



Universitat Autònoma de Barcelona

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL Y TERAPIA GÉNICA

**GENERACIÓN DE UN ADENOVIRUS
QUIMÉRICO Ad5/52s PSEUDOTIPADO CON LA
PROTEÍNA *FIBER* CORTA DEL Ad52 PARA SU
CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* COMO
VECTOR DE TERAPIA GÉNICA**

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA
MOLECULAR Y BIOMEDICINA

MARC GARCIA MOURE

Noviembre, 2015



Universitat Autònoma de Barcelona

**GENERACIÓN DE UN ADENOVIRUS QUIMÉRICO Ad5/52s
PSEUDOTIPADO CON LA PROTEÍNA *FIBER* CORTA DEL
Ad52 PARA SU CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO*
COMO VECTOR DE TERAPIA GÉNICA**

Memoria presentada por

Marc Garcia Moure

Para optar al grado de

Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Tesis doctoral realizada en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica bajo la supervisión del Dr. Miguel Chillón Rodríguez, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona

El director:

El doctorando:

Miguel Chillón Rodríguez

Marc Garcia Moure

A noviembre de 2015

***A mis compañeros, amigos y familia que
han contribuido a en esta tesis estando
ahí siempre que me ha hecho falta***

ABREVIATURAS

- Abs₂₆₀**: Absorbancia a 260nm
- Ad5/40s**: Ad5 pseudotipado con el *fiber* corto del Ad40
- Ad5/52s**: Ad5 pseudotipado con el *fiber* corto del Ad52
- AdF52sR67N**: Ad5/52s con el *fiber* R67N
- ADP**: *Adenovirus Death Protein*
- Ad5K52**: Adenovirus con *shaft* del Ad5 y *knob* de Ad52
- AdX**: Adenovirus humano del serotipo X
- ALT (o GPT)**: Alanina aminotransferasa
- APS**: Persulfato de amonio
- AST (o GOT)**: Aspartato aminotransferasa
- AVP**: Proteasa del adenovirus
- BSA**: Albúmina sérica bovina
- CAR**: *Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*
- CAV-2**: Adenovirus canino de serotipo 2
- CMV**: Promotor constitutivo del citomegalovirus
- CPE**: Efecto citopático
- Cre**: Recombinasa Cre
- Cryo-EM**: Crío-electro microscopía
- CsCl**: Cloruro de cesio
- DBP**: *DNA Binding Protein*
- DMEM**: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- dNTPs**: Deoxinucleótidos
- dsDNA**: DNA de cadena doble
- DSG2**: Desmogleína-2
- DTT**: Dithiothreitol
- F40s**: *Fiber* corto del Ad40
- F5**: *Fiber* del Ad5
- F52s**: *Fiber* corto del Ad52
- F52sR67N**: *Fiber* corto el Ad52 con la arginina 67 mutada a asparagina
- FBS**: Suero fetal bovino
- Fc**: Fragmento constante del anticuerpo
- FX**: Factor X de coagulación
- FXa**: Factor X de coagulación activado
- GdCl₃**: Cloruro de gadolinio

Abreviaturas

GFP: Proteína verde fluorescente

GON: *Group-of-nine*. Los 9 *hexon* centrales de cada lado de la cápside del adenovirus

GOS:

GST: Glutación S-transferasa

HAdV-X: Adenovirus humano de la especie X

HDAdV: *Helper-dependent adenovirus*, o adenovirus de tercera generación

HS: Suero de caballo

HSPGs: Heparán Sulfato Proteo Glicanos

HVRs: Regiones hipervariables del *hexon*

IgG: Inmunoglobulina de isotipo G

IgM: Inmunoglobulina de isotipo M

IL12: Interleuquina 12

IL6: Interleuquina 6

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

ISCs: Células madre intestinales

ITR: *Inverted Terminal Repeat*

IU: Unidades infecciosas

kb: kilobase

KC: Células de Kupffer

KKTK: Motivo Lys-Lys-Tre-Lys presente en el *shaft* del Ad5

LB: Medio de cultivo *Luria Broth*

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MLP: *Major Late Promoter*

MOI: Multiplicidad de infección (dosis de IU/célula)

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

o/n: *Overnight*

OD₆₀₀: Densidad óptica a 600nm

p.i: Post-infección

P/S: Penicilina/Estreptomina

pb: par de bases

PBS: Solución tamponada con fosfato

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEI: Polietilenimina

PFU: Unidades formadoras de placas

- PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- PP:** Partículas físicas (viriones)
- pTP:** Precursor de la proteína terminal del adenovirus
- qPCR:** PCR cuantitativa
- RBC:** eritrocitos
- RGD:** Motivo Arg-Gly-Asp presente en el *penton base*
- RGN:** Motivo Arg-Gly-Asn presente en el *knob* del F52s
- RPF (o DsRed2-mito):** Proteína roja fluorescente
- RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute* (medio de cultivo)
- S5K52:** *Fiber* con el *shaft* del F5 y el *knob* del F52s
- SAdVX:** Adenovirus de simio de serotipo X
- SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
- ssDNA:** DNA de cadena sencilla
- TEMED:** Tetrametiletilendiamina
- TP:** Proteína terminal del adenovirus
- U:** Unidades enzimáticas
- v/v:** Proporción volumen/volumen
- VG:** Genomas virales
- VP:** Partículas virales
- w/v:** Proporción peso/volumen
- WBC:** leucocitos mononucleares
- βgal:** βgalactosidasa
- Ψ:** Señal de empaquetamiento o encapsidación

RESUMEN

La terapia génica es una estrategia terapéutica perteneciente al campo de la biomedicina que consiste en la manipulación y utilización de material genético para el tratamiento de patologías. No obstante, esta estrategia requiere la utilización de vectores de terapia génica que permitan hacer llegar el material genético al tejido diana de forma eficiente. Los vectores de terapia génica utilizados pueden ser tanto virales como no virales, aunque los más comunes en tratamientos *in vivo* son los vectores virales por tener una mayor eficiencia de transducción del material genético. De entre los vectores virales, los que más se han utilizado en ensayos clínicos de terapia génica en humanos son los vectores adenovirales, concretamente los que se basan en el adenovirus humano de serotipo 5 (Ad5).

Los Ad5 presentan una serie de ventajas respecto a otros serotipos de adenovirus, como son su bioseguridad, la facilidad de su producción, así como una elevada eficiencia de transducción del material genético en los tejidos diana. Sin embargo, para que una célula pueda ser transducida por el Ad5 ha de expresar en su membrana un receptor que pueda ser reconocido por el Ad5, siendo el principal de ellos la proteína CAR (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*), al que se une el adenovirus a través de su proteína de la cápside *fiber*. En otros serotipos de adenovirus, el *fiber* se une a receptores virales diferentes, permitiendo así la transducción de tipos celulares diferentes a los transducidos por el Ad5. Por lo tanto, una de las estrategias utilizadas para obtener un vector adenoviral con las ventajas del Ad5, pero con el tropismo propio de un serotipo diferente, es la pseudotipación del adenovirus, que consiste en la sustitución de la proteína *fiber* del Ad5 por la de otro serotipo, manteniendo el resto de proteínas de la cápside del Ad5.

De entre los más de 50 serotipos de adenovirus humanos, uno de los más recientemente descritos es el Ad52. Este serotipo tiene la particularidad de poseer dos proteínas *fiber* de diferentes longitudes, lo cual solo había sido descrito en los adenovirus humanos intestinales de la especie F. El Ad52 fue identificado a partir de muestras de heces de pacientes con gastroenteritis por lo que se le atribuye también un tropismo intestinal, sin embargo esto aún no se ha podido demostrar. En el caso de los adenovirus de la especie F, su proteína *fiber* larga reconoce el receptor CAR y, por lo tanto, se asume que su tropismo intestinal es mediado por la proteína *fiber* corta, de la cual se desconoce el receptor. Debido a la cercanía evolutiva entre el Ad52 y los adenovirus de la especie F, se asume por analogía que el *fiber* largo reconocerá el receptor CAR mientras que el *fiber* corto se unirá a otro receptor, otorgándole así a la cápside un tropismo independiente de CAR.

Esta tesis consiste en la generación de un vector quimérico Ad5 pseudotipado con el *fiber* corto del Ad52 (Ad5/52s) con el que se realizan experimentos que nos permiten estudiar el rol específico de esta proteína *fiber* y, a la vez, caracterizar este adenovirus como vector de terapia génica.

La primera parte de la tesis consiste en la generación del genoma del adenovirus Ad5/52s, con diferentes genes marcadores y su producción, lo que incluye un estudio de su ciclo viral donde se observa este se encuentra moderadamente retrasado respecto al del Ad5. El conocimiento del ciclo viral nos permitió también la optimización de la producción del Ad5/52s para aumentar su rendimiento.

Una vez producidos los vectores, se comparó su tropismo con el del Ad5 en cultivos *in vitro*, demostrando que la substitución del *fiber* comporta una modificación en el tropismo del Ad5 hacia líneas celulares estables, así como aumenta de forma notable su capacidad de transducción en cultivos primarios de células de Schwann. Sin embargo, este *fiber* no parece aumentar el tropismo del Ad5 en modelos intestinales *in vitro*.

Ya caracterizado el virus *in vitro*, se intentó identificar el receptor reconocido por el *fiber* corto del Ad52, demostrando que no tiene afinidad por el receptor CAR y que su unión al receptor es dependiente del dominio *knob* del *fiber*. Durante la realización de la tesis, otro grupo identificó el ácido siálico como receptor del *fiber* corto del Ad52.

El siguiente paso fue la administración intravenosa del Ad5/52s para comparar su biodistribución *in vivo* con la del Ad5. A diferencia de este último, el Ad5/52s no es secuestrado en hígado. Sin embargo, tan solo se observa una ligera transducción pulmonar por parte del Ad5/52s. Experimentos posteriores permitieron descartar problemas de estabilidad de la cápside como causa de la baja transducción *in vivo*.

En la parte final de la tesis se estudió el comportamiento del Ad5/52s en sangre para comprender el motivo de la baja eficiencia de transducción, observándose que este vector es inactivado en sangre más rápido que el Ad5, probablemente debido a la interacción con algún factor plasmático como la trombina. Así pues, se modificó la proteína *fiber* para reducir esta interacción, lo que comporta un aumento en la supervivencia del Ad5/52s en sangre.

ÍNDICE

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.	BIOMEDICINA Y TERAPIA GÉNICA.....	3
1.1	TERAPIA GÉNICA EN HUMANOS	3
1.2	VECTORES DE TERAPIA GÉNICA	6
1.2.1	VECTORES NO VIRALES	6
1.2.2	VECTORES VIRALES	8
2.	BIOLOGÍA DE LOS ADENOVIRUS	10
2.1	ESTRUCTURA DE LA CÁPSIDE	11
2.1.1	HEXON	13
2.1.2	PENTON BASE	14
2.1.3	FIBER	16
2.1.4	PROTEÍNAS MINORITARIAS DE LA CÁPSIDE	21
2.1.5	PROTEÍNAS MINORITARIAS DEL <i>CORE</i>	23
2.2	GENOMA DE LOS ADENOVIRUS	23
2.3	CICLO VIRAL DE LOS ADENOVIRUS	25
2.3.1	UNIÓN A LA MEMBRANA CELULAR	25
2.3.2	INTERNALIZACIÓN EN LA CÉLULA	26
2.3.3	DISRUPCIÓN DEL ENDOSOMA Y PENETRACIÓN EN EL CITOSOL	26
2.3.4	MIGRACIÓN HACIA EL NÚCLEO CELULAR	26
2.3.5	TRANSLOCACIÓN AL INTERIOR DEL NÚCLEO	27
2.3.6	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES VIRALES Y REPLICACIÓN	27
2.3.7	ENCAPSIDACIÓN DEL GENOMA	29
2.3.8	ESCAPE DE LOS VIRIONES Y DISPERSIÓN A NUEVAS CÉLULAS	30
2.4	ADENOVIRUS COMO VECTOR DE TERAPIA GÉNICA.....	30
2.4.1	GENERACIONES DE VECTORES ADENOVIRALES.....	31
2.4.2	ADENOVIRUS NO HUMANOS.....	32
2.4.3	MODIFICACIONES DE LAS CÁPSIDES DE LOS VECTORES	33
2.4.3.1	Modificaciones en las proteínas de la cápside del adenovirus	34
2.4.3.2	Pseudotipación de adenovirus.....	34
3.	INTERACCIONES ENTRE LOS VECTORES ADENOVIRALES Y EL ORGANISMO	35
3.1	RECEPTORES DE LOS ADENOVIRUS.....	35
3.1.1	CAR.....	36

3.1.2 INTEGRINAS	37
3.1.3 CD46	37
3.1.4 DSG2	38
3.1.5 ÁCIDO SIÁLICO	38
3.2 BIODISTRIBUCIÓN DE LOS VECTORES ADENOVIRALES <i>IN VIVO</i>	38
3.3 EFECTO DEL SISTEMA INMUNE FRENTE A VECTORES ADENOVIRALES	42
3.3.1 LIMITACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL VECTOR POR LA INMUNIDAD ADQUIRIDA.....	42
3.3.2 LIMITACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL VECTOR POR LA INMUNIDAD INNATA.....	43
3.4 COMPORTAMIENTO <i>IN VIVO</i> DE LOS ADENOVIRUS PSEUDOTIPADOS.....	44
4. CLASIFICACIÓN DE LOS ADENOVIRUS HUMANOS	44
4.1 ADENOVIRUS 52.....	45
II. OBJETIVOS	5
III. RESULTADOS.....	51
1. GENERACIÓN Y PRODUCCIÓN DEL ADENOVIRUS QUIMÉRICO Ad5/52s	53
1.1 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LOS TRES DOMINIOS DEL <i>FIBER</i> CORTO DEL Ad52	53
1.1.1 COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DEL <i>KNOB</i> DEL <i>FIBER</i> CORTO DEL Ad52.....	53
1.1.2 EL <i>FIBER</i> CORTO DEL Ad52 CONTIENE LA SECUENCIA CONSERVADA DE UNIÓN AL <i>PENTON BASE</i>	54
1.1.3 ANÁLISIS DEL <i>SHAFT</i> DEL <i>FIBER</i> CORTO DEL Ad52	55
1.2 CONSTRUCCIÓN DEL GENOMA DEL ADENOVIRUS QUIMÉRICO Ad5/52s.....	56
1.3 INCORPORACIÓN DE GENES MARCADORES EN EL GENOMA DEL Ad5/52s.....	58
1.4 PRODUCCIÓN DEL VIRUS QUIMÉRICO Ad5/52s-GFP	58
2. ESTIMACIÓN DEL CICLO VIRAL DEL Ad5/52s PARA OPTIMIZAR SU PRODUCCIÓN	60
3. MODIFICACIÓN DEL TROPISMO EN CULTIVOS <i>IN VITRO</i> DEL Ad5 MEDIADO POR EL F52s	61
4. IDENTIFICACIÓN DEL RECEPTOR DEL F52s.....	65
4.1 INDEPENDENCIA DEL Ad5/52s DE LOS RECEPTORES DEL F5 EN LA TRANSDUCCIÓN DE CULTIVOS CELULARES	65
4.2 PAPEL DEL <i>KNOB</i> DEL F52s EN EL RECONOCIMIENTO DEL RECEPTOR DEL <i>FIBER</i>	67
4.3 IDENTIFICACIÓN DEL RECEPTOR DEL F52s MEDIANTE <i>PULL DOWN</i>	68
5. TROPISMO INTESTINAL DEL ADENOVIRUS QUIMÉRICO Ad5/52s.....	71
5.1 TRANSDUCCIÓN DEL Ad5/52s EN LÍNEAS CELULARES DE ORIGEN INTESTINAL.....	72
5.2 TRANSDUCCIÓN DEL Ad5/52s EN ORGANOIDES INTESTINALES	72
6. BIODISTRIBUCIÓN DEL Ad5/52s ADMINISTRADO POR VÍA INTRAVENOSA	73

7.	ADMINISTRACIÓN LOCAL <i>IN VIVO</i> DEL Ad5/52s.....	74
7.1	ADMINISTRACIÓN POR VÍA INTRAMUSCULAR DEL Ad5/52s	75
7.2	ADMINISTRACIÓN POR VÍA INTRANASAL DEL Ad5/52s	75
8.	ELIMINACIÓN DEL Ad5/52s ADMINISTRADO POR VÍA INTRAVENOSA EN SANGRE.....	76
9.	IMPACTO DE LA ELIMINACIÓN DE LAS CÉLULAS DE KUPFFER EN LA BIODISTRIBUCIÓN DEL Ad5/52s	77
10.	CUANTIFICACIÓN DE LOS GENOMAS VIRALES DEL Ad5/52s EN SANGRE	78
11.	INTERACCIÓN DEL Ad5/52s CON LAS DIFERENTES FRACCIONES DE LA SANGRE.....	79
11.1	INTERACCIÓN <i>IN VIVO</i> DEL Ad5/52s CON LAS FRACCIONES DE SANGRE	79
11.2	INTERACCIÓN <i>EX VIVO</i> DEL Ad5/52s CON LAS FRACCIONES DE SANGRE	82
12.	MODIFICACIÓN DEL Ad5/52s PARA AUMENTAR SU SUPERVIVENCIA EN SANGRE.....	82
12.1	IDENTIFICACIÓN DEL FACTOR PLASMÁTICO RESPONSABLE DE LA PÉRDIDA DE INFECTIVIDAD DEL Ad5/52s.....	83
12.2	EFFECTO DE LA ELIMINACIÓN DE LA DIANA TROMBINA DEL F52s SOBRE LA SUPERVIVENCIA DEL Ad5/52s EN SANGRE	84
IV.	DISCUSIÓN	87
V.	CONCLUSIONES.....	103
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	107
1.	MATERIALES.....	109
1.1	PLÁSMIDOS	109
1.1.1	PLÁSMIDOS UTILIZADOS PARA GENERAR LOS PLÁSMIDOS NECESARIOS PARA ESTA TESIS	109
1.1.2	NUEVOS PLÁSMIDOS GENERADOS DURANTE ESTA TESIS	109
1.2	PRIMERS.....	111
1.3	SECUENCIAS DE PROTEÍNA FIBER UTILIZADAS.....	112
1.4	CEPAS DE BACTERIAS (E. coli)	112
1.5	LINEAS CELULARES.....	113
1.6	ANIMALES	114
1.7	SOLUCIONES	114
1.7.1	SOLUCIONES PARA CULTIVOS BACTERIANOS Y TÉCNICAS DE CLONACIÓN	114
1.7.2	SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES	116
1.7.3	SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ADENOVIRUS Y SU MANIPULACIÓN <i>IN VITRO</i>	117
1.7.4	SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LA MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNA ..	117
2.	MÉTODOS	119

2.1 TÉCNICAS DE CLONACIÓN, MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA	119
2.1.1 PREPARACIÓN DE BACTERIAS QUIMICOMPETENTES	119
2.1.2 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR CHOQUE TÉRMICO	120
2.1.3 MINIPREPARACIONES DE DNA PLASMÍDICO	120
2.1.4 MAXIPREPARACIONES DE DNA PLASMÍDICO	121
2.1.5 DIGESTIONES DE DNA PLASMÍDICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	122
2.1.6 DEFOSFORILACIÓN DE VECTORES	122
2.1.7 ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA	122
2.1.8 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA	123
2.1.9 CLONACIÓN DE DNA en VECTORES PLASMÍDICOS POR LIGACIÓN	123
2.1.10 CLONACIÓN DE DNA en VECTORES PLASMÍDICOS POR RECOMBINACIÓN	123
2.1.11 SECUENCIACIÓN DE DNA	124
2.1.12 AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE PCR	124
2.1.13 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DEL GEN DEL <i>FIBER</i> POR PCR	124
2.1.14 CUANTIFICACIÓN DE GENOMAS VIRALES MEDIANTE PCR CUANTITATIVA	124
2.2 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES	125
2.2.1 MANTENIMIENTO Y PASE DE LOS CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES	125
2.2.2 TRANSFECCIÓN DE DNA EN CULTIVOS HEK293	126
2.2.3 DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS S16	126
2.2.4 CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN PRIMARIAS	126
2.2.5 CUANTIFICACIÓN DE LA FLUORESCENCIA EN CÉLULAS POR CITOMETRÍA	127
2.3 PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES	128
2.3.1 GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS <i>SHUTTLE</i> PARA PSEUDOTIPAR LOS VECTORES	128
2.3.2 PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES A PARTIR DE PLÁSMIDO	129
2.3.3 PURIFICACIÓN DE VECTORES VIRALES POR ULTRACENTRIFUGACIÓN	130
2.3.4 TITULACIÓN DE LAS PARTÍCULAS FÍSICAS VIRALES PURIFICADAS	130
2.3.5 TÍTULACIÓN DE LAS UNIDADES INFECCIOSAS VIRALES	130
2.4 TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	131
2.4.1 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES SDS-PAGE	131
2.4.2 DETECCIÓN DE <i>FIBER</i> DE VIRUS PURIFICADO MEDIANTE WESTERN-BLOT	131
2.4.3 GENERACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE	132
2.4.4 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN BACTERIAS	132
2.4.5 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN CULTIVOS CELULARES	133

2.4.6 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE MEMBRANA DE CULTIVOS 293F	134
2.4.7 ENSAYO DE <i>PULL DOWN</i> PARA IDENTIFICAR EL RECEPTOR DEL F52s.....	134
2.4.8 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE ACRILAMIDA POR TINCIÓN DE COOMASSIE	135
2.4.9 ANÁLISIS DE LA TRIMERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA KNOB RECOMBINANTE	135
2.4.10 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE TEJIDOS PARA EL ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD β GALACTOSIDASA	136
2.4.11 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD β GALACTOSIDASA EN EXTRACTOS DE PROTEÍNAS DE TEJIDOS MEDIANTE LUMINOMETRÍA.....	136
2.5 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> CON VECTORES ADENOVIRALES.....	136
2.5.1 DETERMINACIÓN DEL CICLO VIRAL DEL Ad5/52s	136
2.5.2 TRANSDUCCIÓN DE VECTORES EN CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES	137
2.5.3 TRANSDUCCIÓN DE VECTORES EN CÉLULAS S16 DIFERENCIADAS	137
2.5.4 TRANSDUCCIÓN DE VECTORES EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE SCHWANN.....	137
2.5.5 TRANSDUCCIÓN DE VECTORES EN ORGANOIDES INTESTINALES	137
2.5.6 INHIBICIÓN DE LA TRANSDUCCIÓN POR COMPETENCIA CON <i>KNOB</i> RECOMBINANTE	138
2.6 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> CON VECTORES ADENOVIRALES.....	138
2.6.1 BIODISTRIBUCIÓN DE LOS VECTORES POR ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA	138
2.6.2 ADMINISTRACIÓN INTRAMUSCULAR DE VECTORES.....	138
2.6.3 ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE VECTORES.....	139
2.6.4 ELIMINACIÓN DE LAS CÉLULAS DE KUPFFER HEPÁTICAS CON CLORURO DE GADOLINIO	139
2.6.5 DETERMINACIÓN DE LA ELIMINACIÓN EN SANGRE DE VECTORES.....	139
2.6.6 CUANTIFICACIÓN DE LOS VECTORES EN FRACCIONES DE SANGRE	140
2.6.7 INTERACCIÓN DE LOS VECTORES CON FRACCIONES DE SANGRE DE RATÓN <i>EX VIVO</i>	140
3.7 ANÁLISIS INFORMÁTICO DE DATOS.....	140
2.7.1 COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LOS <i>FIBER</i>	140
2.7.2 CÁLCULOS ESTADÍSTICOS.....	141
VII. BIBLIOGRAFÍA	143
VIII. ANEXO.....	169

I. INTRODUCCIÓN

1. BIOMEDICINA Y TERAPIA GÉNICA

Los avances en las últimas décadas en el campo de las ciencias naturales (biología molecular, biología celular, bioquímica, fisiología...) han propiciado la aparición del concepto de biomedicina, que se define como la aplicación clínica del conocimiento de estas ciencias naturales. Una de las disciplinas que se engloban en el concepto de biomedicina es la terapia génica, que consiste en la manipulación de material genético para posteriormente introducirlo con fines terapéuticos en pacientes afectados por alguna patología.

La terapia génica puede ser utilizada para el tratamiento de múltiples enfermedades, pero la estrategia a utilizar debe ser diferente dependiendo de las características de cada patología. El material genético puede ser administrado *ex vivo* en las células de interés para después introducir las en el paciente, o bien se puede administrar directamente al paciente *in vivo*. Una posibilidad es la introducción de una copia funcional de un gen que no se esté expresando correctamente. Por ejemplo, la cardiopatía asociada a la ataxia de Friedreich por la falta de la proteína frataxina (FXN) podría ser corregida introduciendo una copia funcional del gen FXN en cardiomiocitos [1]. En otras patologías, un gen determinado se sobreexpresa o su producto génico es hiperactivo, y en este caso la estrategia irá enfocada a silenciar este gen o reducir su expresión mediante *knockout* o *knockdown*. En esta línea, el uso RNAi para el silenciamiento de la expresión de factores de transcripción sobreexpresados en algunos tumores, como por ejemplo β -catenina [2], es una estrategia que se está estudiando para el tratamiento del cáncer. Y en otros casos, se pueden introducir genes *de novo* que al expresarse puedan servir para tratar la enfermedad o aliviar su sintomatología. Un ejemplo podría ser la administración de genes que codifican anticuerpos para combatir o prevenir enfermedades causadas por agentes infecciosos como la gripe [3]. Aunque para el diseño de una estrategia de terapia génica además del material genético a administrar también se ha de considerar donde se quiere dirigir el tratamiento. Éste puede tener un objetivo sistémico en el organismo, o bien ir destinado a un órgano o tejido diana concreto. Para ello, se ha de tener en cuenta qué promotor dirigirá la expresión del material genético, que puede ser un promotor de expresión ubicua, o un promotor de expresión específica del tejido de interés. De los diferentes elementos que participan en un tratamiento de este tipo, el vector de terapia génica es el agente que transportará el material genético a su destino y, por lo tanto, la elección y el diseño del vector también son puntos clave en la planificación de la terapia.

La combinación de todos estos elementos implicados en la terapia génica ha llevado al desarrollo de múltiples estrategias para tratar patologías en humanos.

1.1 TERAPIA GÉNICA EN HUMANOS

El primer ensayo clínico de terapia génica en humanos fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en 1990, para dos pacientes con inmunodeficiencia combinada grave por déficit de adenosina desaminasa (ADA-SCID) [4]. Se les extrajeron células T de sangre y fueron transducidas con el gen de la adenosina desaminasa (ADA) usando un vector retroviral, y después se volvieron a introducir en los pacientes. Aunque se detectó una mejora en la

funcionalidad del sistema inmune, los resultados fueron cuestionados porque a los pacientes no se les retiró completamente la terapia de sustitución enzimática de ADA estabilizada con polietilenglicol (PEG-ADA).

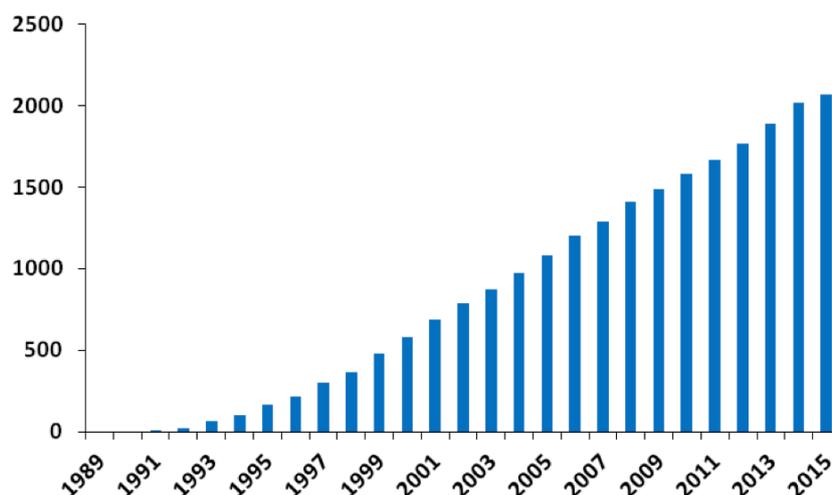


Figura 1. Número de protocolos de terapia génica en ensayos clínicos (valores acumulados). Datos de julio de 2015. Fuente: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

Uno de los primeros resultados prometedores en terapia génica para enfermedades genéticas en humanos fue dirigido al tratamiento de pacientes pediátricos afectados por inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X (SCID-X1) [5, 6]. Esta patología, asociada al cromosoma X, está causada por la deficiencia en la cadena γ (γ c), común a varios receptores de citoquinas implicados en el desarrollo de células T y NK [7, 8]. A estos pacientes se les extrajeron células CD34+ para transducirlas *ex vivo* con un retrovirus *Moloney murine leukemia virus* (MMLV) que contenía el gen de la γ c y, posteriormente, se reintrodujeron en los pacientes. Varios meses después, la mayoría de pacientes presentaron indicios de sistema inmune funcional, como proliferación de células T, NK y la presencia de anticuerpos en suero. Éste puede ser considerado el primer tratamiento exitoso de terapia génica ya que el sistema inmune de los pacientes mejoró sin recibir tratamientos complementarios. Sin embargo, a pesar de la mejora inicial, 4 de los 10 pacientes desarrollaron leucemia entre 31 y 68 meses después del tratamiento. En 3 de ellos la leucemia fue causada por la integración del vector retroviral en la región del protooncogén LMO2, induciendo su activación [9-11].

Actualmente ya se han llevado a cabo más de 2000 ensayos clínicos de terapia génica en humanos, en diferentes fases clínicas, y este número se ha ido incrementando exponencialmente durante los últimos 25 años (Figura 1). De éstos, 1729 (el 78,2%) se encuentran en Fase I o I/II, mientras que los ensayos que se encuentran entre las fases II y III suman 476 (el 21,5%) (Figura 2). Hay ensayos de terapia génica para una gran variedad de enfermedades, pero 1973 de ellos (el 89,3%) van dirigidos al tratamiento de cáncer, enfermedades monogénicas, infecciosas y cardiovasculares (Figura 3), siendo el grupo más numeroso, con diferencia, el de tratamiento del cáncer con 1415 ensayos (64,0% del total). Esto también se ve reflejado en el tipo de genes utilizados en los ensayos, ya que en 1346 de

ellos (66,7%) se utilizan antígenos, citoquinas, receptores, genes suicidas o supresores de tumores (Figura 4).

Sin embargo, debido a la relativamente reciente aparición de estrategias de terapia génica en biomedicina, actualmente son pocas las que han llegado a su aplicación comercial. Así, en octubre de 2003 fue aprobado por la *State Food and Drug Administration* (actualmente *China Food and Drug Administration*, CFDA) el primer fármaco de terapia génica para su uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello [12]. Conocido con el nombre comercial de Gendicine™, este fármaco consiste en un adenovirus humano de serotipo 5 no replicativo que contiene el gen supresor de tumores p53. El lanzamiento de este producto fue controvertido por la diferencia de criterios existente entre las agencias reguladoras occidentales y chinas en referencia a los resultados necesarios en estudios de fase clínica III [13].

