidas del virus y reemplazadas por el transgen de interés. Las secuencias activas *cis* esenciales, tales como secuencias de señal de empaquetamiento (Ψ) requeridas para la encapsidación, tienen que ser incluidas en la construcción del vector. Las secuencias necesarias para la transcripción reversa del RNA del vector e integración del DNA proviral, las LTRs, el sitio de unión al iniciador de RNA de transferencia y el tracto central de polipurinas (PPT), deben estar presentes en el vector construido. Muchas modificaciones

han sido introducidas en los sistemas básicos de vectores retrovirales. Por ejemplo, la inclusión del extremo 5' del dominio *gag* lleva a un incremento de 50-200 veces en los títulos de vectores, debido a un incremento en la eficiencia de la encapsidación del vector de RNA. Los vectores basados en MLV que portan esta señal de empaquetamiento extendida (nucleótidos 215 – 1039 de *gag*) son llamados vectores Ψ^+ o *gag+* (Pfeifer y Verma, 2001).

1.2.1. Diseño de vectores retrovirales

El primer paso en el diseño de un vector viral es identificar las secuencias que se requieren para ensamblar las partículas virales, el empaquetamiento del genoma viral en la partícula y el direccionamiento del transgen a las células blanco. En seguida, es necesario que los genes dispensables sean deletados del genoma retroviral para reducir la patogenicidad e inmunogenicidad. El genoma residual viral y el gen de interés (también denominado transgen) se integran en la construcción del vector (Figura 3).

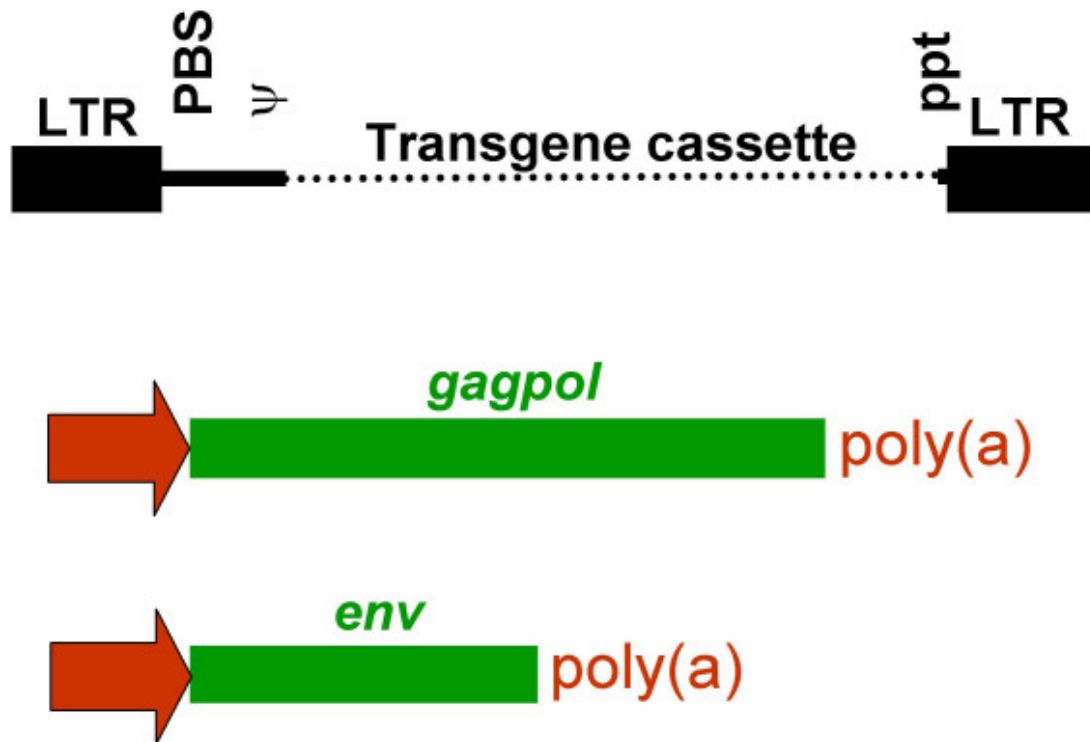


Figura 3. Sistemas de transducción retroviral. Los sistemas de vectores retrovirales de replicación deficiente están hechos separando las funciones genéticas *cis* (en negro) y *trans* (en verde) del virus en construcciones plasmídicas, las cuales contienen las secuencias *cis* y “helper” o plásmidos de empaquetamiento que codifican las proteínas virales (i.e. contienen las secuencias *trans*). Sólo el vector transcrito se incorpora en los viriones debido a que únicamente este RNA contiene la señal de empaquetamiento retroviral (Ψ) (Pfeifer y Verma, 2001).

1.2.2. Pseudotipado de vectores retrovirales

El tropismo de los retrovirus está determinado por la glicoproteína de la envoltura viral, la cual se une al receptor en las células blanco. El MLV ecotrópico puede infectar sólo células murinas que expresan el receptor para

Env (un transportador de aminoácidos catiónicos independiente de sodio) (Yoshii *et al.*, 2008). Afortunadamente, el número de huéspedes de los vectores puede ser fácilmente expandido reemplazando el gen *env* de MLV con secuencias de la envoltura de otros retrovirus, por ejemplo, virus anfotrópicos que son capaces de infectar especies murinas y no murinas (Pouw *et al.*, 2007).

El pseudotipado de vectores retrovirales no está restringido a las glicoproteínas de la envoltura de otros retrovirus. La proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), un miembro de la familia de los rhabdovirus, puede sustituir las proteínas virales Env (Cronin *et al.*, 2005; Kaikkonen *et al.*, 2006; Ohishi *et al.*, 2007).

1.3. Retrovirus y cáncer

Los virus están etiológicamente asociados a cerca de un 20% de las neoplasias a nivel global. De este porcentaje, los retrovirus representan entre un 8-10% del total. El riesgo de desarrollar cáncer se incrementa enormemente después de la infección crónica por HIV, como consecuencia de la inmunodeficiencia (Blattner, 1999). El sarcoma de Kaposi (KS, Kaposi's sarcoma) y el linfoma no Hodgkin de alto grado (NHL, non-Hodgkin's lymphoma) están muy asociados a SIDA. La inmunodeficiencia permite la infección con el herpesvirus humano tipo 8 (HHV-8, human herpesvirus 8), cuyos genes ciclina viral D y bcl-2 promueven la

desregulación del ciclo celular (Dubina y Goldenberg, 2009; Engels, 2007; Krause, 2005).

En 1980, Robert Gallo identificó un nuevo retrovirus en cultivos de células de linfoma de células T humanas que denominó virus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1), el agente etiológico de la leucemia de células T en adultos (ATL, adult T-cell leukemia) (Poiesz *et al.* 1980). El mecanismo molecular por el cual el HTLV-1 no es conocido, pero se sabe que involucra a la función de la proteína viral Tax, más que a la mutagénesis insercional, mecanismo más común de carcinogénesis en animales (Yoshida, 2001). La proteína Tax regula la expresión de genes virales y celulares que interfieren con proteínas involucradas con la progresión del ciclo celular y la reparación del DNA (Pise-Masison *et al.*, 2005).

1.3.1. Virus Xenotrópico parecido a los Virus de la Leucemia Murina, XMRV

El Virus Xenotrópico parecido a los Virus de la Leucemia Murina (XMRV) recientemente descrito es un gammaretrovirus que ha sido asociado al síndrome de la fatiga crónica (CFS) (Lombardi *et al.*, 2009) y al cáncer de próstata (CaP) (Urisman *et al.*, 2006). El retrovirus fue detectado en tejidos de CaP con microarreglos de DNA viral (Virachip) en familias que eran homocigotas

para la pérdida de función del alelo R462Q de RNasa L (gen hereditario de cáncer de próstata-1). La RNasa L rompe una cadena sencilla de RNA en sitios de oligonucleótidos UpUp y UpAp en el RNA ribosomal y de varios virus (Castelli *et al.*, 1998; Silverman, 2003). Las proteínas del XMRV fueron encontradas en 23% de una población de New York, pero el DNA se encontró en sólo 6% de 334 de muestras de pacientes con CaP (Schlaberg *et al.*, 2009). Los tumores de alto grado son los que mayormente han mostrado evidencia del XMRV. Significativamente, el XMRV se detectó en sólo una de 105 muestras de CaP, y en una de 70 muestras de próstata normal en un estudio realizado en Alemania (Fischer *et al.*, 2008). Un segundo grupo alemán no detectó XMRV por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Western blot o pruebas serológicas en 589 muestras de pacientes con CaP. De aquí surge la posibilidad de que los casos de CaP infectados con XMRV estén restringidos a los Estados Unidos (Hohn *et al.*, 2009). Un estudio reciente demuestra un incremento en la frecuencia de secuencias de XMRV en muestras de tracto respiratorio de pacientes inmunocomprometidos (10% de 161 muestras), en comparación con muestras de pacientes inmunocompetentes (2% a 3% de 168 muestras) (Fischer *et al.*, 2010).

Aloia y cols. emplearon proteínas purificadas por HPLC para generar un antisuero específico que fue empleando en inmunotinciones, en este estudio se analizaron casi 800 muestras de CaP por PCR en tiempo real e inmunohistoquímica sin encontrar ninguna evidencia del XMRV, lo que

incrementó la controversia sobre el uso de antisueros no específicos para la detección de proteínas del XMRV (Aloia *et al.*, 2010). La principal controversia sobre el papel patogénico del XMRV fue la que suscitó el estudio realizado por Lombardi y cols., donde encontraron que 67% de pacientes con CFS eran portadores del XMRV (Lombardi *et al.*, 2009), mientras que Hohn y cols. analizaron 39 pacientes con CFS y 114 con esclerosis múltiple mediante prueba de ELISA validado para la detección de proteínas de env y gag sin encontrar ninguna evidencia del XMRV (Hohn *et al.*, 2010). En un estudio realizado en China en 65 pacientes con CFS no se logró la detección de secuencias del XMRV por un ensayo de PCR en tiempo real multiplex altamente sensible y específica (Hong *et al.*, 2010). Al igual que en estos estudios, otros grupos han reportado la nula o muy escasa presencia del XMRV y MLV en pacientes con CaP o CFS a pesar de usar ensayos de PCR altamente sensibles. Estudios posteriores encontraron correlaciones entre el 100% de muestras de DNA humano que fueron positivas XMRV o MLV con la presencia de DNA de ratón, lo que ha llamado la atención sobre contaminaciones en el laboratorio por material genético murino (Oakes *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2010; Switzer *et al.*, 2010).

El XMRV es xenotrópico debido su alta similitud con virus existentes en la línea germinal de ratón, pero sus proteínas de la envoltura (env) no tienen un receptor en células murinas (Battini *et al.*, 1999). Aunque no se puede reproducir en ratones, el virus puede unirse a receptores en otras especies (del griego *xenos*), incluyendo humanos (Levy, 1999). Remanentes similares de infecciones

pasadas ahora forman elementos transposones que corresponden a más del 8% del genoma humano. El precursor del MLV y sus virus relacionados probablemente infectaron al ratón hace 1 millón de años. No se sabe cuándo el XMRV comenzó a infectar humanos, pero pudo haber ocurrido en las últimas generaciones, dado el 99% de identidad entre los seis genomas que han sido secuenciados a la fecha a partir de leucocitos activados de pacientes con CaP y CFS avanzado (Urisman *et al.*, 2006; Lombardi *et al.*, 2009). Éstos difieren en sólo 30 de 8000 nucleótidos y muchas de las modificaciones ocurren en las regiones no-traducidas del virus o como polimorfismos silentes en la tercera posición de codones que no cambian las secuencias de las proteínas. Las infecciones xenotrópicas pudieron haber ocurrido durante un período en el cual los ratones fueron una parte importante de la dieta humana. No se sabe si el XMRV ha entrado en la línea germinal humana o si es transmitida en la población. Los humanos son susceptibles debido a que el XMRV puede unirse al receptor-1 de retrovirus xenotrópicos y politrópicos (XPR-1) (Battini *et al.*, 1999; Stieler *et al.*, 2010). Esta proteína puede ser un transportador de fosfato o sensor que puede actuar en coordinación con el antígeno prostático específico (Hong *et al.*, 2009). La unión al XPR-1 y a sus correceptores potenciales conduce a la endocitosis del virus. La invaginación del fagosoma elimina la envoltura de membrana plasmática del virus para descubrir la cápside. Ésta está compuesta de proteínas de la matriz y contiene las cadenas del genoma de RNA, la enzima integrasa y la transcriptasa reversa. La cápside se mueve al núcleo, donde el RNA es reversamente transcrito y colocado en sitios de

inserción dentro del DNA huésped. El XMRV tiende a insertarse en el genoma humano en sitios de inicio de la transcripción, islas CpG, sitios hipersensibles a DNasa y regiones densas de genes (Kim *et al.*, 2008; Rusmevichientong y Chow; 2010). En el CaP, el virus se integra en puntos de rompimiento de cáncer, sitios frágiles comunes, genes de microRNAs y algunos genes relacionados con el CaP. Estas regiones muestran desdoblamiento de la cromatina con secuencias regulatorias de transcripción estructuralmente abiertas. Por el contrario, la cromatina condensada rica en nucleosomas no ofrece sitios de integración adecuados. El provirus de XMRV incorporado es entonces transcrito para servir como RNAm para la formación de nuevas proteínas y RNA genómico para generar viriones infecciosos. El genoma retroviral puede producir dos RNAm debido al corte y empalme. Uno codifica para las tres regiones río arriba, la región codificante contigua gag-pro-pol y es empalmado a las 5 regiones no traducidas, mientras que la otra tiene tres regiones empalmadas a las regiones que codifican la envoltura y la secuencia 5' no traducida contigua. Ambas proteínas son cortadas por la proteasa viral para formar la matriz, la integrasa, transcriptasa reversa y la región stem transmembrana y glicoproteína de la envoltura de unión a XPR-1. El virus es ensamblado en la membrana. La cápside que contiene el RNA emerge y se libera de la superficie celular (Baraniuk, 2010).

1.3.2. El XMRV como vector de transducción

El XMRV es un retrovirus con estructura similar a otros gammaretrovirus de los cuales se han derivado vectores retrovirales. En el laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL, hemos logrado aislar secuencias pertenecientes a la forma proviral del XMRV a partir de la línea celular 22Rv1, en la cual no se ha reportado la presencia de este virus. Dada la estructura y organización genómica que presenta el XMRV, resulta ser una buena opción para la generación de un vector retroviral, ya que también se han derivado vectores de virus con estructura similar, con la ventaja de que este vector podría tener un mejor tropismo hacia nuestra especie y probablemente sería más eficiente en lesiones tumorales con actividad deficiente de la proteína RNasa L. Este nuevo vector representa una opción más en los actuales sistemas de transferencia retroviral para ensayos de transducción génica.

CAPÍTULO II:

JUSTIFICACIÓN

Dado el creciente desarrollo de nuevas herramientas en el área de la biología molecular y la constante búsqueda de opciones terapéuticas contra el cáncer que permitan dirigir de manera más fina un efecto antineoplásico, resulta imperante realizar investigación de nuevos vectores de transferencia génica que puedan ser empleados en la terapia génica antineoplásica.

CAPÍTULO III:

OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Generar y validar un nuevo vector retroviral derivado del genoma de XMRV, el cual podría ser propuesto como una nueva herramienta de transferencia de genes en ensayos de biología molecular y usado en futuras aplicaciones de terapia génica.

3.2. Objetivos específicos

1. Construir un vector retroviral de transducción derivado del XMRV.
2. Establecer una línea celular de empaquetamiento con secuencias estructurales del XMRV.
3. Demostrar la funcionalidad del vector retroviral producido por la línea de empaquetamiento.
4. Determinar la eficiencia de transducción *in vitro* del vector derivado de XMRV.

CAPÍTULO IV:

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material Biológico

4.1.1. Líneas Celulares

Se emplearon las células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) para los protocolos de clonación y subclonación de plásmidos. Para la generación de vectores retrovirales y ensayos de expresión in vitro se emplearon las siguientes líneas celulares: HepG2 (ATCC HB-8065, carcinoma hepatocelular), HEK-293 (ATCC CRL-1573, riñón embrionario humano), SiHa (ATCC HTB-35, carcinoma de células escamosas de cérvix grado II), PC-3 (ATCC CRL-1435, adenocarcinoma de próstata grado IV), 293T (ATCC CRL-11268, riñón embrionario humano), LNCaP (ATCC CRL-1740, carcinoma de próstata), 22Rv1 (ATCC CRL-2505, carcinoma de próstata), HeLa (ATCC CCL-2™, adenocarcinoma epitelial de cérvix).