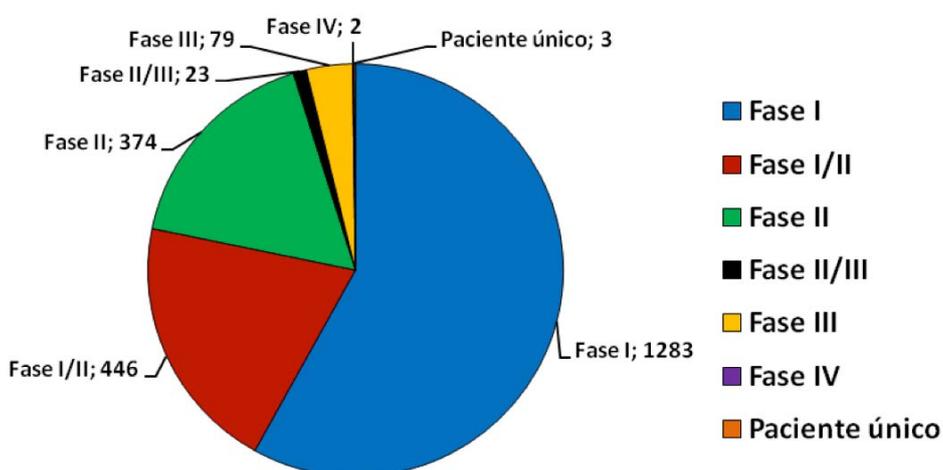


Figura 2. Protocolos de terapia génica en humanos por fase de ensayo clínico. Datos de julio de 2015. Fuente: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

En 2005 la compañía Ark Therapeutics recibió la certificación GMP (*Good Manufacturing Practice*) por la agencia del medicamento finlandesa para la producción de su fármaco Cerepro®. Éste consiste en un adenovirus (*sitimagene ceradenovec*) que contiene el gen de la timidina quinasa del virus *Herpes simplex* (HSV-tk) para el tratamiento de gliomas de alto grado inyectado intratumoralmente, junto con la droga ganciclovir por vía intravenosa [14, 15]. La compañía también solicitó la *Marketing Authorization Application* a la *European Medicines Agency* (EMA), pero el *Committee for Medicinal Products for Human Use* (CHMP), dependiente de la EMA, no dio su aprobación [16]. La agencia europea considera que los beneficios del medicamento no son suficientes en relación a los posibles efectos adversos, y finalmente la compañía anunció su intención de retirar la solicitud. No obstante, en Francia y Finlandia está aprobado su uso compasivo en pacientes concretos.

La EMA aprobó en 2012 la comercialización del primer tratamiento de terapia génica en Europa [17-19]. Se trata de Glybera® (*alipogene tiparvovec*), desarrollado por la compañía

Amsterdam Molecular Therapeutics (posteriormente uniQure). Este tratamiento está aprobado para su uso en pacientes afectados de deficiencia de lipoprotein lipasa (LPLD), enfermedad rara con una incidencia de 1-2 personas por millón, y que causa una hipertrigliceridemia severa. Glybera consiste en un vector viral adenoasociado de serotipo 1 (AAV1) que codifica una variante mutada con ganancia de función de la LPL (LPL^{S447X}), asociada a un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares. Los resultados obtenidos en los ensayos clínicos demostraron la seguridad del tratamiento y una mejora significativa en la sintomatología de los pacientes [20].

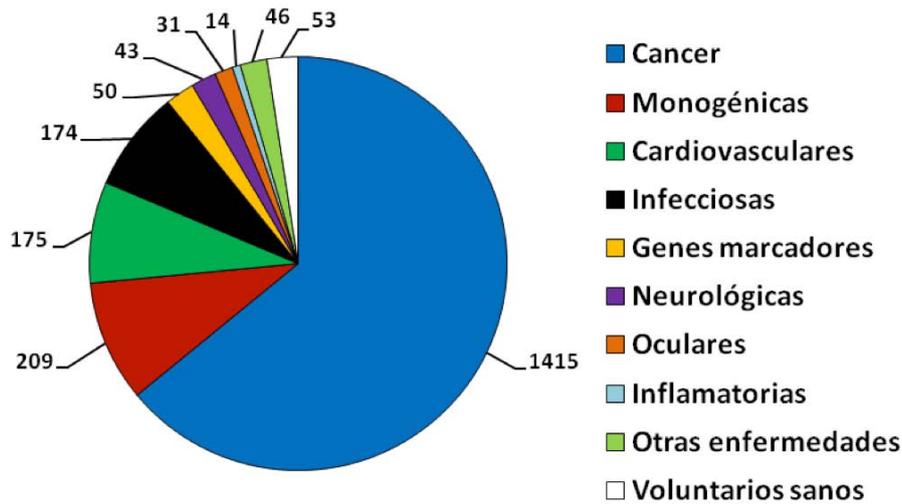


Figura 3. Indicaciones para las que se han aprobado ensayos clínicos de terapia génica. Datos de julio de 2015. Fuente: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

1.2 VECTORES DE TERAPIA GÉNICA

Una vez administrado el material genético al paciente, éste ha de poder transducir las células diana. Sin embargo, el DNA por si mismo tiene una baja eficiencia de transducción debida a todas las barreras biológicas extracelulares e intracelulares que ha de superar (Figura 5). Además, una vez administrado el DNA tiene un tiempo de semivida corto [21].

Los vectores de terapia génica son las herramientas que permiten hacer llegar el material genético terapéutico hasta el núcleo de las células diana de manera eficiente, para que éste se exprese en niveles suficientes para ejercer un efecto terapéutico. Hay muchos vectores de terapia génica disponibles y todos ellos tienen ventajas e inconvenientes. Esto implica que el diseño de una estrategia de terapia génica no se ha de focalizar únicamente en el constructo de DNA, sino que se ha de tener una visión global que incluya también la elección del vector que mejor se adapte a las necesidades del tratamiento. Los vectores se pueden clasificar en dos grandes grupos, los vectores no-virales y los vectores virales.

1.2.1 VECTORES NO VIRALES

Los vectores no virales consisten en sistemas físicos o químicos que permiten al DNA entrar en las células, ya sea permeabilizando la membrana celular o promoviendo la endocitosis.

Comparados con los vectores virales, los no virales son fáciles de producir y su coste es bajo. Además, la longitud del DNA a administrar no se ve tan limitada como con los vectores virales, y también son menos inmunogénicos. No obstante, la eficiencia de transducción y la persistencia del transgén son inferiores a las obtenidas con los vectores virales.

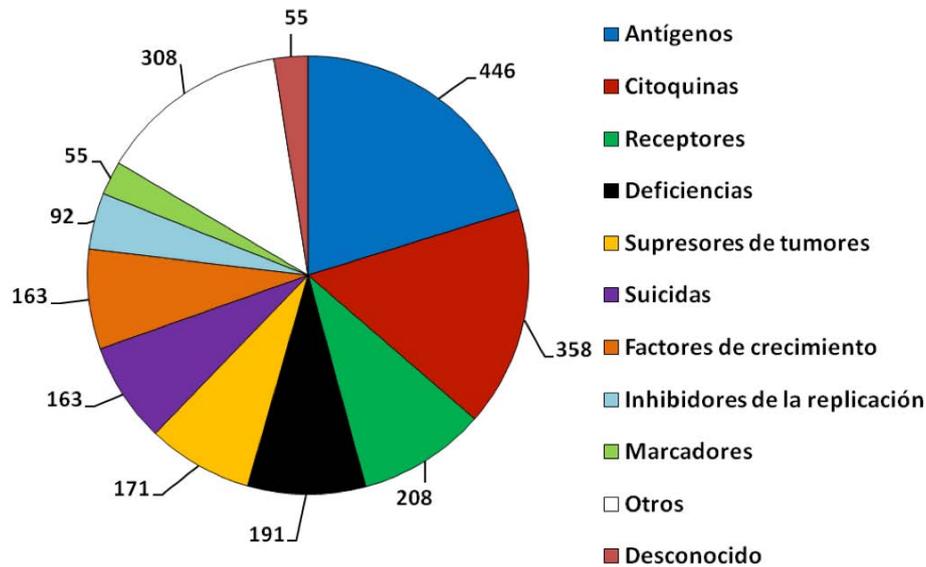


Figura 4. Genes utilizados en ensayos clínicos de terapia génica. Datos de julio de 2015. Fuente: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

Entre los métodos físicos se encuentra la electroporación, consistente en aplicar una corriente eléctrica en los tejidos diana que generan poros transitorios en las membranas celulares a través de los cuales entra el DNA. Este sistema se ha utilizado para transducir hígado, pulmón, piel, músculo esquelético o tumores, entre otros [22-26]. Aunque en algunos casos los resultados han sido positivos, la inserción quirúrgica de los electrodos en el órgano es una técnica invasiva y esto, sumado al pulso eléctrico, puede dañar el tejido significativamente. También se ha ensayado la administración hidrodinámica, donde se inyecta por vía intravenosa un elevado volumen (sobre un 10% del peso corporal) en un corto tiempo. La sobrepresión generada aumenta la permeabilidad del endotelio al DNA, pudiendo éste difundir desde el torrente sanguíneo hasta el parénquima tisular. Usando esta técnica se han conseguido elevados niveles de transducción hepática en roedores [27, 28], pero es de difícil aplicación en humanos.

Los vectores de naturaleza química son compuestos policationicos con capacidad de unirse al DNA por interacción electrostática, facilitando su absorción por parte de las células y protegiéndolo de la degradación por nucleasas. Los más comunes son los basados en lípidos o en polímeros catiónicos. Los lípidos catiónicos forman liposomas con una carga positiva en la superficie donde se une el DNA a transducir [29]. Los complejos liposoma-DNA, llamados *lipoplex*, tienen como ventajas su poca toxicidad y el bajo coste de producción. Se han utilizado en ensayos con pacientes [30-32], aunque en general la eficiencia de transducción *in vivo* es baja, y algunos autores han observado reacciones inflamatorias atribuidas al *lipoplex* [33]. Además de liposomas, también se han utilizado polímeros catiónicos que pueden unir los

fosfatos del DNA debido a que contienen un número elevado de grupos amino protonados, como por ejemplo la polietilenimina (PEI) [34-36]. Los complejos polímero catiónico-DNA son llamados *polyplex*, y también son fáciles de producir, aunque su poca estabilidad *in vivo* y su toxicidad son un freno para su utilización. Una familia nueva de vectores químicos son los basados en nanomateriales. En concreto, los nanotubos de carbono funcionalizados (*f*-CNTs) pueden unirse a DNA, y estos complejos son capaces de atravesar la membrana celular, llegar al núcleo y expresar el transgén *in vitro* e *in vivo* [37-40]. No obstante, su seguridad está muy cuestionada, y algunos estudios la comparan la toxicidad de estas partículas con la de las fibras de asbesto, incluida la carcinogénesis [41-43].

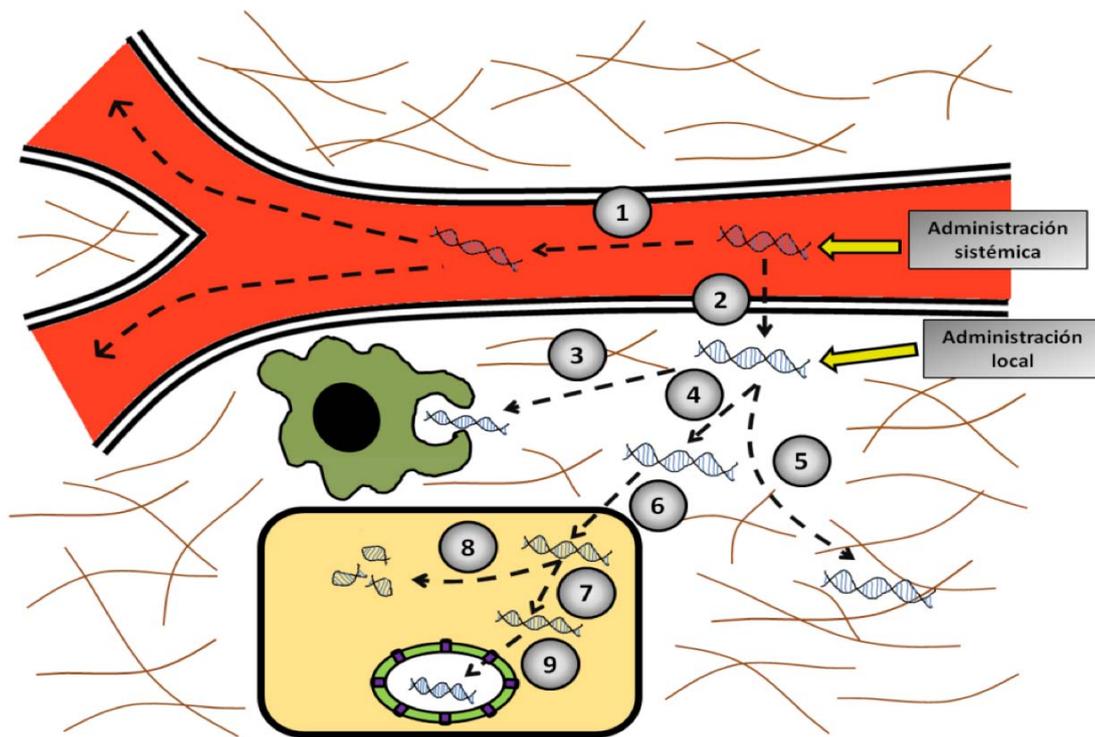


Figura 5. Barreras biológicas para la transducción del DNA. 1) Difusión sistémica. 2) Endotelio capilar. 3) Secuestro por macrófagos y otros componentes del sistema inmune. 4) Migración a través del tejido. 5) Retención en el tejido. 6) Internalización en la célula a través de la membrana. 7) Migración intracelular. 8) Degradación por nucleasas celulares. 9) Entrada en el núcleo celular

1.2.2 VECTORES VIRALES

Los vectores virales son, con diferencia, los más comunes en terapia génica, suponiendo más del 66% de los vectores utilizados en ensayos clínicos (Figura 6). En general, los vectores virales tienen una mayor eficiencia de transducción que los no virales. Esta eficiencia es debida a que los virus son, precisamente, elementos diseñados y perfeccionados por la evolución, con la única finalidad de proteger y transportar un genoma a través de un organismo hasta el interior de las células y, una vez allí, inducir su expresión.

Los vectores virales se basan en substituir parcialmente el genoma viral por el material genético de interés terapéutico. De esta manera, cuando se generan nuevos viriones el material genético es incorporado en la cápside y, por lo tanto, estos viriones serán capaces de

transducirlo. Cabe destacar que los virus utilizados como vectores no pueden replicarse cuando infectan las células diana ya que se les ha eliminado aquellos genes imprescindibles para su replicación. Así se aumenta su bioseguridad al convertirlos en vectores suicidas que perderán su viabilidad cuando el material genético sea transducido. En contraste con los no virales, el tamaño del inserto que se puede introducir en un vector viral se ve limitado por la capacidad de encapsidación del virus.

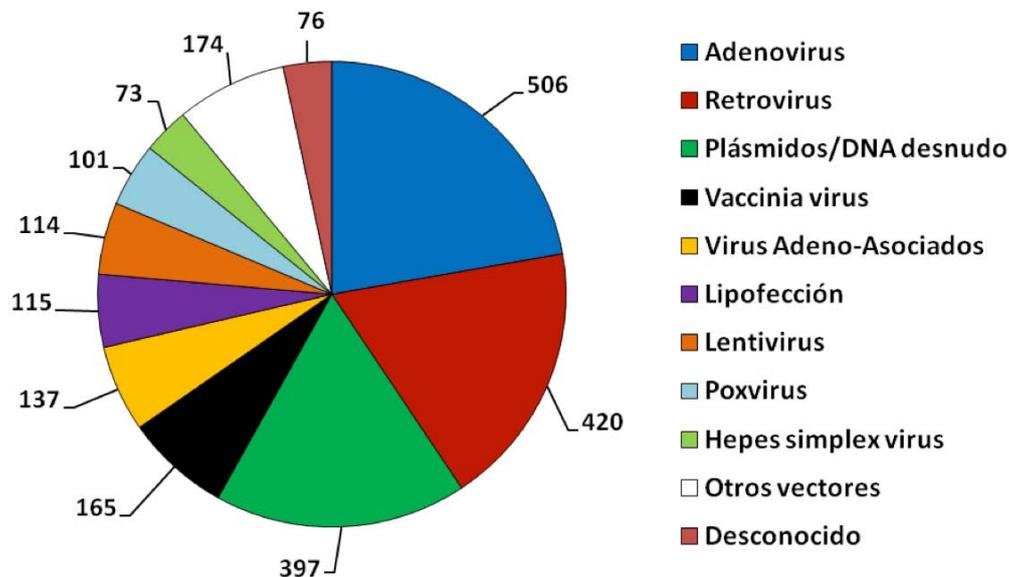


Figura 6. Vectores de terapia génica utilizados en ensayos clínicos. Datos de julio de 2015. Fuente: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

El primer vector viral usado para transducir células de mamífero fue basado en un retrovirus, el virus de la leucemia murina (MLV) [44]. Los retrovirus tienen una envuelta lipídica y un genoma de RNA que se replica por retrotranscripción. Este vector ha sido uno de los más utilizados en ensayos clínicos de terapia génica (Figura 6), y una de sus características es que integran su genoma en el de la célula huésped, dando lugar así a una expresión prolongada del transgén. De esta manera también se obtiene una expansión clonal de las células modificadas. Sin embargo, la integración del genoma también puede causar mutagénesis insercional, ya que se integra preferentemente en regiones de inicio de transcripción [9, 45]. Además, los retrovirus basados en el MLV no pueden atravesar la membrana nuclear, limitando su transducción a células en división [46, 47]. Esto no es así en los vectores lentivirales (retrovirus basados principalmente en el HIV-1) que sí pueden atravesar la membrana nuclear [48, 49].

Otro tipo de vectores virales son los derivados de los virus adenoasociados (AAV). Estos son virus sin envuelta lipídica y con un genoma formado por DNA lineal de cadena sencilla (ssDNA). Los AAV se llaman así porque fueron identificados por microscopía electrónica a partir de preparaciones de adenovirus contaminadas con partículas virales de 20-25nm [50, 51]. Hoy en día se sabe que los AAV necesitan la maquinaria proteica de adenovirus o herpesvirus para poder replicarse, y por lo tanto estos genes deben ser provistos en *trans* para producir los vectores. Los AAV son virus sin patogenicidad conocida, poco inmunogénicos, capaces de infectar células que no están en división, y que permiten expresiones prolongadas del

transgén. Además, hay disponibles serotipos de AAV con tropismos para diferentes tejidos. Debido a todas estas ventajas, su elección como vectores de terapia génica ha aumentado considerablemente en los últimos años (Figura 7). De hecho, el único tratamiento de terapia génica actualmente aprobado por la EMA para su uso comercial utiliza precisamente un vector adenoasociado [17]. El principal inconveniente de los AAV es que tienen un genoma pequeño en comparación con otros vectores virales, y esto limita el tamaño del DNA terapéutico que se puede incorporar.

Los vectores adenovirales han sido los más utilizados en ensayos clínicos de terapia génica (Figura 6). Los adenovirus tienen una cápside icosaédrica sin envuelta, y con un genoma de DNA lineal de doble cadena (dsDNA). Pueden infectar células tanto en división como quiescentes, y su genoma permanece de forma episomal. Las ventajas de los serotipos de adenovirus utilizados en terapia génica son su bioseguridad y la facilidad de su producción. Por otro lado, los genes transducidos por adenovirus tienen una expresión de tan solo 2-3 semanas. Esto es debido a que, a pesar de ser virus no replicativos, algunos de sus antígenos se expresan en niveles suficientes para estimular una respuesta inmune contra la célula infectada [52, 53]. Por eso es importante el desarrollo de nuevas generaciones de vectores adenovirales que no expresen estos antígenos, y así aumentar la persistencia de la expresión del transgén [54].

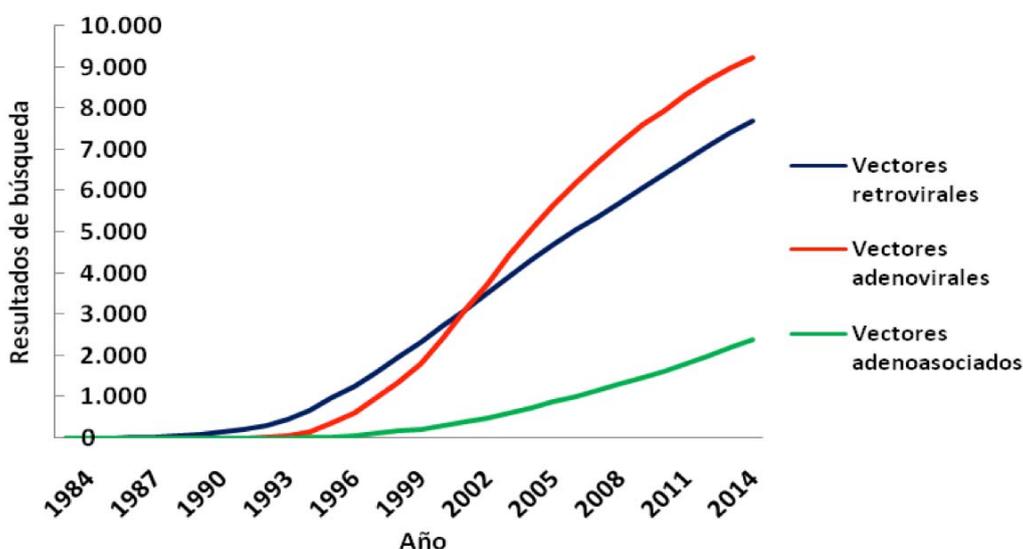


Figura 7. Evolución de los artículos publicados utilizando vectores retrovirales, adenovirales y adenoasociados. Datos de octubre de 2015. Fuente: Pubmed (NCBI)

2. BIOLOGÍA DE LOS ADENOVIRUS

En la década de los años 30 se descubre que la encefalitis epizoótica del zorro es causada por un virus virtualmente indistinguible del virus de la hepatitis infecciosa canina [55]. En 1953 se publica el aislamiento del primer adenovirus humano a partir de cultivos de tejido de adenoides, de donde reciben el nombre de adenovirus [56]. Posteriormente, se aislaron también el virus de la hepatitis infecciosa canina y se identifica como un adenovirus, el

adenovirus canino tipo 1 (CAV-1) [57]. Desde entonces, se han descubierto más de 40 especies de adenovirus que incluyen adenovirus humanos, de simios, caninos, murinos, ovinos, bovinos, porcinos, equinos, de murciélagos, de zarigüeya, de aves, de ranas, de serpientes, de lagartos, de peces e incluso de musaraña arborícola (orden *Scadentia*). Siguiendo los criterios del ICTV, las diferentes especies de adenovirus se engloban en la familia *Adenoviridae* (no asignada en ningún orden) que se divide en 5 géneros aceptados (Figura 8). Recientemente, se ha propuesto la creación de un nuevo género de adenovirus llamado *Testadenovirus* [58].

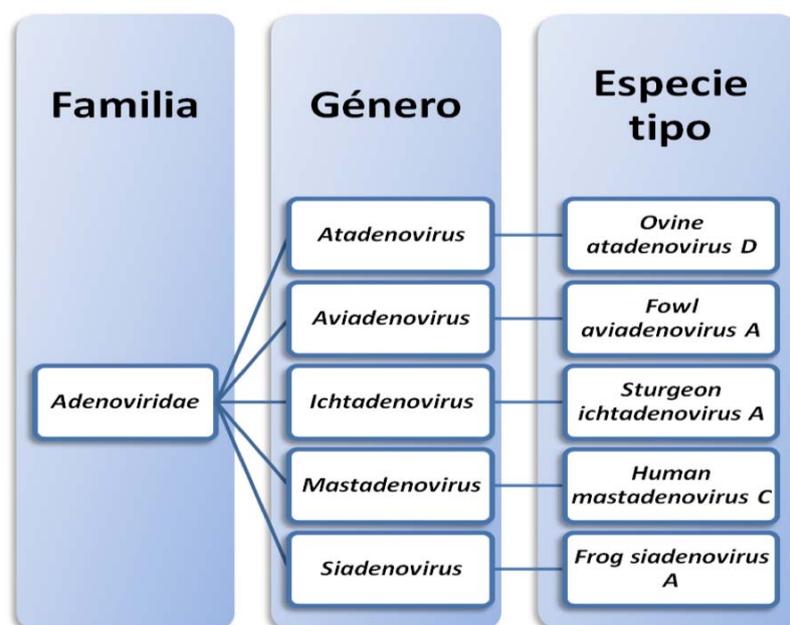


Figura 8. Clasificación de los taxones de adenovirus aceptados por el ICTV en 2013. Fuente: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>

Las 7 especies de adenovirus descritos en humanos (A-G) pertenecen al género *Mastadenovirus*, y se han caracterizado hasta 60 serotipos diferentes [59]. Por lo general, los adenovirus humanos causan infecciones en el tracto respiratorio, en el tracto gastrointestinal o en la conjuntiva y, aunque generalmente produce infecciones leves, pueden suponer un problema sanitario en algunos grupos de riesgo. Por ejemplo, los adenovirus son un agente etiológico importante durante los brotes de infecciones respiratorias en soldados, ya que el hacinamiento y el estrés al que se ven sometidos son factores de riesgo [60-62]. Otro grupo de riesgo son los niños, donde comúnmente los adenovirus son causantes de gastroenteritis y diarrea infantil [63-65], especialmente por parte de los adenovirus de la especie F que son abundantes en aguas contaminadas [66, 67].

2.1 ESTRUCTURA DE LA CÁPSIDE

Las partículas adenovirales tienen un tamaño de 80-90 nm y aproximadamente 150×10^6 Da. El 15% de la masa del adenovirus corresponde al genoma y el 85% restante a la fracción proteica, compuesta por más de 2.500 polipéptidos [68, 69]. La arquitectura de los viriones es común en todos los adenovirus descritos. A grandes rasgos, consiste en una cápside de geometría icosaédrica, de cuyos vértices se proyectan unas estructuras fibrilares conocidas como fibras o

fiber (Figura 9.A) [70, 71], y que alberga en su interior el DNA asociado con proteínas del *core* [72]. Las proteínas estructurales de los viriones se nombran con números romanos en orden creciente de su migración electroforética en geles SDS-PAGE [73] (Figura 9.B).

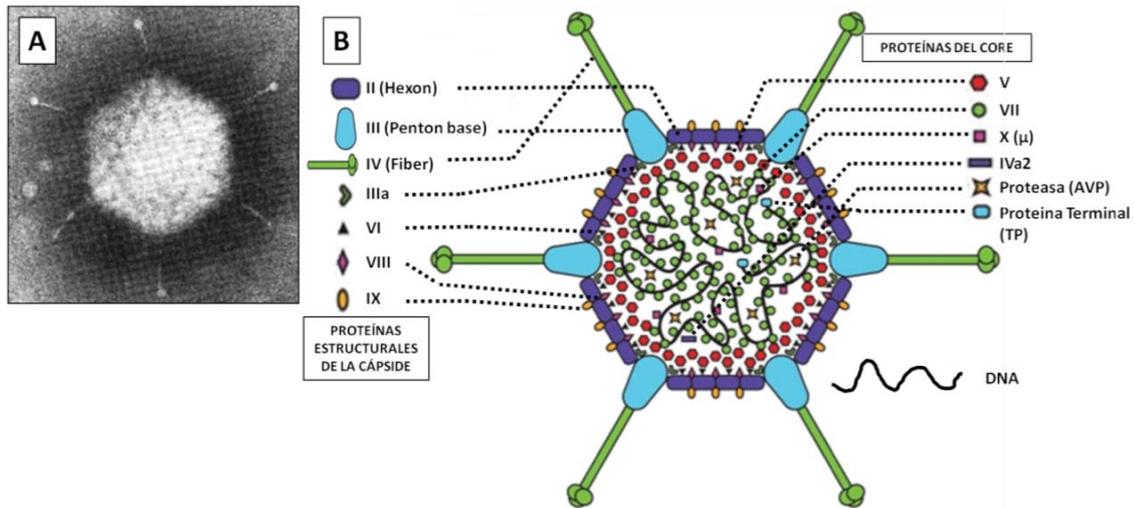


Figura 9. Cápside del adenovirus. A) Fotografía de un virión de adenovirus donde se observa la forma icosaédrica y el *fiber* sobresaliendo del vértice. Figura obtenida de [74]. B) Esquema representativo de las proteínas de la cápside y del *core*. Figura adaptada de [74]

La cápside está formada principalmente por tres proteínas estructurales mayoritarias que son *hexon*, *penton base* y *fiber* (polipéptidos II, III y IV). El *hexon* es la más abundante de las tres y es la que forma las 20 caras triangulares del icosaedro. En los 12 vértices se encuentra el *penton*, que a su vez está formado por un *penton base* que cierra el vértice y un *fiber* anclado al *penton base* y se proyecta desde el vértice [68, 75, 76]. La estructura de la cápside también contiene otras proteínas estructurales minoritarias que son las proteínas IIIa, VI, VIII y IX [69].

Con los datos obtenidos de la observación de viriones por microscopía electrónica [71, 77], de cristales de las proteínas estructurales (especialmente las mayoritarias) [78-80] y, finalmente, del estudio de cápsides intactas (mediante técnicas de Cryo-EM y cristalografía) [70, 81-84] se ha podido establecer un modelo de organización de la cápside y las interacciones entre sus componentes.

Cada uno de los triángulos del icosaedro está formado por 12 trímeros de *hexon* en su superficie y un complejo *penton* (*penton base* más *fiber*) en cada uno de sus vértices (Figura 10). Al hacer una disociación de la cápside en condiciones suaves se observa que entre los 12 *hexon* se pueden distinguir dos tipos en función de su comportamiento. Los 9 *hexon* centrales se disocian formando un único bloque conocido como *group-of-nine* (GON) [85, 86]. Por otro lado, los 3 *hexon* peripentonaes (uno de cada vértice) se disocian junto al *penton* en una estructura conocida como *group-of-six* (GOS), que consiste en el *penton* unido a un *hexon* peripentonal por cada lado del icosaedro en contacto con el *penton* [83]. Esta diferencia de disociación de los *hexon* se explica por el papel de las proteínas minoritarias de la cápside. Los GONs además de los *hexon* centrales también incluyen la proteína IX [87]. Cada GON contiene

cuatro trímeros de proteína IX que se encuentran formando un *triskelion* entre los *hexon* centrales y refuerzan su unión [68, 70, 88].

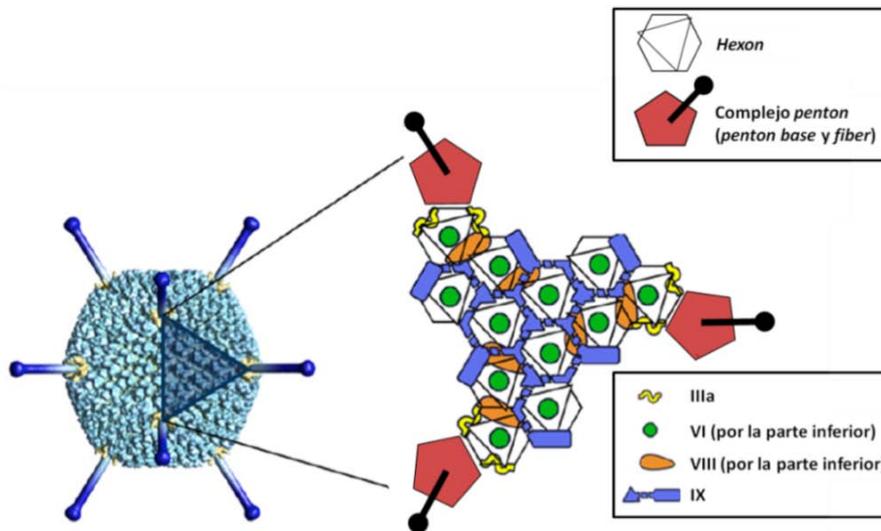


Figura 10. Organización de la cápside. A la izquierda, imagen obtenida por Cryo-EM de un virión. A la derecha, esquema de la localización de las proteínas en una cara del icosaedro. Figura adaptada de [89]

2.1.1 HEXON

El *hexon*, la proteína más abundante de la cápside, es un homotrímero formado por tres subunidades del polipéptido II, de 110 kDa cada uno [68, 90], y fue la primera proteína de un virus animal en ser cristalizada [91]. La cápside contiene 12 *hexon* en cada uno de sus 20 caras y constituyen la unidad básica de construcción del icosaedro. El nombre *hexon* se debe a que cada uno está rodeado por otros 6 capsómeros [92], y esta disposición se explica por su forma pseudohexagonal [93]. La estructura del *hexon* se estudió por difracción de rayos X, y se observaron dos partes claramente diferenciadas, una basal y una apical (Figura 11.D) [78, 93]. El pedestal (la parte basal) forma la base hexagonal de la proteína, dónde cada monómero se une a los otros a través de dos motivos estructurales de barril β con topología *jelly roll* llamados P1 y P2 (Figura 11.A y C). La parte apical (exterior) tiene una forma triangular, y en ella los monómeros se entrelazan creando tres torres. Cada torre está formada por los *loops* 1 y 4 de los barriles P1 y P2, respectivamente, de dos subunidades adyacentes, y por el *loop* 2 del barril P1 de la subunidad opuesta (Figura 11.B y C). Así, estas torres aumentan la superficie de contacto entre dos subunidades contiguas y, a la vez, anclan la tercera subunidad. De esta manera las tres subunidades del *hexon* quedan imbricadas en cada una de las tres torres. Este conjunto de uniones entre monómeros a nivel de torres y de pedestal son las responsables de la elevada estabilidad del trímero. La complejidad del plegamiento del *hexon* explica su resistencia a la desnaturalización en urea 8M [94], y la necesidad de la proteína 100K como chaperona para su ensamblaje [95, 96].