4.1.2. Plásmidos

Para la construcción del plásmido de expresión de proteínas gag-pol del XMRV se empleó el vector pcDNA3.1Hygro(+) (Invitrogen, Carlsbad, CA), mientras que para la expresión de proteínas env se empleó el plásmido pcDNA3.1Zeo(-) (Invitrogen, Carlsbad, CA), (Figura 4). En la generación de un esqueleto genómico de vector retroviral se empleó el plásmido pBlueScript II KS (+) (Stratagene, La Jolla, CA) (Figura 4). Durante los procesos de clonación se emplearon los siguientes vectores: pCR2.1 topo, pGemT-Easy, pCR4Blunt-Zero, pGL3-Basic (Promega, Madison, WI).

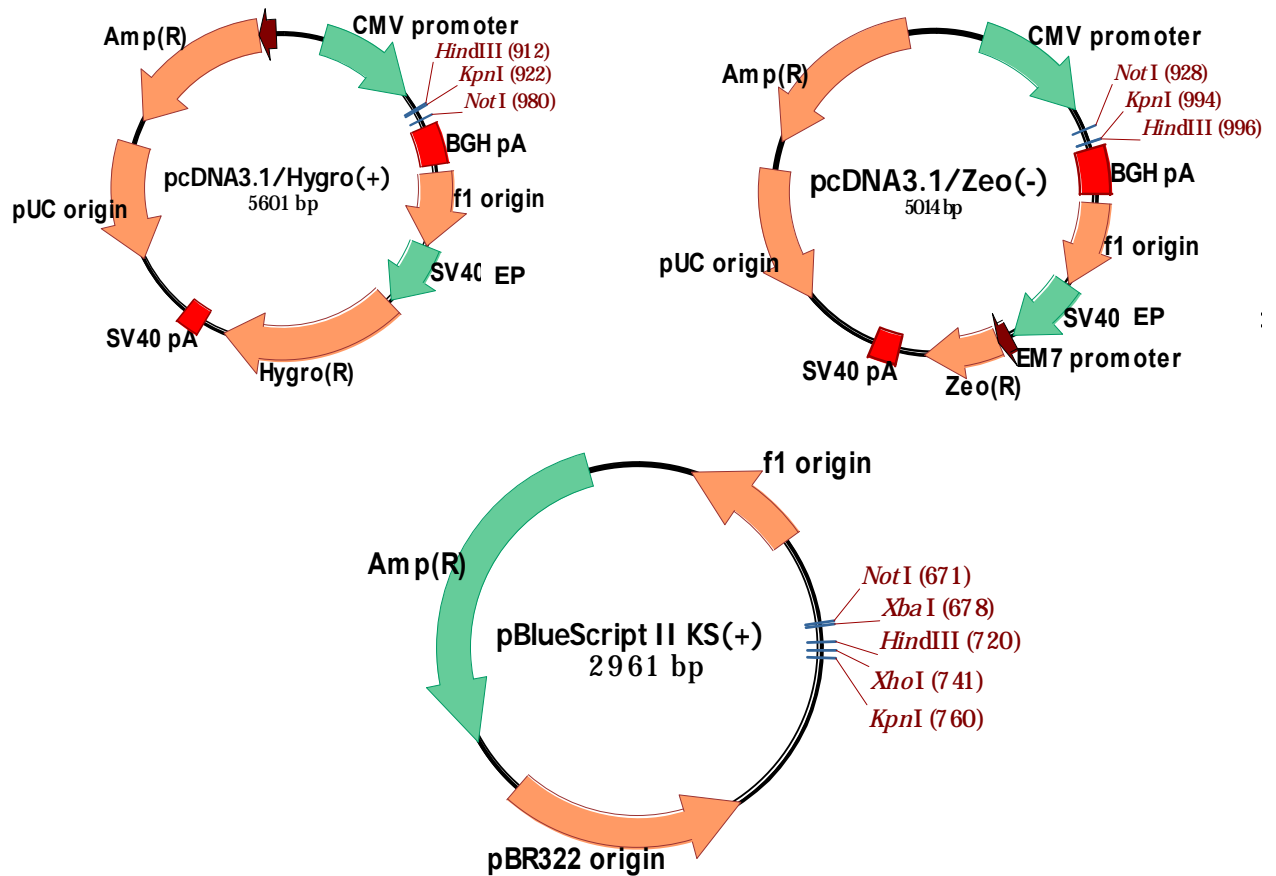


Figura 4. Mapas de los plásmidos empleados para la generación de vectores retrovirales y de empaquetamiento.

4.2. Materiales y Reactivos

A. Enzimas de restricción y ligasa. New England BioLabs® (Ipswich, Reino Unido):

*Bam*HI, *Hind*III, *Avr*II, *Xho*I, *Spe*I, *Ven*t, *Taq*, estuche de ligasa T4.

B. EPICENTRE® Biotechnologies (Madison, WI):

Polimerasa MasterAmp™ Taq DNA.

C. Promega (Madison, WI):

Estuche de clonación pGEM T-Easy, pGL3-Basic, pGL3-SV40, pRL-SV40, Sistema de purificación en columna PureYield™, Sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo®.

D. Invitrogen™ y Gibco® (Carlsbad, CA):

Estuche de clonación pCR2.1-Topo y pCR4Blunt-Zero, lipofectamina™ 2000, medio Iscove avanzado de Dulbecco modificado de Eagle (Iscove's Medio Advanced Dulbecco's Modified Eagle), suero bovino fetal certificado en Estados Unidos, tripsina 0.25 %, zeocina, higromicina.

F. Sigma-Aldrich (St. Louis, MO):

Acetato de potasio, ácido bórico, ácido fosfórico, bromuro de etidio, cloroformo, cloruro de calcio, dodecil sulfato de sodio, EDTA, fenol, fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de sodio, glucosa, HEPES, hidróxido de sodio, tris, tris-HCl. Ácido bórico, agar bacteriológico, agarosa, cloruro de sodio, extracto de levadura, triptona de caseína, tris, tris-HCl, bromuro de etidio,

G. Merck (Whitehouse Station, NJ):

Alcohol etílico, ácido acético glacial, metanol, isopropanol.

H. Corning y Costar (Costar City, NY):

Tubos para microcentrífuga 1.5 mL, tubos para microcentrífuga 2 mL, puntas para pipeta 20 μ L, puntas para pipeta 200 μ L, puntas para pipeta 1000 μ L, criotubos 2 mL, botella para cultivo celular de 25 cm², botella para cultivo celular de 75 cm², cajas Petri 100 mm, pipeta serológica 5 mL, pipeta serológica 10 mL, pipeta serológica 25 mL.

4.3. Estrategia General

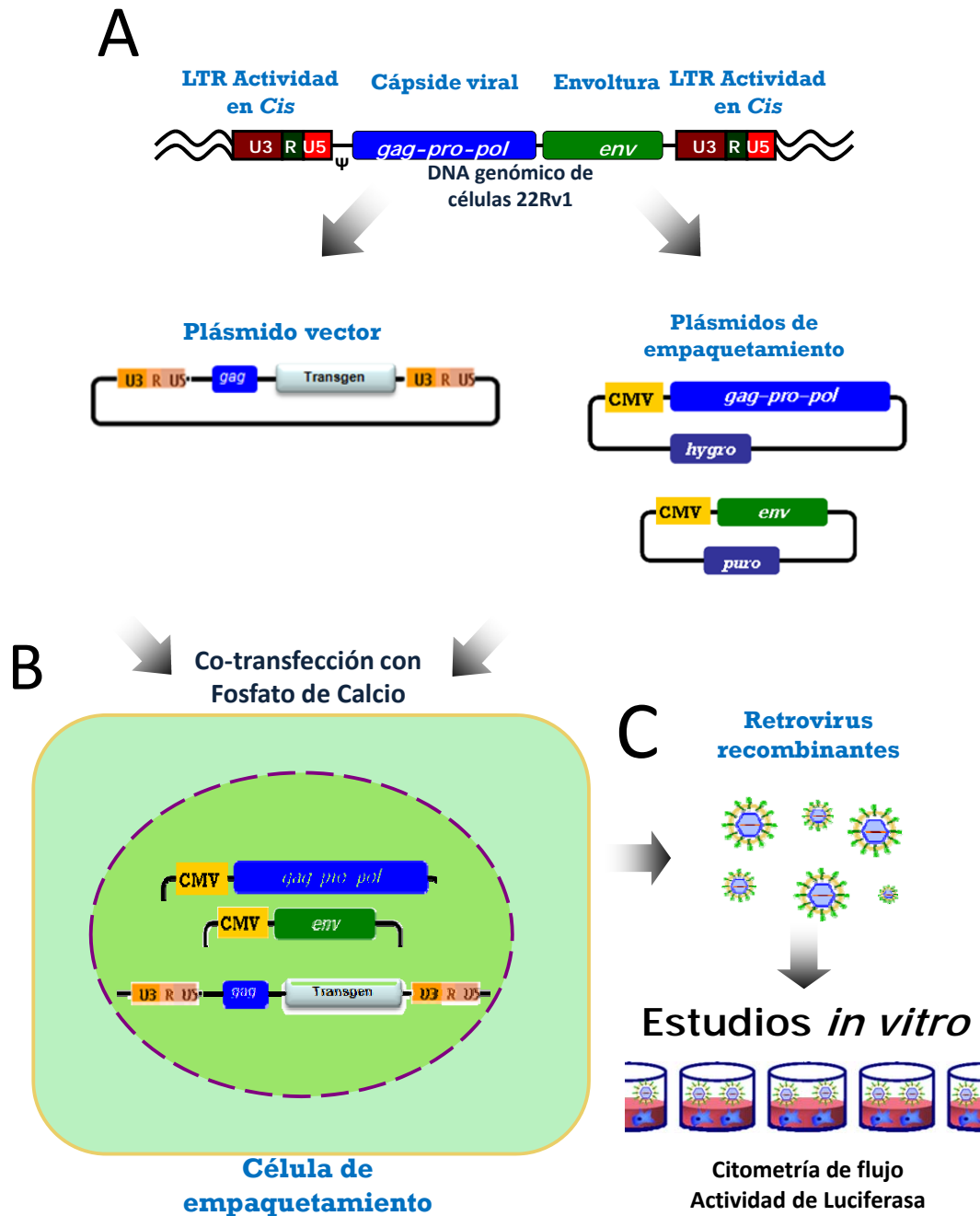


Figura 5. Estrategia general. (A) Se generaron plásmidos de empaquetamiento y genomas de vectores retrovirales derivados del XMRV, (B) los cuales fueron transfectados en células para la producción de vectores retrovirales recombinantes. (C) La producción fue determinada mediante citometría de flujo y actividad de luciferasa.

4.4. Determinación de la Actividad Promotora de U3

Un punto clave para la generación de un vector retroviral es determinar si los elementos *cis* reguladores son transcripcionalmente activos. Para obtener estas regiones se aisló DNA genómico a partir de la línea celular 22Rv1 y se emplearon los siguientes oligonucleótidos para aislar la región correspondiente a U5 de la LTR de XMRV: 1-LTR 5'-GCG CCA GTC ATC CGA TAG ACT GA-3', 366-LTR 5'-GCC GGG AAT ACG AAC TCG TCA GT-3'. El fragmento amplificado fue clonado empleando el estuche de clonación Topo Cloning TA. También se aisló mediante PCR el fragmento correspondiente a U3 de la LTR de XMRV: 7620-LTR3 5'-GCC CTG GTT CTG ACC CAA CAG TAT -3', 8173-LTR3 5'-AAA GGC TTT ATT GGG AAC ACG GGT -3'. Ambas clonas fueron caracterizadas por restricción con *EcoRI* y PCR.

Las clonas obtenidas fueron nombradas pCR2.1-LTR3 y pCR2.1-LTR5 y fueron digeridas con las enzimas *SacI* (o *HindIII*) y *XhoI* para liberar fragmentos de 632 nt y 450 nt, respectivamente. Ambos fragmentos fueron separados en electroforesis de agarosa, purificados con el estuche Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System y subclonados en los sitios *SacI* y *XhoI*, para pGL3-U3, y *XhoI* y *HindIII*, para pGL3-U5, del plásmido pGL3-Basic (Figura 6). Los plásmidos de expresión generados, pGL3-U5 y pGL3-U3, fueron propagados en células DH5 α .

y se realizó extracción de DNA plasmídico empleando el estuche PureYield Plasmid Midiprep System.

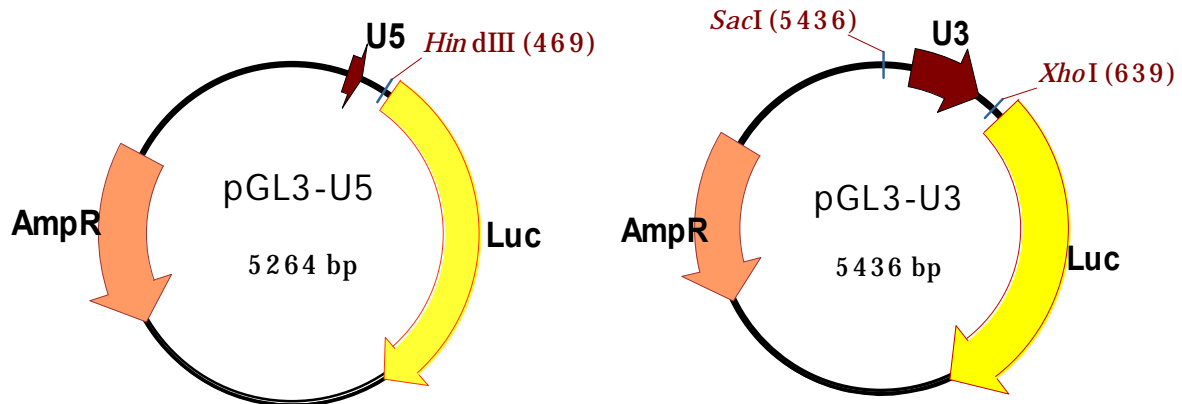


Figura 6. Plásmidos de expresión para la evaluación de la actividad promotora de los elementos U3 y U5 de las LTRs del XMRV.

Se transfectaron 100 ng de los plásmidos pGL3-U5, pGL3-U3, pGL3-SV40, pGL3-Basic y pRL-SV40 por triplicado en las líneas celulares HepG2, HEK293, SiHa, 22Rv1 y PC3, empleando lipofectamina como agente de transfección. Luego de 48 h, se determinó la actividad de luciferasa con el estuche Dual-Glo® Luciferase Assay System.

4.5. Generación de un vector retroviral derivado del XMRV

Se realizó PCR a partir de 300 ng de DNA genómico de células 22Rv1 con los siguientes oligonucleótidos: LTR5-1f 5'-CAA TTG GCG CCA GTC ATC CGA

TAG AC-3' y LTR5-1294r 5'-GTC GAC TGT AAG TGA CGG CCA GTA CTG AAG CTG G-3'; LTR3-7726f 5'-CCT AGG TGA AAG ACC CCA CCA TAA GG-3' y LTR3-8178r 5'-GCT AGC AGC AAA AGG CTT TAT TGG G-3'. Los productos amplificados LTR5-gag (1314 nt) y LTR3 (465 nt) fueron clonados para generar los plásmidos pCR2.1 LTR5-gag y pCR2.1 LTR3. Para generar una LTR completa, el plásmido pCR2.1 LTR3 fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *XmaI* para producir un fragmento de 437 nt. El fragmento purificado fue subclonado en el plásmido pCR2.1 LTR5-gag en los sitios *MfeI* (compatible con *EcoRI*) y *XmaI* (Figura 7). El plásmido resultante, pCR2.1 U3RU5-gag, fue caracterizado por digestión con *EcoRI*.

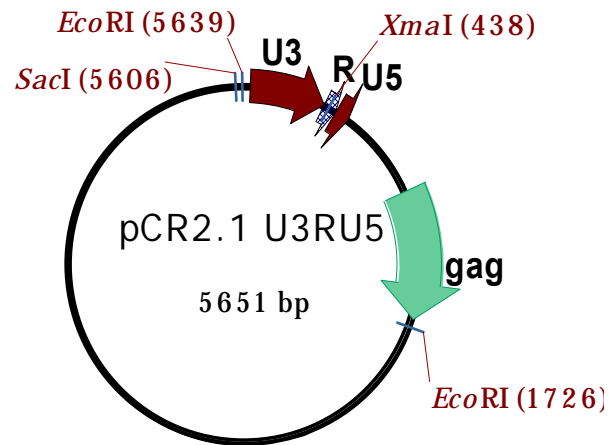


Figura 7. Plásmido con LTR 5', señal de empaquetamiento y un segmento de gag del XMRV.

A partir de este plásmido se generaron una serie de fragmentos correspondientes a la LTR5 más la señal de encapsidación con tres diferentes

versiones de gag. Mediante SOE-PCR (Splicing by Overlapping Extension PCR) se generó una versión de LTR5-gag en la cual el ATG de gag estaba mutado como se muestra en la figura 8. Los oligonucleótidos fueron diseñados de manera que permitieran la caracterización mediante digestión con *XhoI* y para introducir una mutación en el inicio de la traducción (ATG) de gag. Los oligonucleótidos fueron los siguientes: U3-F 5'-CGC CCT CAA TTG GAA TGA AAG ACC CCA CC-3', GagMut-R 5'-GTC TGT CCC ACG ATC CCG AGA ACC GTA AAG-3', GagMut-F 5'-GTT ACG GGT CTC GGG ATC GTG GGA CAG AC-3', Gag500-R 5'-CGC CTC GTC GAC ATT GTT CTC CCT GGC AGA GG-3'.

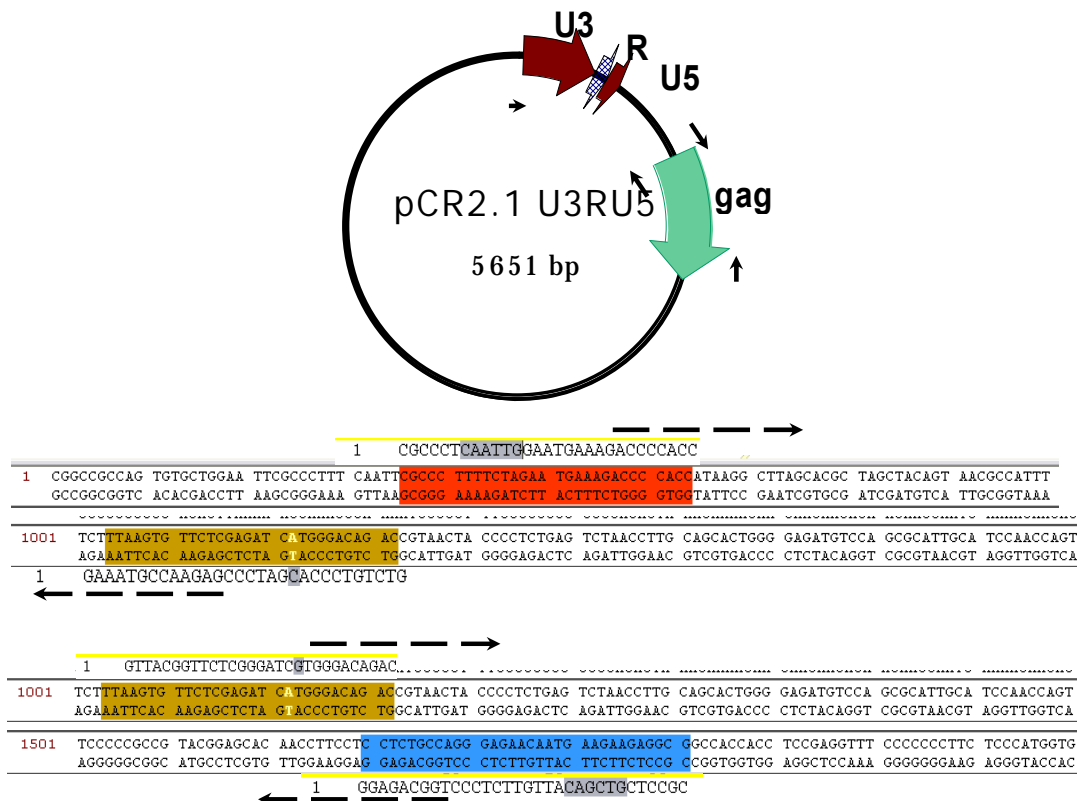


Figura 8. Estrategia SOE-PCR para mutar el ATG→GTG de la región gag en el plásmido pCR2.1 U3RU5.

El nuevo fragmento generado (U3RU5-GagMut) fue clonado para generar el plásmido pCR2.1 U3RU5-GagMut. Las clonas fueron caracterizadas por restricción con *EcoRI* y *XhoI*. Para generar el genoma retroviral, el fragmento *EcoRI* y *XhoI* del plásmido pCR2.1 U3RU5-GagMut (1026 nt) fue subclonado en el plásmido pBlueScript II KS + en los sitios *EcoRI* y *XhoI* para generar el plásmido pBS-U3RU5 (Figura 9).

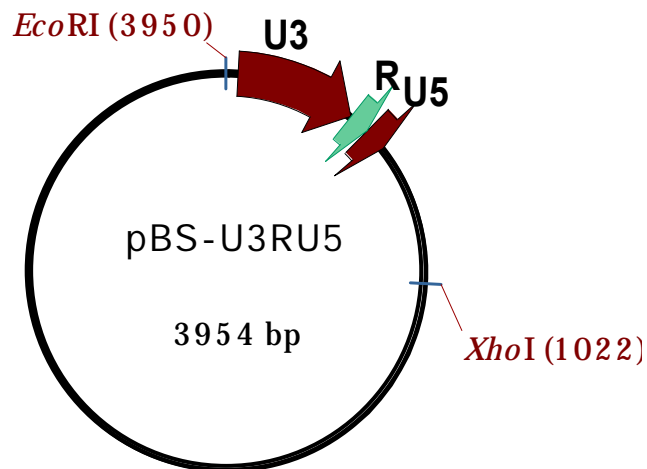


Figura 9. Plásmido pBS-U3RU5 para la generación de un esqueleto retroviral.

El genoma del esqueleto del vector fue completado subclonando el fragmento *SacI* y *NotI* del plásmido pCR2.1 U3RU5-gag (1631 nt) en el plásmido pBS

U3RU5 en los sitios *SacI* y *NotI*. El plásmido generado, pXM-gag, corresponde al primer prototipo de un esqueleto retroviral derivado del XMRV (Figura 10).

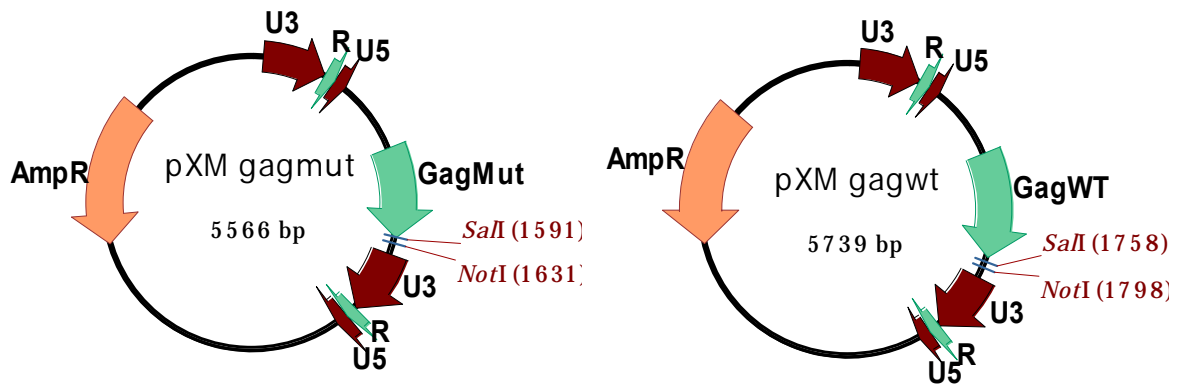


Figura 10. Esqueletos de genomas retrovirales derivados del XMRV.

El siguiente paso fue colocar un gen reportero dentro del esqueleto retroviral XMRV. Para esto, la secuencia de GFP del plásmido pHR-CMV GFP fue obtenida por digestión con las enzimas *Bam*HI y *NotI* y el fragmento liberado de 741 nt fue subclonado en el plásmido pBlueScript II KS + en los sitios *Bam*HI y *NotI*. El plásmido pBS GFP fue digerido en los sitios *SacI* y *NotI* para liberar un fragmento de 786 nt que contiene la secuencia de GFP y subclonado en el plásmido de esqueleto retroviral pXM-gag en los sitios *SacI* y *NotI*, generando así el plásmido pXM-gag GFP (Figura 11).

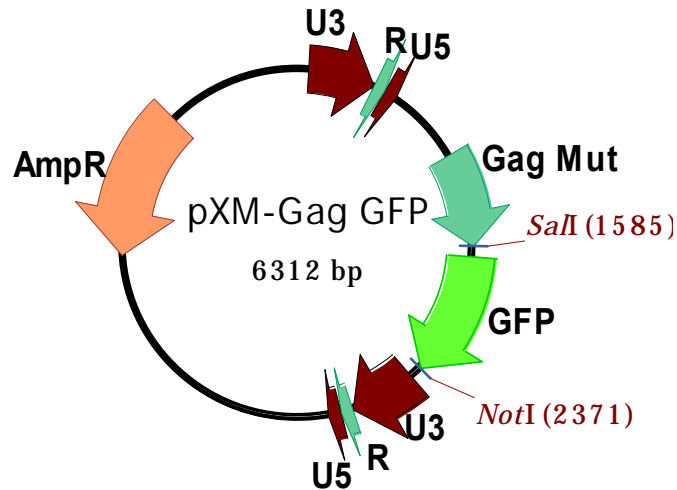


Figura 11. Esqueletos de genomas retrovirales derivados del XMRV. En el vector XM-gag-GFP la expresión es dirigida por el promotor U3.

4.6. Determinación de la longitud mínima de señal de encapsidación

Mediante PCR y empleando 100 ng del vector XM-gag-GFP se generaron otros dos fragmentos diferentes correspondientes a la LTR5 y diferentes longitudes en *gag* manteniendo la señal de encapsidación mínima. Se emplearon los siguientes oligonucleótidos: XMRVgGag-F 5'-CAC TAT AGG GCG AAT TGG AGC TC-3', dGag6009-R 5'-ATA GGC AAG TCG ACC TGT AAG TGC CTA GGC GAT ATA TGG GAC CTG ATC C-3' y dGag5761-R 5'-AGA GGG TAG TCG ACC TGT AAG TGC CTA GGA CGA TCC CGA GAA CCG TAA C-3'. Las secuencias de sitios donadores y aceptores de corte y empalme están subrayadas. Los fragmentos producidos por PCR empleando el plásmido pXM-gag fueron de 1334 nt y 1109 nt, respectivamente, los cuales fueron clonados

usando el Zero Blunt® PCR Cloning Kit. Los plásmidos generados, pCR4 Blunt LTR5-gag250 y pCR4 Blunt LTR5-Δgag, fueron digeridos empleando los sitios *SacI* y *SaII* para liberar fragmentos de 1307 nt y 1082 nt, respectivamente. Los fragmentos fueron utilizados para reemplazar el fragmento de 1585 nt del plásmido pXM-gag GFP empleando los sitios de restricción *SacI* y *SaII*. Fue así como se generaron los esqueletos retrovirales pXM-250gag GFP y pXM-Δgag GFP (Figura 12).

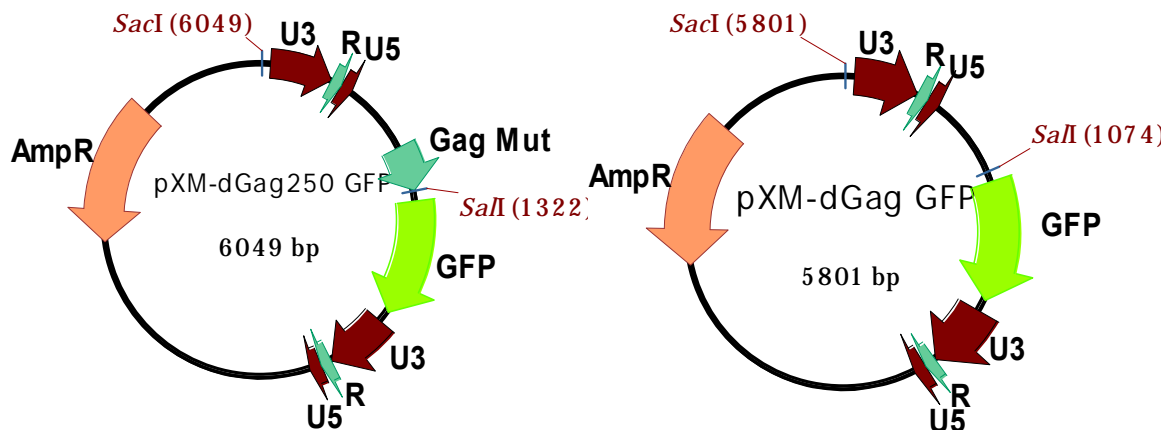


Figura 12. Esqueletos retrovirales con deleciones en la región gag (mutada).

4.7. Genoma de vectores retrovirales bicistrónicos

Para generar un vector retroviral bicistrónico, se fusionaron los genes de *GFP* y *pac* (puromicina N-acetil-transferasa) separados por la secuencia F2A del FMDV (Foot and Mouth Disease Virus), todos siguiendo un mismo marco de lectura. Los virus de RNA de cadena positiva codifican poliproteínas que son cortadas

por proteinasas virales y celulares para producir proteínas maduras. Uno de los mecanismos empleados por estos virus son las secuencias 2A o secuencias que codifican péptidos similares que median el rompimiento de la poliproteína. La secuencia F2A se inestabiliza entre la glicina 2A y prolina 2B por medio de un mecanismo de salto ribosomal sin afectar la traducción de la siguiente secuencia de manera que se libera el primer segmento del polipéptido traducido y el ribosoma continua procesando el mismo RNA para traducir el siguiente segmento polipeptídico en el mismo marco de lectura (Chinnasamy *et al.*, 2006). La fusión de esos tres elementos fue realizada mediante SOE-PCR empleando los siguientes oligonucleótidos: GFP-F2A-F 5'-G CCA CCG TCG ACC ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG C-3', GFP-F2A-R 5'-GGA CTC GAC GTC TCC CGC AAG CTT AAG AAG GTC AAA ATT CAA CAG CTG TTT CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC -3', Puro-F2A-F 5'-TTT GAC CTT CTT AAG CTT GCG GGA GAC GTC GAG TCC AAC CCT GGG CCC ATG ACC GAG TAC AAG CCC AC-3' y Puro-F2A-R 5'-GGG CGG GCG TCA GGC ACC GGG CTT GC-3'. Se resalta la secuencia subrayada del elemento Kozak en el fragmento amplificado para GFP. Para producir el fragmento GFP-F2A se empleó como templado el plásmido pBS GFP descrito previamente y se amplificó un fragmento de 784 nt. Para producir el fragmento F2A-Puro (657 nt) se empleó como templado el plásmido pBabe-Puro. El producto de ambos fragmentos fusionados GFP-F2A-Puro (1405 nt) fue clonado en el vector pGEM T-Easy para generar el plásmido pGem GFP-F2A-Puro. Este plásmido fue digerido con las enzimas *Sall* y *NotI*, liberando el fragmento GFP-F2A-Puro (1422 nt) para reemplazar el gen de GFP

de los plásmidos pXM-gag GFP, pXM-250gag GFP y pXM-Δgag GFP y crear los plásmidos de esqueletos retrovirales pXM-gag GFP-F2A-Puro, pXM-250gag GFP-F2A-Puro y pXM-Δgag GFP-F2A-Puro (Figura 13).