En una comparación de las secuencias del *hexon* de los primeros 51 serotipos humanos llevada a cabo por Ebner *et al.* [97], se concluyó que el *hexon* tiene un patrón de homología que se da en todos los serotipos, y que consiste en 4 zonas conservadas (C1 a C4) y 3 variables (V1 a V3). Las zonas conservadas comprenden cerca del 80% del total de la secuencia, y la variabilidad de estas zonas entre serotipos es menor al 15%. Por el contrario, las tres zonas variables

muestran una alta divergencia entre serotipos y especies de adenovirus tanto en longitud como en secuencia de aminoácidos. Otros estudios acerca de las zonas variables hablan de *clusters* de variabilidad más concretos llamados regiones hipervariables (HVRs), que son específicas de serotipo. Se han descrito 7 HVRs [98], aunque algunos autores han propuesto hasta 9 HVRs [79]. Estas HVRs se localizan en los *loops* 1 y 2 de las torres de la proteína y se proyectan hacia el exterior de la cápside, ocupando una gran parte de la superficie en contacto con el medio [99], como se puede ver en la Figura 12. Mediante el estudio de adenovirus quiméricos para el *hexon* se ha observado que la sustitución de las HVRs de un serotipo por las de otro previene la neutralización por parte de anticuerpos durante la respuesta humoral contra los adenovirus [99-101]. Es por esto que los HVRs son uno de los principales epítomos implicados en la reacción serológica específica de serotipo y, por lo tanto, en su clasificación taxonómica clásica. Desde el punto de vista estructural, las HVRs participan en el contacto entre trímeros de *hexon* diferentes a través de uniones electrostáticas [84].

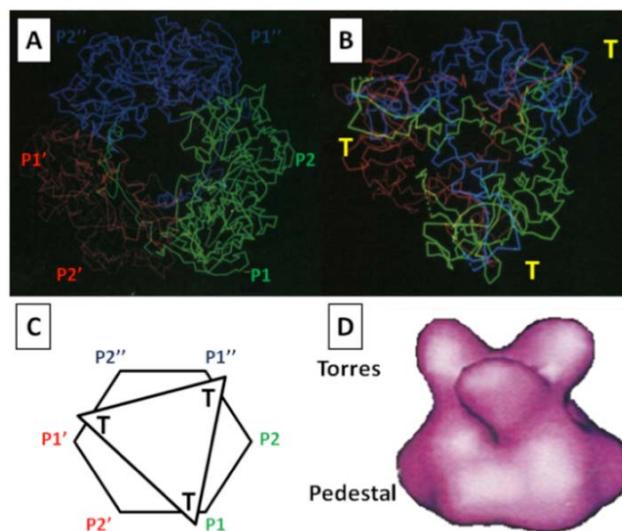


Figura 11. Organización de las tres subunidades en un trímero de *hexon*. Cada monómero se representa en un color diferente. A) Pedestal del trímero en vista superior. Localización de los barriles β de una subunidad indicados como P1 y P2. B) Parte apical del trímero en vista superior. Indicado con T la localización de una de las torres formada por *loops* de los tres monómeros. C) Representación esquemática de las dos partes del trímero superpuestas. D) Mapa de densidad del *hexon* en vista lateral donde se aprecian las dos partes de la proteína. Figura tomada y adaptada de [78] (A-C) y de [70] (D)

El *hexon* juega un papel importante en la biodistribución de los adenovirus de las especies A, B y C, pero no en la D, debido a su unión con el factor de coagulación X (FX) [102], que se da a nivel de las HVRs 5 y 7 [103].

2.1.2 PENTON BASE

El *penton* es el capsómero que sella los 12 vértices de la cápside, y recibe este nombre por contactar con otros 5 capsómeros, los 5 *hexon* peripentonales [92]. La interfase entre el *penton* y resto de la cápside se caracteriza por una baja superficie de contacto [70]. Así se explica la facilidad con la que se puede aislar el *penton* bajo condiciones de disociación suaves [75]. En realidad, el *penton* es un complejo formado por dos tipos de proteínas unidas de forma no covalente, los polipéptidos III y IV o *penton base* y *fiber*, respectivamente. El *penton*

base es la estructura que forma el vértice, y desde él se proyecta una proteína fibrosa alargada que es el *fiber* [70]. Ambas proteínas participan en la interacción con la célula huésped, siendo responsables de la unión del virus al receptor primario y de su posterior internalización en la célula. Tanto es así, que se ha demostrado que dodecaedros recombinantes formados únicamente por *penton base* y *fiber* pueden unirse a la membrana de las células y después entrar en ellas para migrar hasta una localización perinuclear [104].

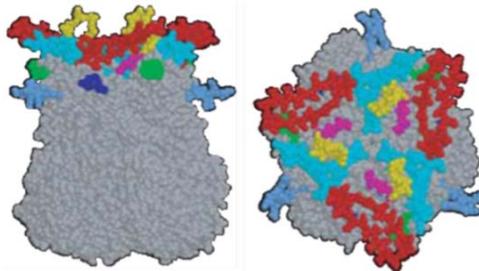


Figura 12. Localización de las 7 HVRs en vista lateral (izquierda) o vista apical (derecha) del trímero *hexon*. HVR1, rojo; HVR2, verde; HVR3, fucsia; HVR4, azul; HVR5, amarillo; HVR6 azul marino, HVR7, cian. Figura obtenida y modificada de [99]

El *penton base* es un pentámero formado por 5 subunidades del polipéptido III de 63 kDa [68], que se unen íntimamente y se disponen helicoidalmente girando en sentido antihorario [70] (Figura 13.A). La obtención de cristales de la proteína del Ad2 permitió observar la estructura alargada de los monómeros de *penton base* en la que se distinguen dos dominios [80]. El dominio proximal, en contacto con la cápside, lo forman los extremos N y C-terminal, y consiste en un motivo estructural de barril β con topología *jelly roll* compuesto por 8 cadenas β antiparalelas. En los primeros 50 residuos de la proteína se encuentran dos motivos xPPxY conservados en todas las especies de adenovirus humanos, y el primero de ellos está implicado en la unión del *penton base* con E3 ubiquitina ligasas celulares [105]. El dominio distal, en contacto con el medio, supone el 60% de los residuos de la proteína y consiste en dos largas inserciones intercaladas entre las cadenas β D/E y F/G del *jelly roll* del dominio proximal. La primera inserción sobresale de la superficie de la cápside y contiene un *loop* flexible en el que se encuentra el motivo RGD, y en la segunda inserción también se observa un *loop* variable entre serotipos diferentes (Figura 13.C).

La secuencia del *penton base* está altamente conservada, con más de un 70% de homología entre proteínas de dos adenovirus diferentes. La variabilidad interespecífica, tanto en longitud como en secuencia, está prácticamente restringida a los *loops* variable y RGD, siendo este último un *loop* hipervariable [106].

El motivo RGD (Arg-Gly-Asp) de los monómeros del *penton base* se encuentra expuesto al medio [107] y interacciona con las integrinas de la superficie celular para promover la endocitosis del virus [108-111]. Esta secuencia está presente en el *penton base* de la mayoría de especies de adenovirus humanos, en concreto en las especies A, B, C, D, E y G [112-114]. La excepción es la especie de adenovirus humano F que contiene las secuencias RGAD e IGDD en los serotipos 40 y 41, respectivamente [115].

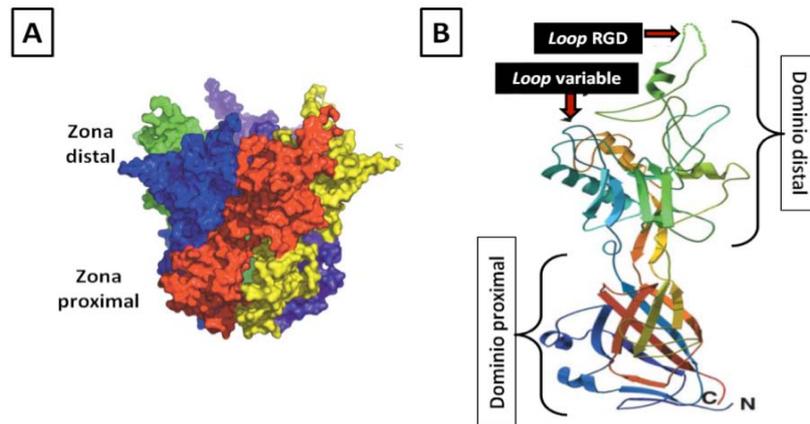


Figura 13. A) Representación del pentámero de *penton base*. B) Monómero de *penton base*. Figuras A y C obtenidas de [80].

La obtención de cristales de *penton* de Ad2 por Zubieta *et al.* [80] permitió analizar por difracción de rayos X la disposición y las interacciones entre los componentes del *penton*. En el centro del eje de simetría del *penton base* se observa un poro de 15-25 Å de diámetro que queda cubierto por el *fiber* (Figura 14.A), siendo los residuos implicados en la interacción con el *fiber* altamente conservados. La interacción *penton base-fiber* se da en la superficie del pentámero, en concreto en las hendiduras que se forman en la interfase entre dos monómeros de *penton base* (Figura 14.A). Estas cinco hendiduras se disponen radialmente cada 72°, y en ellas reposa el dominio flexible *tail* del *fiber*, que se une al *penton base* a través de puentes de hidrógeno y salinos. Este modelo fue confirmado por Cryo-EM de Ad5 y Ad5F35 [116, 117], pero en estos estudios se observaron algunas diferencias debidas al uso de cápsides enteras en lugar de cristales de *penton*. La interacción de las dos proteínas también se da a través de uniones hidrofóbicas entre la parte basal del dominio *shaft* del *fiber* y un anillo en la superficie del *penton base* alrededor del poro central. El estudio de cristales de adenovirus quiméricos Ad5F35 a 3,5 Å mostró que el *fiber* se inserta en el poro [84], pero podría ser un artefacto [117]. Y un tercer tipo de interacción es la que se da entre el extremo N-terminal del *fiber* que se extiende hasta contactar con el *loop* RGD del *penton base*. Esto podría explicar los cambios conformacionales observados en este *loop* al unirse el *fiber* al *penton base* [118] (Figura 14.B).

2.1.3 FIBER

El *fiber* es un trímero formado por tres subunidades del polipéptido VI. En Ad2 y Ad5 tiene una masa molecular de unos 62 kDa [68], pero el tamaño varía entre las diferentes especies de adenovirus (Tabla 1). Habitualmente hay una proteína *fiber* en cada uno de los 12 vértices de la cápside, donde se une al *penton base* y se proyecta desde él hacia el exterior como una estructura fibrosa (Figura 9 y Figura 10). Sin embargo hay algunas excepciones, como el adenovirus de ave FAV1 que tiene dos *fibers* de diferentes longitudes unidos a cada *penton base* [119, 120], o el adenovirus de lagarto LAdV2 que contiene *pentons* o bien con un *fiber* corto o bien con tres *fiber* largos [121]. Los genomas de los adenovirus humanos de las especies A-E contienen un solo gen para el *fiber*, pero las especies F y G tienen dos genes que codifican dos *fibers* de diferentes longitudes y secuencias [114, 122-124].

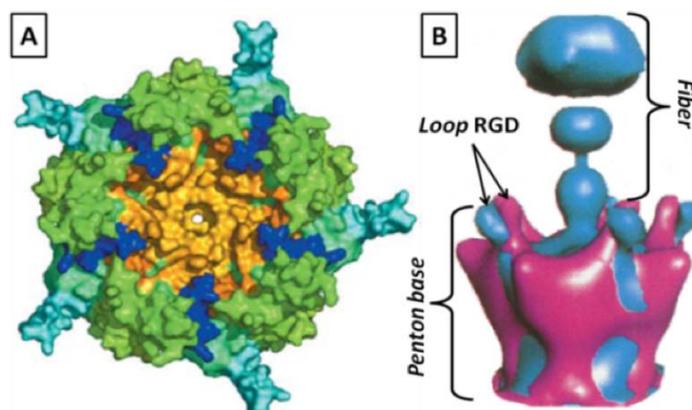


Figura 14. A) Vista apical del *penton base* donde se observan el poro central y las hendiduras de unión al *fiber* (azul). B) Conformación del *loop RGD* con (azul) y sin (magenta) el *fiber* unido al *penton base*. Figuras obtenidas y adaptadas de [80] (A) y de [118] (B)

El *fiber* es el principal responsable de la unión del virus al receptor celular primario [125], que después será internalizado en la célula por la interacción entre el *penton base* y las integrinas. El uso de una estructura fibrilar que se una al receptor es atípico en la mayoría de virus icosaédricos, y su presencia facilitaría la interacción virus-célula, minimizando así la repulsión electrostática debida a las cargas en la superficie plana de la cápside [126, 127]. De hecho, en ausencia de *fiber*, la infectividad de los adenovirus se ve reducida en 4 órdenes de magnitud [128].

Tabla 1: Tamaños del <i>fiber</i> de las especies A-F de adenovirus humanos			
Especie	Nº de residuos	Longitud (nm)	Nº de repeticiones del <i>shaft</i>
A	556-587	33	20,5 ó 22,5
B	319-353	13	5,5 ó 7,5
C	528-582	33	18,5 ó 21,5
D	359-371	15	7,5
E	426	Desconocida	11,5
F (<i>fiber corto</i>)	387	22	11,5
(<i>fiber largo</i>)	547 ó 562	33	20,5 ó 21,5

Tabla 1. Tamaño de la proteína *fiber* de los adenovirus humanos. El número de residuos, de repeticiones del *shaft* y la longitud de las especies A-F se han obtenido de [127].

La estructura global de la proteína es compartida por todos los adenovirus, pero tanto la longitud como la secuencia son características de cada especie. En la estructura del *fiber* se distinguen tres dominios diferentes (Figura 15): un dominio *tail* corto y flexible en el extremo N-terminal, un dominio globular *knob* en el extremo C-terminal, y ambos separados por el dominio fibrilar *shaft* con un número variable de repeticiones.

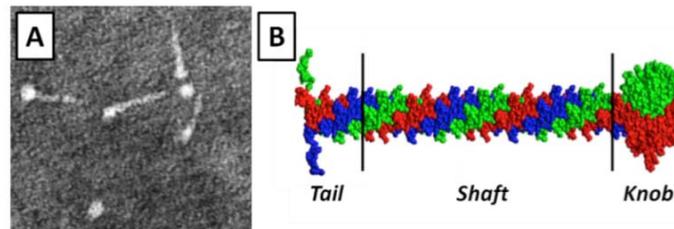


Figura 15. A) Fotografía tomada por microscopía electrónica de la proteína *fiber*. B) Representación y localización de los dominios *tail*, *shaft* y *knob* del *fiber*. Imágenes obtenidas y adaptadas de [71] (A) y [116] (B)

El *tail* del N-terminal es un dominio flexible de unos 45-50 residuos que ancla el *fiber* al *penton base*, y la interacción de estas dos proteínas se observó a través del estudio tanto de cristales de *penton base* asociados a los primeros 20 residuos del *tail* [80], como de cápsides intactas por Cryo-EM [116, 117]. La secuencia del *tail* está conservada, especialmente el motivo de unión al *penton base* FNPVYPY [80, 129]. El *tail* de los tres monómeros se dispone radialmente sobre tres de las cinco hendiduras del *penton base*, dejando libres las otras dos (Figura 16). El extremo N-terminal del *tail* se extiende hasta contactar con el *loop* RGD del *penton base*, mientras que sus C-terminales confluyen en el centro del *penton base*, desde donde emergen erguidos para formar el *shaft*.

El dominio central del *fiber* es el *shaft*, que se encuentra delimitado por las secuencias conservadas GVL y TLWT, constituyendo los motivos de transición *tail/shaft* y *shaft/knob*, respectivamente [130]. La excepción son los *fibers* cortos de los adenovirus de la especie F donde la secuencia TLWT es substituida por TIWS.

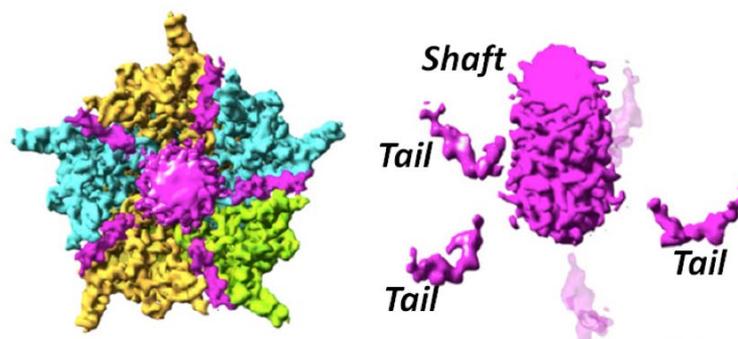


Figura 16. A la derecha, vista apical del *shaft* del *fiber* sobre el poro central del *penton base*. A la izquierda, vista lateral de la localización de las tres cadenas *tail* sobre las hendiduras del *penton base*. En transparente, las hendiduras no ocupadas por el *fiber*. Figura obtenida y adaptada de [116]

Estructuralmente, el *shaft* constituye la región fibrosa y alargada de la proteína debido a que los tres monómeros del *fiber* se ensamblan íntimamente de forma helicoidal mediante uniones inter e intramoleculares, formando una triple espiral β muy estable. Cada monómero del *shaft* está formado por un número variable de motivos pseudorepetitivos de aproximadamente 15 aminoácidos (Figura 17). Esta estructura repetitiva consiste en dos cadenas β antiparalelas conectadas por un giro β de tipo I o tipo II [131, 132]. En cada uno de los motivos repetitivos hay tres residuos hidrofóbicos que quedan situados en el interior de la espiral y que, en conjunto con los equivalentes de los otros dos monómeros, forman un núcleo hidrofóbico longitudinal. Otros dos residuos hidrofóbicos se sitúan de forma periférica y forman parches

hidrofóbicos que estabilizan el trímero. El último residuo del giro β que conecta las dos cadenas β de la repetición también está conservado, y es una glicina o una prolina. Dos repeticiones consecutivas se conectan por un *loop* variable expuesto al medio. El número de motivos en el *shaft* varía entre las diferentes especies de adenovirus, y es el principal factor que determina la longitud del *fiber* (Tabla 1), que en el caso de los adenovirus humanos Ad2 y Ad5 el número de repeticiones es 21,5.

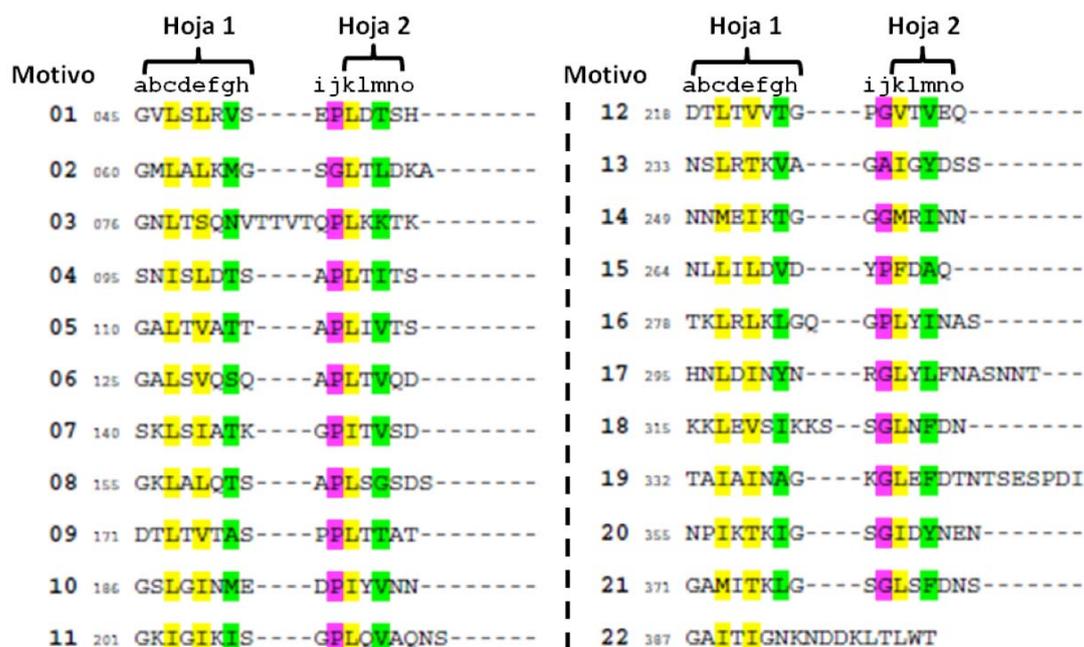


Figura 17. Representación de los motivos repetitivos del *shaft* del Ad2. Se indican de a-o los 15 residuos de cada repetición. Las dos cadenas β antiparalelas están formadas por los residuos b-h y k-n. En amarillo, los 3 residuos que forman el núcleo hidrofóbico central del *shaft* (c, e, k), en verde los residuos que forman los parches hidrofóbicos periféricos (g, m), y en púrpura los residuos P/G al final del giro β (i, j). Los residuos de o-a forman el *loop* variable que conecta dos repeticiones consecutivas. Figura basada en el artículo [132]

Una de las funciones del *fiber* es mantener el dominio de unión al receptor (*knob*) alejado de la superficie de la cápside, y de esta manera, se evitan los choques estéricos entre las cargas de la cápside y la membrana celular. Por esto, la longitud del *shaft* es clave para la correcta interacción entre el adenovirus y su receptor celular. Si esta longitud es modificada artificialmente, ya sea por alteración del número de repeticiones o por el uso de *fibers* quiméricos, la infectividad del virus se ve alterada drásticamente [126, 133, 134].

Por otro lado, el *shaft* no es un dominio completamente rígido, sino que en su parte más cercana al *penton base* se ha observado frecuentemente la existencia de una zona flexible que actúa como bisagra e inclina el *fiber* [135]. Esta región bisagra coincide con la tercera repetición del *shaft*, que en la mayoría de adenovirus contiene 2-4 residuos extra entre sus dos cadenas β . También se ha observado una segunda región flexible en la última repetición entera del *shaft*, donde la mayoría de adenovirus contienen una secuencia consenso KLGXGLXFD/N, y que facilitaría la inclinación del *knob*. Sin estas regiones flexibles el adenovirus no puede transducir las células eficientemente [136] ya que la flexibilidad del *fiber* permitiría que, una vez unido el *knob* a su receptor CAR, el *penton base* pueda interactuar con las integrinas

para la internalización del adenovirus, evitando los choques estéricos entre cápside y membrana celular (Figura 18). La especie D de adenovirus humanos es una excepción, ya que muchos de los serotipos que pertenecen a esta especie (como el Ad37) tienen *fibers* rígidos debido a la ausencia de una o ambas regiones de flexibilidad [130, 135]. El caso del Ad37 es especialmente ilustrativo, ya que a pesar de que se ha demostrado la capacidad de su *knob* de unirse a CAR, el virus no es capaz de transducir las células a través de CAR sino que lo hace a través de la unión a ácido siálico. En cambio, los adenovirus quiméricos basados en el Ad5 (incluido el *shaft*), pero con el *knob* del Ad37 sí que transducen las células a través del receptor CAR.

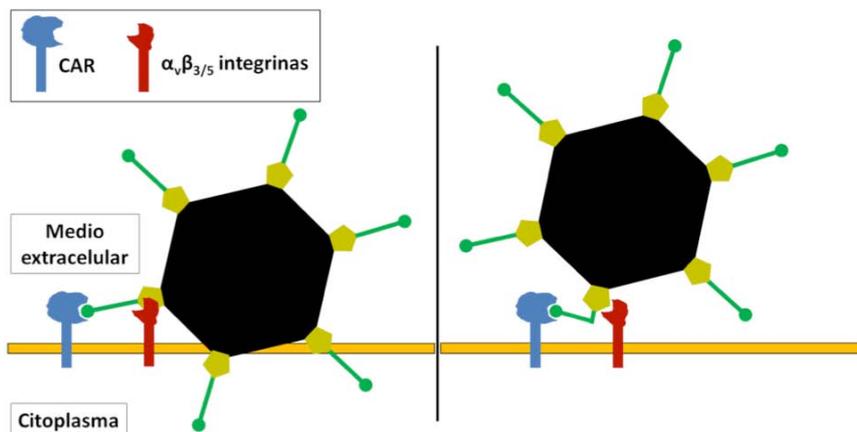


Figura 18. Representación esquemática del papel que juega el dominio flexible de la tercera repetición del *shaft* en la interacción entre el adenovirus (Ad5) y la célula, según el modelo propuesto en [136]. A la izquierda se ilustra el choque de la cápside con la membrana celular cuando el *fiber* es rígido. A la derecha, la flexibilidad del *fiber* permite el contacto del *penton base* con las integrinas sin que la cápside choque con la membrana celular

En el extremo C-terminal del *fiber*, la parte más distal respecto a la cápside, se encuentra un dominio en forma de cabeza globular, el *knob*. Este dominio es el responsable de la unión de los adenovirus a la célula huésped, mediante la unión del *knob* a su receptor celular [137, 138]. Así pues, la especificidad de receptor primario y célula diana de los diferentes adenovirus viene determinada en gran medida por la capacidad de su *knob* de unirse a un receptor celular u otro.

El *knob* fue el primer dominio del *fiber* en ser cristalizado, lo que permitió analizar su estructura y disposición tridimensional [139]. La estructura del monómero de *knob* consiste en 8 cadenas β antiparalelas (numeradas de la A a la J) que forman un sándwich β . Las cadenas G, H, I y D forman una hoja expuesta al medio llamada hoja R (*R-sheet*), mientras que las cadenas J, C, B y A forman la hoja V que está parcialmente enterrada en el trímero. Las cadenas E y F se encuentran en la hoja V, pero se consideran parte del *loop* DG (Figura 19.A). El ensamblaje del *fiber* se da gracias a la capacidad del *knob* de trimerizar espontáneamente, y esto desencadena la trimerización del *shaft* [140]. Los tres monómeros se unen en una estructura de hélice de tres aspas, con el eje de simetría en la depresión central de la hélice (Figura 19.B). Las hojas V participan en la trimerización del *knob*, dado que la mayoría de uniones intermoleculares se dan entre las hojas V de los tres monómeros.

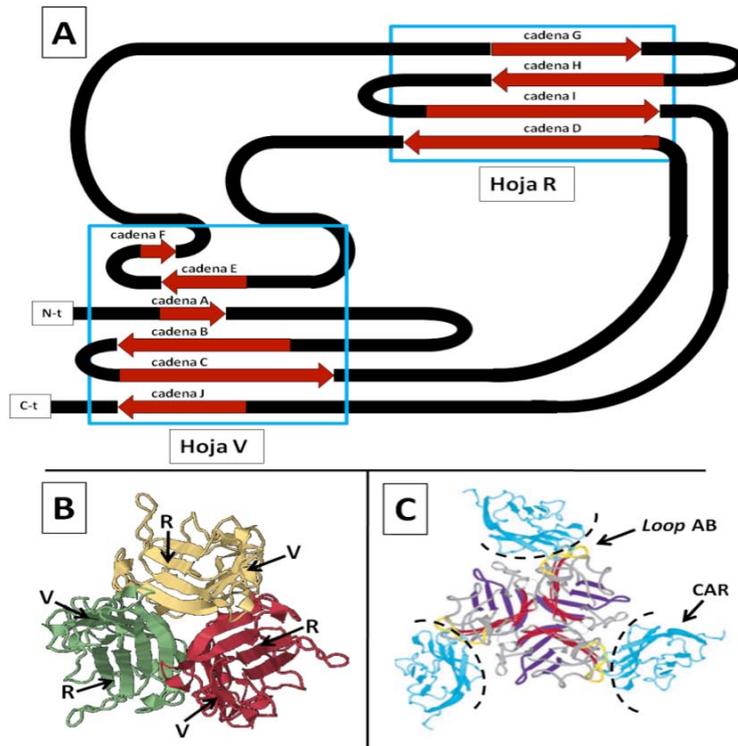


Figura 19. A) Representación esquemática de la disposición de las cadenas β (flechas rojas) que forman las dos hojas β antiparalelas (Hoja V y Hoja R) para el *knob* del Ad12. Figura basada en el modelo representado en [141]. B) Modelo tridimensional del trímero de *knob* en vista apical. Se señala la localización de las hojas V y R. El modelo se ha obtenido del *Protein Data Bank* (PDB) con la referencia 1KNB, publicado por Xia *et al.* [139]. C) Trímero de *knob* de Ad12 en complejo con tres moléculas de CAR (cian). Resaltado en amarillo el *loop* AB del *knob*. Figura adaptada de [142]

Inicialmente se pensó que la interacción con el receptor celular se daría en la depresión central de la proteína, pero cuando se pudo analizar por difracción de rayos X la interacción entre el *knob* del Ad12 y el CAR se observó que no era así [142]. Realmente, la unión entre CAR y el *knob* se da en los *loops* localizados en la interfase entre dos monómeros de este último, de manera que cada *fiber* puede unirse simultáneamente hasta a tres moléculas de CAR (Figura 19.C). En concreto, el *loop* AB participaría en más del 50% de las conexiones con el receptor, y sus residuos clave están conservados en aquellos adenovirus con capacidad de unirse a CAR, y ausentes en los que utilizan otros receptores [142, 143]. También contribuyen el *loop* DE (a veces englobado en el *loop* DG) y la cadena F del mismo monómero, así como el *loop* FG del monómero adyacente [144].

En aquellos serotipos de adenovirus humanos que sus *knob* se unen a receptores diferentes a CAR la estructura general del *knob* es similar. La afinidad por otros receptores se debe a diferentes factores como son la sustitución de residuos que participan en la unión, la longitud de los *loops* y su disposición en el espacio, y diferencias de cargas en la proteína.

2.1.4 PROTEÍNAS MINORITARIAS DE LA CÁPSIDE

Además de las tres proteínas mayoritarias (*hexon*, *penton* y *fiber*) los viriones contienen en la cápside otras proteínas minoritarias, llamadas también proteínas cemento. No se han podido obtener estructuras de estas proteínas a nivel atómico y, por lo tanto, la información sobre

ellas procede principalmente tanto de estudios funcionales como de la observación de cápsides enteras por Cryo-EM y difracción de rayos X. Esto ha provocado que el modelo descrito de su estructura y localización en la cápside vaya evolucionando y corrigiéndose a medida que se obtiene más información que, frecuentemente, contradice lo anteriormente publicado.

De todas las proteínas minoritarias del adenovirus, las que formarían parte de la estructura del virus son las proteínas IIIa, VI, VIII y IX, y participan en el ensamblaje del virión y la encapsidación del DNA, la estabilización de los diferentes componentes de la cápside y en el desensamblaje del virión durante la infección.

Su localización exacta es controvertida, pero estas cuatro proteínas se organizarían en la cápside en una capa externa, formada por IIIa y IX (Figura 20.A), y una interna formada por VI y VIII (Figura 20.B), disponiéndose así en un entramado que estabiliza los demás componentes del virión.