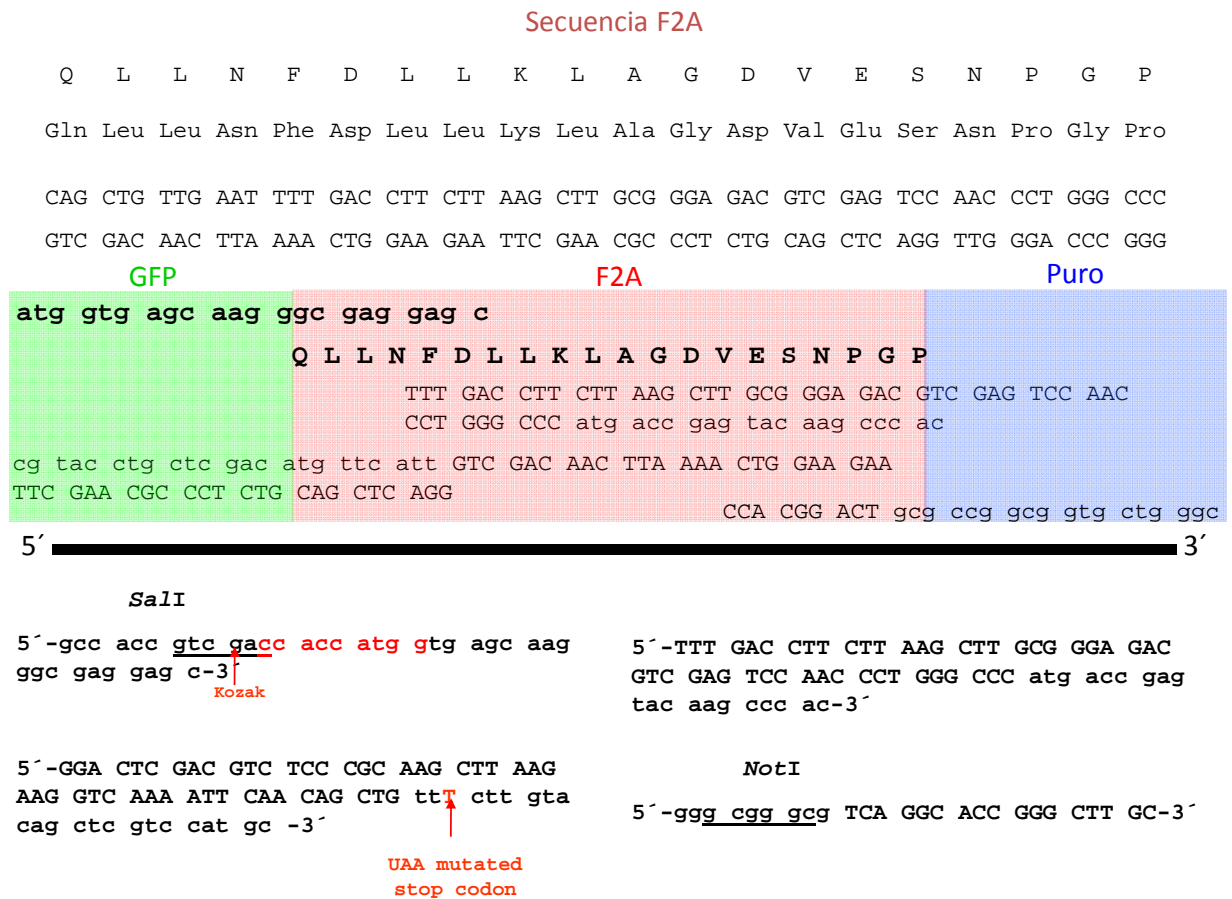


Figura 13. Estrategia para la generación de un bicistrón fusionado por la secuencia F2A.

4.8. Plásmidos de empaquetamiento

Los plásmidos de empaquetamiento corresponden a aquellos en los cuales se logra la expresión de las proteínas estructurales del retrovirus. Estos plásmidos, arreglados en dos construcciones diferentes, fueron generados tomando como DNA templado la clona VP62 de XMRV previamente reportada (GeneBank NC_007815.1 GI:89889045). Como ya se mencionó en la introducción, ambos marcos de lectura *gag-pol* y *env* son separados para minimizar el riesgo de generación de vectores retrovirales que porten secuencias nucleotídicas estructurales por recombinación.

Para generar el plásmido de expresión *gag-pol*, se realizó PCR a partir de 100 ng la clona VP62-XMRV (donada por el Dr. Hung Fan) y los siguientes oligonucleótidos: GagPol-1 F 5'-GCT AGC ATC ATG GGA CAG ACC GTA ACT AC-3' y GagPol-4 R 5'-TAT ACG GGG TTG AGT CCT CTA TG-3'; GagPol-3 5'-GAC TTG CTG ACT AAA CTA AAA GCC-3' y GagPol-6 5'-TTA GGG AAA GTG TCT GTC ATC GTG CGG CCG C-3'. Se amplificaron fragmentos de 4015 nt y 3483 nt, los cuales fueron clonados en el plásmido pGEM T-Easy. Los plásmidos pGEM GagPol1-4 y pGEM GagPol3-6 fueron digeridos con las enzimas *SaI* y *NotI*, de manera que el fragmento de 2279 nt del plásmido pGEM GagPol3-6 fue ligado en el plásmido pGEM GagPol1-4 para generar el plásmido pGEM GagPol. El plásmido pGEM GagPol fue digerido en los sitios *NheI* y *NotI* para liberar un fragmento de 5366 nt, el cual fue subclonado usando las mismas enzimas en el

vector plasmídico de expresión pcDNA3.1Hygro(+), para crear el plásmido de empaquetamiento pcDNA3.1 GagPol (Figura 14).

El ORF de env fue amplificado por PCR a partir de 100 ng de DNA genómico de la línea celular 22Rv1 y empleando los siguientes oligonucleótidos: Env-F y Env-R, amplificando un fragmento de 2001 nt el cual fue clonado en el plásmido pCR4 Blunt para crear el plásmido pCR4 Blunt Env. La digestión con las enzimas *SpeI* y *NotI* del plásmido pCR4 Blunt Env generó un fragmento de 2070 nt correspondiente al ORF de *env*. Este fragmento fue subclonado en el plásmido de expresión pcDNA3.1Zeo(-) en los sitios *XbaI* (compatible con *SpeI*) y *NotI* para generar el plásmido pcDNA3.1 Env (Figura 14).

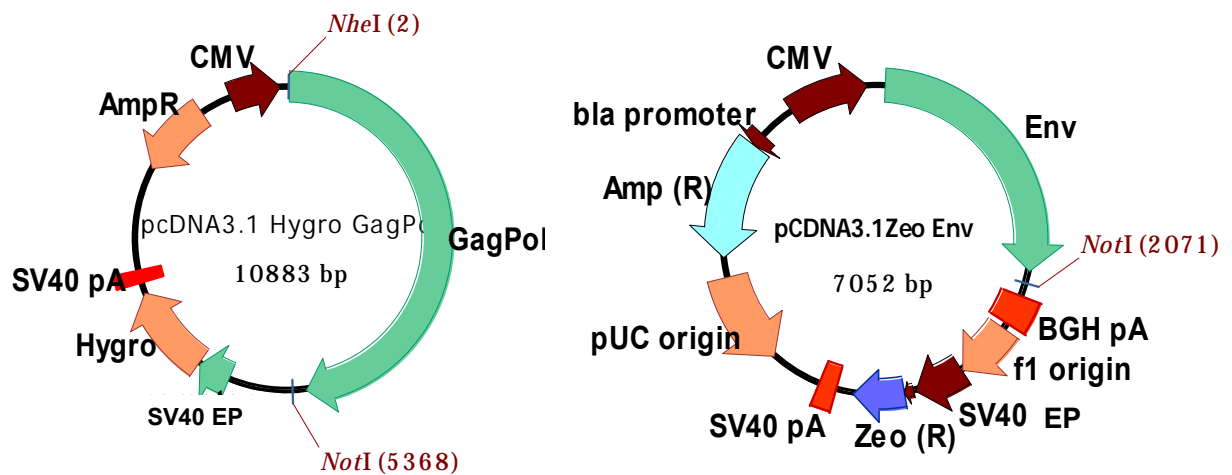


Figura 14. Plásmidos de empaquetamiento para la expresión de los genes estructurales *gag-pol* y *env*.

4.9. Establecimiento de la línea productora de proteínas de la envoltura de XMRV

El plásmido de empaquetamiento pcDNA3.1 Env fue purificado empleando el estuche PureYield™ Plasmid Midiprep System. En una placa de 6 pozos se sembraron 1×10^6 células 293T con medio DMEM modificado de Iscove completo (10% suero bovino fetal, 20 mM L-glutamina, 10 I.U. penicilina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomicina, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicina) (Iscove completo). Luego de 24 h, se realizó la transfección de 300 ng del plásmido pcDNA3.1 Env por el método de co-precipitación con fosfato de calcio. Después de 48 h de incubación bajo condiciones estándar de cultivo celular (37°C , 5% CO_2 , 95% humedad relativa), las células fueron despegadas de la superficie de la placa por tripsinización (tratamiento durante 5 min con 0.25% tripsina/2.21 mM EDTA en HBSS y condiciones estándar de cultivo celular) y recultivadas en placas de 100 mm bajo condiciones estándar de cultivo durante 48 h. Después, el medio fue suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de zeocina y cambiado cada 24 h por medio fresco con lavado previo con PBS. Luego de 15 días se observaron clonas celulares resistentes a zeocina, las cuales fueron levantadas con papel filtro estéril impregnado con 0.25% tripsina/2.21 mM EDTA en HBSS y resuspendidas en placas de 24 pozos con medio Iscove completo suplementado con zeocina. Las clonas celulares fueron propagadas y se analizó la expresión de env por PCR en tiempo real empleando el estuche SYBR Green PCR Master Mix con los siguientes oligonucleótidos: Env-1 y Env-2. Las clonas generadas fueron

congeladas en nitrógeno líquido con medio Iscove completo suplementado con 20% de suero bovino fetal, 10% de DMSO y 100 µg/mL de zeocina. Para determinar si existía la presencia de proteínas de env en la superficie, se empleó el suero de tres pacientes con CaP, previamente diagnosticados de ser portadores del XMRV, como anticuerpo primario (dilución 1:100) y ratón anti-IgG humano conjugado con AlexaFluor 644 (1:1000). Además se incluyó el suero de un individuo sano como control. Se realizó la inmunotinción incubando 1×10^5 células de cada clona con una dilución 1:100 de suero de paciente y 1:1000 de anti-IgG humano conjugado con AlexaFluor 644. Se llevó a cabo la citometría de flujo para determinar el número de células positivas.

4.10. Establecimiento de una línea celular para la expresión de las proteínas gag-pol de XMRV

Se sembraron 1×10^5 células en placas de seis pozos con medio completo y en condiciones de cultivo estándar. Después de 24 h, las células fueron transfectadas mediante precipitación con fosfato de calcio con 300 ng del plásmido pcDNA3.1Hygro GagPol y luego de 48 h de incubación en condiciones estándar de cultivo celular, el medio fue suplementado con 100 µg/mL de higromicina. El medio fue cambiado cada 24 h con medio completo suplementado con 100 µg/mL de higromicina. Las clonas seleccionadas fueron propagadas y congeladas para su posterior análisis. Se determinó la expresión

de transcriptasa reversa empleando el estuche The RetroSys™ C-type RT Activity (Innovagen, Suecia).

4.11. Generación de vectores retrovirales derivados del XMRV

Los plásmidos de los esqueletos retrovirales fueron transfectados (300 ng cada uno) mediante co-precipitación con fosfato de calcio en 5×10^5 células de clonas establecidas o LNCaP. Se colectaron sobrenadantes luego de 72 h de incubación a condiciones de cultivo estándar. Los sobrenadantes fueron filtrados con un filtro de $0.22 \mu\text{m}$ y almacenados a -80°C hasta su uso.

4.12. Infección mediada por centrifugación

Se sembraron 5×10^5 células en placas de 24 pozos con medio completo suplementado con 8 $\mu\text{g/mL}$ de polibreno. Luego de 24 h de incubación a condiciones estándar de cultivo, se reemplazó el medio con los sobrenadantes provenientes de la generación de vectores retrovirales por co-transfección. Las placas fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 120 min a temperatura de 22°C . Después se incubó bajo condiciones estándar durante 72 h y luego se determinó la expresión de GFP mediante citometría de flujo.

4.13. Citometría de flujo

El análisis de expresión de GFP en células transducidas se realizó mediante citometría de flujo en un FACSCalibur flow cytometer. Brevemente, la monocapa celular fue lavada con buffer PBS y luego cubierta con PBSE (PBS, 0.5 mM EDTA). Se incubaron de 5 a 20 min a condiciones de cultivo celular. Las células fueron transferidas a un tubo e incubadas en hielo de 5 a 20 min para disociar grumos, se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm a 4°C. Se lavaron con PBS para remover el EDTA y fueron contabilizadas. Se tomaron 5×10^5 células y fueron resuspendidas en PBSA frío (PBS, 0.02% azida de sodio) y colocadas en tubos Eppendorf 1.5 mL o pozos de placa de 96 pozos de fondo U o V para la cuantificación directa de GFP o Inmunotinción. En caso de cuantificación directa, las células fueron lavadas y resuspendidas en PBSF (PBS, 2% formaldehído) y colocadas a 4°C hasta su uso. En el caso de la inmunotinción, las células fueron centrifugadas (5 min, 1500 rpm, 4°C) y resuspendidas en 100 μ L de buffer de tinción para FACS (PBS o PBSA, 2% suero bovino fetal). Se agregó la cantidad de anticuerpo conjugado a fluorocromo o anticuerpo primario no conjugado mezclando con una pipeta. Las células fueron incubadas de 30 a 60 min en hielo protegidas de la luz. Se lavaron dos veces con PBSA frío. Para usar el anticuerpo secundario conjugado, las células fueron resuspendidas en buffer de tinción para FACS y se agregó la cantidad necesaria de anticuerpo secundario.

Las células fueron lavadas dos veces con PBSA frío y resuspendidas con PBSF y se mantuvieron protegidas de la luz hasta ser analizadas por citometría de flujo.

4.14. Cuantificación de transcriptasa reversa

La cuantificación de transcriptasa reversa se realizó empleando el The RetroSys™ C-type RT Activity Kit (Innovagen, Suecia). Este estuche está optimizado para la determinación cuantitativa de actividad de RT dependiente de Mn^{2+} de retrovirus tipo C tales como el MLV y el XMRV. Brevemente, la RT en la muestra sintetiza una cadena de DNA. El trifosfato de bromo-desoxiuridina (BrdUTP) en la mezcla de reacción es incorporado en el templado de oligonucleótido inmovilizado. El BrdUMP incorporado es cuantificado por el anticuerpo anti-BrdU conjugado a fosfatasa alcalina. La actividad de fosfatasa alcalina es colorimétricamente medida y es proporcional a la actividad de RT en la muestra.

4.15. Western blot para la identificación de proteínas de gag y env de XMRV

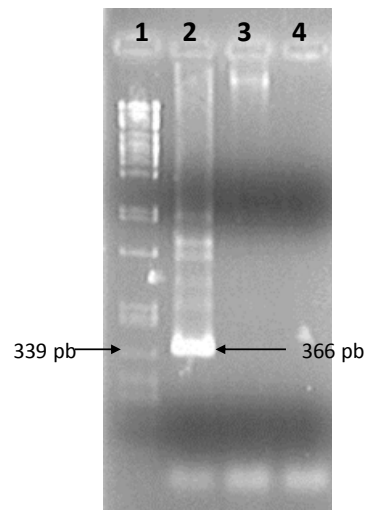
Para la detección de proteínas estructurales del XMRV, se sembraron 3×10^7 células LNCaP en placas de 100 mm o T75 un día antes de realizar la

transfección. Los plásmidos transfectados fueron cuantificados y verificados en gel para verificar su integridad. Se transfectaron 100 µg de cada vector empleando lipofectamina 2000 según indica el proveedor. Las células fueron incubadas bajo condiciones estándar de cultivo celular. Después de 96 h, se realizó extracción de proteínas. Las células fueron lavadas con PBS y cosechadas con PBS-EDTA 1 mM. El botón de células fue resuspendido con 20 µL de buffer de lisis: tritón X-100 1%, Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 1µL, PMSF 0.5M 1µL, inhibidor de proteasas 40µL, agua miliQ c.b.p. 1 mL. Se incubaron durante 20 min en hielo y centrifugadas a 14,000 rpm, 20 min a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y mantenido a -80°C hasta su uso. Los extractos fueron cuantificados con el método de Bradford. Alrededor de 100 µg de proteína fueron concentrados empleando metanol-clofoformo, para realizar electroforesis al 10% de acrilamida. La electrotransferencia en nitrocelulosa fue realizada a 80 mA, a 4°C durante toda la noche. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada durante 1 h a temperatura ambiente con PBS-Tween 0.5% - leche descremada 5%. El anticuerpo primario se incubó en PBS-Tween 0.5% - leche descremada 1% a una dilución 1:1000 y el secundario 1:10,000. La detección se realizó con los anticuerpos primarios monoclonal de rata anti-p30 (subunidad CA de gag) y un anticuerpo de cabra dirigido contra la gp70 de MLV. Como anticuerpos secundarios: conejo anti-IgG rata (Invitrogen) y conejo anti-IgG cabra (H+L)-HRP (Invitrogen). La quimioluminiscencia fue detectada con el Supersignal West Femto (Pierce, Rockford, IL) o Westernblotting Luminol Reagent (Santacruz Biotech, Santacruz, CA).