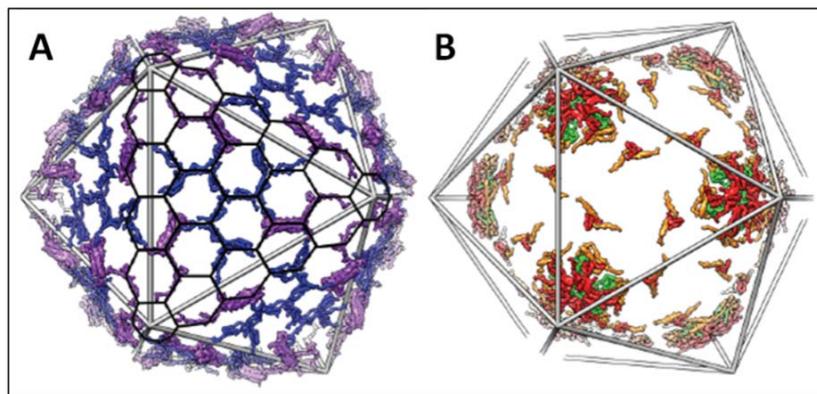


Figura 20. Organización de las proteínas minoritarias de la cápside IIIa, VI, VIII y IX. La proteína V del core interactúa con la proteína VI. A) Proteínas del exterior de la cápside. B) Proteínas del interior de la cápside. Figura obtenida de [145]

La proteína IIIa tiene una masa de aproximadamente 63 kDa [146, 147], y un número estimado de 60 copias por cápside [68]. Es necesaria para el ensamblaje de los viriones y la encapsidación del DNA [132, 148-151] y se localiza en los vértices de la cápside, junto al *penton base* y los *hexon* peripentonaes [83, 152], uniendo los GONs entre ellos y al vértice.

La proteína IX es propia del género *Mastadenovirus*. Es un polipéptido de unos 14 kDa, con 12 subunidades por cada lado del icosaedro (240 copias en total) [68, 153], que se organizan en 4 trímeros formando un *triskelion* que conecta los 9 *hexon* del GON, reforzando su unión y estabilizando la cápside [70, 88, 145]. En su ausencia, la cápside es más lábil y no se disocia en forma de GON [154, 155]. Una función no estructural asociada a la proteína IX es la inducción de la expresión de los genes tardíos (*late*) a través de la activación del *Major Late Promoter* (MLP) [156], aunque este papel podría no ser decisivo para una eficiente replicación de los viriones [157].

La proteína VI es un polipéptido de 23 kDa [68] y se sintetiza como un precursor de proteína VI (pVI) que participa en la translocación a núcleo de los trímeros de *hexon* [158]. Este precursor es procesado por la proteasa del adenovirus para obtener la forma madura, desprendiéndose

un fragmento del extremo C-terminal (pVIc) que actúa como cofactor de la propia proteasa durante la maduración de la cápside [159]. La forma madura de la proteína VI se localiza asociada íntimamente a los *hexon* peripentonales, uniendo dos de estos entre si y, a su vez, con el GON contiguo [84, 145]. De esta manera, la proteína VI quedaría expuesta tras la disociación del *penton*, después de la internalización del virus en la célula. Esto explica otra función atribuida a esta proteína, que es la disrupción de la membrana del endosoma que permite el escape del adenovirus a citoplasma [160-162].

La proteína VIII es un polipéptido de unos 15 kDa [68] que se encuentra bajo el vértice, asociada a las proteínas VI y V (del *core*), formando una estructura anular que conecta los *hexon* peripentonales y los une al GON [81, 145].

2.1.5 PROTEÍNAS MINORITARIAS DEL CORE

Tal y como se ilustra en la Figura 9.B, los adenovirus también contienen proteínas minoritarias en el interior de la cápside (*core*), que son las proteínas V, VII, μ (o X), IVa2, proteína terminal (TP) y la proteasa del adenovirus (AVP) [163]. Las proteínas V, VII y μ están asociadas al DNA debido su alto contenido en residuos básicos [74].

De todas ellas la proteína VII es la más abundante y envuelve la molécula de DNA en toda su extensión, condensándola de forma análoga a las histonas en el DNA celular [164, 165]. El complejo nucleoproteína VII-DNA se estructura en un núcleo denso con proyecciones hacia cada uno de los vértices de la cápside.

La proteína V tiene afinidad tanto por el complejo nucleoproteína como por proteínas de la cápside, formando un esqueleto que conecta las dos estructuras [166].

La proteína pre- μ también se une al DNA con alta afinidad [167]. El papel que se propone para esta proteína sería participar en la condensación del DNA en su forma precursora pre- μ y, una vez procesada por la proteasa a su forma madura (μ), se relajaría la estructura del DNA para facilitar su entrada en el núcleo [168].

La proteína IVa2 participa en la translocación del genoma adenoviral al interior de la cápside, y hay unas 6 copias por virión, de las cuales una se encuentra en un único vértice [169].

La proteína terminal (TP) se encuentra unida covalentemente a cada extremo 5' del DNA. Además de proteger el DNA de exonucleasas, la TP participa en la replicación del genoma del adenovirus [170].

La proteasa del adenovirus se encuentra en el interior de la cápside, y sus sustratos conocidos son las proteínas pIIIa, pVI, pVII, pVIII, pre- μ y pTP [168]. La proteólisis es necesaria tanto para la maduración de los viriones como para su desensamblaje durante la infección [171].

2.2 GENOMA DE LOS ADENOVIRUS

El genoma de los adenovirus consiste en una sola molécula lineal de DNA de cadena doble (dsDNA) de una longitud aproximada de 36 kb que contiene los genes del adenovirus en ambas

hebras de la cadena de DNA (Figura 21). Estas unidades de transcripción se dividen en *early*, *intermediate* o *late* dependiendo de si se activan antes, durante o después de iniciarse la replicación del genoma, respectivamente [172]. Las unidades de transcripción *early* son E1A, E1B, E2A, E2B, E3 y E4, y entre sus funciones están la regulación de la expresión de otras proteínas, la replicación del DNA viral y la modificación del entorno celular para una óptima producción de los viriones. Las unidades de transcripción *intermediate* codifican las proteínas IX, IVa2 y L4-22k/33k, y éstas activarán la transcripción de las proteínas de la fase *late* [157, 173, 174]. Las unidades de transcripción *late* son L1, L2, L3, L4 y L5, y están bajo control de un único promotor denominado *Major Late Promoter* (MLP). El exón U también se expresa en fase *late*, pero su transcripción está regulada por un promotor propio [175, 176]. Las proteínas expresadas en la fase *late* incluyen los elementos estructurales de la cápside, así como también otras proteínas necesarias para el ensamblaje y maduración del virión. En prácticamente todas las unidades de transcripción se dan procesos de *splicing* alternativo [177], de manera que los adenovirus producen más de 40 tipos de proteínas diferentes.

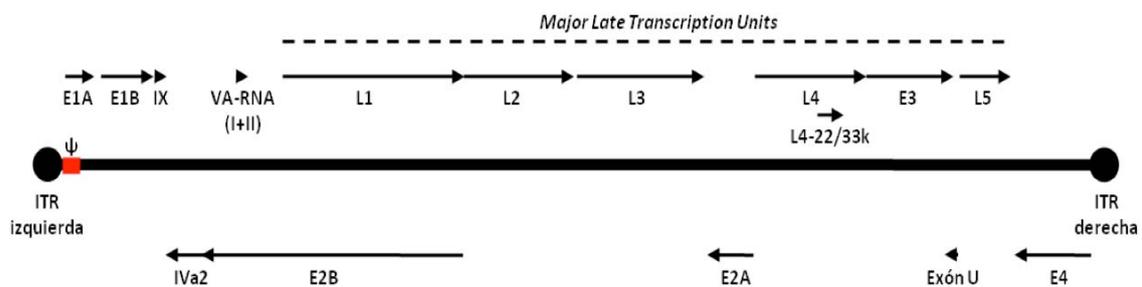


Figura 21. Distribución de las unidades de transcripción del HAdV-5. La localización, orientación y el tamaño han sido extraídos de la referencia AC_000008.1 (NCBI). En rojo se indica la posición de la señal de empaquetamiento (ψ), pero el tamaño no está a escala.

Además de las regiones codificantes, los adenovirus también transcriben un RNA denominado *Virus Associated RNA* (VA RNA). El VA RNA es transcrito por la RNA Polimerasa III, y tiene una longitud de unos 160 pb con secuencia autocomplementaria, dando lugar a una estructura similar a un dsRNA [178, 179]. Dependiendo de la especie de adenovirus hay uno o dos VA RNAs (VA RNA-I, VA RNA-II) [179]. Los VA RNA impiden la dimerización y activación de la proteína quinasa R (PKR), componente de la inmunidad innata que en respuesta a dsRNA suprime la traducción de proteínas virales [180].

Por último, el genoma contiene dos elementos más que son necesarios en *cis* para la replicación y la encapsidación. Uno de estos elementos es el *Inverted Terminal Repeat* (ITR), una secuencia de unos 100 pb presente en ambos extremos del DNA, y que actúa como origen de replicación del genoma. El otro elemento es la señal de empaquetamiento (Ψ) situada adyacente a la ITR izquierda, que consiste en una secuencia repetitiva con una longitud total de 150-200 pb. La señal de empaquetamiento es imprescindible para la incorporación del DNA en la cápside [181-183] (Figura 21).

2.3 CICLO VIRAL DE LOS ADENOVIRUS

Los adenovirus son virus dsDNA y, por lo tanto, cuando infectan una célula necesitan alcanzar el núcleo para replicar el genoma y producir nuevos viriones. Estos viriones escaparán de la célula huésped e infectarán otras células, completando así el ciclo. Las fases del ciclo viral se esquematizan en la Figura 22.

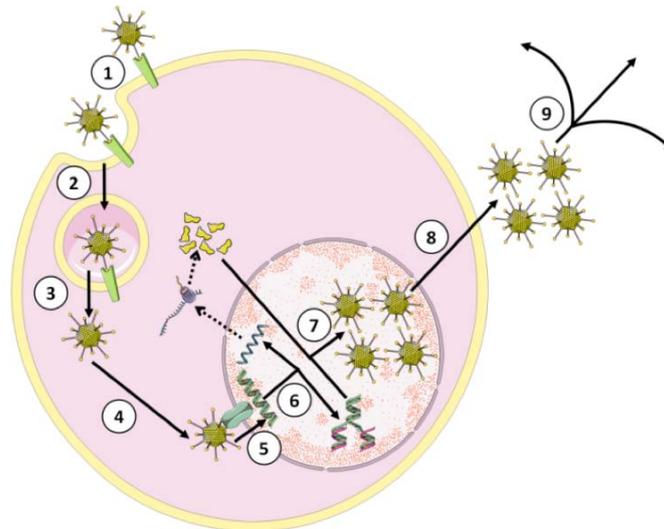


Figura 22. Representación de las diferentes fases del ciclo viral. 1) Unión al receptor celular, 2) internalización en la célula, 3) penetración en el citosol, 4) migración hasta el núcleo, 5) translocación del genoma al interior del núcleo, 6) expresión de los genes virales y replicación del genoma, 7) formación de nuevos viriones, 8) salida de la célula huésped y 9) dispersión hacia nuevas células

2.3.1 UNIÓN A LA MEMBRANA CELULAR

El primer paso del ciclo consiste en el reconocimiento por parte del adenovirus de su célula diana a través de la interacción con proteínas celulares de membrana, que actúan como receptores. Esto se produce mediante la unión del *fiber* al receptor celular por el cual tiene afinidad [125]. Tal y como se ha explicado anteriormente, las características del *fiber* en cuanto a longitud y flexibilidad, permiten el correcto acercamiento de la cápside a la membrana para que se pueda dar la interacción entre el *penton base* y las integrinas que, a su vez, promoverán la internalización del virus [109, 110].

Por otro lado, durante la unión del virus a la membrana también se dan los primeros pasos del desensamblaje de la cápside [184] debido a la dinámica de las proteínas de membrana que interactúan con el virus. La combinación de movimientos de deriva del CAR, estimulados en parte por la unión al *fiber*, junto con el confinamiento de las integrinas unidas al *penton base*, conduce a la aparición de fuerzas mecánicas que tensionan la cápside y, estas tensiones producen un desprendimiento parcial del *fiber*, quedando expuesta la proteína VI [185]. Además, la unión del *penton base* a las integrinas induce cambios conformacionales en ambas proteínas, que podrían debilitar la unión del *fiber* al *penton base* y facilitar su desprendimiento [186].

2.3.2 INTERNALIZACIÓN EN LA CÉLULA

Las integrinas de la membrana celular forman un anillo alrededor del *penton base* [186] que activa vías de señalización en las que participan dinamina [187], PI3K [188] y GTPasas de la familia de Rho [189]. Como resultado, se reorganiza el citoesqueleto y se estimula la endocitosis del adenovirus en compartimentos endosomales.

Se han descrito mecanismos de internalización alternativos dependiendo de la especie y serotipo del adenovirus, y de la célula huésped. Así, en los adenovirus de la especie B (Ad3 y Ad35) la internalización en células epiteliales y hematopoiéticas se da por macropinocitosis [190, 191]. El Ad37 entra en las células de la cornea a través de endocitosis mediada por balsas lipídicas (*lipid rafts*) en caveolas [192]. Otro ejemplo es el adenovirus canino 2 (CAV-2) que en neuronas usa el receptor CAR tanto para la unión a la célula como para su endocitosis [193].

2.3.3 DISRUPCIÓN DEL ENDOSOMA Y PENETRACIÓN EN EL CITOSOL

Una vez internalizado, el adenovirus ha de escapar del endosoma para poder migrar hacia el núcleo. El adenovirus tiene la capacidad de comprometer la integridad de la membrana endosomal y provocar su disrupción para acceder al citosol [194]. Inicialmente se pensaba que el pH ácido del endosoma era responsable de cambios conformacionales en la cápside que, a su vez, expondrían los epítomos hidrofóbicos del *penton base* que desintegrarían la membrana [195-197]. Actualmente, se atribuye a la proteína VI la capacidad de disrupción de la membrana del endosoma por un mecanismo independiente del pH [160]. El pH del endosoma contribuiría al desensamblaje parcial de la cápside, emergiendo así la proteína VI encerrada en el vértice, aunque el papel del pH del endosoma es un tema controvertido [194, 198]. Se ha propuesto que la lisis de la membrana se da a través de un dominio en hélice α anfipática en el extremo N-terminal de la proteína VI, junto con otras tres hélices α internas [161, 199].

Los endosomas tempranos, con los adenovirus endocitados, prosiguen su ruta de maduración hacia endosomas tardíos y lisosomas. Un factor que influye en la fase de maduración del endosoma en la cual escapa el adenovirus es la interacción entre el *knob* y su receptor primario [200, 201].

2.3.4 MIGRACIÓN HACIA EL NÚCLEO CELULAR

Una vez el adenovirus se encuentra en el citosol, tiene que continuar su ruta hacia el núcleo (Figura 23). El Ad5 se acumula en la región perinuclear entre 60 y 90 minutos después de la infección [202, 203]. Esto implica que los adenovirus no se mueven por difusión, sino que utilizan un mecanismo de migración dirigido hacia el núcleo. Este mecanismo es la utilización de los microtúbulos para moverse en dirección al centrosoma o MTOC (*MicroTubule Organizing Center*) que se localiza cerca del núcleo [202]. El adenovirus tiene un movimiento neto hacia el extremo (-) del microtúbulo (hacia el MTOC), aunque alterna movimientos hacia el extremo (+) y el (-) [204]. Para desplazarse, el adenovirus utiliza la proteína motora dineína [204] que se une directamente al *hexon* [205], pero para que se de esta unión se han de cumplir dos condiciones. Por un lado, la dineína ha de ser fosforilada por la proteína kinasa A (PKA) para poder unirse al *hexon* [206]. El propio adenovirus induce la activación de la vía de

PKA [207]. Y por otro lado, dineína se une a *hexon* si este previamente ha sido expuesto a un pH ácido [205, 208].

Aunque el mecanismo más estudiado es la migración del adenovirus por la unión dineína-*hexon*, no se puede descartar la participación de otras proteínas. En concreto, se ha observado que la ubiquitinación del motivo PPXY de la proteína VI también podría participar en la migración, por un mecanismo aún desconocido [209].

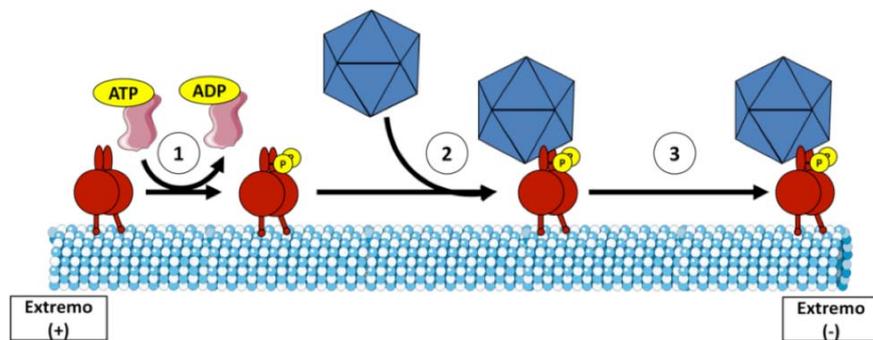


Figura 23. Migración del adenovirus hacia el núcleo. 1) Fosforilación de dineína por parte de PKA. 2) Unión de la cápside (parcialmente desensamblada) a la dineína fosforilada, a través del *hexon*. 3) Transporte de la cápside hacia el extremo (-)

2.3.5 TRANSLOCACIÓN AL INTERIOR DEL NÚCLEO

Cuando el adenovirus termina su recorrido a través de los microtúbulos debe entrar en el núcleo para producir nuevos viriones. Para entrar en el núcleo utilizan el complejo del poro nuclear (NPC) [210], cuyo diámetro es de 40nm [211]. La cápside del virus tiene un diámetro mayor, por lo tanto el adenovirus ha de terminar el desensamblaje de la cápside para introducir el DNA en el núcleo, el cual entra acompañado de la proteína del *core* VII [210]. La proteína VII contiene señales de importación a núcleo, y los mecanismos de importación en sus formas madura y precursora (pVII) son diferentes [212]. Esto convierte a la proteína VII en una firme candidata a ser la lanzadera que se asociaría a los factores de importación nuclear para translocar el genoma al nucleoplasma.

La cápside del adenovirus, ya parcialmente desensamblada en los pasos anteriores, se ancla al NPC por unión directa entre el *hexon* y la nucleoporina CAN/Nup214 [213, 214], para posteriormente ser desensamblada por la proteína motora kinesina-1, que también aumenta la permeabilidad del NPC [215]. La kinesina-1 se une a través de su cadena ligera a la proteína IX del virus, y a través de su cadena pesada a la nucleoporina Nup358, de tal manera que al desplazarse hacia el polo (+) de los microtúbulos provoca la disrupción de los GONs y el NPC, y así el genoma adenovirus puede translocarse hacia el núcleo a través de un poro más permeable.

2.3.6 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES VIRALES Y REPLICACIÓN

Una vez en el núcleo, el genoma del adenovirus se mantiene de forma episomal. La proteína VII se disocia gradualmente del DNA viral, permaneciendo durante más tiempo en aquellas

regiones de expresión tardía [216]. Paralelamente, el DNA viral se asocia con histonas celulares.

De forma esquemática, se pueden distinguir tres etapas en la expresión de genes virales. Una primera fase preparativa temprana (*early*), una fase intermedia de replicación del DNA, y una fase tardía (*late*) de formación de los capsómeros y ensamblaje de los viriones. El adenovirus ejerce un control estricto sobre los genes virales implicados en cada fase, dando como resultado una activación secuencial de los mismos.

Durante la fase temprana, la transcripción de E1A es detectable minutos después de la entrada del genoma viral en el núcleo [217], por eso a veces es llamada la fase *immediate early*. La expresión de E1A es facilitada por la presencia de *enhancers* en sus elementos reguladores [218], y la función de sus productos génicos es la transactivación de E1B, E2, E3 y E4 [219]. La proteína celular retinoblastoma (Rb) retiene la célula en fase G1, ya que se une al factor de transcripción E2F (*E2 promoter binding factor*) y reprime su actividad promotora [220]. Una de las funciones de E1A es precisamente la disociación del complejo Rb-E2F, promoviendo la entrada de la célula en fase S [221, 222]. El E2F liberado activa la expresión de la región E2 del adenovirus [223] activando la replicación del genoma viral, ya que el E2 codifica las proteínas necesarias para la replicación del DNA, que son las proteínas DNA polimerasa viral, pTP y DNA *Binding Protein* (DBP).

La replicación del genoma se inicia en las ITRs del adenovirus, donde se formará un complejo de iniciación. Las proteínas pTP y polimerasa, sintetizadas a partir de la región E2, forman un heterodímero donde la polimerasa catalizará la unión de un nucleótido dCTP en el radical –OH del residuo S580 de pTP, de manera que pTP-dCMP provee el extremo 5'-OH necesario para iniciar la polimerización [224]. Este complejo pTP-dCMP/polimerasa reconoce el origen de replicación de la ITR para iniciar la replicación [225], en un proceso donde también participa la DBP viral [226]. Además, el complejo de iniciación está compuesto también por los factores celulares NFI y Oct-1 que se unen a la ITR para potenciar la replicación [227]. Cuando se forma el complejo de iniciación, el dCMP de la pTP se complementa con el cuarto nucleótido (G) de la cadena molde 3'-GTAGTA y la polimerasa añade los siguientes dos nucleótidos A y T, formando un intermediario pTP-CAT [228]. Después, este intermediario se separa de la polimerasa desplazándose hacia los primeros tres nucleótidos, que también son GTA en la cadena molde, para iniciar la fase de elongación [229]. Cuando pTP-CAT se coloca en el primer nucleótido de la cadena molde, la polimerasa se separa del complejo de iniciación, pudiendo empezar así la elongación de la cadena naciente. La iniciación de la replicación se esquematiza en la Figura 24.A. La proteína DBP es necesaria también durante la elongación [230-232]. Por un lado, su actividad helicasa separa ambas hebras del DNA y aumenta la procesividad de la polimerasa. Por otro lado, su capacidad de unión a ssDNA le permite mantenerse unida a la cadena desplazada, protegiéndola de la exposición a nucleasas (Figura 24.B). Finalmente, la cadena ssDNA desplazada durante la elongación también debe replicarse (Figura 24.C). Dado que el complejo de iniciación requiere dsDNA, ambas ITRs de la cadena desplazada deben hibridarse para que se pueda formar el complejo, y replicar la cadena [233].

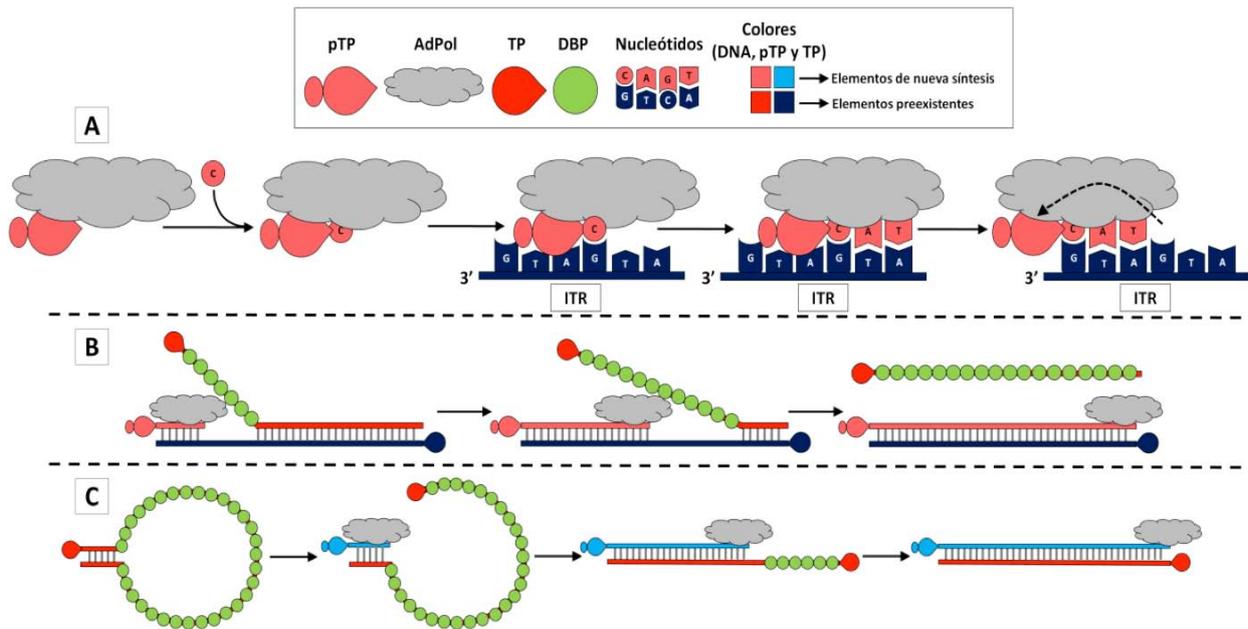


Figura 24. Replicación del genoma del adenovirus. A) Iniciación de la replicación. B) Elongación de la cadena sintetizada. C) Replicación de la cadena desplazada

Además de replicar el DNA, el adenovirus debe generar las proteínas necesarias para ensamblar los viriones y encapsidar en ellos el genoma viral, lo que implica que ha de activar la transcripción de los genes de la fase tardía bajo control del MLP, que hasta la replicación del genoma ha estado prácticamente inactivo. La activación de este promotor viene estimulada por las proteínas L4-22k y 33k que, a pesar de encontrarse en la región L4, su expresión está controlada por un promotor propio (L4P) activo durante la fase intermedia [174, 234]. El promotor L4P se encuentra inhibido durante la fase temprana por el factor de transcripción TFII-I [235]. Algunos de los factores que participan en su activación son las proteínas virales E1A, E4 Orf3 y IVa2 [174], así como la proteína celular p53 [236]. En el caso de la proteína IVa2, que es un gen de expresión intermedia, su expresión está reprimida por factores celulares. Al replicarse el DNA, la concentración de los represores no es suficiente para inhibir la expresión de IVa2 [237], de manera que la propia replicación del genoma es un elemento de control para asegurarse la expresión tardía de las proteínas de la cápside.

2.3.7 ENCAPSIDACIÓN DEL GENOMA

El último paso que debe hacer el adenovirus antes de escapar de la célula es el ensamblaje de los viriones y la encapsidación del DNA en su interior. Aún no se conoce el mecanismo de encapsidación, aunque se sabe que es un proceso en el que participan las proteínas pIIIa, L1-52/55k, IVa2 y L4-22k [151, 238-240]. Estas proteínas reconocen la señal de encapsidación y forman en ella un complejo proteico que dirigirá la encapsidación [241-244]. La presencia de un dominio ATPasa en la proteína IVa2 la sitúa como candidata a ser el motor que transloca el DNA al interior de la cápside [245, 246]. Finalmente, la proteasa del adenovirus ingresa en la cápside y proteoliza la proteína L1-52/55k, que no se encuentra en los viriones maduros, así como las proteínas pIIIa, pVI, pVII, pVIII, pμ y pTP [247].

2.3.8 ESCAPE DE LOS VIRIONES Y DISPERSIÓN A NUEVAS CÉLULAS

Finalmente, una vez formados los viriones, han de escapar de la célula huésped para infectar nuevas células y empezar un nuevo ciclo viral. No se conoce el mecanismo por el cual el virus mata la célula huésped para salir, pero para hacerlo es imprescindible el papel de la *Adenovirus Death Protein* (ADP) [248, 249]. La ADP es una glicoproteína integral de membrana que se localiza principalmente en la membrana nuclear [250]. Esta proteína, codificada por el adenovirus, se acumula en grandes cantidades hacia el final del ciclo [251] y su expresión está controlada por la L4-22k [244]. Se ha propuesto que la función de ADP podría ser antagonizar los efectos de la proteína viral antiapoptótica E1B-19k, puesto que los virus mutantes para E1B-19k lisan las células independientemente de la presencia o ausencia de ADP [252]. A pesar de esto, no se sabe de qué manera actuarían puesto E1B-19k inhibe la liberación de la progenie viral por algún mecanismo independiente de su efecto antiapoptótico.

En epitelio respiratorio, los adenovirus escapan de las células polarizadas por la membrana basolateral, pero deben infectar nuevas células a través de la membrana apical. Esto supone una barrera a la difusión ya que, en el epitelio, las superficies apical y basal están separadas por la presencia de uniones intercelulares estrechas. Se ha descrito que los adenovirus producen un exceso de *penton base* y *fiber* [253-256], y esta sobreexpresión se atribuye a su capacidad de deshacer las uniones intercelulares mediadas por CAR, lo que permeabilizaría el epitelio, permitiendo al virus migrar hacia la superficie apical para infectar nuevas células.

2.4 ADENOVIRUS COMO VECTOR DE TERAPIA GÉNICA

Los adenovirus han sido históricamente los vectores más utilizados en ensayos de terapia génica. A pesar del auge de otros vectores virales, como los AAV, aún son los vectores (tanto virales como no virales) con los que se han llevado a cabo más estudios clínicos (Figura 6). Hay varias razones que explican la preferencia de los adenovirus, especialmente los derivados de Ad2 y Ad5, respecto a otros vectores. Por un lado, son vectores con una elevada capacidad de transducción dando lugar a niveles elevados de expresión del transgén. Por otro lado, su biología ha sido ampliamente estudiada, de manera que se tiene un vasto conocimiento sobre su comportamiento y posible toxicidad. A diferencia de otros vectores virales no producen mutagénesis insercional, porque su DNA permanece de forma episomal, y tiene una frecuencia muy baja de integración en el genoma de la célula huésped [257-259]. Además, los vectores adenovirales pueden ser producidos de forma eficiente bajo condiciones GMP (*Good Manufacturing Practices*) [260].

Es importante destacar que los vectores adenovirales de terapia génica no son adenovirus *wild type*. Por bioseguridad, los vectores adenovirales contienen deleciones en su genoma que afectan, al menos, a la región E1 de su genoma [261]. Tal y como se ha explicado en el apartado del ciclo viral, en la región E1 se encuentran los elementos que se activan al llegar al núcleo celular, y que disparan la expresión del resto de genes virales y la consiguiente replicación del genoma y formación de viriones. Eliminando el E1 se mejora la bioseguridad de los vectores adenovirales ya que así serán incapaces de replicarse en el paciente. Por otro lado, es conveniente evitar la expresión de los genes virales por la capacidad transformante que de

las regiones E1 y E4 de algunos serotipos [262, 263]. Además de la bioseguridad, la expresión de proteínas virales induce la respuesta inmune contra la célula transducida por el virus, extinguiendo la expresión del transgén. Y por último, el espacio que se libera eliminando genes virales, es utilizado para la introducción del gen de interés.

La producción de los vectores adenovirales debe hacerse en líneas celulares permisivas para su replicación que complementen en *trans* las proteínas de E1 que le faltan [264]. De todas las líneas celulares desarrolladas para la producción de adenovirus la más utilizada ha sido la línea HEK293 (*Human Embryonic Kidney*). Esta línea contiene un fragmento de DNA del Ad5 del nucleótido 1 al 4344 integrado en su cromosoma 19 [265, 266]. Así, las HEK293 (o simplemente 293), producen de forma constitutiva las proteínas de los transcritos E1A y E1B.

A la hora de diseñar el vector adenoviral se ha de tener en cuenta el tamaño del genoma, ya que una longitud fuera del rango óptimo (75-105% del genoma original) afecta la estabilidad y viabilidad del virión [267-270].

2.4.1 GENERACIONES DE VECTORES ADENOVIRALES

Tal como se ha explicado en el apartado anterior, los vectores adenovirales no son replicativos por la ausencia de la región E1. Estos vectores son conocidos como de primera generación. Adicionalmente también pueden tener una delección en la región E3 (Figura 25), que no es necesaria para la replicación del virus. Esta generación de vectores puede alojar insertos de hasta 5-8kb, dependiendo de si son $\Delta E3$ o no. Sin embargo, la presencia del resto de genes virales presenta dos inconvenientes. En primer lugar, debido a la homología de secuencia entre el vector y la célula productora, se pueden dar recombinaciones que generen virus replicativos denominados RCA (*Replication-Competent Adenovirus*) [264], que contaminarán las preparaciones de vectores adenovirales comprometiendo su seguridad, especialmente si se administran a pacientes inmunocomprometidos [271]. El segundo inconveniente es que, a pesar de ser virus $\Delta E1$, hay una cierta expresión basal del resto de genes virales, y las proteínas virales resultantes permiten al sistema inmune reconocer y eliminar las células transducidas de manera que los vectores de primera generación no dan lugar a expresiones de transgén prolongadas [272, 273].

Para reducir los problemas derivados de los vectores de primera generación se diseñaron los vectores de segunda generación [274-276]. En estos vectores, además de las deleciones en E1 y E3, también se han eliminado las regiones E2 y, adicionalmente, E4 (Figura 25). Con estos vectores se consiguen tiempos de expresión del transgén más largos que con la primera generación, debido a que las células transducidas presentan menos epítomos virales al sistema inmune, lo que también implica una menor toxicidad *in vivo* por respuesta inmune contra las células transducidas. La producción de estos vectores se ha de hacer en células que complementen también los genes delecionados adicionales [277].

Debido a la necesidad de insertar constructos de gran tamaño se han desarrollado los vectores de tercera generación [278, 279]. Estos vectores, llamados *Helper-Dependent Adenovirus* (HDAV), solo conservan las ITR y la señal de empaquetamiento del adenovirus (Figura 25). Por

lo tanto, estos vectores pueden alojar constructos de hasta 36kb. Además, la ausencia de todos los genes virales impide tanto la expresión basal de epítomos virales como la replicación del virus, reduciendo la respuesta inmune contra las células transducidas. Así pues, *in vivo*, los vectores de tercera generación son una herramienta prometedora para la expresión de transgenes a largo plazo. No obstante, para su producción se requiere la coinfección con un vector de primera generación (*helper*) que complemente en *trans* las funciones necesarias para la propagación del virus, lo que conlleva el riesgo de obtener preparaciones de HDAdV contaminadas con virus *helper*. La diferencia de densidad entre HDAdV y *helper* permite la separación de ambos virus por ultracentrifugación en gradiente de CsCl. Aún así, siempre hay contaminación que podría dificultar la aceptación de protocolos de ensayos clínicos de terapia génica basados en HDAdV. Con tal de reducir la contaminación por *helper* a niveles aceptados por las agencias sanitarias, se han desarrollado estrategias que dificulten la formación de partículas viables de *helper* virus [280-284].

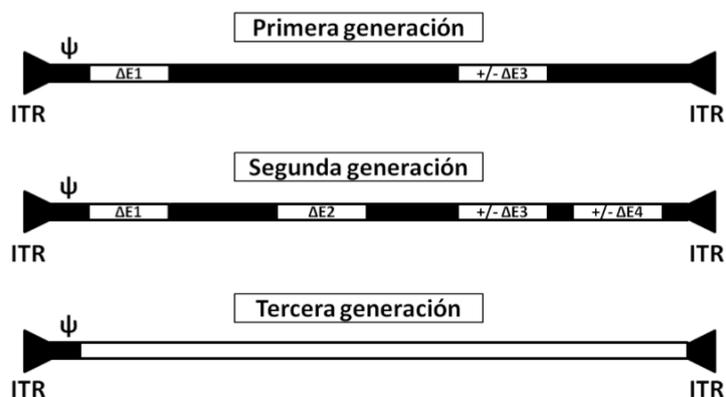


Figura 25. Representación de las tres generaciones de vectores adenovirales. En blanco se indican las regiones delecionadas

2.4.2 ADENOVIRUS NO HUMANOS

Los adenovirus humanos de los serotipos 2 y 5 (Ad2 y Ad5) han sido los más utilizados en terapia génica. Esto se debe al vasto conocimiento acerca de su biología, así como su elevada bioseguridad en humanos, y el alto rendimiento en su producción. Pero la alta seroprevalencia de estos virus en humanos presenta dificultades para su uso como vectores ya que gran parte de los vectores son eliminados antes de que puedan transducir las células.

El uso de adenovirus no humanos podría reducir este problema ya que estos adenovirus no tienen a los humanos como su huésped habitual y, por lo tanto, hay una baja seroprevalencia en su contra. A continuación se comentan algunos ejemplos de adenovirus no humanos en desarrollo como vectores.

Uno de los adenovirus no humanos con mayor potencial como vector de terapia génica es el adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2) [285] ya que en humanos hay una baja seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes [286]. Igual que en Ad2 y Ad5, el receptor de CAV-2 es CAR [193], pero a diferencia de estos, CAV-2 tiene un tropismo preferente por neuronas del sistema

nervioso central [287], lo que permitiría transducir eficientemente este tejido con vectores basados en CAV-2.

También se están desarrollando vectores derivados del adenovirus bovino de tipo 3 (BAd3). El BAd3 tiene un tropismo independiente de CAR. En su lugar, utiliza el ácido siálico presente en glicoproteínas de membrana para transducir las células [288]. Por vía intravenosa, la persistencia en los órganos transducidos es superior a la del Ad5 [289]. En cuanto a la eficiencia, BAd3 transduce con una eficiencia similar a Ad5 hígado y bazo, y con una eficiencia superior en riñón, corazón y pulmón [289]. El BAd3 también escapa a la inmunidad preexistente por la ausencia de anticuerpos neutralizantes, pero estimula más la inmunidad innata que Ad5 [290].

El adenovirus porcino de tipo 3 (PAd3) tampoco utiliza CAR ni integrinas $\alpha_v\beta_{3/5}$ [291]. A pesar de eso, administrado por vía intravenosa tiene un perfil de transducción similar al del Ad5, pero con una persistencia mucho menor [289]. Igual que el BAd3, el PAd3 también estimula más la inmunidad innata que el Ad5 [290]. La ventaja respecto al Ad5 es la capacidad de PAd3 de escapar la inmunidad preexistente [292].

Se han descrito muchas especies de adenovirus que infectan a primates no humanos, que infectan tanto a grandes simios como a monos. Los adenovirus de chimpancé son una herramienta prometedora para su utilización como vectores para vacunas contra antígenos insertados en su genoma [293]. Debido a la diversidad de adenovirus de primates que hay, y su similitud con los adenovirus humanos (muchos de ellos se clasifican en la especie HAdV-E), es difícil establecer generalidades sobre ellos. Así, por ejemplo, un suero neutralizante para Ad4 puede neutralizar el adenovirus de chimpancé de tipo 3 (ChAd3) [294], pero no neutraliza el ChAd68 [295]. En general, la presencia de anticuerpos neutralizantes preexistentes para los adenovirus de chimpancé es menor que para los adenovirus humanos. Sin embargo, hay una gran variabilidad que depende no solamente del tipo de virus, sino también de la región a la que pertenezca la población evaluada [296]. Por ejemplo, en un estudio en Brasil se obtuvo una seroprevalencia para los adenovirus ChAd6 y ChAd68 del 21% y el 23,5%, respectivamente [297], mientras que en estudios en China se ha determinado una seroprevalencia del 12,2% para el ChAd6 [298], y del 12,7% para el ChAd68 [299]. Esto indica que la eficiencia de un mismo vector adenoviral puede ser diferente en función de la población.

2.4.3 MODIFICACIONES DE LAS CÁPSIDES DE LOS VECTORES

Los adenovirus humanos más utilizados como vectores de terapia génica están basados en Ad2 y Ad5, sin embargo por vía intravenosa estos vectores quedan mayoritariamente retenidos en hígado de manera que gran parte de la se restringe a hepatocitos, lo que dificulta la desarrollo terapia génica dirigida a otros tejidos. Además, también puede ser de interés transducir tipos celulares para los que Ad2 y Ad5 tienen poca afinidad natural. Es por esto que se han desarrollado vectores con modificaciones en las proteínas de la cápside, o bien que contienen *fibers* de otros serotipos de adenovirus, de manera que se puede reconducir la transducción del vector al tejido de interés.

2.4.3.1 Modificaciones en las proteínas de la cápside del adenovirus

La modificación de las proteínas de la cápside también permite tanto reducir la neutralización por el sistema inmune, como dirigir los vectores a tejidos que no son su diana habitual. Principalmente, las proteínas modificadas son las tres mayoritarias de la cápside, ya que son las responsables de la neutralización por parte del sistema inmune. Además, al ser las proteínas expuestas al medio exterior, son las que determinan el perfil de distribución del virus, la afinidad por los diferentes receptores, y contra quien va dirigida la respuesta inmune preexistente. En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de modificaciones en las proteínas de la cápside que se han publicado, así como la finalidad con la que se desarrollaron.

Tabla 2: Modificaciones de proteínas de la cápside			
Proteína modificada	Modificación	Finalidad	Ref.
<i>Fiber</i>	Adición de 7 residuos lisina en el extremo C-t del <i>knob</i>	Reducción de la respuesta inmune y de la toxicidad hepática	[300]
<i>Fiber</i>	Inserción en el <i>shaft</i> de una diana proteolítica FXa y un dominio de trimerización heterólogo	Substituir fácilmente el <i>knob</i> por un ligando que confiera al vector un tropismo independiente de CAR	[301]
<i>Hexon</i>	Substitución de las HVRs del Ad5 por las del Ad48	Reducir la neutralización del virus por inmunidad preexistente	[99]
<i>Hexon</i>	Incorporación en la HVR2 de un epítipo de la proteína gp41	Obtención de una vacuna que inmunice frente al HIV	[302]
<i>Penton base</i>	Inserción del epítipo FLAG	Aumentar la transducción en células CAR-negativas usando anticuerpos bifuncionales que reconocen FLAG y α_v integrinas	[303]
pIX	Adición de 3 u 8 residuos lisina en el extremo C-t	Aumentar el tropismo del virus para células CAR-negativas a través de la unión a HSPGs	[304]

Tabla 2. Ejemplos de algunas de las modificaciones que se han hecho en la cápside de los adenovirus, y con qué finalidad se modificaron.

2.4.3.2 Pseudotipación de adenovirus

El uso de vectores de serotipos con un tropismo diferente a Ad5 posibilitaría dirigir la terapia génica a células negativas para CAR. Sin embargo, el conocimiento acerca de estos serotipos alternativos es, por lo general, menos extenso. Debido a que el tropismo de los adenovirus viene marcado en gran parte por la afinidad de su *fiber* (Tabla 3), el uso de vectores basados en Ad5, pero con *fibers* de otros serotipos, permitiría redirigir los vectores hacia nuevos tipos

celulares. Estos adenovirus quiméricos, denominados adenovirus pseudotipados, combinarían las ventajas en cuanto a seguridad, producción, etc. del Ad5, junto con el tropismo asociado a ese *fiber*. Se han utilizado vectores quiméricos con *fibers* de adenovirus de las especies B, D o F para aumentar la transducción en células que tienen una baja expresión de CAR o se encuentra inaccesible, como células hematopoiéticas, algunos tipos de tumores, o intestino [305-310].

Para generar estos vectores se substituye el gen del *fiber* del Ad5 por el del adenovirus de interés, de tal manera que al producirse el vector en células permisivas se expresará el *fiber* del adenovirus alternativo en lugar del original. Una vez producido el *fiber*, se podrá incorporar al *penton base* del Ad5 ya que tanto la estructura general como el dominio *tail* son muy similares, obteniéndose así los vectores quiméricos pseudotipados. No obstante, la obtención de cantidades suficientes de este tipo de vectores se podría ver dificultada si el *fiber* incorporado en el vector quimérico tiene poca afinidad por los receptores presentes en la línea celular utilizada. Esto reduciría la infectividad del vector y, por lo tanto, su productividad. Para aumentar la productividad se han desarrollado técnicas para aumentar la productividad de estos virus. Un ejemplo es combinar el uso del polímero catiónico *polybrene* para aumentar la infectividad del virus, junto con la utilización de la línea celular 211B que produce en *trans* el *fiber* de Ad5 [311]. La utilización de esta línea celular durante las rondas de amplificación tendría como resultado la incorporación del *fiber* de Ad5 en la cápside del vector para aumentar la infectividad, y en el último paso de amplificación se infectarían células HEK293 para producir los viriones quiméricos [312].

3. INTERACCIONES ENTRE LOS VECTORES ADENOVIRALES Y EL ORGANISMO

Para poder diseñar una estrategia de terapia génica que maximice la eficiencia y, a su vez, minimice los efectos indeseados, es necesario conocer las interacciones que se dan entre el vector y el organismo. La predicción del comportamiento de un vector adenoviral *in vivo* es de una gran complejidad ya que no solo implica la unión del adenovirus a sus receptores en las células, sino que otros elementos del organismo, como pueden ser diferentes proteínas en sangre o el sistema inmune, también interactúan con el vector. Así pues, la combinación de todas las interacciones entre virus y organismo determinará tanto la biodistribución y la eficiencia de transducción del vector como su toxicidad.

3.1 RECEPTORES DE LOS ADENOVIRUS

Los adenovirus reconocen a sus células diana uniéndose a los receptores presentes en dichas células para su posterior internalización. Sin embargo, no todos los adenovirus utilizan los mismos receptores (Tabla 3), y su conocimiento es importante para diseñar un vector adenoviral, ya que su eficiencia de transducción en los diferentes tejidos dependerá del perfil de expresión de sus receptores.

Tabla 3: Receptores descritos para los adenovirus humanos		
Especie	Receptores conocidos	Tropismo
A	CAR	Entérico, respiratorio
B1	CD46, CD80, CD86, DSG2	Respiratorio, ocular
B2	CD46, CD80, CD86, DSG2	Renal, respiratorio, ocular
C	CAR, HSPG, MHC1, SR (<i>Scavenger Receptor</i>), VCAM-1	Respiratorio, ocular, linfóide, hepático
D	Ácido siálico, CAR, CD46	Entérico, ocular
E	CAR	Respiratorio, ocular
F	CAR	Entérico
G	Ácido siálico, CAR	Entérico

Tabla 3. Lista con los principales receptores descritos para los *fibers* de los adenovirus humanos, así como el tejido por el que tienen tropismo. La información de las especies A-F ha sido obtenida de [313] y la de G de [314]

3.1.1 CAR

La proteína CAR (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*) es una proteína con un peso molecular aparente de 46 kDa, y que inicialmente fue identificada como el receptor *in vitro* de adenovirus de la especie C [315]. Posteriormente, se ha observado su capacidad de interactuar con el *fiber* de adenovirus humanos de las especies A, D, E, y los *fiber* largos de F y G [314, 316], aunque la afinidad del *fiber* por CAR varía en función del adenovirus [317]. Asimismo, CAR también actúa como receptor para algunos adenovirus humanos, entre ellos CAV-2 [193] y FAdV1 (también conocido como CELO, *Chicken Embryo Lethal Orphan virus*) [318]. En las células, CAR es una proteína integral de membrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que participa en la formación de *tight junction* a través de uniones homofílicas [319]. Su fracción extracelular contiene dos dominios inmunoglobulina denominados D1 y D2. El dominio D1 está implicado tanto en las uniones homofílicas entre dos proteínas CAR, como en la unión al *knob* de los adenovirus [142, 320]. En cambio, el dominio D2 no participa directamente, pero sí es necesario para las funciones de CAR [321]. La fracción intracelular no es necesaria para la transducción de los adenovirus humanos, aunque sí lo es para CAV-2 [322, 323]. Sin embargo, la fracción intracelular sí es importante para dirigir la proteína CAR a la membrana apical o bien a la basolateral en un epitelio polarizado. La mayor parte de CAR se localiza en la membrana basolateral, y por lo tanto es poco accesible al virus [324, 325]. No obstante, posteriormente se identificó la isoforma CAR(Ex8), que solo se diferencia en su porción intracelular [326, 327]. La isoforma CAR(Ex8), que equivale a la isoforma mCAR1 murina, se encuentra en la membrana apical del epitelio, y posiblemente sería la que utilizaría el adenovirus para iniciar la infección. La expresión de CAR es diferente en humanos y en ratón [328]. En humanos, se detectan niveles altos de mRNA de CAR en páncreas, cerebro, corazón, intestino delgado, testículo y próstata. En menor medida, se

detecta también en hígado, pulmón y colon. Se observa mRNA de CAR en niveles muy bajos, o no se detecta, en riñón, músculo esquelético, leucocitos de sangre periférica, ovario, timo y bazo. En ratón en cambio, el mRNA de CAR se detecta en niveles elevados en riñón, hígado, pulmón, corazón y, en menor medida, en cerebro. Por otro lado, CAR está implicado también en el desarrollo embrionario, y su expresión varía con la edad [329, 330].

3.1.2 INTEGRINAS

Las integrinas son proteínas de membrana heterodiméricas, formadas por una subunidad α y una β unidas de forma no covalente. La mayoría de integrinas se unen a proteínas de la matriz extracelular a través del reconocimiento de un motivo RGD, participando así en procesos de unión celular, migración o diferenciación [331, 332]. El *penton base* de la mayoría de los adenovirus humanos, excepto los de la especie F [115], contienen un motivo RGD en un *loop* flexible que se extiende hacia el exterior de la cápside. Los adenovirus se unen a las integrinas a través de su motivo RGD, formando un anillo de integrinas alrededor del *penton base*. Esta condensación de integrinas activa vías de señalización que promueven la internalización del virus. Se han descrito 18 subunidades α y 8 subunidades β que se combinan para formar diferentes integrinas. Las integrinas de las cuales se ha descrito su unión al *penton base* contienen las subunidades α_v o β_1 . Las principales son $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ [109, 110], pero hay otras integrinas que también pueden ser reconocidas por el adenovirus, como $\alpha_v\beta_1$ [333, 334], $\alpha_3\beta_1$ [335], y $\alpha_5\beta_1$ [336]. Las $\alpha_M\beta_2$ y $\alpha_L\beta_2$ también permiten la unión del adenovirus a la célula, pero no participan en su internalización [337].

3.1.3 CD46

La proteína CD46, también llamada MCP (*Membrane Cofactor Protein*), es una glicoproteína de integral de membrana. Su función es unir las proteínas del complemento C3b y C4b, actuando como cofactor en su inactivación por el factor-I [338, 339]. De esta manera, CD46 evita un posible ataque del complemento sobre tejidos autólogos. En su fracción extracelular, CD46 contiene (de distal a proximal) 4 dominios SCR (*Short Consensus Repeat*) denominados del I al IV, 3 dominios STP (ricos en Ser, Thr y Pro), y un dominio no estructurado de unión a la fracción transmembrana. CD46 es conocido informalmente por ser un “imán de patógenos” debido a la diversidad de patógenos que lo utilizan como receptor [340]. Los adenovirus humanos de la especie B utilizan CD46 como receptor [341]. Algunos serotipos de la especie D, como Ad37, también pueden utilizar CD46 como receptor [342]. Los dominios SCR-I y II (los más distales) son los que participan en la unión adenovirus-receptor [343, 344]. El sitio de unión se localiza en SCR-II, pero SCR-I es necesario para mantener la conformación de CD46 adecuada para la unión del virus [345]. CD46 es una proteína ubicua en humanos, pero en ratón su expresión se limita a testículo [341, 346, 347]. Se ha descrito que en células epiteliales polarizadas CD46 se encuentra en la membrana basolateral [348]. No obstante, igual que en el caso de CAR, la región intracelular de las diferentes isoformas de CD46 determina su localización en la membrana apical o basolateral [327, 349].

3.1.4 DSG2

La desmogleína-2 (DSG2) es una glicoproteína de membrana que pertenece a la familia de las caderinas, y se encuentra formando uniones intercelulares dependientes de calcio en los desmosomas. A diferencia de otras desmogleínas, DSG2 se encuentra en todos los tejidos que forman desmosomas, así como en tejidos no epiteliales [350, 351]. DSG2 es el receptor para algunos adenovirus humanos de la especie B (Ad3, 7, 11 y 14) [352]. A pesar de que la DSG2 humana y la murina comparten un 76% de la secuencia, los ratones son resistentes a Ad3 [352]. El Ad3 durante su infección produce dodecaedros de *penton* (PtDd) que se unen a DSG2 para debilitar las uniones celulares, y facilitar su dispersión [256]. Los PtDd podrían tener un potencial terapéutico ya que la disrupción de desmosomas facilitaría el acceso de determinados fármacos a receptores diana que en las uniones intercelulares.

3.1.5 ÁCIDO SIÁLICO

Los ácidos siálicos son carbohidratos de distribución ubicua, derivados del monosacárido ácido neuramínico, y que se encuentran habitualmente en glicoproteínas y gangliósidos. Cuando se encuentran unidos a glicoproteínas por enlaces $\alpha(2\rightarrow3)$ pueden actuar como receptores para los adenovirus humanos Ad8, Ad19a y Ad37 (especie D) [353-355], que son tres adenovirus causantes de queratoconjuntivitis epidémica (EKC, *Epidemic Keratoconjunctivitis*). La unión de estos adenovirus al receptor es dependiente de cargas [356], y se ve facilitada por un punto isoeléctrico inusualmente alto de sus *knobs* (alrededor de 9,0), de manera que ofrecen una superficie básica que permite la interacción entre las dos moléculas. Los residuos que participan en la unión a ácido siálico se encuentran en la parte más apical del *knob*, y están conservados en todos los adenovirus D [357]. Recientemente, se ha descrito el ácido siálico también como receptor para el Ad52 [314].

3.2 BIODISTRIBUCIÓN DE LOS VECTORES ADENOVIRALES *IN VIVO*

La presencia en la superficie celular de receptores adecuados para un vector adenoviral concreto es un factor que determina su tropismo por ese tipo celular. Esto se pone de manifiesto cuando se administran adenovirus a animales transgénicos que expresan CAR de forma ubicua, o específicamente en tejidos CAR negativos. En estos animales transgénicos, los adenovirus pueden transducir células como linfocitos, macrófagos o miocitos de músculo esquelético, que en los animales *wild type* son resistentes a los adenovirus [358, 359].

Sin embargo, muchas veces la biodistribución de los adenovirus no se correlaciona con la de sus receptores. Así, un tipo celular puede expresar los receptores necesarios, pero ser poco accesibles para el virus debido a la presencia de barreras físicas [360]. Un ejemplo es el epitelio respiratorio, donde la expresión de CAR e integrinas se localiza principalmente en la membrana basolateral de las células ciliares. Esto limita la eficiencia de transducción cuando los vectores son administrados directamente en el lumen del epitelio respiratorio [324, 361-363]. El propio glicocáliz de las células del epitelio también representa una barrera que dificulta el contacto entre el virus y su célula diana [364, 365]. Además, los adenovirus también son atacados por el sistema inmune, como los macrófagos alveolares de pulmón, que eliminan gran parte del vector antes de poder transducir las células [366].

En cierta medida, un vector adenoviral puede considerarse un fármaco e, igual que todos los fármacos, una vez está en sangre se distribuirá, metabolizará y eliminará en función de su farmacocinética. Sin embargo, es un fármaco no convencional, ya que es un derivado de un patógeno. Por un lado, el organismo ha desarrollado evolutivamente mecanismos para bloquear los adenovirus. A su vez, el adenovirus también ha desarrollado mecanismos para llegar eficientemente a su célula diana. Esto implica que la biodistribución del vector es un rompecabezas de gran complejidad que es necesario resolver para poder diseñar vectores eficaces y eficientes para un tratamiento determinado.

La vía intravenosa es una vía de administración sistémica ya que, en mayor o menor medida, todo el organismo está irrigado por el sistema circulatorio. Por lo tanto, por vía intravenosa, un vector adenoviral virtualmente podrá acceder a tejidos dónde una administración local sería complicada, por ejemplo, por requerir procedimientos quirúrgicos. Además, si la terapia va dirigida a varios tejidos, por vía intravenosa se puede hacer llegar el vector a todos ellos, mientras que por vía local requeriría la administración del vector individualmente en cada uno de los tejidos de interés.

El hígado es un órgano altamente vascularizado que contiene aproximadamente el 10% del volumen total de sangre del organismo, y gran parte de ella se encuentra en los sinusoides hepáticos, lo que quiere decir que la mayoría de los adenovirus administrados por vía intravenosa se acumulan en estos sinusoides hepáticos. Es por esto que las interacciones que se dan entre el organismo y el adenovirus en el hígado determinan la biodistribución y la disponibilidad de vector ya que, aquí en los sinusoides, se elimina la mayor parte del adenovirus circulante y, a su vez, los adenovirus entran en el parénquima hepático para transducir su principal célula diana por vía intravenosa, que son los propios hepatocitos.

En cuanto a la eliminación del adenovirus circulante, este es un proceso rápido que se refleja en un tiempo de semivida en sangre del virus inferior a dos minutos después de ser administrado por vía intravenosa [367]. Como se ha comentado en el párrafo anterior, los sinusoides hepáticos juegan un papel clave en este proceso ya que los adenovirus son fagocitados por las células endoteliales del sinusoides y, sobretodo, por las células de Kupffer (KC), que son macrófagos residentes de hígado. Estas KC eliminan el virus de forma independiente a su capacidad de transducir hepatocitos [368, 369], fagocitándolos mediante el reconocimiento de *clusters* de cargas negativas en la cápside a través de *Scavenger Receptors* (SRs), y también a través de la unión de sus receptores de FC y complemento a las cápsides de los adenovirus cuando éstas están opsonizadas por IgMs naturales y complemento [370]. El papel de las KC en la eliminación del adenovirus es clave en cuanto a la disponibilidad del virus, que se ve aumentada cuando se bloquean las KC y, por lo tanto, también la eficiencia de transducción del vector [371, 372]. No obstante, la capacidad de las KC de eliminar el vector adenoviral no es ilimitada. En un estudio a diferentes dosis de vector, se demostró que a dosis baja ($1-3 \times 10^{10}$ vp/ratón) la expresión del transgén es apenas detectable, sin embargo a dosis alta (10^{11} vp/ratón) aumenta de forma no proporcional [373]. En un segundo estudio también se observó que al aumentar la dosis de vector 10 veces (de 10^{10} a 10^{11} vp/ratón) la expresión aumentaba 200 veces [374]. Esto demuestra que hay un umbral de dosis a partir del cual las KC quedan saturadas y ya no son capaces de eliminar más adenovirus. Además, una dosis superior a 10^{11} vp/kg, provoca la necrosis de las KC y reduce su número en hígado a las 4 horas [375].

Además de la eliminación del virus, el hígado es el principal órgano transducido por los adenovirus cuando éstos son administrados por vía intravenosa [376-378], y esta transducción se ve facilitada por la presencia de discontinuidades en el endotelio de los sinusoides hepáticos llamadas fenestras. Estas fenestras son aberturas que permiten a los adenovirus en sangre acceder al espacio de Disse (o perisinusoidal) para transducir los hepatocitos (Figura 26). Sin embargo, no todos los animales tienen el mismo diámetro medio de ventana, por ejemplo en humanos y conejos las fenestras miden 90-110nm de diámetro, mientras que en roedores éste es de 120-160nm [379-381], y el diámetro es un factor que tiene una correlación positiva con la eficiencia de los adenovirus para transducir hígado [379, 382].

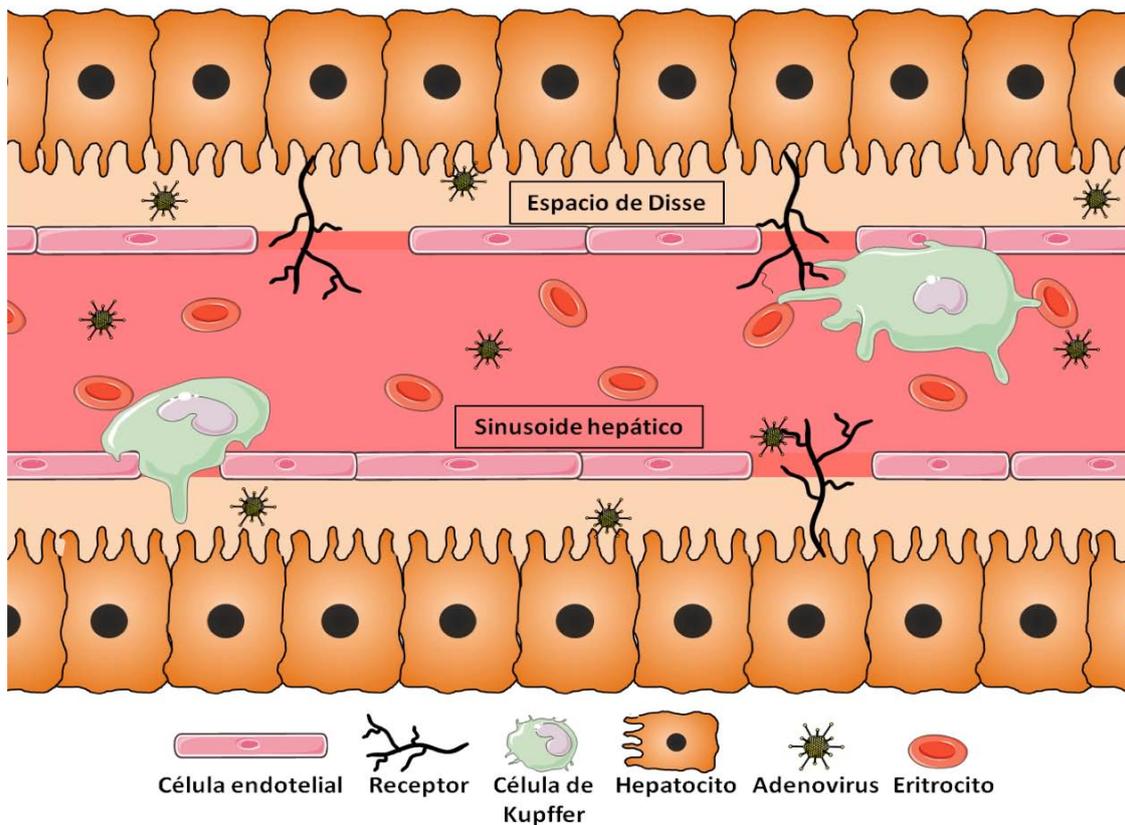


Figura 26. Representación de un vaso sanguíneo los sinusoides hepáticos, donde se ilustran la localización de las células de Kupffer y la presencia de discontinuidades en el endotelio (fenestras), que permiten al adenovirus tanto interactuar con receptores en los hepatocitos como translocarse hacia el espacio de Disse.

Debido a que la transducción de los hepatocitos por parte de los adenovirus es independiente de su unión a CAR y α_v integrinas [383, 384], se han propuesto varios mecanismos para explicar el tropismo hepático. Uno de ellos se basa en la presencia de un motivo KKTK en la tercera repetición del *shaft* de los adenovirus de la especie C (Figura 17) [385-387]. Este motivo podría mediar la unión del virus a HSPGs (Heparán Sulfato Proteo Glicanos) de la superficie de los hepatocitos (Figura 26), para posteriormente ser internalizado. No obstante, el papel de este motivo es cuestionado. Por un lado, *in vitro*, los Ad5 mutantes para KKTK también transducen ineficientemente células permisivas, como A549 [385]. Además, si se intercambia el *shaft* del Ad5 por el de otros adenovirus que no contienen el motivo KKTK, la transducción en hígado no se ve afectada [388]. Dada la localización de esta secuencia en la zona bisagra del *shaft*, algunos autores comentan que la mutación de KKTK aumentaría la rigidez del *fiber* y

disminuiría la infectividad del virus [388, 389]. También se ha propuesto que el adenovirus podría valerse de proteínas de sangre, especialmente C4BP y los factores de coagulación dependientes de vitamina K FIX y FX, para unirse a los HSPGs en la superficie del hepatocito [390-392]. El FX utiliza su dominio Gla para unirse a las HVRs del *hexon*, siendo las más relevantes HVR5 y HVR7 [102, 103]. De esta manera, dada la variabilidad de las HVR, la unión del FX al *hexon* para el reconocimiento de los HSPGs sería dependiente de serotipo (Figura 27.A). Sin embargo, este modelo también se está discutiendo, ya que en ausencia de IgMs naturales y proteínas del complemento el FX es irrelevante para la transducción hepática [393]. Estos resultados sugieren que el adenovirus une FX a su cápside para protegerse de la inmunidad innata (Figura 27.B). Por otra parte, el organismo también ha desarrollado mecanismos para reconocer los adenovirus protegidos por FX. Los macrófagos murinos detectan los adenovirus unidos a FX a través del TLR4 y activan la respuesta inmune innata [394], pero esto no se observa en macrófagos humanos [395].