CAPÍTULO V:

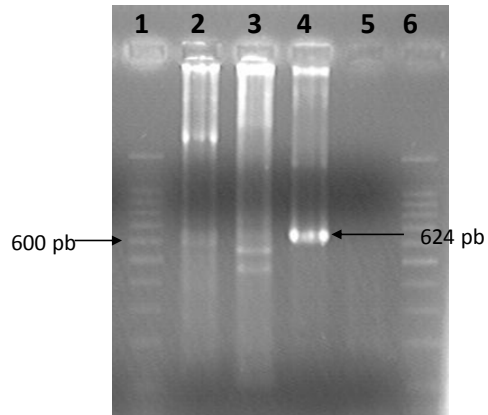
RESULTADOS

Para el aislamiento de las secuencias correspondientes a las regiones LTR se realizó PCR con los oligonucleótidos señalados en Métodos. En las figuras 15 y 16 se muestran las amplificaciones por PCR de las regiones LTR5' y LTR3', respectivamente. Los fragmentos obtenidos de 366 pb de LTR5' y 624 pb de LTR3', fueron clonados en el vector pCR2.1-Topo siguiendo las especificaciones de la casa comercial.



1. Lambda *PstI*
2. PCR LTR5 DNAg 22Rv1
3. PCR LTR5 Ad
4. PCR LTR5 S/T

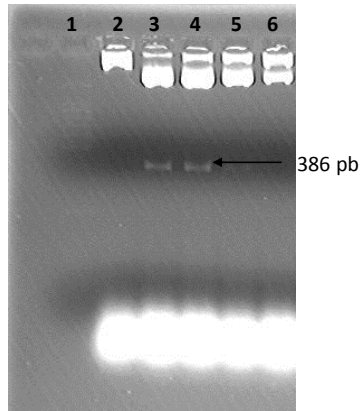
Figura 15. PCR para amplificar la LTR5 de XMRV.



1. Marcador PM 100 pb
2. PCR HeLa
3. PCR pAd
4. PCR 22Rv1
5. PCR ST
6. Marcador PM 100 pb

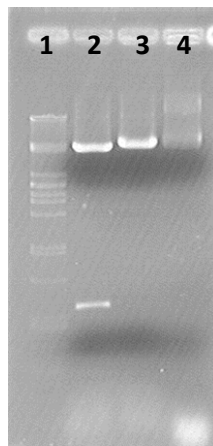
Figura 16. PCR para amplificar la LTR3 de XMRV.

A partir de los plásmidos pCR2.1-LTR5 y pCR2.1-LTR3 se generaron los vectores de expresión pGL3-LTR5 y pGL3-LTR3 (Figura 6). La caracterización de las clonas seleccionadas se muestra en las figuras 17 y 18, respectivamente.



1. Marcador PM 100 pb
2. Clona G1 *EcoRI*
3. Clona G2 *EcoRI*
4. Clona G3 *EcoRI*
5. Clona G4 *EcoRI*
6. Clona G5 *EcoRI*

Figura 17. Caracterización pGL-LTR5 por digestión con *EcoRI*.



1. Lambda *PstI*
2. pGL3-LTR3 *EcoRI*
3. pGL3-LTR3 *XmaI*
4. pGL3-LTR3

Figura 18. Caracterización pGL3-LTR3 por digestión con *EcoRI* y *XmaI*.

Los plásmidos pGL3-LTR5 y pGL3-LTR3 fueron transfectados en un panel de líneas celulares empleando lipofectamina como agente de transfección y siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Como controles se incluyeron los plásmidos pGL3-SV40 y pGL3-CMV y el plásmido pRL-TK para normalizar. Luego de 72 h de incubación a condiciones estándar de cultivo celular, se determinó la actividad de luciferasa en el luminómetro Veritas y siguiendo las especificaciones de la casa comercial. En la Figura 19, se muestran los resultados en Unidades Relativas de Luciferasa (Relative Luciferase Units, RLU) alcanzadas en cada línea celular, por triplicado. Los datos fueron ajustados empleando la cuantificación de actividad de luciferasa bajo el promotor SV40 como unidad de referencia y graficados en la figura 20 para el promotor U3 y potenciador U5. No existe una clara tendencia a cierto tipo celular; mientras que para las líneas de cérvix (SiHa) y de hígado (HepG2), la actividad del promotor U3 localizado en LTR3 fue similar a la actividad del SV40, en células de riñón (HEK293) y próstata (22Rv1) la potencia transcripcional de U3 fue 50% menor con respecto a la lograda por el promotor de referencia SV40. Sin embargo, en otra línea de próstata, PC-3, la actividad del promotor U3 fue un 50% mayor que la actividad de SV40.

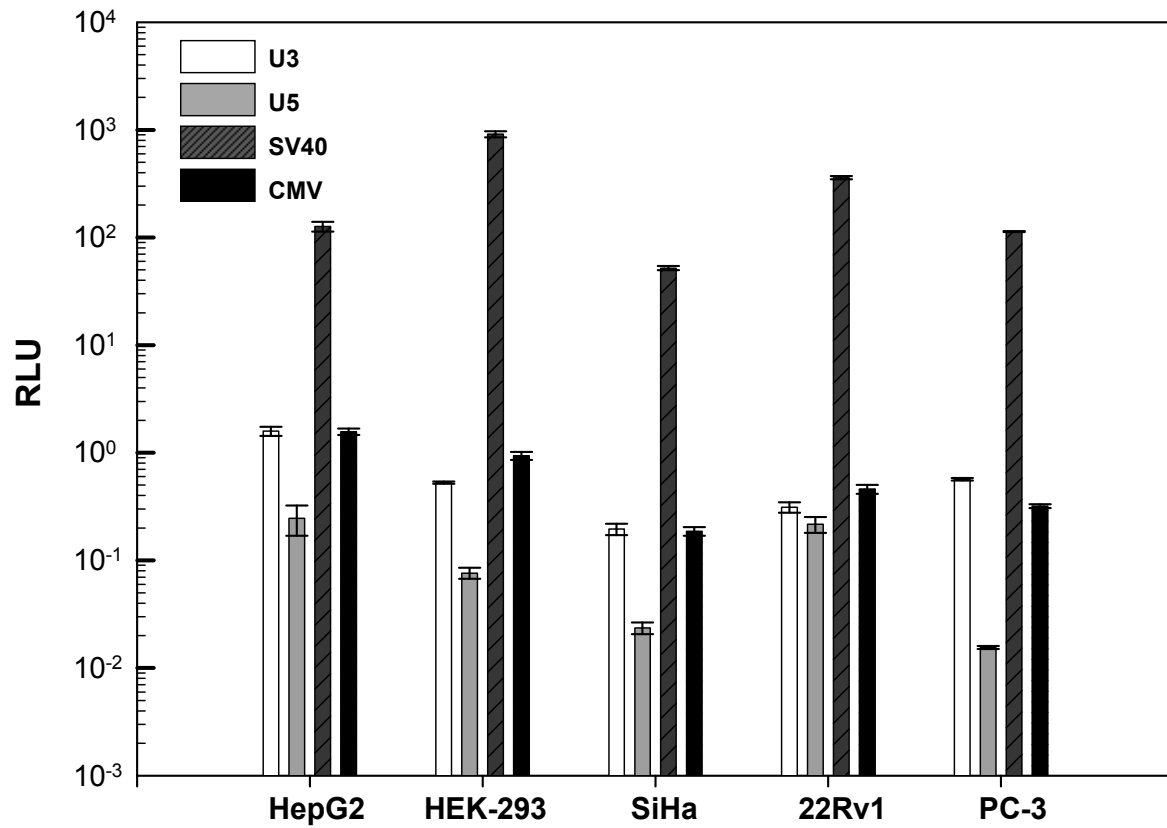


Figura 19. Determinación de la potencia del promotor U3 de XMRV por medición de actividad de luciferasa. U5, pGL3-LTR5; U3, pGL3-LTR3; SV40, pGL3-SV40; CMV, pGL3-CMV.

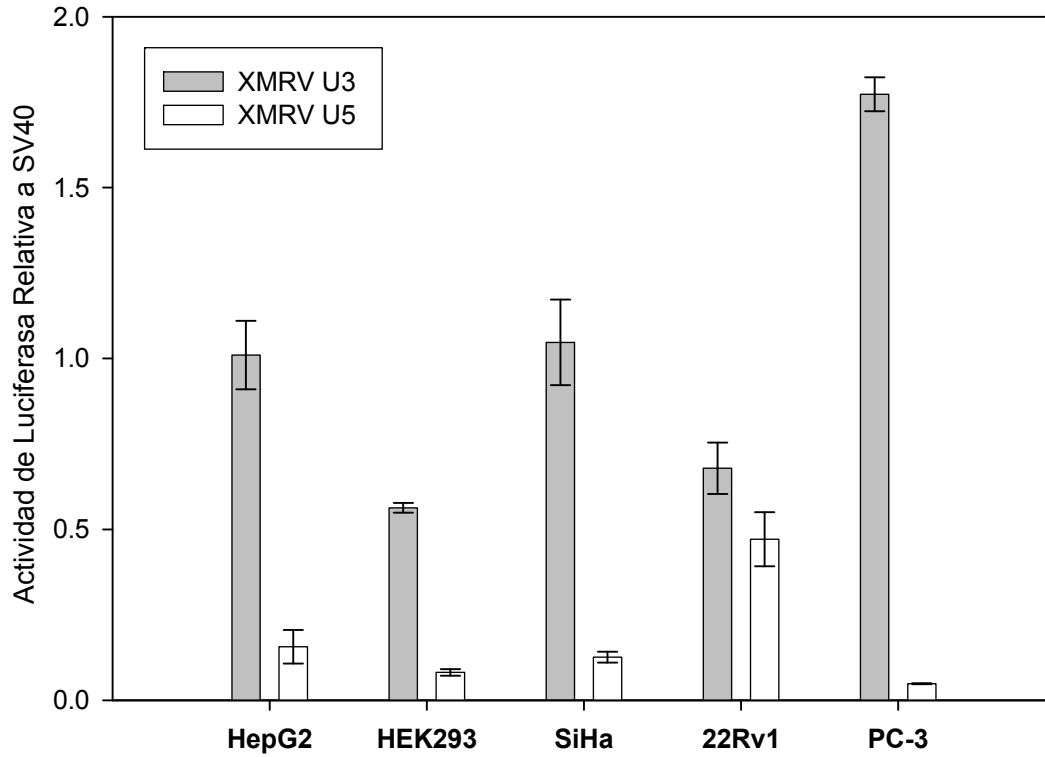


Figura 20. Actividad relativa del promotor U3 de XMRV.

Dado que las regiones LTR del XMRV mantienen su potencia promotora, se puede deducir que son funcionales, por lo tanto es posible generar genomas de vectores retrovirales derivados del XMRV. Se generaron una serie de vectores básicos de expresión en los cuales las LTR 5' y 3' se encontraban flanqueando el gen reportero GFP (Figura 21). En primer lugar se encuentra la LTR 5' y enseguida la señal de encapsidación, en la cual se encuentran elementos de corte y empalme donadores (SD) y un PBS. Como elemento para mejorar la encapsidación se mantuvo una región de 500 pb y 250 pb del gen *gag* en el cual

el inicio de la traducción (ATG) fue mutado para mejorar la bioseguridad. Al final del vector se mantiene la LTR 3'.

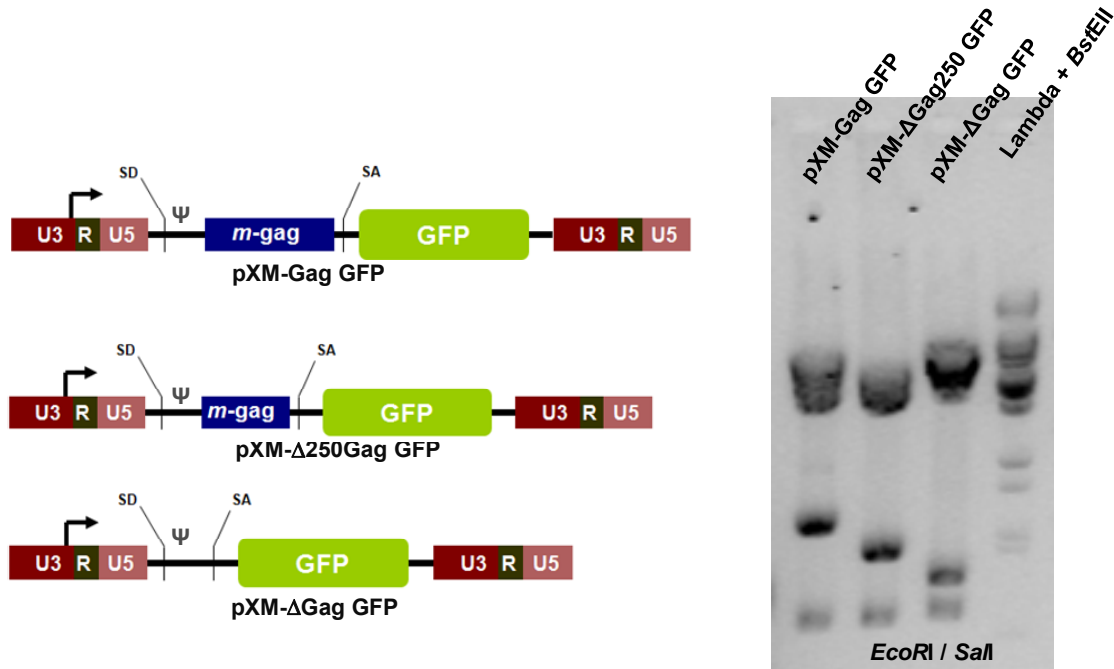


Figura 21. Esqueletos genómicos de vectores retrovirales derivados del XMRV.

Además de los esqueletos genómicos de los vectores retrovirales derivados del XMRV, también se generaron los plásmidos de empaquetamiento, aislando los marcos de lectura para los genes *gag-pol* y *env* por PCR. En la figura 22 se muestra los geles de la construcción pGEM-GagPol (*izquierda*) y pcDNA3.1 GagPol Hygro (*derecha*).

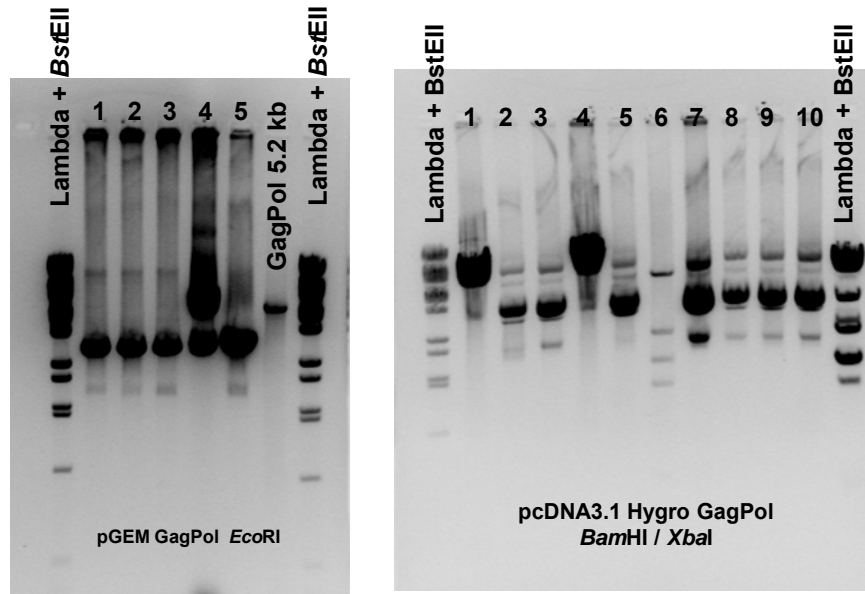


Figura 22. Plásmido de expresión de *gag-pol* de XMRV.