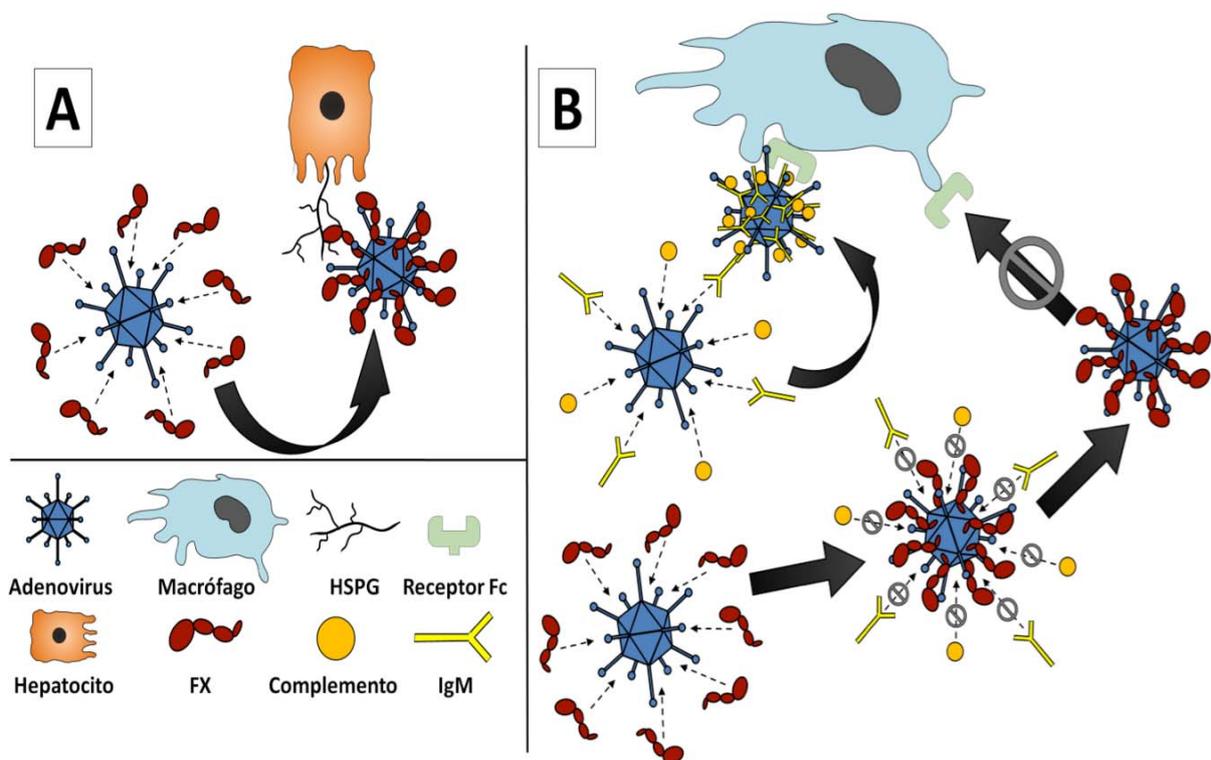


Figura 27. Modelos propuestos para el papel de la interacción de FX con los adenovirus. A) El FX se une al *hexon* del virus y lo une a los HSPG de los hepatocitos. B) La unión de FX al *hexon* impide la opsonización del virus y su fagocitosis

Además de con factores solubles, los adenovirus en sangre también interactúan con plaquetas, eritrocitos y leucocitos, lo que impacta en la biodistribución de los virus. En cuanto a las plaquetas, se había reportado que los adenovirus pueden causar trombocitopenia en pacientes neonatales con infecciones naturales [396], y también cuando son administrados por vía intravenosa en ratón, conejo y monos [397-400]. Al investigar las posibles interacciones entre adenovirus y plaquetas, se observó que su unión provoca la activación y la agregación de las plaquetas [400, 401], y estos agregados son posteriormente eliminados por las KC [402, 403], lo que causa la trombocitopenia. Además, los adenovirus podrían unirse a las plaquetas humanas ya que estas expresan la proteína CAR [400, 403, 404].

Asimismo, los adenovirus también se unen a eritrocitos a través del *fiber*, formando complejos reticulares adenovirus-eritrocito que acaban induciendo hemaglutinación en muestras de sangre [405, 406]. Esta hemaglutinación es un fenómeno dependiente tanto del serotipo del virus como del origen animal del eritrocito, lo que se relaciona con la diferencia interespecífica en cuanto a la expresión de los receptores adenovirales en los eritrocitos. En el caso de los eritrocitos humanos, éstos contienen en sus membranas ácido siálico (principalmente en las glicoforinas) y CAR, lo que permite que se unan a ellos Ad37 y Ad5 [407, 408], limitando así la disponibilidad del virus para transducir otros tejidos de interés. La unión de Ad5 también se observa en los eritrocitos de rata, ya que también expresan CAR, pero no en eritrocitos de otras especies, como ratón o mono Rhesus, ya que los eritrocitos de éstas especies son negativos para CAR [407, 408]. Esto implica que, dependiendo del modelo animal utilizado, la eficacia de un tratamiento de terapia génica con vectores adenovirales en humanos puede ser diferente a la observada en animales.

3.3 EFECTO DEL SISTEMA INMUNE FRENTE A VECTORES ADENOVIRALES

Debido a que los vectores adenovirales son derivados de patógenos, cuando se administran *in vivo*, el organismo va a reaccionar contra ellos. Así pues, es importante conocer cómo se comportará el sistema inmune por dos motivos. En primer lugar, las defensas limitan la eficiencia de los vectores de terapia génica ya sea eliminándolos, bloqueando sus interacciones o destruyendo las células transducidas por el vector. Pero además, los adenovirus generan una respuesta inflamatoria que podría comprometer la salud del paciente. Esta reacción del sistema inmune puede llegar a ser fatal, como se puso en evidencia en un ensayo clínico de terapia génica en 1999, donde falleció el paciente Jesse Gelsinger de 18 años, que padecía deficiencia de ornitina transcarbamilasa (OTC) [409, 410]. Al paciente se le administró por vía intrahepática un Ad5 que contenía el gen de la OTC y falleció 98 horas después de recibir el tratamiento. El fallecimiento fue atribuido a un fallo multiorgánico por una respuesta inflamatoria sistémica causada por la elevada dosis recibida de adenovirus [411]. Éste caso condujo a un gran debate sobre la terapia génica y la necesidad de revisar la seguridad de los vectores.

3.3.1 LIMITACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL VECTOR POR LA INMUNIDAD ADQUIRIDA

El contacto con los adenovirus es muy frecuente y por lo tanto la mayor parte de la población tiene IgG neutralizantes contra ellos, especialmente contra Ad2 y Ad5 [412, 413], lo que limita la eficiencia de transducción de los vectores [414]. Estos anticuerpos preexistentes van dirigidos principalmente contra los antígenos *penton base*, *fiber* y, sobretodo, *hexon* (especialmente las HVRs) [99, 415, 416], y al opsonizar las cápsides de los adenovirus promueven su reconocimiento y eliminación por el sistema inmune (macrófagos, complemento, etc.). Además de promover la eliminación del virus, los anticuerpos unidos a la cápside dificultan tanto su interacción con los receptores como los cambios conformacionales necesarios para escapar del endosoma y desensamblarse [197, 417], impidiendo así que el genoma de vector llegue al núcleo y exprese el transgén. Si la unión de IgGs a la cápside no fuese suficiente para bloquear la actividad del virus, las células contienen un receptor intracelular de IgG, llamado *Tripartite motif-containing 21* (TRIM21), que media la eliminación

del virus [418] por reconocimiento del Fc de las IgGs unidas al adenovirus en el citosol, y dirige el virus hacia el proteasoma para su degradación [419, 420]. Paralelamente, TRIM21 también induce la secreción de interferón y citoquinas proinflamatorias a través de los factores de transcripción NF- κ B, AP-1, y los IRF3, 5 y 7 [420], lo que activará la respuesta inmune.

Finalmente, la inmunidad adquirida también atacará las células transducidas, ya sea por reconocimiento de proteínas virales producidas de forma basal, como por reconocimiento del transgén [272, 273, 421].

3.3.2 LIMITACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL VECTOR POR LA INMUNIDAD INNATA

El organismo también ataca al vector adenoviral independientemente de que haya estado expuesto a él previamente o no. Esto se debe a que contienen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que son reconocidos y activan mecanismos de inmunidad innata contra el adenovirus, en los que participan proteínas solubles, células del sistema inmunitario y mecanismos intracelulares de las células infectadas.

Las defensinas son péptidos catiónicos con actividad antimicrobiana que se encuentran en los fluidos extracelulares de las mucosas [422]. Los adenovirus son atacados por las α -defensinas que se unen en toda la cápside, pero es la unión en los vértices la que afecta a su infectividad, ya que estabiliza el *penton base* y el *fiber* impidiendo su disociación y, por lo tanto, el escape del endosoma del adenovirus [423-426]. De esta manera, a pesar de que los vectores puedan internalizarse en la célula, quedarán retenidos en los endosomas y serán degradados. La sensibilidad de los adenovirus a las defensinas es dependiente del serotipo [425].

Las IgM naturales también pueden bloquear la transducción de los vectores adenovirales [371]. Las IgM son inmunoglobulinas pentaméricas, de manera que cada pentámero puede unirse simultáneamente hasta a 5 cápsides, formando grandes complejos anticuerpo-adenovirus. Asimismo, la opsonización de la cápside por IgM activa la vía clásica del complemento, de manera que las proteínas del complemento también opsonizan la cápside [393]. Además de bloquear la interacción del virus con sus receptores, la IgM y proteínas del complemento permiten a células del sistema inmune, como las KC, fagocitarlos a través de sus receptores de Fc y de complemento [370, 371].

Los adenovirus activan la inmunidad innata al ser detectados por diferentes tipos de receptores. Algunos ejemplos son los *Toll-Like Receptors* TLR2, TLR4 y TLR9 [394, 427, 428], o la proteína citosólica cGAS (sintasa del GMP-AMP cíclico) [429]. Dependiendo del tipo celular, las vías de señalización activadas por estos receptores podrán ser diferentes [430], pero la mayoría de ellas desencadenan la secreción de citoquinas proinflamatorias. Así, se atrae la respuesta inmune hacia los tejidos transducidos para eliminar las células que contienen el vector, lo que conlleva la extinción de la expresión del transgén e, incluso, daño en el tejido.

Debido a que gran parte de los adenovirus son atrapados en hígado, este órgano va a recibir el ataque de la inmunidad innata, lo que provoca toxicidad hepática que se ve reflejada en la liberación de transaminasas como AST y ALT en suero [431, 432]. Cuando se analiza el perfil de citoquinas inducidas por el adenovirus, se observa que la toxicidad hepática va acompañada de

una rápida activación de TNF α durante las primeras horas después de la administración intravenosa del vector adenoviral y que, además, es dependiente de la dosis de vector [431, 433]. Esta activación rápida de TNF α es mediada por la fagocitosis del adenovirus por KC [432], aunque se observa un segundo pico de TNF α y transaminasas varios días después, que se relaciona con la expresión de los genes del vector [431, 432]. Además de TNF α , durante las primeras horas después de la administración de los adenovirus también se induce la liberación de IL6 e IL12 de forma dosis dependiente, pero en este caso no participan las KC de hígado ya que cuando se deplecionan selectivamente estas células, IL6 e IL12 se liberan en igual o mayor medida (dependiendo del estudio) [375, 432, 433]. En su lugar, estas interleuquinas son producidas en gran medida en el bazo, que captura los adenovirus presentes en sangre en la zona marginal, donde se acumulan células dendríticas activadas y macrófagos MARCO+ en respuesta al adenovirus [433, 434], y éstas células liberarán las interleuquinas IL6 e IL12 al suero [433].

3.4 COMPORTAMIENTO *IN VIVO* DE LOS ADENOVIRUS PSEUDOTIPADOS

La utilización de adenovirus pseudotipados es una estrategia que permite aumentar la eficiencia de transducción del vector en tejidos por los que el virus nativo no tiene afinidad natural. Sin embargo, la substitución del *fiber* también va a modificar las interacciones que se dan entre el vector y el organismo, como su eliminación de sangre circulante y la respuesta inmune.

Una de las características que se ve más afectada por la substitución del *fiber* es la interacción de los virus con el hígado, y su tropismo por hepatocitos [388, 390, 435, 436]. La transducción de los hepatocitos se ve reducida cuando los virus quiméricos administrados contienen *shafts* de serotipos con *fiber* corto, independientemente del receptor que reconozca su *knob*. Sin embargo, los papeles se invierten cuando se trata de la fagocitosis de los adenovirus quiméricos por KC, ya que en este caso el factor determinante es el *knob* [436].

Por otro lado, la administración *in vivo* de vectores pseudotipados también puede inducir unos niveles de toxicidad y una respuesta inmune diferentes a los del vector nativo. Así por ejemplo, los Ad5 quiméricos con el *fiber* del Ad35 generan menos toxicidad hepática que el propio Ad5, acompañada también de una menor respuesta inmune temprana [437]. Sin embargo, cuando el *fiber* quimérico contiene el *shaft* del Ad5 y el *knob* del Ad35, entonces tanto la toxicidad como la respuesta inmune son similares a las inducidas por Ad [436, 438]. Esta diferencia en la respuesta inducida por los adenovirus quiméricos con *knob* de Ad35, dependiendo de si el *shaft* es largo o corto, implica que la longitud del *fiber* utilizado también influye en la respuesta inmune temprana activada por el vector, así como la toxicidad hepática asociada a esta respuesta.

4. CLASIFICACIÓN DE LOS ADENOVIRUS HUMANOS

Desde el descubrimiento de los adenovirus, se han identificado más de 7 especies diferentes de adenovirus humanos denominadas HAdVA-G [439], que están asociados a patologías diversas (Tabla 4). Estas especies de adenovirus incluyen en total hasta 60 serotipos de

adenovirus humanos, así como otros serotipos que, a pesar de ser identificados en monos del viejo mundo, están emparentados filogenéticamente (Figura 28) [59]. Tradicionalmente, se habían utilizado criterios serológicos y de hemaglutinación para la clasificación de los adenovirus, pero desde el descubrimiento del Ad52 (el primer serotipo humano identificado en el siglo XXI) se ha impuesto el análisis bioinformático del genoma del adenovirus como criterio [439, 440].

Tabla 4: Clasificación de los adenovirus humanos		
Especie	Serotipos humanos	Infecciones asociadas a la especie
A	12, 18, 31	Gastrointestinal, respiratoria, urinaria
B1	3, 7, 16, 21, 50, 55	Queratoconjuntivitis, gastrointestinal, respiratoria, urinaria
B2	11, 14, 34, 35	Gastrointestinal, respiratoria, urinaria
C	1, 2, 5, 6, 57	Gastrointestinal, respiratoria, urinaria
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 54, 56, 58, 59, 60	Queratoconjuntivitis, gastrointestinal
E	4	Respiratoria
F	40, 41	Gastrointestinal
G	52	Gastrointestinal

Tabla 4. Clasificación de los adenovirus humanos en las especies A-G, los serotipos que las componen y las patologías asociadas a cada especie. La especie B habitualmente se subdivide en B1 y B2 [59, 439]

4.1 ADENOVIRUS 52

En 2007 Jones *et al.* publicaron haber descubierto un nuevo serotipo de adenovirus humano a partir de muestras de heces de 5 pacientes con gastroenteritis [114]. Los virus se identificaron inicialmente propagándolos en cultivos primarios de células de mono, y posteriormente se enviaron al *Viral and Rickettsial Disease Laboratory* (VRDL) en California para una mejor caracterización. Debido a la dificultad de propagar el virus en cantidades suficientes para su análisis serológico, su caracterización se basó en el análisis de la secuencia del genoma, dando así el pistoletazo de salida a un nuevo método de clasificación basado en la bioinformática [429]. Después de analizar la secuencia del adenovirus, fue identificado como un nuevo serotipo 52 (Ad52) y se propuso clasificarlo en una nueva especie de adenovirus humanos, la especie G. Entre los adenovirus humanos, los más cercanos son los de la especie F (serotipos 40 y 41) (Figura 28), con los que comparte tanto el tropismo intestinal como la presencia de dos genes *fibers* de diferentes longitudes. Sin embargo, y a pesar de que en una carta al editor se cuestionó que el Ad52 pudiese ser realmente un Ad41 [441], hay diferencias notables entre

ellos en organización del genoma. Además, la presencia en el Ad52 del motivo RGD en el *penton base*, así como de los genes E3-12,5k y la dUTPasa de E4 descarta que se trate de un Ad41. Después de los de la especie F, los adenovirus humanos más cercanos a Ad52 son los de la especie A (Figura 28), y al igual que éstos contiene un solo VA RNA, un rasgo compartido con los adenovirus F y con otros adenovirus de simios, así como la ausencia del gen E3-19k.

Además del Ad52, en la especie G también se incluyen los adenovirus de simio SAdV1 y SAdV7, siendo el más cercano de ellos el SAdV1 (Figura 28), con los que también comparte la presencia de dos *fibers* [124, 442]. Debido a la elevada similitud del Ad52 con adenovirus de simios, sumado a que no se ha vuelto a aislar de pacientes humanos, llevó a algunos autores a plantear la posibilidad de que no fuese un adenovirus humano, sino un adenovirus de simio contaminando las células primarias de mono utilizadas durante la propagación inicial del virus [443, 444]. No obstante, Jones *et al.* no solo identificaron el Ad52 cultivándolo en células de primate, sino que también detectaron retrospectivamente el virus por PCR en una muestra de heces de pacientes almacenadas [114]. A pesar de la polémica, el ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) ha aceptado la especie HAdV-G como un nuevo taxón de adenovirus humanos [445], que incluye tanto al Ad52 como a SAdV1 y SAdV7.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el Ad52 contiene dos proteínas *fiber* de diferentes longitudes. En el momento de comenzar esta tesis se desconocía la función que podrían desempeñar en el virus, pero posteriormente se analizó la secuencia de DNA del *knob* de los dos *fibers* observándose que el del *fiber* largo es similar al del *fiber* de los adenovirus A y al *fiber* largo de los adenovirus F, que tienen afinidad por el receptor CAR [446]. En cambio, el *knob* del *fiber* corto del Ad52 es similar al del *fiber* corto de los adenovirus F, del que se desconoce su receptor, pero se ha especulado que podría ser el responsable del tropismo intestinal de los adenovirus F. De la misma manera, la secuencia de DNA del *shaft* del *fiber* largo del Ad52 también es más similar a los *fiber* largos de los adenovirus F y al de los adenovirus A [130]. Finalmente, a principios de 2015, se describieron los receptores del Ad52, confirmándose la afinidad del *fiber* largo por CAR, mientras que el *fiber* corto interacciona con los ácidos siálicos presentes en proteínas de la membrana celular [314].

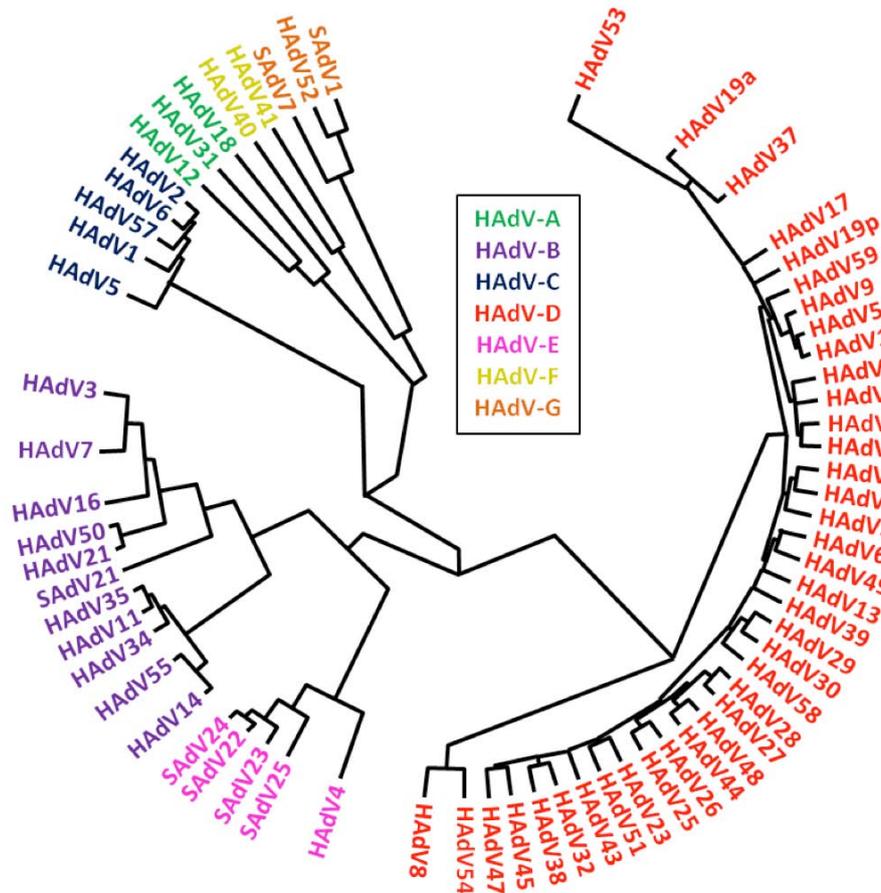


Figura 28. Filogenia de las especies de adenovirus humanos A-G, donde se muestran los serotipos humanos de 1 al 60, así como serotipos de adenovirus de simios incluidos en las especies humanas. Figura modificada de [59]

Con todo lo explicado en esta introducción, creemos que la generación de un Ad5 quimérico pseudotipado con el *fiber* corto del Ad52 podría ser una buena herramienta para estudiar las funciones específicas que confiere esta proteína a los adenovirus. Además, también nos permitiría evaluar el potencial uso como vector de terapia génica de un adenovirus con este *fiber*, en intestino u otros tejidos, manteniendo las ventajas en cuanto a bioseguridad y productividad del Ad5.

II. OBJETIVOS

La finalidad de esta tesis es la caracterización de un vector adenoviral quimérico pseudotipado con el *fiber* corto del Ad52 (Ad5/52s), lo que nos permite evaluar el papel de este *fiber*, así como evaluar el potencial uso terapéutico de este virus como vector de terapia génica. Para ello se fijaron los siguientes objetivos:

1. Generación del genoma del Ad5/52s e incorporación de los genes marcadores necesarios para producir los vectores que serán utilizados en la tesis y, de ser necesario, optimizar la producción de los vectores.
2. Caracterización del tropismo del Ad5/52s *in vitro* en cultivos celulares, así como de su administración por diferentes rutas modelos murinos para caracterizar, también, su comportamiento *in vivo*.
3. Análisis de la disponibilidad del Ad5/52s después de su administración intravenosa, así como de las interacciones de este vector en sangre.

III. RESULTADOS

1. GENERACIÓN Y PRODUCCIÓN DEL ADENOVIRUS QUIMÉRICO Ad5/52s

Cuando comenzó esta tesis, no había ningún trabajo publicado dónde se utilizase el Ad5/52s como vector. Así pues, el primer paso que se realizó fue generar el genoma del virus quimérico y producir un *stock* del vector Ad5/52s con el que realizar experimentos.

1.1 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LOS TRES DOMINIOS DEL *FIBER* CORTO DEL Ad52

Debido a que la única información disponible sobre el Ad52 y sus *fibers* eran sus secuencias nucleotídica y aminoacídica [114], nos planteamos analizar algunos aspectos del *knob*, el *shaft* y el *tail* del *fiber* corto del Ad52 (F52s) antes de generar el virus quimérico.

1.1.1 COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DEL *KNOB* DEL *FIBER* CORTO DEL Ad52

Los adenovirus humanos de la especie F tienen un *fiber* largo con un *knob* que se une al receptor CAR y un *fiber* corto del cual se desconoce su receptor, pero que participaría en el tropismo intestinal de estos virus. Debido a que el Ad52 está asociado a gastroenteritis y tiene también dos *fibers* de diferentes longitudes hipotetizamos que, igual que en los adenovirus F, el *fiber* largo tendría afinidad por CAR mientras que el corto tendría afinidad por un receptor diferente a CAR. Para comprobar nuestra hipótesis, construimos un árbol filogenético utilizando la secuencia de aminoácidos del *knob* de 12 serotipos de las 7 especies de adenovirus humanos descritas. Las *knob* analizados son los de los serotipos Ad12 (HAdV-A), Ad3 (HAdV-B1), Ad35 (HAdV-B2), Ad2 y Ad5 (HAdV-C), Ad9 y Ad37 (HAdV-D), Ad4 (HAdV-E), Ad40 y Ad41 (HAdV-F), Ad52 y SAdV1 (HAdV-G). En las especies F y G se analizaron los *knob* de los *fibers* largos y cortos. Tal y como se observa en la Figura 29, el *knob* del *fiber* largo del Ad52 tiene mayor similitud con el de los *fibers* largos de Ad40, Ad41 y Ad12 (en menor medida), siendo todos ellos *fibers* con afinidad por el receptor CAR. Sin embargo, el *knob* del *fiber* corto del Ad52 es más parecido al de los *fibers* cortos de Ad40 y Ad41, que no tienen afinidad por CAR. Esto reforzó nuestra hipótesis inicial de que el *fiber* corto del Ad52 confiere al virus un tropismo independiente de CAR.

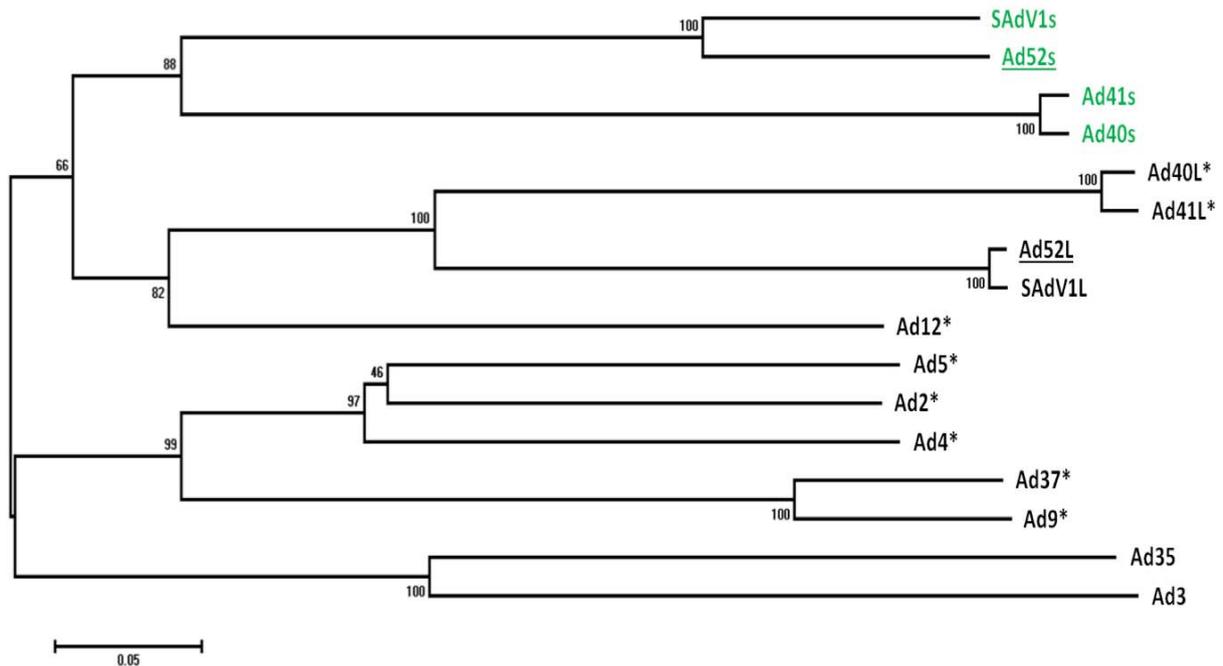


Figura 29. Árbol filogenético de la secuencia de aminoácidos del *knob* de los *fibers* de serotipos humanos que representan las 7 especies de adenovirus humanos. Se resaltan en subrayado los *knob* de los *fibers* corto y largo del Ad52, y en verde los *fibers* cortos de las especies F y G. El asterisco (*) indica los *knob* con capacidad de unirse a CAR conocida. Para los serotipos con dos *fibers* se indica con L el *fiber* largo y con s el *fiber* corto.

1.1.2 EL FIBER CORTO DEL Ad52 CONTIENE LA SECUENCIA CONSERVADA DE UNIÓN AL PENTON BASE

Para producir eficientemente el adenovirus quimérico es necesario que el anclaje del *fiber* al *penton base* sea estable, y eso requiere la presencia del motivo de unión a *penton base*. Este motivo de unión es una secuencia FNPVYPY que está altamente conservada, pero en algunos serotipos hay diferencias de residuos puntuales, así que antes de generar el Ad5/52s se comprobó que el motivo de unión del *fiber* corto del Ad52 fuese igual al que reconoce el *penton base* del Ad5 de forma natural. En la Figura 30.A se puede ver como el *fiber* corto del Ad52 contiene la secuencia conservada de unión FNPVYPY, igual que el Ad5, mientras que los adenovirus Ad12 y Ad4 tienen un residuo cambiado en la secuencia (FNPVYPF y FDPVYPY, respectivamente).

Si se tiene en cuenta la distancia entre secuencias, el *tail* del *fiber* corto del Ad52 tiene una divergencia de 0,33 cambios por cada residuo respecto al *tail* del Ad5 (Figura 30.B), lo cual representa una distancia de secuencias mayor que la de los *fibers* largos de Ad40 y Ad41 (0,31 cambios/residuo), pero es igual o menor que en otros *fibers*, como los *fibers* cortos de Ad40 y Ad41 (0,33), y los *fiber* de Ad9 (0,33), Ad37 (0,36), Ad35 (0,4) y Ad3 (0,42). Con estos valores, se consideró que el *tail* del F52s sería compatible con el *penton base* del Ad5 y, por lo tanto, no debería haber problemas en cuanto a la estabilidad de la cápside.