También se generó el plásmido de expresión para las proteínas del gen *env* del XMRV (Figura 23). El gen *env* se clonó en el vector pCR4-TopoBlunt y las clonas fueron analizadas por PCR (*izquierda*) y subclonado en el plásmido pCDNA3.1-Zeo para generar el plásmido pCDNA3.1 Env Zeo (*derecha*).

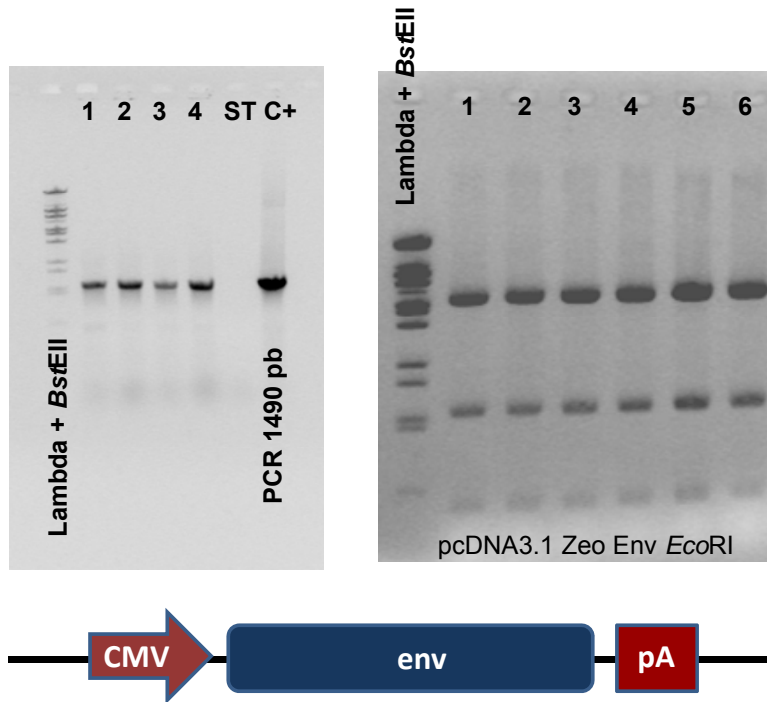


Figura 23. Plásmido de expresión de *env* de XMRV.

Todas las secuencias aisladas fueron secuenciadas y analizadas. No se encontraron mutaciones (deleciones o amplificaciones) que cambien el sentido del marco de lectura.

Luego de haber transfectado las células 293T y establecido las clonas resistentes a zeocina para la expresión del gen *env*, se realizó una Q-PCR de algunas de las clonas seleccionadas para la cuantificación de la expresión del gen *env*. La Q-PCR demostró que la mayoría de las clonas seleccionadas mostraban un nivel de expresión del gen *env* un poco por debajo de la expresión del gen constitutivo *GAPDH* (Figura 24).

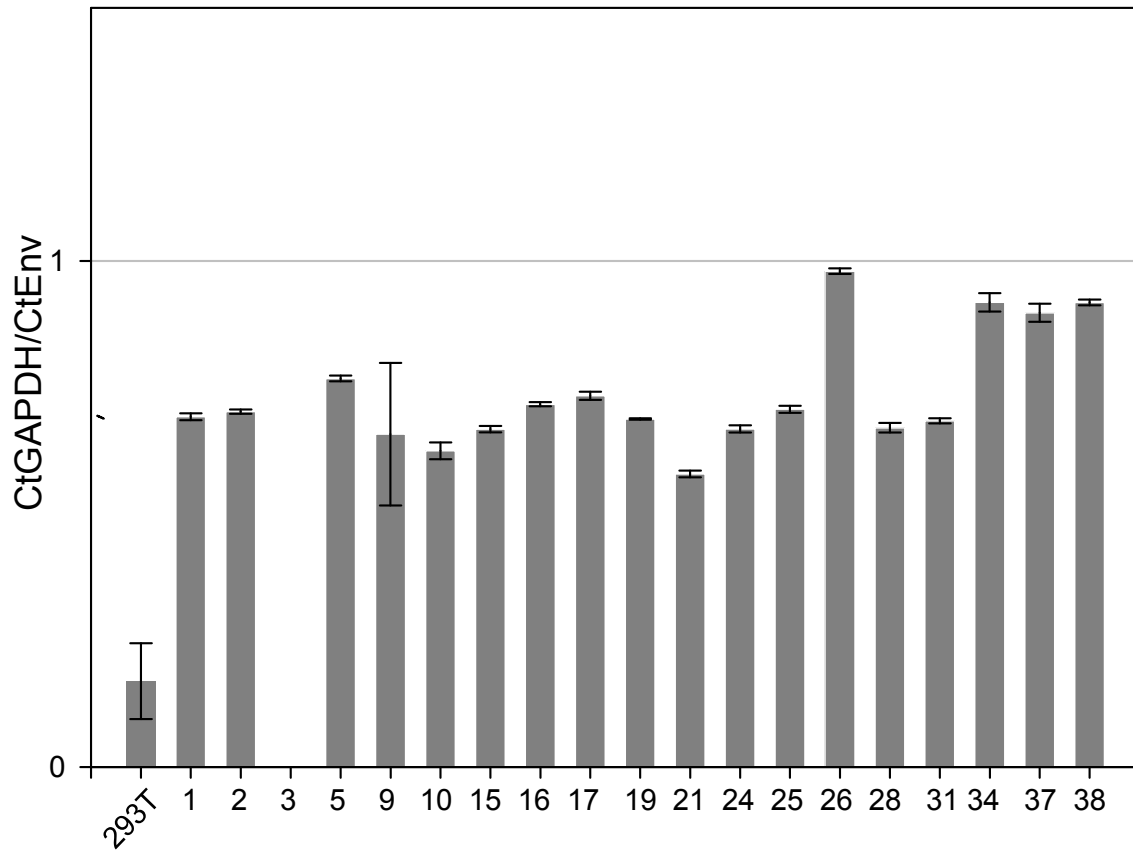


Figura 24. Cuantificación relativa mediante PCR en tiempo real de RNAm de *env* de XMRV.

El reciente descubrimiento del XMRV conlleva la enorme desventaja de la carencia de anticuerpos poli o monoclonales específicos contra las subunidades proteicas estructurales del virión. Para poder detectar la presencia de las proteínas del gen *env*, se optó por el empleo de suero de pacientes previamente diagnosticados que portaban el XMRV en tejido prostático. Dicho antisuero fue empleado como anticuerpo primario a una dilución 1:1000 y como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo de ratón anti-IgG humano conjugado con Alexafluor 644 a una dilución 1:1000. En la figura 25 se muestra la Intensidad

Media de Fluorescencia (MFI, Media Fluorescence Intensity) de cada una de las clonas 293T resistentes a zeocina. Como se puede observar, a diferencia de los controles montados (anticuerpo secundario y antisuero de sujetos no infectados), las clonas presentan antígenos del gen *env* en la superficie.

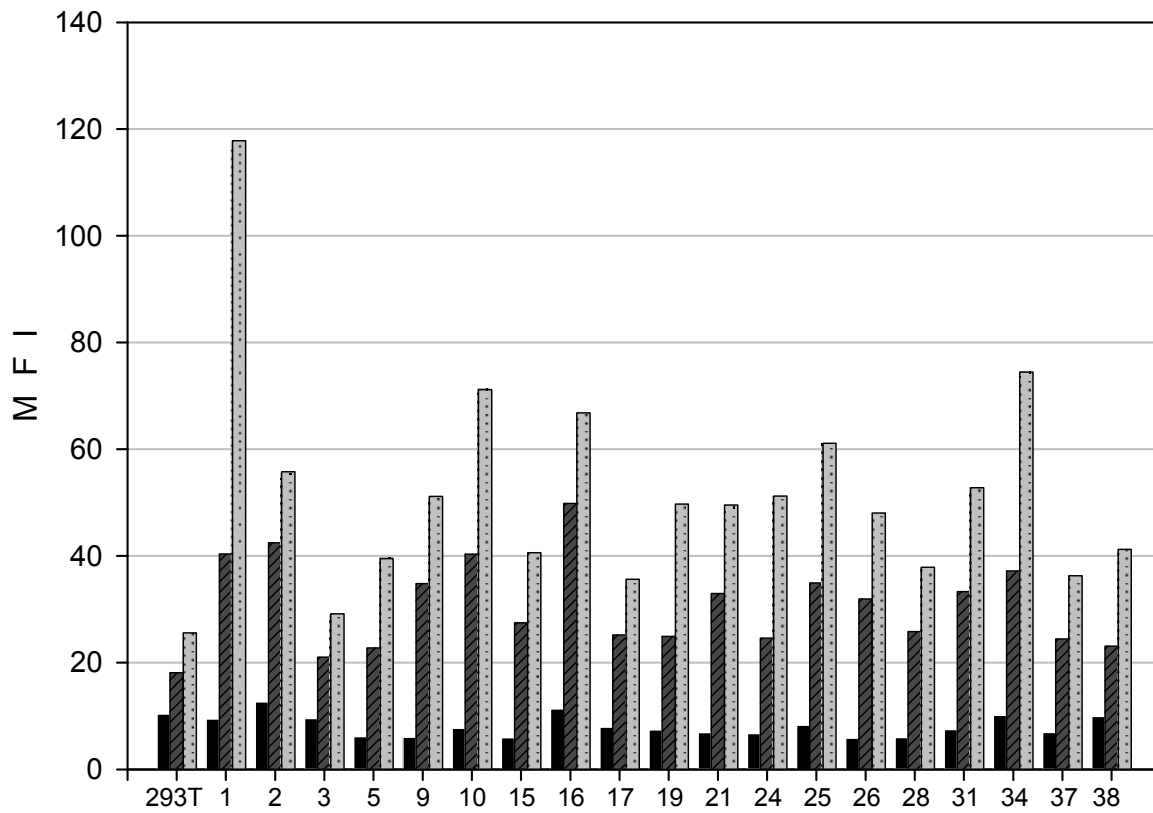


Figura 25. Citometría de flujo con suero de paciente XMRV-positivo.

Luego del establecimiento de clonas para la expresión de *env*, se seleccionó una de ellas para el establecimiento de la clona que expresaría los genes *gag-pol*. Después de haber realizado la selección en presencia de higromicina B, se

empleó un pool de todas las clonas seleccionadas para transfectar en ellas los plásmidos de genomas de vectores retrovirales. Se recolectaron sobrenadantes después de 72 h de incubación en condiciones estándar de cultivo celular. Los sobrenadantes fueron empleados para la cuantificación de actividad de RT que es codificada por el gen *pol*, ya que esta enzima es empaquetada dentro de los viriones liberados al medio. Los resultados se muestran en la figura 26, en la que se incluye una gráfica de la curva estándar. Se puede observar que hubo una mayor cantidad de RT en aquellos sobrenadantes que correspondieron a los viriones XM-dgag-GFP, lo cual puede significar un mejor empaquetamiento de estos genomas en el virión. De igual manera, se empleó un vector de referencia (pMFG-CCR5, derivado del MLV) para investigar el empaquetamiento de genomas ajenos al XMRV y se puede observar que existe formación de partículas retrovirales con dicho vector.

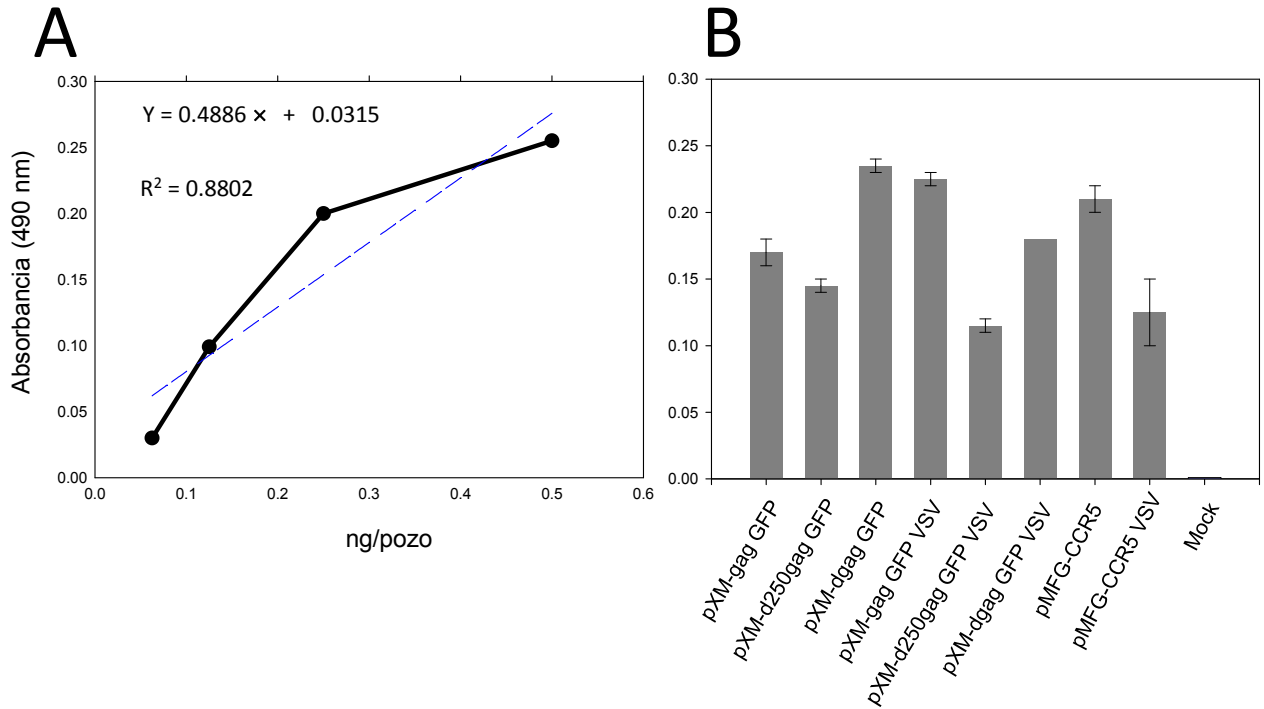


Figura 26. Cuantificación de actividad de transcriptasa reversa en sobrenadantes. A) Curva estándar de la expresión de RT. B) Determinación de RT en sobrenadantes de células de empaquetamiento que producen vectores, se muestra media \pm error estándar de ensayos triplicados.

Los sobrenadantes fueron empleados para la transducción mediada por centrifugación (spinflection) de células 293T. Después de 72 h de incubación a condiciones estándar de cultivo celular, se analizaron las células transducidas para la expresión de GFP mediante citometría de flujo (Figura 27). Se obtuvieron porcentajes de entre 10 y 20% de células transducidas para los sobrenadantes con los vectores XM. No hubo un cambio significativo en la infectividad de los vectores XM al ser pseudotipados con la glicoproteína de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV-g). El estudio de trans-complementación con un

vector MFG demuestra que las proteínas estructurales del XMRV son capaces de encapsidar genomas de retrovirus no asociados al XMRV.

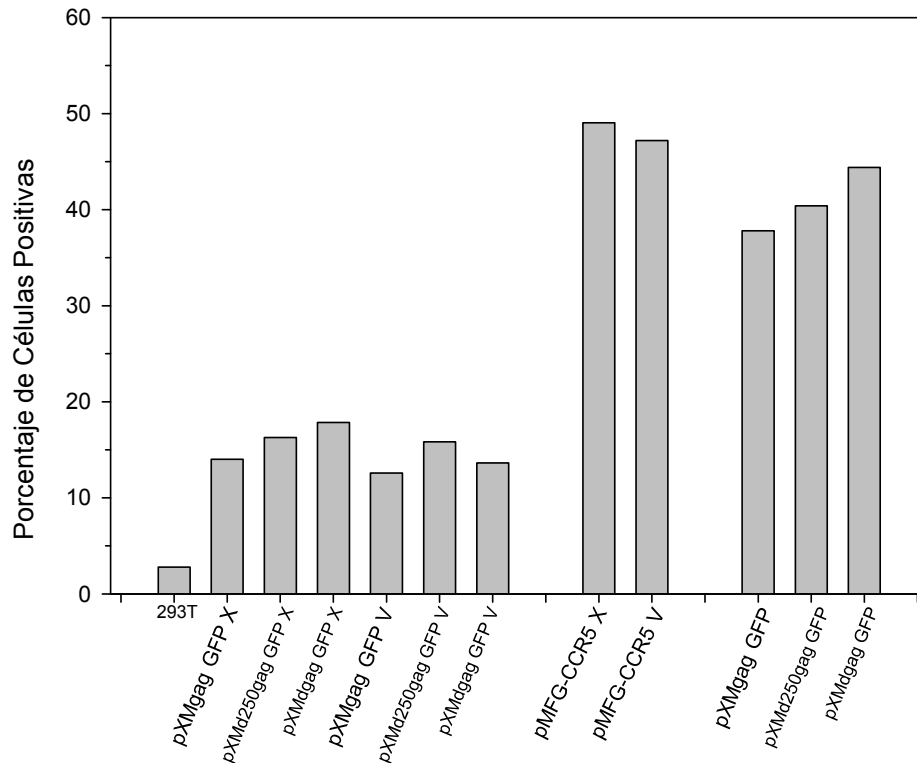


Figura 27. Porcentaje de células GFP-positivas y ensayo de complementación genética de un vector derivado de MLV (CCR5).