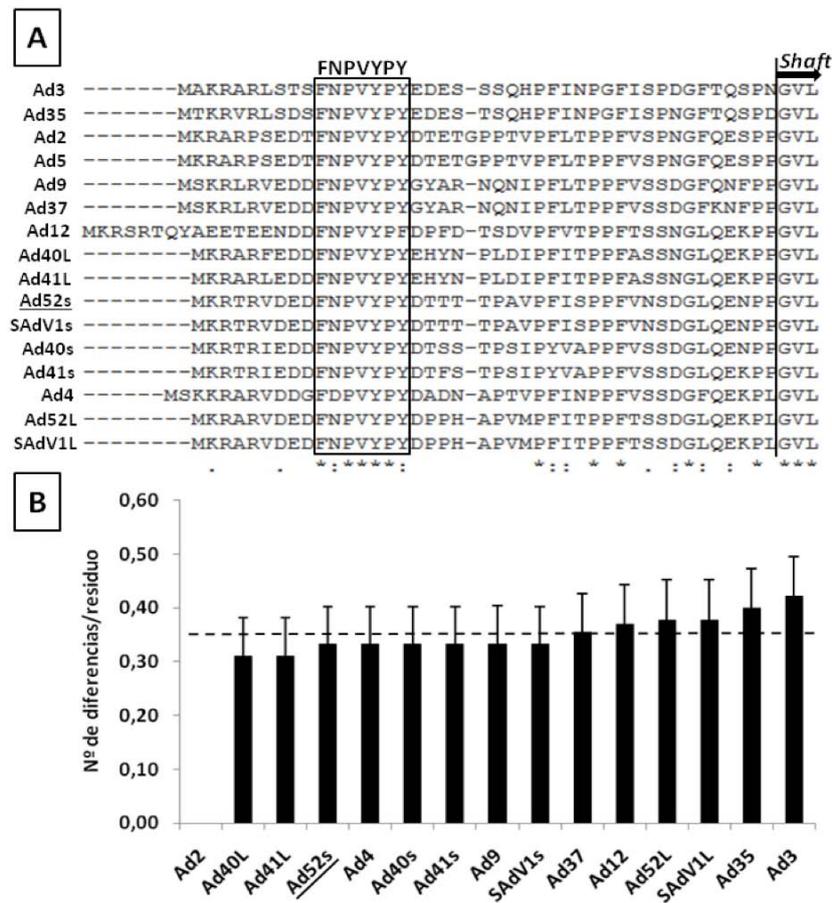


Figura 30. Compatibilidad del dominio *tail* del *fiber* corto del Ad52 con el *penton base* del Ad5. A) Extremo N-t de los *fibers* de serotipos humanos que representan las 7 especies de adenovirus humanos. Se resalta en subrayado el *knob* del *fiber* corto del Ad52. El recuadro resalta la secuencia de unión a *penton base*. Se indica también la secuencia GVL de inicio del *shaft*. B) Distancia del *tail* respecto al del Ad5 en número de diferencias por residuo. La variancia ha sido calculada con 1000 repeticiones. La línea discontinua indica la distancia global

1.1.3 ANÁLISIS DEL SHAFT DEL FIBER CORTO DEL Ad52

La longitud y la flexibilidad del *fiber* son dos parámetros que vienen determinados por el *shaft* y pueden afectar a la infectividad de los adenovirus. Es por esto que quisimos estudiar la secuencia del *shaft* del *fiber* corto del Ad52 y así tener una aproximación su longitud y flexibilidad. Como no se conoce la estructura de este *fiber*, se siguió el modelo propuesto por van Raaij *et al.* [132] que se basa en la estructura observada en las últimas repeticiones del *shaft* del Ad2 (Figura 17). Según este modelo, el *shaft* del *fiber* corto del Ad52 estaría formado por 15 motivos pseudorepetitivos (Figura 31). En la tercera repetición se observa una inserción VQTN entre las dos hojas β que podría constituir una región bisagra en este *fiber*. Sin embargo, carece del motivo de flexibilidad KLGXGLXFD/N que en otros *fibers*, como en el Ad2, se encuentra en la última repetición entera del *shaft*, que en este caso es la novena. Además, esta última repetición entera del *shaft* parece no ajustarse al modelo, ya que los residuos hidrofóbicos de la segunda hoja β se encuentran desplazados respecto a las otras repeticiones debido a la inserción de un residuo aspártico después de la prolina que preceda a esta hoja β .

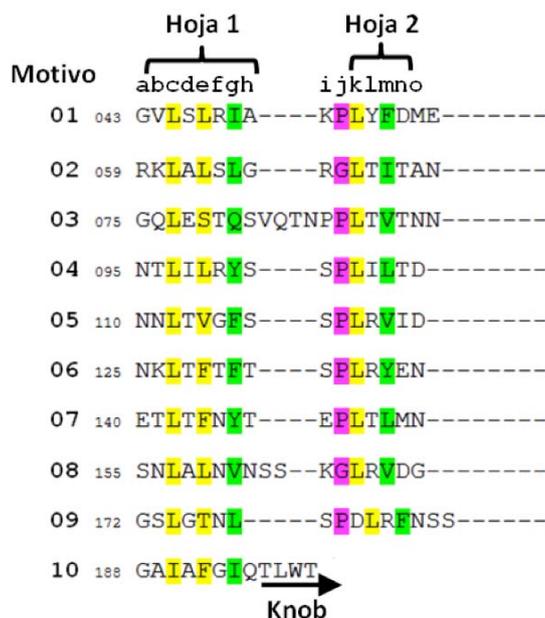


Figura 31. Representación de los motivos repetitivos del *shaft* del *fiber* corto del Ad52. Se indican de a-o los 15 residuos de cada repetición. En amarillo, los 3 residuos que forman el núcleo hidrofóbico central del *shaft* (c, e, k), en verde los residuos que forman los parches hidrofóbicos periféricos (g, m), y en púrpura los residuos P/G al final del giro β (i, j). Los residuos de o-a forman el *loop* variable que conecta dos repeticiones consecutivas. Se resalta también la secuencia TLWT de inicio del *knob*. Modelo basado en el del Ad2 [132]

1.2 CONSTRUCCIÓN DEL GENOMA DEL ADENOVIRUS QUIMÉRICO Ad5/52s

Para generar el vector quimérico Ad5/52s substituímos la secuencia codificante del *fiber* del Ad5 (F5) por la del *fiber* corto del Ad52 (F52s) en el plásmido pKP1.4 Δ CMV, que contiene el genoma del Ad5 con las regiones E1 y E3 deletadas. Con esta finalidad, se encargó la síntesis sintética del fragmento BamHI/MfeI del plásmido pKP1.4 Δ CMV que contiene el F5, pero en su lugar se introdujo la secuencia del F52s obtenida de la base de datos GenBank (Accession DQ923122.2). Los nucleótidos inmediatamente anteriores y posteriores al gen del *fiber* del Ad5 fueron mutados para generar las dianas de restricción XbaI y MluI flanqueando el *fiber* en sus extremos 5' y 3', respectivamente (Figura 32.A). Después de secuenciar el DNA sintético encargado, y comprobar que la secuencia fuese la correcta, procedimos a clonarlo en el pKP1.4 Δ CMV.

El pKP1.4 Δ CMV es un plásmido de gran tamaño, lo que dificulta la clonación directa del *fiber* por ligación, así que previamente se ha de ligar en un vector *shuttle*, o lanzadera, llamado p8900.F5 que contiene un fragmento del genoma del Ad5 donde se encuentra el F5. El DNA sintético que contenía el F52s se digirió por las dianas BamHI/MfeI y se ligó en el vector p8900.F5, abierto con las mismas dianas, para generar el vector p8900.F52s (Figura 32.A).

El siguiente paso consistió en clonar el *fiber* del p8900.F52s en el vector pKP1.4 Δ CMV por recombinación homóloga, pero este paso tampoco se pudo hacer de forma directa debido a la combinación de dianas de restricción existentes en ambos plásmidos. En su lugar, el *fiber* del p8900.F52s se clonó por recombinación homóloga en otro plásmido *shuttle* llamado pK18, que es un fragmento de 18kb de pKP1.4 Δ CMV y que contiene el F5. Para clonarlo, el p8900.F52s se

linealizó con *SpeI*, y el pK18 se abrió con los enzimas *NdeI*/*XmnI* para quitar el F5, y se clonó el F52s por recombinación (Figura 32.B).

El plásmido pK18.F52s sí contenía las dianas adecuadas para clonar el *fiber* en el vector pKP1.4 Δ CMV. Para ello, pK18.F52s y pKP1.4 Δ CMV se linealizaron con los enzimas *SnaBI* y *SpeI*, respectivamente, y se recombinaron para generar el plásmido pKP1.4 Δ CMV.F52s, al que a partir de ahora llamaremos pMG, y que contiene el genoma del adenovirus quimérico Ad5/52s (Figura 32.C).

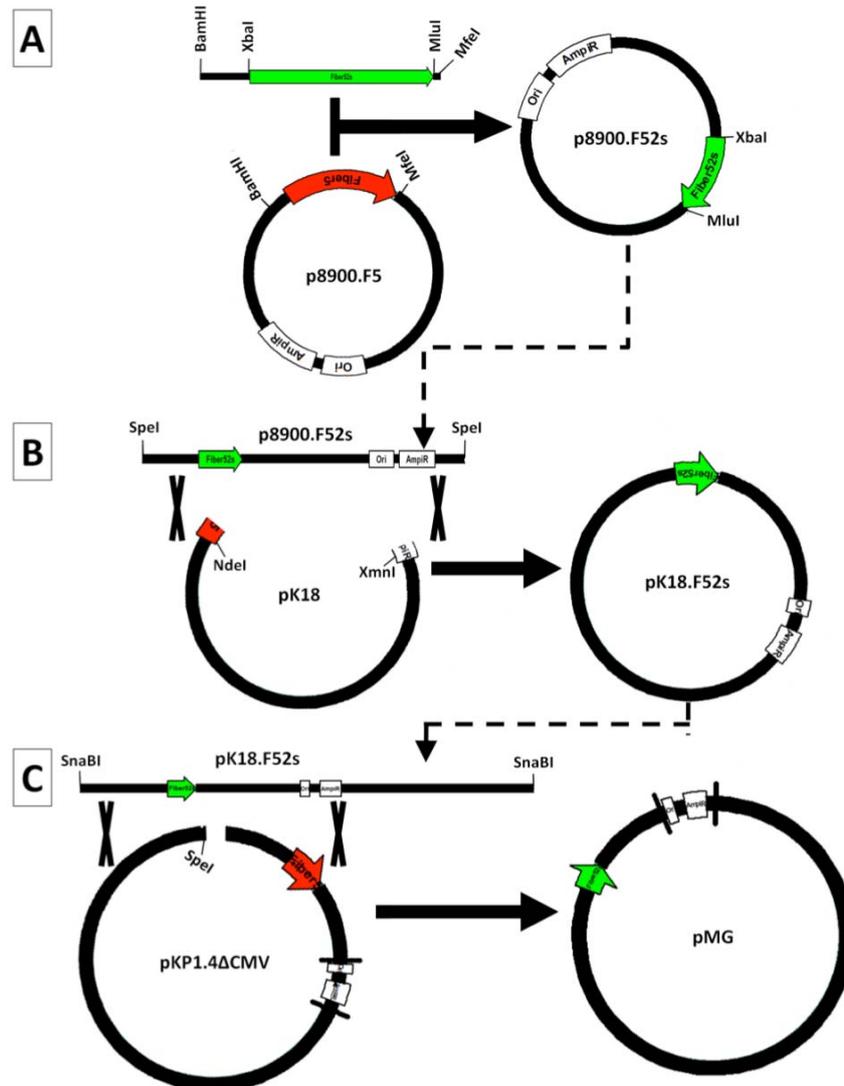


Figura 32. Substitución del F5 (rojo) por el F52s (verde) en el genoma del Ad5. Se indican los enzimas de restricción utilizados en cada paso, además de las dianas *XbaI* y *MluI* introducidas flanqueando el gen del F52s. A) Ligación del F52s sintético en el vector *shuttle* 8900.F5 para obtener el p8900.F52s. B) Substitución del F5 del vector *shuttle* pK18 por el F52s de p8900.F52s mediante recombinación para obtener el pK18.F52s. C) Substitución del F5 del genoma del Ad5 por el F52s a partir del pK18.F52s mediante recombinación con el pKP1.4 Δ CMV. Con este último paso se obtiene el genoma del adenovirus quimérico Ad5/52s

Para estar seguros de que la sustitución del gen del F5 por el del F52s en el pKP1.4 Δ CMV era correcta, se confirmó el tamaño del *fiber* del pMG por PCR, utilizando los *primers* dF52e/rF52e que reconocen el DNA que flanquea al *fiber* (Figura 33).

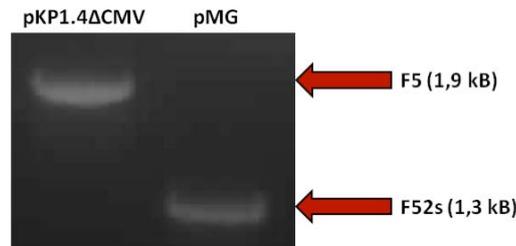


Figura 33. PCR con los *primers* dF52e/rF52e para comprobar el tamaño del *fiber* en el plásmido pMG después de sustituir el F5 por el F52s en el plásmido pKP1.4ΔCMV. Las flechas indican señalan los amplicones de F5 y F52s, y entre paréntesis el tamaño en kilobases (kB)

1.3 INCORPORACIÓN DE GENES MARCADORES EN EL GENOMA DEL Ad5/52s

Una vez generado el genoma del adenovirus quimérico, se decidió introducir los genes marcadores GFP, βgal y Cre que nos servirían para estudiar su comportamiento en futuros experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Para incorporar estos genes marcadores en el pMG, se utilizaron los vectores *shuttle* pTG6600-CMV-GFP, pTG6600-CMV-βgal y pTG6600-CMV-Cre, que contienen aproximadamente las 6 primeras kb del genoma del Ad5 con los genes GFP, βgal y Cre insertados en la región equivalente a la E1, y bajo control del promotor constitutivo CMV. Al ser plásmidos homólogos a los primeros nucleótidos del genoma del pMG, la clonación de los genes se hizo por recombinación homóloga. En esta clonación, los vectores *shuttle* se digirieron con los enzimas FspI/BstEII obteniendo los insertos (XmnI/BstEII para el βgal), mientras que el pMG se linealizó con Swal. Por último, se recombinaron los insertos con el pMG linealizado para obtener los genomas de los virus Ad5/52s-GFP, Ad5/52s-βgal y Ad5/52s-Cre, respectivamente (Figura 34).

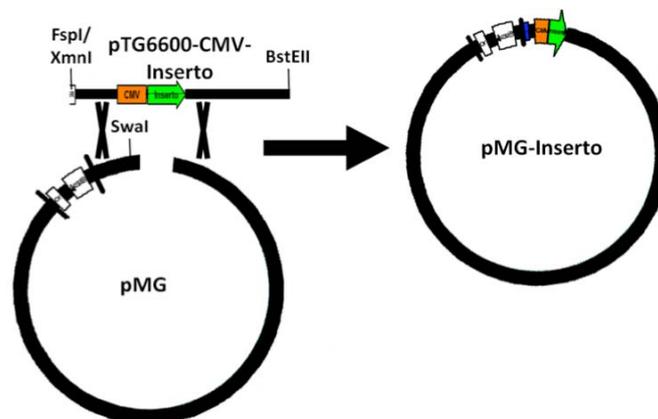


Figura 34. Incorporación por recombinación de un gen marcador en el plásmido pMG (genoma del Ad5/52s). El fragmento de restricción del pTG6600-CMV que contiene el inserto se obtiene con los enzimas FspI y BstEII (GFP o Cre) o con XmnI y BstEII (βgal). La recombinación con el pMG linealizado por Swal genera el genoma del Ad5/52s con el inserto correspondiente localizado en la región equivalente a la E1

1.4 PRODUCCIÓN DEL VIRUS QUIMÉRICO Ad5/52s-GFP

La sustitución del *fiber* en un adenovirus quimérico puede modificar la infectividad y el ciclo viral respecto al virus parental. Es por esta razón que de cara a la primera producción del virus quimérico se decidió trabajar con el vector Ad5/52s-GFP y así poder monitorizar fácilmente

por microscopía de fluorescencia la producción del virus en las sucesivas rondas de amplificación.

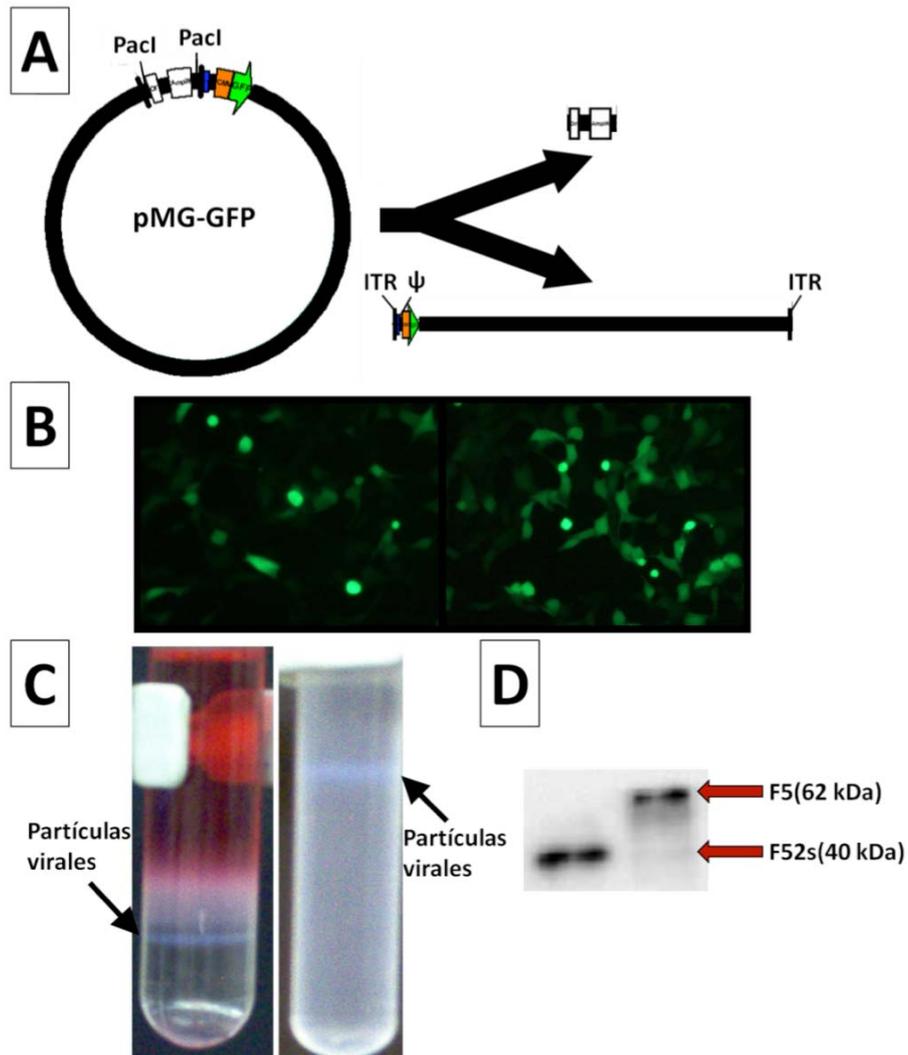


Figura 35. Producción del Ad5/52s-GFP. A) Digestión del plásmido pMG-GFP con PaclI para aislar y linealizar el genoma del Ad5/52s y transfectarlo. Se indican las ITRs y la señal de encapsidación (ψ). B) HEK293 a las 72h de transfectarlas con el pMG-GFP linealizado por PaclI (izquierda). HEK293 infectadas con el Ad5/52s-GFP en el último paso de amplificación. C) Purificación del virus por centrifugación en CsCl, donde se señalan las bandas correspondientes a las partículas virales en la primera (izquierda) y en la segunda (derecha) centrifugación. D) Western Blot utilizando un anticuerpo anti-*fiber* para detectar la presencia del F52s en la cápside, que tiene un tamaño menor al F5 nativo de la cápside

Para producir el vector Ad5/52s-GFP, se digirió el plásmido pMG con el enzima de restricción PaclI (Figura 35.A), que permite separar el DNA adenoviral del no adenoviral (resistencia a ampicilina, origen de replicación bacteriano, etc.) y, además, linealizar el genoma viral para permitir la replicación del adenovirus. Se transfectaron $12\mu\text{g}$ del DNA digerido en 2×10^6 células HEK293, y a los tres días se lisaron los cultivos y se transfirió todo el contenido a una placa que contenía 8×10^6 células. A partir de este paso, se hicieron más rondas de amplificación, guiándonos por el efecto citopático (CPE) para lisar el cultivo, hasta llegar a un cultivo final de 30×10^6 células HEK293. Durante todo el proceso fue posible monitorizar la amplificación del adenovirus gracias al marcador GFP (Figura 35.B). En la última ronda de amplificación, se

recogió el cultivo cuando el CPE alcanzó el 50%, que se dio a las 40 horas de infectar el cultivo, y se purificó el adenovirus por doble centrifugación en CsCl.

Una vez purificado el virus, se tituló la concentración del virus tanto en partículas físicas (PP/mL) como en partículas infecciosas (IU/mL). Para calcular las PP/mL se midió la absorbancia a 260nm de una muestra de virus desnaturalizada y se aplicó la fórmula $PP/mL = Abs_{260} \times 1,1 \times 10^{12}$ [73]. Las IU/mL se titularon mediante la infección en células HEK293 y 48 horas después se contaron las células GFP positivas.

Los títulos obtenidos fueron de $3,3 \times 10^{11}$ PP/mL y $4,5 \times 10^9$ IU/mL, lo que da una ratio IU/PP de 1/73,3. El título en PP/mL es bajo en comparación con los que obtenemos habitualmente en el laboratorio para los Ad5, pero está acorde con el grosor de la banda correspondiente al virus en observada en los gradientes de CsCl (Figura 35.C). Posteriormente, se confirmó la correcta incorporación del F52s en la cápside por Western blot (Figura 35.D).

2. ESTIMACIÓN DEL CICLO VIRAL DEL Ad5/52s PARA OPTIMIZAR SU PRODUCCIÓN

La sustitución del *fiber* puede afectar al ciclo viral de los adenovirus, y si el virus quimérico tuviese un ciclo más lento que el Ad5 se podría explicar el bajo título obtenido PP/mL en la producción del Ad5/52s-GFP.

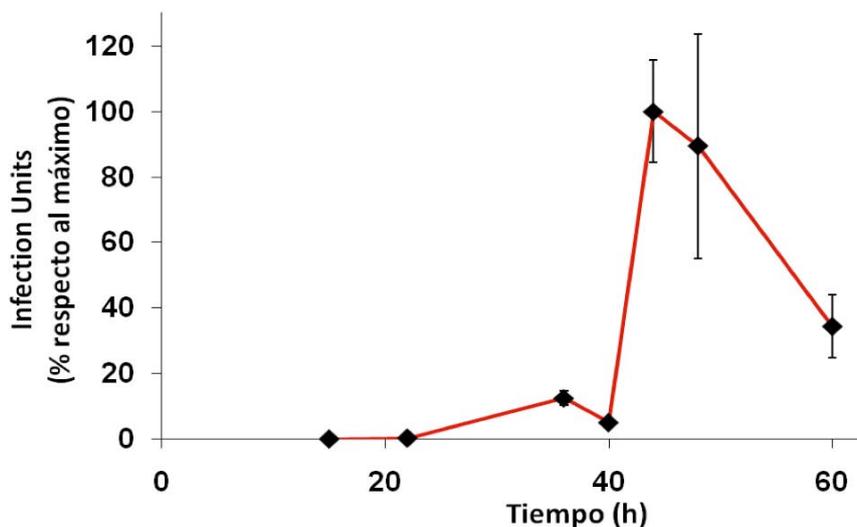


Figura 36. Ciclo viral del Ad5/52s-GFP. IU totales en el lisado del cultivo a diferentes tiempos después de la infección, indicadas como % respecto al máximo obtenido que, en este caso, es el título a 44h.

Para estudiar el ciclo viral se infectaron células HEK293 con el Ad5/52s-GFP a una MOI de 1, y los lisados se recogieron 22, 36, 40, 44, 48 y 60 horas después de la infección, y se tituló la cantidad total de IU en cada tiempo. Para asegurar que no se estaba titulando el virus no internalizado en las células, se lavó el cultivo con PBS 12 horas después de la infección y 3 horas más tarde (15 horas p.i) se tituló el lisado, donde se comprobó que el virus no internalizado representaba tan solo un 0,1% del inoculado. A las 22 horas aún no se habían producido nuevas IU del adenovirus quimérico (Figura 36), pero a las 36-40 horas ya se había

producido un 10% del total de las IU. A partir de aquí, la obtención de nuevas IU aumenta de forma abrupta, llegando al máximo entre las 44 horas y las 48 horas, para luego descender gradualmente hasta las 60 horas. Así, el ciclo viral del Ad5/52s es de 44-48 horas, lo que nos indica que la sustitución del F5 por el F52s en la cápside del Ad5 ralentiza su el ciclo viral, que es de 36 horas.

Éste resultado permitió darnos cuenta de que la recolección a 40 horas de la primera producción de Ad5/52s-GFP había sido prematura, ya que en este punto el adenovirus solo tuvo tiempo de producir aproximadamente el 10% de las IU que es capaz de generar. Por esta razón, las siguientes producciones de Ad5/52s con diferentes marcadores que se han utilizado en esta tesis fueron recolectadas a las 44 horas después de infectar el cultivo, lo que permitió incrementar el rendimiento de las producciones (Tabla 5). Concretamente, la productividad del Ad5/52s se incrementó de $3,7 \times 10^3$ PP por célula a $1,0 \times 10^4$ PP por célula, lo que supone multiplicar por 2,8 el rendimiento. Y en cuanto a las partículas infecciosas, el rendimiento de la producción inicial a 40 horas de 50 IU por célula se incrementa hasta 570 IU por célula cuando los virus son recogidos a las 44 horas, lo que supone un rendimiento 11,5 veces mayor que el inicial. Al aumentar más la productividad de partículas infecciosas que de partículas físicas, la ratio IU/PP pasa de 1/73,3 en la producción a 40 horas a 1/21,2 en la producción a 44 horas.

Tabla 5: Rendimiento de las producciones de Ad5/52s recogidas a 44 horas			
Adenovirus	PP/Célula	IU/Célula	Ratio IU/PP
Ad5/52s-GFP (primera producción)	$3,7 \times 10^3$	50	1/73,3
Ad5/52s (Media del resto de producciones)	$1,0 \times 10^4 \pm$ 25,3%	$5,7 \times 10^2 \pm$ 38,4%	1/21,2 \pm 16,4%
Incremento respecto la primera producción de Ad5/52s	x2,8	x11,5	x3,5
Producciones de Ad5 (Media)	$2,3 \times 10^4 \pm$ 9,0%	$3,2 \times 10^3 \pm$ 27,3%	1/8,1 \pm 24,3%
Rendimiento Ad5/ Rendimiento Ad5/52s	x2,2	x5,6	x2,6

Tabla 5. Comparación del rendimiento obtenido en la producción inicial del Ad5/52s recogida 40 horas después de infectar el cultivo con las siguientes producciones recogidas 44 horas después de infectar el cultivo. La media de la productividad se indica como PP o IU por célula en el cultivo \pm el porcentaje de error estándar

3. MODIFICACIÓN DEL TROPISMO EN CULTIVOS *IN VITRO* DEL Ad5 MEDIADO POR EL F52s

El *fiber* es el responsable de la unión del Ad5 al receptor CAR, y esto implica que su sustitución por un *fiber* que reconozca un receptor diferente modificará el tropismo del Ad5.

Para comparar el tropismo del Ad5 con el nuevo tropismo conferido por el F52s se infectaron nueve líneas celulares de diferente origen con ambos virus para comparar sus eficiencias de

Resultados

transducción. Las líneas S16, RT4, C2C12, HepG2, A549, HeLa, DKZeo, Jurkat E6.1 y PC12 fueron infectadas a una dosis de 10, 100 ó 1000PP/célula con los virus Ad5-GFP o Ad5/52s-GFP, y a las 48 horas se observó la expresión de GFP en los cultivos mediante microscopía de fluorescencia (Figura 37), y se determinó también el porcentaje de transducción por citometría de flujo.

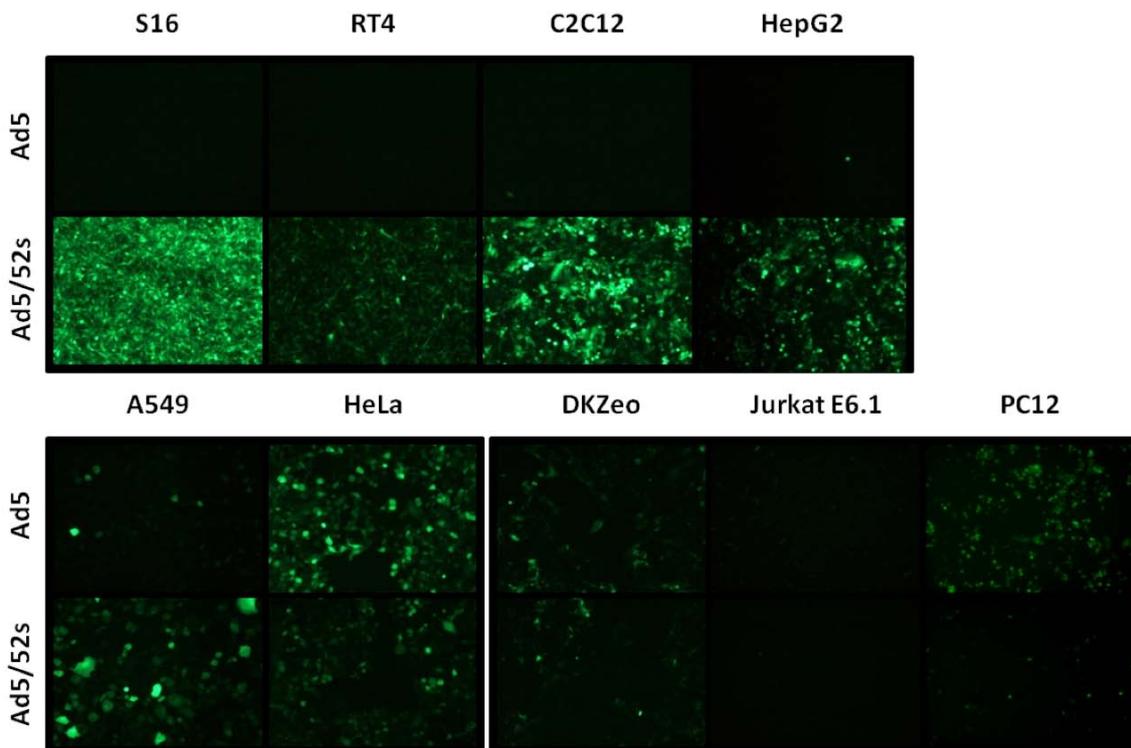


Figura 37. Imágenes de las nueve líneas celulares utilizadas en el experimento 48 horas después de ser incubadas con los adenovirus Ad5-GFP o Ad5/52s-GFP, a una dosis de 1000PP/célula (x200 aumentos)

Las líneas celulares se pueden dividir en tres grupos basándonos en la eficiencia de transducción de los dos virus (Figura 38). El primer grupo lo forman las líneas celulares S16, RT4, C2C12 y HepG2, y son transducidas eficientemente por el Ad5/52s, pero no por el Ad5. En las tres primeras, la transducción por parte del Ad5 es inferior al 1% incluso a 1000PP/célula, igual que en HepG2 a 10 y 100PP/célula, aunque en éstas si se detecta un 10% de transducción a una dosis de Ad5 de 1000PP/célula. En cambio, en este grupo de líneas celulares, el Ad5/52s a 1000PP/célula transduce el 59% de C2C12, el 77% de RT4, el 87% de S16 y el 93% de HepG2. Incluso a la dosis más baja de virus, el Ad5/52s transduce un mayor porcentaje de las células de estas líneas en mayor eficiencia que el Ad5.

El segundo grupo de líneas celulares incluye las A549 y HeLa, dónde ambos virus son capaces de transducirlas de forma eficiente a dosis de 1000PP/célula, llegando a un 84% (A549) y un 91% (HeLa) con el Ad5, y un 94% (A549) y un 84% (HeLa) con el Ad5/52s.

Por último, hay un tercer grupo de líneas celulares, que incluye las líneas DKZeo, Jurkat E6.1 y PC12, dónde a 1000PP/célula el Ad5 transduce un 32% de DKZeo, un 39% de Jurkat E6.1 y un 72% de PC12, mientras que el Ad5/52s a la misma dosis tan solo llega a un 11% en DKZeo, siendo menor en el resto. Además de a la dosis más alta, el Ad5 tiene mayor eficiencia de transducción que el Ad5/52s en todas las dosis de virus utilizadas. En resumen, Ad5 y Ad5/52s

tienen una eficiencia de transducción diferente en función de la línea celular utilizada y, por lo tanto, se demuestra que el F52s confiere a la cápside del Ad5 un tropismo diferente al mediado por F5.