Los bajos títulos de vectores retrovirales XM obtenidos en células 293T creó la inquietud de cambiar la línea celular de empaquetamiento a una derivada de próstata y susceptible a la infección por XMRV. La línea de elección fue la LNCaP, la cual ha demostrado ser susceptible a la infección por la carencia de respuesta al estímulo por IFN- γ . Esta línea se transfectó con el plásmido de empaquetamiento pcDNA3.1 GagPol Hygro y luego de 96 h se extrajeron las

proteínas para realizar Western blot para la detección de la subunidad p30 del gen gag con un anticuerpo monoclonal de rata anti-p30 (amablemente donado por los Drs. Sandra and Francis Ruscetti). Como control se empleó la línea superinfectada 22Rv1. En la figura 28 se puede observar la detección de la subunidad p30 en células LNCaP transfectadas con el plásmido pcDNA3.1 GagPol Hygro.

Al igual que con la subunidad CA de gag, se realizó Western blot para la detección de la región SU de env mediante reacción cruzada con un anticuerpo de cabra dirigido contra la gp70 de MLV, este anticuerpo fue donado por el Dr. John Elder. La figura 29 muestra la detección de la gp70 de XMRV en células LNCaP transfectadas con los plásmidos pHIS-envX, pcDNA3.1Zeo-env y pJD-1 Amphi, además del control positivo con un extracto de 22Rv1 y control negativo LNCaP sin transfectar.

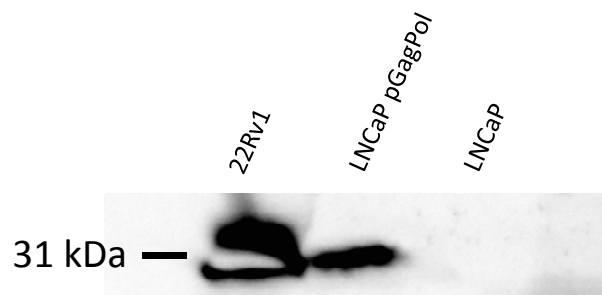


Figura 28. Western Blot para la detección de la subunidad p30 (CA) en células LNCaP transfectadas con el plásmido de empaquetamiento pcDNA3.1Hygro GagPol.

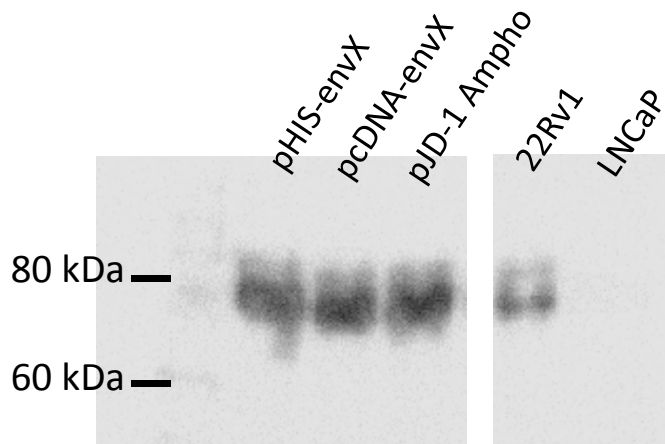


Figura 29. Western Blot para la detección de la subunidad gp70 (SU) en células LNCaP transfectadas con el plásmido de empaquetamiento pcDNA3.1Zeo-Env.

Se realizaron cambios en la estructura del genoma retroviral del vector XM-dgag para mejorar su eficacia. Se incluyó el potenciador de CMV río arriba del promotor U3, el gen GFP fue cambiado por un cassette de expresión con el promotor CMV dirigiendo la expresión del gen luciferasa y se agregó la región central de polipurinas (PPT, PolyPurine Central Tract) para proveer de resistencia a la actividad de RNasaH de la transcriptasa reversa al realizar la retrotranscripción (Figura 30).

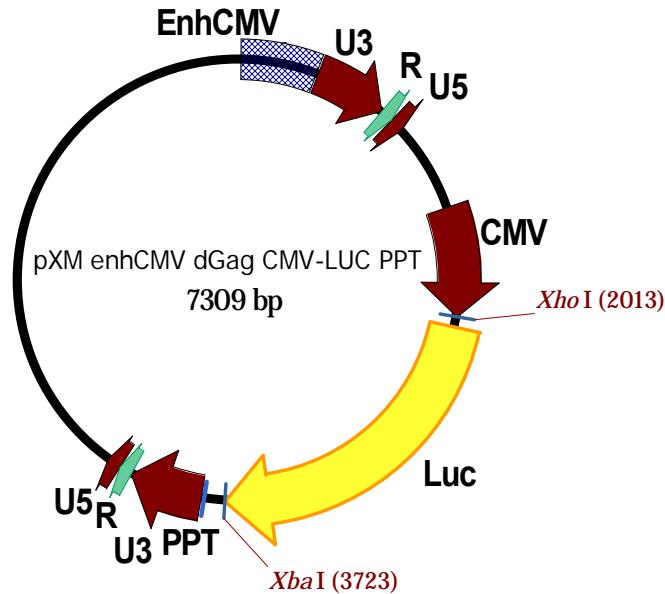


Figura 30. Mapa del genoma retroviral pXM enhCMV Δ gag CMV-Luc PPT.

Se co-transfectaron los plásmidos de empaquetamiento (gag-pol y env) y el genoma de vector retroviral (XM-CMV-Luc-PPT) en la línea LNCaP y los sobrenadantes fueron empleados para transducir células LNCaP y luego de 72 h de incubación a condiciones estándar de cultivo celular se determinó la actividad de luciferasa siguiendo las especificaciones del proveedor. La figura 31 muestra los resultados de RLU obtenidos para el vector prueba (pXMenh CMV-Luc), como control un vector vacío (pXMenh CMV-GFP) y la transfección por fosfato de calcio de pGL3-CMV. Hubo buenos niveles de expresión de luciferasa con el vector retroviral XM-Luc. En comparación con células transfectadas con PGL3-CMV, el nivel de expresión quedó al menos un orden de magnitud por debajo de la alcanzada con este control.

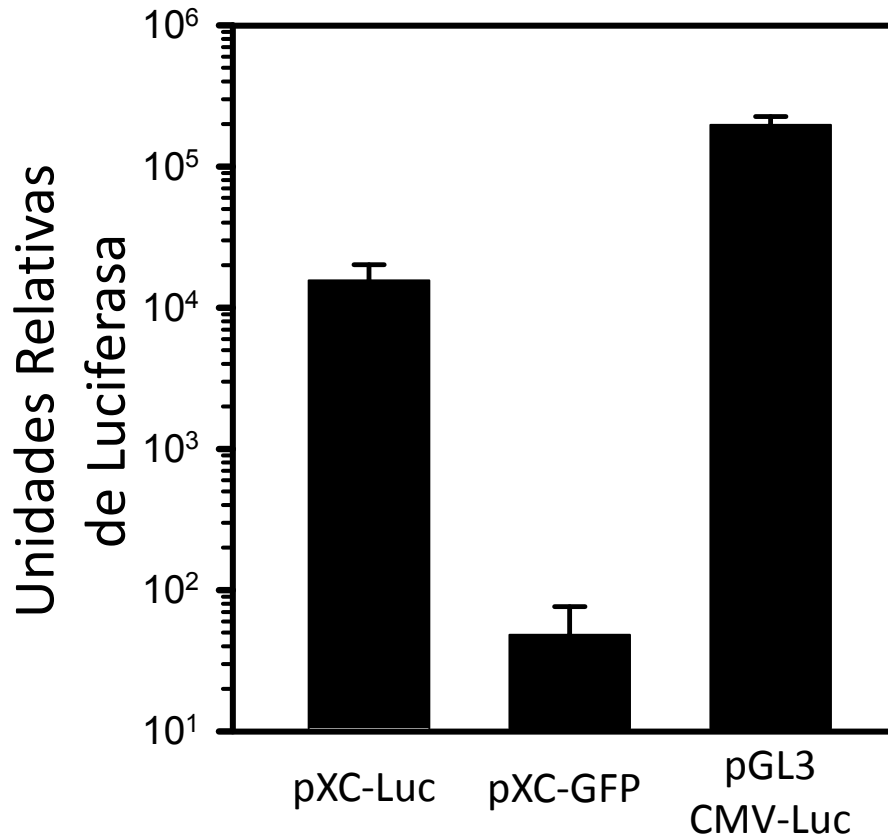


Figura 31. Producción de partículas retrovirales XMRV a partir de la co-precipitación con calcio en células LNCaP, se muestra media \pm error estándar de ensayos triplicados.

Los sobrenadantes también fueron empleados para investigar la eficacia de transducción de otras líneas celulares. Se emplearon células HeLa y 293T en la transducción con el vector XMenh CMV-Luc-PPT. Los niveles de expresión de luciferasa por el vector XM fueron inferiores a lo observado con la línea celular LNCaP. Existe una tendencia del vector XM a ser más eficaz en la línea LNCaP cuando se compara con la línea 293T (Figura 32).

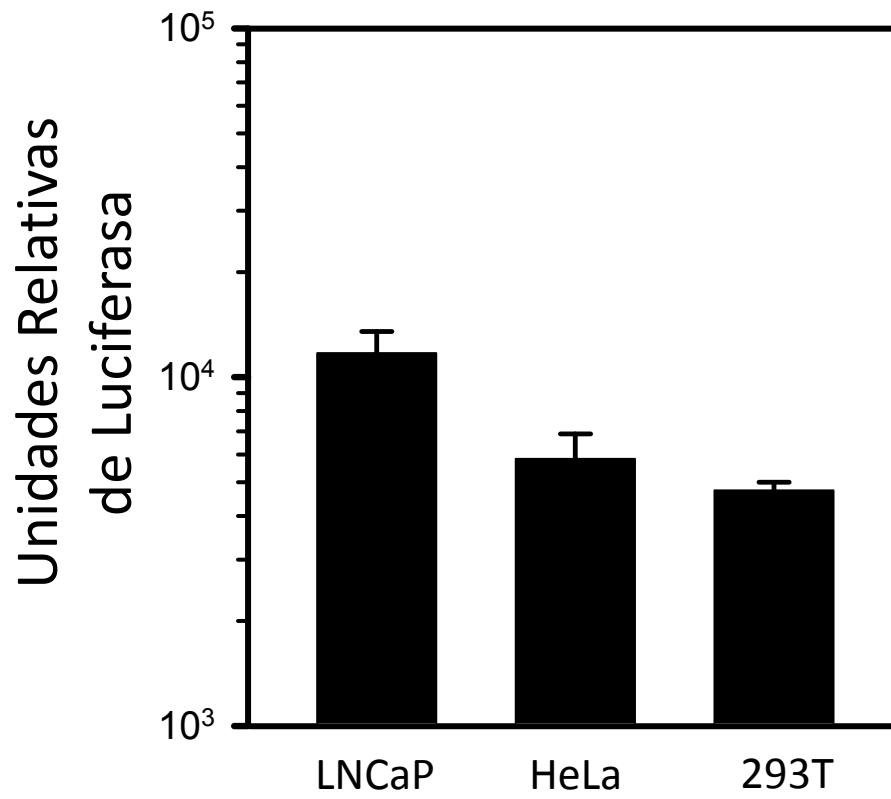


Figura 32. Transducción con el vector pXMenh CMV-Luc PPT en diferentes líneas celulares, se muestra media \pm error estándar de ensayos triplicados.

CAPÍTULO VI:

DISCUSIÓN

La generación de vectores retrovirales como herramientas de biología molecular ha marcado significativamente los avances en la biomedicina y biotecnología. Los retrovirus son manipulados para ser incapaces de realizar la replicación y portar genes de transferencia génica, todo esto debido a la remoción de los genes *gag*, *pol* y *env* de su genoma, los cuales son reemplazados por el cassette de expresión que contiene el transgen de interés. Los principales elementos LTR y señal de encapsidación se mantienen para lograr la expresión del transgen y empaquetamiento en cápsides virales durante la producción del vector. Como resultado, los vectores mantienen su capacidad de transducir una célula y expresar el gen ajeno a su genoma, pero no pueden producir partículas virales una vez que realizan la transducción, debido a que carecen de los genes estructurales y enzimáticos para lograrlo. Con el objetivo de facilitar la producción, los genes *gag*, *pol* y *env* se introducen en una línea celular murina o humana, de manera que las proteínas estructurales y enzimáticas son producidas en *trans* e interaccionan para constituir las partículas de vectores retrovirales. Esta línea se conoce como línea celular de empaquetamiento y son transfectadas de manera estable o temporal con plásmidos que codifican los

genomas del vector retroviral que contienen el transgen de interés. Luego de la transfección, los genomas son expresados, empaquetados y liberados al medio como retrovirus de replicación no-competente. Los vectores retrovirales son entonces cosechados del medio de cultivo y purificados mediante ultracentrifugación. Este protocolo básico fue establecido para la generación de vectores retrovirales derivados del XMRV.

El XMRV se ha asociado a CaP. Está reconocido como un virus murino que no puede infectar células de ratón, pero que puede infectar células humanas (Aloia *et al.*, 2010). Su estructura genética corresponde a los retrovirus convencionales, en la que regiones *cis*-reguladoras (LTRs) se encuentran flanqueando un juego de tres genes estructurales (*gag-pol* y *env*). El gen *gag* codifican la poliproteína que formará la cápside viral en tres capas: MA, CA y NC. El gen *pol* codifican las enzimas necesarias para realizar la síntesis de DNA a partir de RNA (RT) y la integración en el genoma huésped (IN). El gen *env* son aquellos que le permiten poder unirse a receptores de superficie y en el caso del XMRV, le proporciona la característica de xenotropismo; este gen expresa las subunidades TM y SU que forman las espículas que se proyectan al exterior de la envoltura viral.

La actividad *cis*-reguladora (promotor y potenciador) de las regiones LTRs del XMRV es fundamental para investigar la factibilidad de sus secuencias de generar vectores retrovirales de primera generación. La región promotora U3 del XMRV mantiene una potencia transcripcional muy similar a la lograda por el

promotor de referencia del SV40. En 2010, Stieler y cols., demostraron que la potencia transcripcional de la región LTR del XMRV en células 293T se mantenía a niveles bajos, mientras que en este estudio se observaron resultados similares en la cuantificación de actividad de luciferasa (Stieler *et al.*, 2010). A pesar de que se sabe que en la región U3 se encuentra un elemento de unión a andrógenos (ARE, Androgen Response Element), no se observó preferencia por las células prostáticas 22Rv1 en comparación con las células hepáticas HepG2 y cervicales SiHa. Lo anterior probablemente se debe a que la línea celular 22Rv1 se encuentra superinfectada por el XMRV y demasiadas copias del promotor U3 minimicen el efecto de la construcción transfectada. Un resultado interesante fue encontrar una actividad incrementada del promotor U3 en células PC-3 de próstata, de la cual se sabe existe una baja actividad de testosterona-5-alfa reductasa (necesaria para la activación de testosterona a su forma activa), por lo que se puede sugerir que la presencia del ARE no refleja potencia transcripcional selectiva a células de próstata. Sin embargo, el alto grado de metástasis de la cual la línea celular PC-3 (metástasis de hueso grado IV) puede significar regulación por otros factores de transcripción diferentes al ARE.

Dentro del diseño y manipulación de vectores retrovirales, la encapsidación es un paso importante para mejorar los títulos de los vectores obtenidos. Con los tres vectores “tipo” generados (XM-gag GFP, XM- Δ 250gag GFP, XM- Δ gag GFP) se buscó delimitar una región mínima de encapsidación. Se sabe que las secuencias *gag* son capaces de ser reconocidas por su proteína y facilitan así la

encapsidación de genomas retrovirales (Bowzard *et al.*, 1998; Patience *et al.*, 1998; Rulli *et al.*, 2007). Es por eso que se mantuvo una región de gag en dos vectores (XM-gag GFP, XM- Δ 250gag GFP). Sin embargo, las mejores lecturas de transducción por determinación de células GFP+ fueron logradas con el vector que carece de gag (XM- Δ gag GFP). Otros estudios han demostrado que la eliminación de gag tiene poco efecto sobre los títulos de vectores producidos, pero que mejoran la bioseguridad, al reducir las secuencias que pueden generar RCR por recombinación (Zhao *et al.*, 2000). Por lo anterior podemos decir que el vector XM- Δ gag GFP mantiene buenas características de bioseguridad. Sin embargo, los bajos títulos de los vectores XM continúan significando un obstáculo para el sistema ensayado.

Con el objetivo de mejorar los títulos de los vectores XM, se realizaron modificaciones en la estructura del esqueleto genómico del mejor vector (XM- Δ gag GFP). Además se optó por cambiar la línea celular de empaquetamiento con el fin de mantener las posibles regulaciones postranscripcionales y postraduccionales nativas presentes en una infección en células de próstata. Es por eso que se empleó la línea LNCaP, la cual ha demostrado ser ampliamente susceptible a la infección por el XMRV (Rodríguez y Goff, 2010). De esta manera, la señal del gen reportero luciferasa por el vector XM enh CMV-Luc PPT incrementó notoriamente después de transducir células prostáticas (LNCaP), riñón (293T) y cérvix (HeLa). Dado que la mayor actividad se obtiene en células LNCaP, es posible que existan una serie de mecanismos que faciliten

el desensamblaje de la partícula viral, la formación del complejo de preintegración, la exportación de mensajeros virales al citoplasma, etc.

Con lo anterior se demuestra la factibilidad de generar partículas de vectores retrovirales derivadas del XMRV. Como perspectivas podemos mencionar las siguientes: (A) mejorar los títulos retrovirales estableciendo líneas de empaquetamiento estables derivadas de cáncer de próstata, (B) modificar la especificidad del vector por células tumorales mediante el empleo de otras proteínas de superficie y promotores tejido específicos y (C) debido a que los RCR pueden originarse por recombinación homóloga, es necesario determinar su presencia en sobrenadantes de vectores retrovirales por inoculación en líneas celulares permisivas (ensayo de formación de focos en células PG-4 S+L-) para amplificar su la presencia potencial de RCR (Uchida *et al.*, 2004).

CAPÍTULO VII:

CONCLUSIONES

En este trabajo se logró:

- 1) La generación de un vector retroviral derivado del XMRV.
- 2) El vector XM representa el primer vector gammarretroviral humano, ya que los anteriores han sido desarrollados a partir del MLV.
- 3) La funcionalidad de este vector queda demostrada determinando la actividad del gen reportero que expresa. La célula de empaquetamiento 293T, tradicionalmente la de elección para estos vectores, no es la más adecuada para generar altos títulos del vector, sin embargo, la línea LNCaP es más eficiente para la producción de partículas retrovirales.

CAPÍTULO VII:

BIBLIOGRAFÍA

Aloia AL, Sfanos KS, Isaacs WB, Zheng Q, Maldarelli F, De Marzo AM, Rein A. 2010. XMRV: A New Virus in Prostate Cancer?. *Cancer Res.* 70(24):10028-10033.

Anderson WF. 1984. Prospects for human gene therapy. *Science.* 226(4673):401-409.

Anderson WF. 1985. Human gene therapy: scientific and ethical considerations. *J Med Philos.* 10(3):275-291.

Baraniuk JN. 2010. Xenotropic murine leukemia virus-related virus in chronic fatigue syndrome and prostate cancer. *Curr Allergy Asthma Rep.* 10(3):210-214.

Battini JL, Rasko JE, Miller AD. A human cell-surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses: possible role in G protein-coupled signal transduction. *PNAS.* 96(4):1385-1390.

Blattner WA. 1999. Human retroviruses: their role in cancer. *Proc Assoc Am Physicians.* 111(6):563-572.

Blissenbach M, Grewe B, Hoffmann B, Brandt S, Uberla K. 2010. Nuclear RNA export and packaging functions of HIV-1 Rev revisited. *J Virol.* 84(13):6598-6604.

Bowzard JB, Bennett RP, Krishna NK, Ernst SM, Rein A, Wills JW. 1998. Importance of basic residues in the nucleocapsid sequence for retrovirus Gag assembly and complementation rescue. *J Virol.* 72(11):9034-9044.

Cardiff RD, Kenney N. 2007. Mouse mammary tumor biology: a short history. *Adv Cancer Res.* 98:53-116.

Castelli J, Wood KA, Youle RJ. 1998. The 2-5A system in viral infection and apoptosis. *Biomed Pharmacother.* 52(9):386-390.

Chinnasamy D, Milsom MD, Shaffer J, Neuenfeldt J, Shaaban AF, Margison GP, Fairbairn LJ, Chinnasamy N. 2006. Multicistronic lentiviral vectors containing the FMDV 2A cleavage factor demonstrate robust expression of encoded genes at limiting MOI. *Virology J.* 3:14.

Colman PM, Lawrence MC. 2003. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(4):309-19.

Coté ML, Roth MJ. 2008. Murine leukemia virus reverse transcriptase: structural comparison with HIV-1 reverse transcriptase. *Virus Res.* 134(1-2):186-202.

Delamarre L, Rosenberg AR, Pique C, Pham D, Callebaut I, Dokh elar MC. 1996. The HTLV-I envelope glycoproteins: structure and functions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1(S1):S85-S91.

Dubina M, Goldenberg G. 2009. Viral-associated nonmelanoma skin cancers: a review. *Am J Dermatopathol.* 31(6):561-573

Dudley, Jaquelin. 2011. Retroviruses and Insights into Cancer. 1^a Edici n. Vol. XII. 363 p. 44. Springer.

Engels EA. 2007. Infectious agents as causes of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16(3):401-404.

Fischer N, Hellwinkel O, Schulz C, Chun FK, Huland H, Aepfelbacher M, Schlomm T. 2008. Prevalence of human gammaretrovirus XMRV in sporadic prostate cancer. *J Clin Virol.* 43(3):277-283.

Fischer N, Schulz C, Stieler K, Hohn O, Lange C, Drosten C, Aepfelbacher M. 2010. Xenotropic murine leukemia virus-related gammaretrovirus in respiratory tract. *Emerg Infect Dis.* 16(6):1000-1002.

Flügel RM, Pfrepper KI. 2003. Proteolytic processing of foamy virus Gag and Pol proteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 277:63-88.

Freed EO. 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology.* 251(1):1-15.

Hansen AC, Pedersen FS. 2002. Safety features of retroviral vectors. *Curr Opin Mol Ther.* 4(4):324-333.

He N, Liu M, Hsu J, Xue Y, Chou S, Burlingame A, Krogan NJ, Alber T, Zhou Q. 2010. HIV-1 Tat and host AFF4 recruit two transcription elongation factors into a bifunctional complex for coordinated activation of HIV-1 transcription. *Mol Cell.* 38(3):428-438.

Hill M, Tachedjian G, Mak J. 2005. The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Curr HIV Res.* 3(1):73-85.

Hohn O, Krause H, Barbarotto P, Niederstadt L, Beimforde N, Denner J, Miller K, Kurth R, Bannert N. 2009. Lack of evidence for xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) in German prostate cancer patients. *Retrovirology.* 6:92.

Hohn O, Strohschein K, Brandt AU, Seeher S, Klein S, Kurth R, Paul F, Meisel C, Scheibenbogen C, Bannert N. 2010. No evidence for XMRV in German CFS and

MS patients with fatigue despite the ability of the virus to infect human blood cells in vitro. *PLoS One*. 5(12):e15632.

Hong S, Klein EA, Das Gupta J, Hanke K, Weight CJ, Nguyen C, Gaughan C, Kim KA, Bannert N, Kirchhoff F, Munch J, Silverman RH. 2009. Fibrils of prostatic acid phosphatase fragments boost infections with XMRV (xenotropic murine leukemia virus-related virus), a human retrovirus associated with prostate cancer. *J Virol*. 83(14):6995-7003.

Hong P, Li J, Li Y. 2010. Failure to detect Xenotropic murine leukaemia virus-related virus in Chinese patients with chronic fatigue syndrome. *Virology*. 7:224.

Kaikkonen MU, Rättyä JK, Airene KJ, Wirth T, Heikura T, Ylä-Herttuala S. 2006. Truncated vesicular stomatitis virus G protein improves baculovirus transduction efficiency in vitro and in vivo. *Gene Ther*. 13(4):304-312.

Kalina J, Senigl F, Micáková A, Mucksová J, Blazková J, Yan H, Poplstein M, Hejnar J, Trefil P. 2007. Retrovirus-mediated in vitro gene transfer into chicken male germ line cells. *Reproduction*. 134(3):445-453.

Kim S, Kim N, Dong B, Boren D, Lee SA, Das Gupta J, Gaughan C, Klein EA, Lee C, Silverman RH, Chow SA. 2008. Integration site preference of xenotropic murine leukemia virus-related virus, a new human retrovirus associated with prostate cancer. *J Virol*. 82(20):9964-9977.

Krause J. 2005. AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas. *Microsc Res Tech*. 68(3-4):168-175.

Lee CC, Jimenez DF, Kohn DB, Tarantal AF. 2005. Fetal gene transfer using lentiviral vectors and the potential for germ cell transduction in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Hum Gene Ther.* 16(4):417-425.

Levy JA. 1999. Xenotropism: the elusive viral receptor finally uncovered. *PNAS.* 96(3):802-804.

Li W, Xie S, Guo X, Gong X, Wang S, Lin D, Zhang J, Ren Z, Huang S, Zeng F, Zeng Y. 2008. A novel transgenic mouse model produced from lentiviral germline integration for the study of beta-thalassemia gene therapy. *Haematologica.* 93(3):356-362.

Lindemann D, Goepfert PA. 2003. The foamy virus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 277:111-129.

Lombardi VC, Ruscetti FW, Das Gupta J, Pfof MA, Hagen KS, Peterson DL, Ruscetti SK, Bagni RK, Petrow-Sadowski C, Gold B, Dean M, Silverman RH, Mikovits JA. 2009. Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. *Science.* 326(5952):585-589.

Lucas TM, Lyddon TD, Grosse SA, Johnson MC. 2010. Two distinct mechanisms regulate recruitment of murine leukemia virus envelope protein to retroviral assembly sites. *Virology.* 405(2):548-555.

Mateu MG. 2009. The capsid protein of human immunodeficiency virus: intersubunit interactions during virus assembly. *FEBS J.* 276(21):6098-6109.

Oakes B, Tai AK, Cingöz O, Henefield MH, Levine S, Coffin JM, Huber BT. 2010. Contamination of human DNA samples with mouse DNA can lead to false detection of XMRV-like sequences. *Retrovirology.* 7:109.

Ohishi M, Shioda T, Sakuragi J. 2007. Retro-transduction by virus pseudotyped with glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Virology*. 362(1):131-138.

Patience C, Takeuchi Y, Cosset FL, Weiss RA. 1998. Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells. *J Virol*. 72(4):2671-2676.

Pearson MN, Rohrmann GF. 2006. Envelope gene capture and insect retrovirus evolution: the relationship between errantivirus and baculovirus envelope proteins. *Virus Res*. 118(1-2):7-15.

Pereira LA, Bentley K, Peeters A, Churchill MJ, Deacon NJ. 2000. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res*. 28(3):663-668.

Pfeifer A, Verma IM. 2001. Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2:177-211.

Pise-Masison CA, Jeong SJ, Brady JN. 2005. Human T cell leukemia virus type 1: the role of Tax in leukemogenesis. *Arch Immunol Ther Exp*. 53(4):283-296.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Mier JW, Woods AM, Gallo RC. 1980. T-cell lines established from human T-lymphocytic neoplasias by direct response to T-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77(11):6815-6819.

Porada CD, Park PJ, Tellez J, Ozturk F, Glimp HA, Almeida-Porada G, Zanjani ED. 2005. Male germ-line cells are at risk following direct-injection retroviral-mediated gene transfer in utero. *Mol Ther*. 12(4):754-762.

Porada CD, Tran N, Eglitis M, Moen RC, Troutman L, Flake AW, Zhao Y, Anderson WF, Zanjani ED. 1998. In utero gene therapy: transfer and long-term

expression of the bacterial neo(r) gene in sheep after direct injection of retroviral vectors into preimmune fetuses. *Hum Gene Ther.* 9(11):1571-1585.

Pouw NM, Westerlaken EJ, Willemsen RA, Debets R. 2007. Gene transfer of human TCR in primary murine T cells is improved by pseudo-typing with amphotropic and ecotropic envelopes. *J Gene Med.* 9(7):561-570.

Robinson MJ, Erlwein OW, Kaye S, Weber J, Cingoz O, Patel A, Walker MM, Kim WJ, Uprasertkul M, Coffin JM, McClure MO. 2010. Mouse DNA contamination in human tissue tested for XMRV. *Retrovirology.* 7:108.

Rodriguez JJ, Goff SP. 2010. Xenotropic murine leukemia virus-related virus establishes an efficient spreading infection and exhibits enhanced transcriptional activity in prostate carcinoma cells. *J Virol.* 84(5):2556-2562.

Rulli SJ Jr, Hibbert CS, Mirro J, Pederson T, Biswal S, Rein A. 2007. Selective and nonselective packaging of cellular RNAs in retrovirus particles. *J Virol.* 81(12):6623-6631.

Rusmevichientong A, Chow SA. 2010. Biology and pathophysiology of the new human retrovirus XMRV and its association with human disease. *Immunol Res.* 48(1-3):27-39.

Scarlata S, Carter C. 2003. Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochim Biophys Acta.* 1614(1):62-72.

Schlaberg R, Choe DJ, Brown KR, Thaker HM, Singh IR. 2009. XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors. *PNAS.* 106(38):16351-16356.

Schultz SJ, Champoux JJ. 2008. RNase H activity: structure, specificity, and function in reverse transcription. *Virus Res.* 134(1-2):86-103.

Silverman RH. 2003. Implications for RNase L in prostate cancer biology. *Biochemistry.* 42(7):1805-1812.

Stieler K, Schulz C, Lavanya M, Aepfelbacher M, Stocking C, Fischer N. 2010. Host range and cellular tropism of the human exogenous gammaretrovirus XMRV. *Virology.* 399(1):23-30.

Switzer WM, Jia H, Hohn O, Zheng H, Tang S, Shankar A, Bannert N, Simmons G, Hendry RM, Falkenberg VR, Reeves WC, Heneine W. 2010. Absence of evidence of xenotropic murine leukemia virus-related virus infection in persons with chronic fatigue syndrome and healthy controls in the United States. *Retrovirology.* 7:57.

Temin HM. 1990. Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus vectors. *Hum Gene Ther.* 1(2):111-123.

Uchida E, Sato K, Iwata A, Ishii-Watabe A, Mizuguchi H, Hikata M, Murata M, Yamaguchi T, Hayakawa T. 2004. An improved method for detection of replication-competent retrovirus in retrovirus vector products. *Biologicals.* 32(3):139-146.

Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, Plummer SJ, Casey G, Klein EA, Malathi K, Magi-Galluzzi C, Tubbs RR, Ganem D, Silverman RH, DeRisi JL. 2006. Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog.* 2(3):e25.

Yoshida M. 2001. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol.* 19:475-496.

Yoshii H, Kamiyama H, Amanuma H, Oishi K, Yamamoto N, Kubo Y. 2008. Mechanisms underlying glycosylation-mediated loss of ecotropic receptor function in murine MDTF cells and implications for receptor evolution. *J Gen Virol.* 89(1):297-305.

Zábranský A, Hadravová R, Stokrová J, Sakalian M, Pichová I. 2009. Premature processing of mouse mammary tumor virus Gag polyprotein impairs intracellular capsid assembly. *Virology.* 384(1):33-37.

Zábranský A, Sakalian M, Pichová I. 2005. Localization of self-interacting domains within betaretrovirus Gag polyproteins. *Virology.* 332(2):659-666.