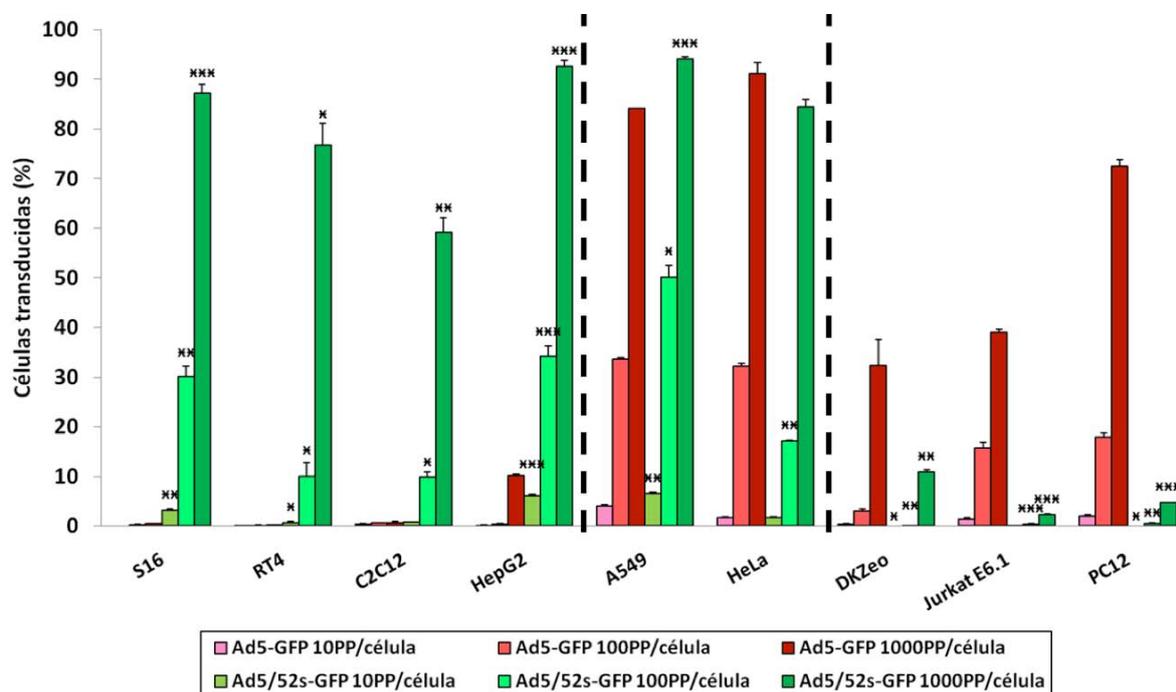


Figura 38. Eficiencia de transducción de los adenovirus Ad5-GFP y Ad5/52s-GFP indicado como % de células GFP positivas. Las líneas celulares se han agrupado en función de si son transducidas eficientemente por el Ad5/52s (izquierda), por ambos virus (centro) o por el Ad5 (derecha). En cada línea celular, se indican las diferencias estadísticamente significativas del Ad5/52s respecto al Ad5 a la misma dosis. $p < 0,05$ (x), $p < 0,01$ (xx) y $p < 0,001$ (xxx). Se representan también las barras de error estándar

Debido a la elevada eficiencia del Ad5/52s transduciendo líneas celulares derivadas de células de Schwann (S16 y RT4), quisimos probar si también podía transducir modelos de éstas líneas diferenciadas a células de Schwann *in vitro*, ya que la diferenciación podría modificar la expresión de los receptores para el virus. Para esto, se siguió un protocolo de 72h de diferenciación de células S16 a células de Schwann, y una vez diferenciadas se incubaron con Ad5-GFP o Ad5/52s-GFP a una dosis de 10, 100 ó 1000PP/célula, y a las 48 horas después de la inoculación del virus, se observó la fluorescencia por microscopía. Las imágenes de la Figura 39 muestran que el Ad5 tiene una baja eficiencia de transducción, ya que por microscopía no se detecta un número significativo de células fluorescentes ni siquiera a una dosis de 1000PP/célula. En cambio, con el Ad5/52s a 10PP/célula ya se puede observar un número significativo de células fluorescentes, y a 100PP/célula prácticamente la totalidad del cultivo ha sido transducido por el Ad5/52s, llegando a la saturación con una dosis de 1000PP/célula. Esto nos indica que cuando la línea celular S16 es diferenciada a un modelo de células de Schwann la expresión de los posibles receptores para el Ad5/52s no parece estar afectada.

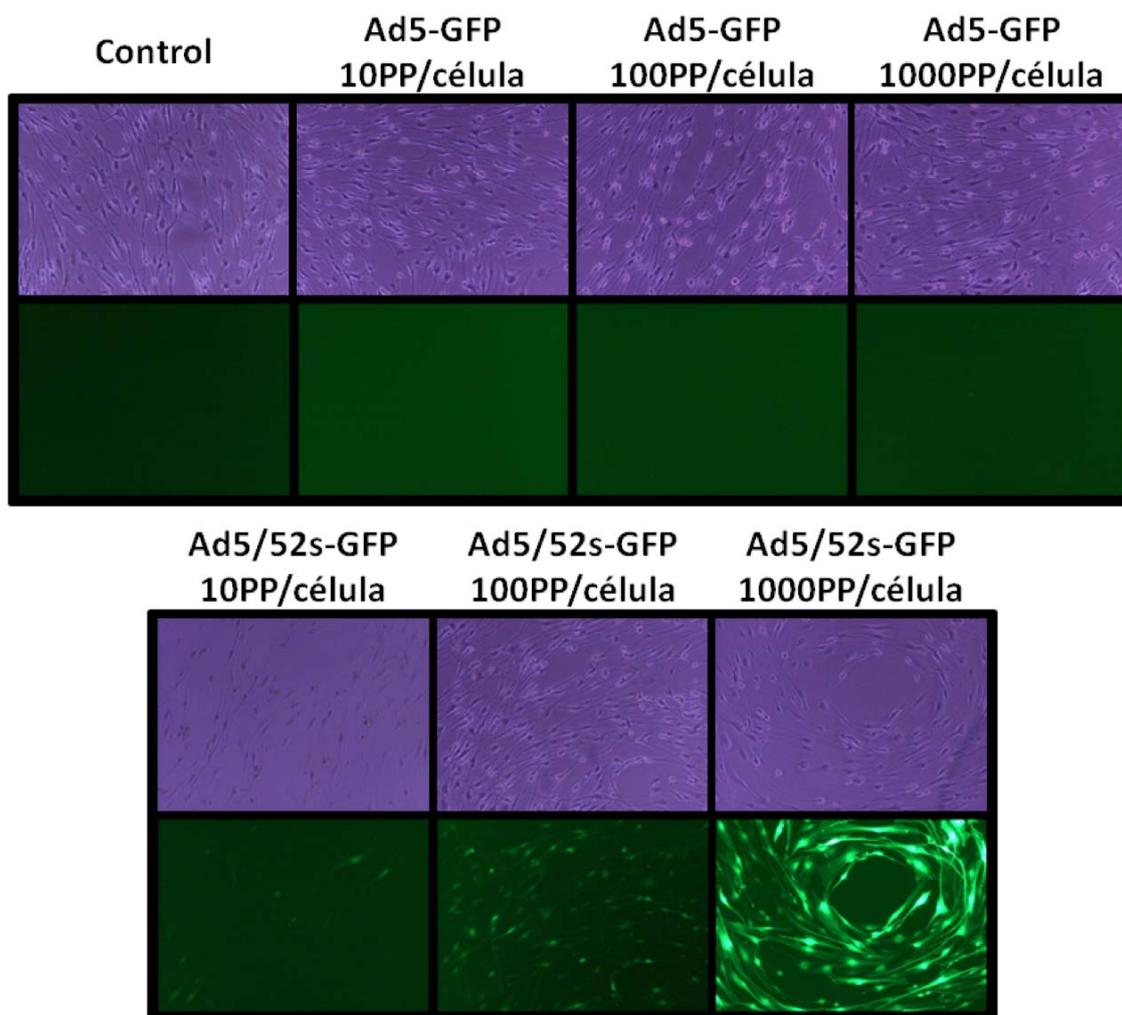


Figura 39. Imágenes de campo claro (superior) y fluorescencia (inferior) de cultivos S16 diferenciados a células de Schwann 48 horas después de ser incubados con Ad5-GFP o Ad5/52s-GFP a una dosis de 10, 100 ó 1000PP/célula. Las imágenes control representan las S16 no incubadas con virus (x200 aumentos)

Viendo el elevado tropismo que tiene el Ad5/52s, en comparación con el Ad5, por un modelo de línea celular S16, y su versión diferenciada a célula de Schwann, se quiso confirmar este resultado en un cultivo primario de células de Schwann. Para ello, se extrajeron las células de Schwann a partir del nervio ciático de ratones post-natales, y se cultivaron hasta llegar a la confluencia. Una vez el cultivo estuvo estabilizado y en la confluencia óptima (5 días de cultivo), las células se incubaron con Ad5-GFP o Ad5/52s-GFP a una dosis de 50, 500 ó 5000PP/célula, y a las 48h se observaron las células transducidas por microscopía de fluorescencia (Figura 40). En las imágenes se puede ver como la transducción de células de Schwann por parte del Ad5 es ineficiente, ya que a 5000PP/célula apenas se observan diferencias significativas en comparación con las células no incubadas con virus. Sin embargo, con el Ad5/52s se observan claramente un número significativo de células que expresan el marcador GFP a 50PP/célula, y este número se ve incrementado hasta representar casi la totalidad del cultivo a 500PP/células. A 5000PP/célula de Ad5/52s no solo se observa fluorescencia en prácticamente todas las células, sino que la intensidad de su fluorescencia sugiere que la gran mayoría han sido transducidas por múltiples partículas virales. En

conclusión, el Ad5/52s no solo tiene una eficiencia de transducción mayor a la del Ad5 en líneas derivadas de células de Schwann, sino que también se da en cultivos primarios de estas células.

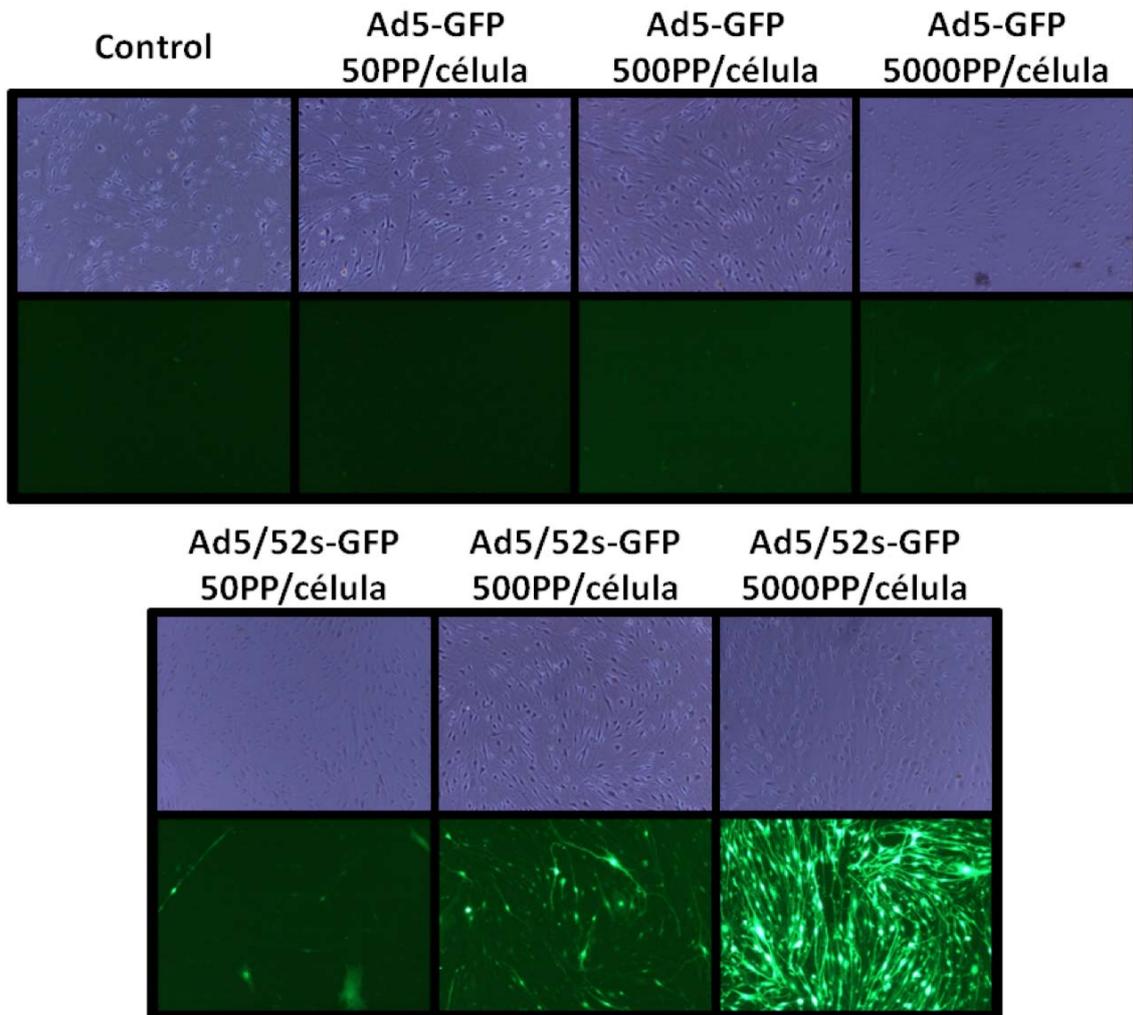


Figura 40. Imágenes de campo claro (superior) y fluorescencia (inferior) de cultivos primarios de células de Schwann 48 horas después de ser incubadas con los adenovirus Ad5-GFP o Ad5/52s-GFP a una dosis de 50, 500 ó 5000PP/célula. Las imágenes control representan los cultivos no incubados con virus (x200 aumentos))

4. IDENTIFICACIÓN DEL RECEPTOR DEL F52s

La substitución del *fiber* del Ad5 por el *fiber* corto del Ad52 modifica el tropismo del virus hacia diferentes tipos celulares. Para conocer mejor el comportamiento del virus, planteamos identificar el receptor por el que tiene afinidad el F52s.

4.1 INDEPENDENCIA DEL Ad5/52s DE LOS RECEPTORES DEL F5 EN LA TRANSDUCCIÓN DE CULTIVOS CELULARES

Antes de plantear la búsqueda del receptor del F52s se decidió confirmar que la transducción del Ad5/52s es independiente de los receptores utilizados por el Ad5, principalmente CAR. Para evaluar la independencia del Ad5/52s de los receptores reconocidos por el F5 se

incubaron cultivos de células HEK293 durante 2 horas con diferentes cantidades de proteína *knob* del Ad5 recombinante (0, 50, 100 y 200ng) que nos cedió el Dr. André Lieber. Pasadas las 2 horas, se añadieron los virus Ad5-GFP o Ad5/52s-GFP a una dosis de 20 ó 10PP/célula, y se incubaron los cultivos con los virus durante una hora, y 24 horas después se midió el porcentaje de transducción por citometría de flujo (Figura 41). En el caso del Ad5, las células no incubadas con *knob* recombinante fueron transducidas en un 20,2% y un 12,4% para las dosis de 20 y 10PP/célula, respectivamente, y a ambas dosis se consigue la máxima reducción del porcentaje de transducción cuando las células se han incubado previamente con 50ng de proteína recombinante, disminuyendo hasta el 1,70% de transducción con el Ad5 a una dosis de 20PP/célula, y hasta 0,70% cuando la dosis de virus es de 10PP/célula. Las incubaciones con 100 y 200ng de *knob* recombinante no suponen un aumento significativo de la inhibición del Ad5 respecto a la conseguida con 50ng. Por otro lado, cuando los cultivos no se han tratado previamente con *knob* del Ad5 recombinante, el Ad5/52s a una dosis de 20PP/célula transduce el 11,0%, y el 9,1% a una dosis de 10PP/célula. Sin embargo, la incubación con *knob* recombinante no afecta al porcentaje de transducción del Ad5/52 de forma significativa, a excepción de la incubación con 200ng de *knob* seguida de la incubación con el Ad5/52s a una dosis de 10PP/célula, donde se observa una leve disminución de la transducción desde el 9,1% inicial hasta un 7,3% de células transducidas.

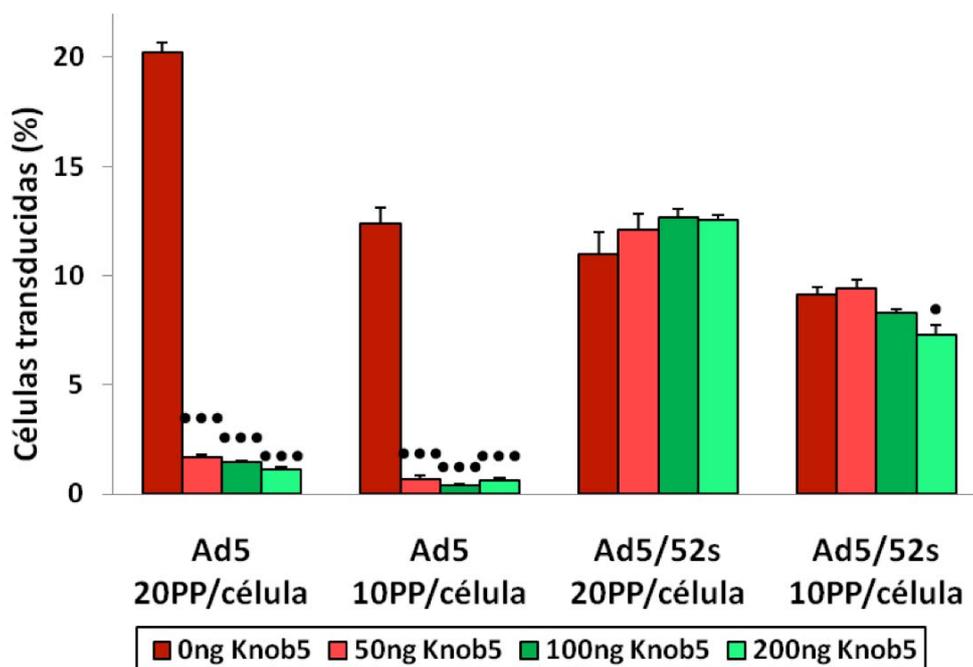


Figura 41. Porcentaje de transducción de los virus Ad5-Gfp o Ad5/52s-GFP en cultivos HEK293 previamente tratados con diferentes cantidades de proteína recombinante del *knob* del Ad5. Para cada virus y dosis, se indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a las células no tratadas con proteína recombinante como $p < 0,01$ (●) y $p < 0,001$ (●●). Las barras corresponden al error estándar

Paralelamente, se realizó un segundo experimento basado en la utilización de la línea celular CHO-K1, que es un modelo ampliamente utilizado de célula resistente a la transducción por parte del Ad5, ya que no expresa el receptor CAR. Para ello, incubamos los cultivos de células CHO durante 48 horas con los adenovirus Ad5-GFP y Ad5/52s-GFP a una dosis de 10, 100 ó 1000PP/célula, y después medimos el porcentaje de transducción por citometría de flujo

(Figura 42). El resultado de la citometría muestra que el Ad5/52s puede transducir eficientemente las células CHO-K1, obteniendo un porcentaje de transducción del 3,5%, el 27,2% y el 89,9% a las dosis de 10, 100 y 1000PP/célula, respectivamente. Por otro lado, el porcentaje de transducción del Ad5 en esta línea celular es despreciable, excepto a la dosis de 1000PP/célula donde tan solo consigue transducir el 2,5% de las células. Así pues, con estos resultados confirmamos que el Ad5/52s transduce las células principalmente a través de un receptor diferente al receptor CAR utilizado por el Ad5.

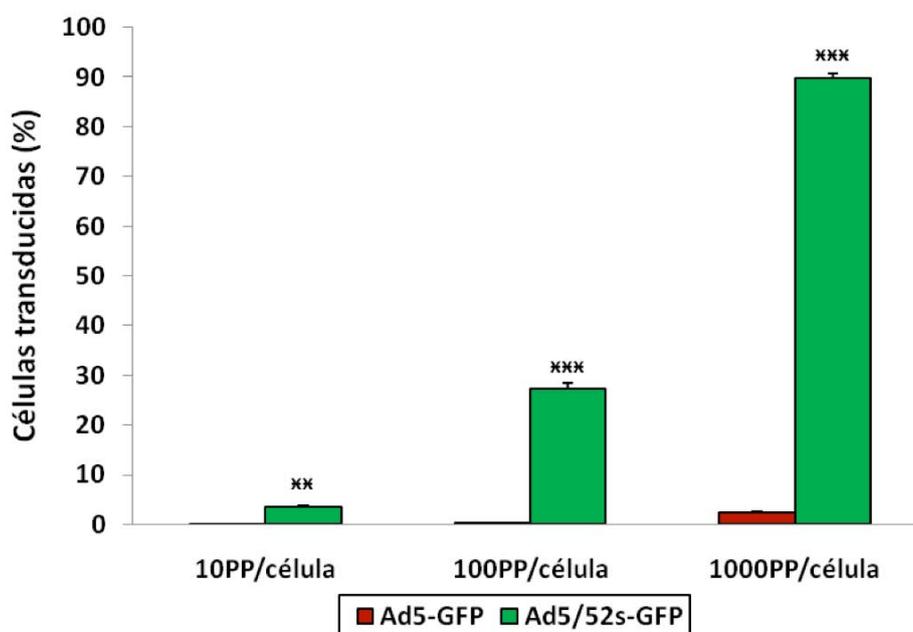


Figura 42. Eficiencia de transducción de los adenovirus Ad5-GFP y Ad5/52s-GFP en cultivos CHO-K1 a dosis de 10, 100 ó 1000PP/célula. Se indican las diferencias estadísticamente significativas de la transducción del Ad5/52s respecto al Ad5 como $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***)

4.2 PAPEL DEL *KNOB* DEL F52s EN EL RECONOCIMIENTO DEL RECEPTOR DEL *FIBER*

Con los resultados anteriores, confirmamos que el F52s otorga a la cápside del Ad5 la capacidad de transducir células a través del reconocimiento de receptores diferentes a los propios. No obstante, aunque gran parte de las interacciones descritas entre el *fiber* y su receptor son mediadas por el dominio *knob*, también se han descrito algunas que involucran al dominio *shaft*. Por esta razón, para identificar el receptor del F52s primero debíamos determinar si el tropismo diferencial del virus quimérico era determinado por el *shaft* o por el *knob* del F52s. Para comprobar esto, se generó un adenovirus quimérico AdS5K52 que contenía el *shaft* del F5 y el *knob* del F52s, y a este virus se le incorporó el gen marcador GFP. Una vez producido el virus, se incubaron las células A549, S16 y CHO-K1 con los adenovirus Ad5-GFP, Ad5/52s-GFP y AdS5K52-GFP a una dosis de 100 ó 1000PP/célula, y 48 horas después se midió el porcentaje de transducción por citometría de flujo (Figura 43). Los tres virus pueden transducir eficientemente las células A549 en las dosis utilizadas. Sin embargo, el AdS5K52 lo hace de una forma más eficiente que los adenovirus Ad5 y Ad5/52s, obteniendo unos porcentajes de transducción del 55% a dosis 100PP/célula y del 97% a dosis de 1000PP/célula. Por otro lado, en las células S16 y CHO-K1 el Ad5 tiene una baja eficiencia de transducción, llegando a un máximo del 6% a 1000PP/célula en S16, mientras que tanto

Ad5/52s como AdS5K52 sí las transducen eficientemente. Sin embargo, igual que en las A549, tanto en S16 como en CHO-K1 el AdS5K52 transduce un mayor porcentaje de células que el Ad5/52s en las dos dosis utilizadas, observándose las mayores diferencias a 100PP/célula probablemente por estar menos saturadas. Así pues, con este resultado concluimos que el nuevo tropismo que confiere el F52s a la cápside del Ad5 se debe principalmente a la interacción del *knob* con un receptor diferente, y no a la del *shaft*. La mayor eficiencia observada en el AdS5K52 respecto al Ad5/52s podría deberse a la diferencia de longitud de sus *fibers*.

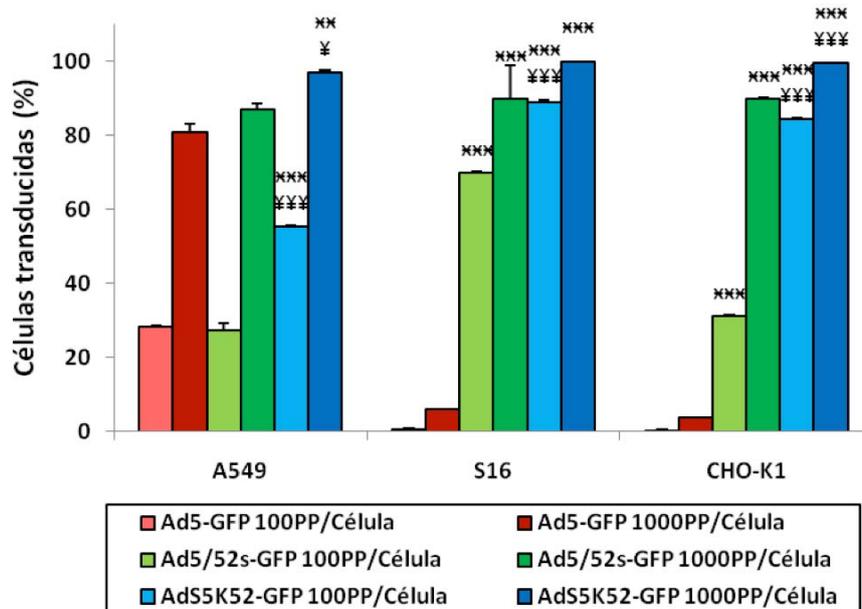


Figura 43. Eficiencia de transducción de los virus Ad5-GFP, Ad5/52s-GFP y AdS5K52-GFP a 100 ó 1000PP/célula en cultivos A549, S16 y CHO-K1. Se indican las diferencias estadísticamente significativas: 1) respecto a la misma dosis de Ad5 como $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***); 2) del AdS5K52 respecto a la misma dosis de Ad5/52s como $p < 0,05$ (¥) y $p < 0,001$ (¥¥¥)

4.3 IDENTIFICACIÓN DEL RECEPTOR DEL F52s MEDIANTE *PULL DOWN*

Una vez identificado el *knob* del F52s como el principal responsable del tropismo del Ad5/52s, se decidió identificar el receptor celular con el que interacciona este dominio mediante una estrategia de *pull down*. Esta estrategia consistía en producir la proteína recombinante *knob* del F52s unida a un *tag* GST, e incubarla con lisados celulares para permitir la interacción del *knob* con su receptor y, posteriormente, aislarlo e identificarlo. Debido a que la trimerización del *knob* requiere la presencia de la última repetición del *shaft* [140], se sintetizó una secuencia de DNA que correspondía o bien al último motivo repetitivo del *shaft* del F52s junto con el dominio *knob* del F52s (Shaft52Knob52), o bien al último motivo repetitivo del *shaft* del F5 junto con el *knob* del F52s (Shaft5Knob52), y ambos insertos se clonaron en el vector de expresión procariota pGEX-6P-1. Una vez clonados los insertos, se produjeron y purificaron las proteínas recombinantes GST-Shaft52Knob52 y GST-Shaft5Knob52, y se corrieron alícuotas de ambas en SDS-PAGE para determinar su concentración (Figura 44).

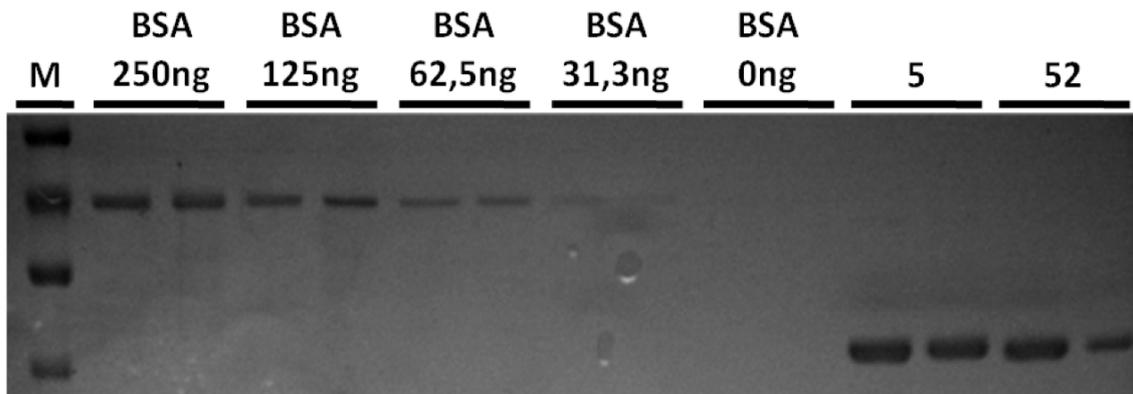


Figura 44. Gel de SDS-PAGE teñido por Coomassie para detectar la expresión de las proteínas recombinantes GST-Shaf5Knob52 (5) o GST-Shaft52Knob52 (52) de 46 kDa. Se utilizaron cantidades conocidas de BSA para determinar la concentración de las proteínas recombinantes

Una vez producidas las proteínas recombinantes, se incubaron 25 μ g de GST-Shaft52Knob52 o GST-Shaft5Knob52 con un extracto de proteínas de membrana de 10⁹ células de la línea 293F. La incubación se realizó en presencia de sefarosa-glutación para retener los complejos *knob52s*-receptor y, posteriormente, se eluyeron los complejos y se corrieron en SDS-PAGE para visualizar mediante tinción de Coomassie las bandas correspondientes tanto al *knob* recombinante como a las posibles proteínas asociadas a él. Sin embargo, las únicas bandas que detectamos fueron las de las proteínas GST-Shaft52Knob52 o GST-Shaft5Knob52 (Figura 45).

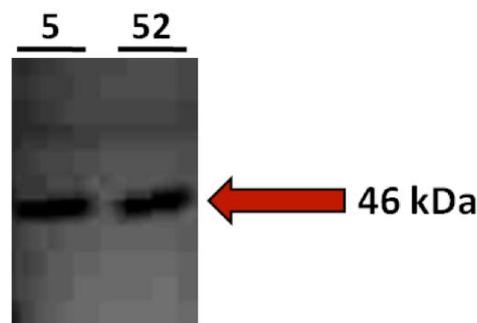


Figura 45. Gel SDS-PAGE teñido por Coomassie para detectar las eluidas junto a las proteínas recombinantes GST-Shaf5Knob52 (5) o GST-Shaft52Knob52 (52). La única banda que se observa (46 kDa) corresponde a las proteínas recombinantes.

Como en el ensayo de *pull down* no se detecta ninguna proteína de membrana asociada a los *knob* recombinantes, se comprobó la capacidad de estos *knob* de unirse a los receptores mediante un ensayo funcional. Para ello, se incubaron células HEK293 con 200ng de las proteínas recombinantes GST-Shaft52Knob52 o GST-Shaft5Knob52 durante dos horas y, posteriormente, se añadieron los adenovirus Ad5-GFP o Ad5/52s-GFP a 50PP/célula durante una hora adicional. Como control, también se realizó el experimento utilizando el *knob* recombinante del Ad5 utilizado anteriormente (Figura 41). A las 24 horas se observaron los cultivos por microscopía de fluorescencia (Figura 46), comprobándose que la transducción del Ad5 se ve disminuida cuando las células se han preincubado con 200ng de *knob* del Ad5, pero en cambio la del Ad5/52s no se ve alterada cuando se utilizan las proteínas recombinantes de su *knob* GST-Shaft5Knob52 ni GST-Shaft52Knob52. Como era de esperar, la transducción de las

células por Ad5 y Ad5/52s no se ve alterada cuando se preincuban los cultivos con el *knob* del adenovirus contrario. Así pues, concluimos que las proteínas recombinantes del *knob* del F52s no eran funcionales y por eso no se pudo identificar ninguna proteína asociada a ellas en el ensayo de *pull down*.

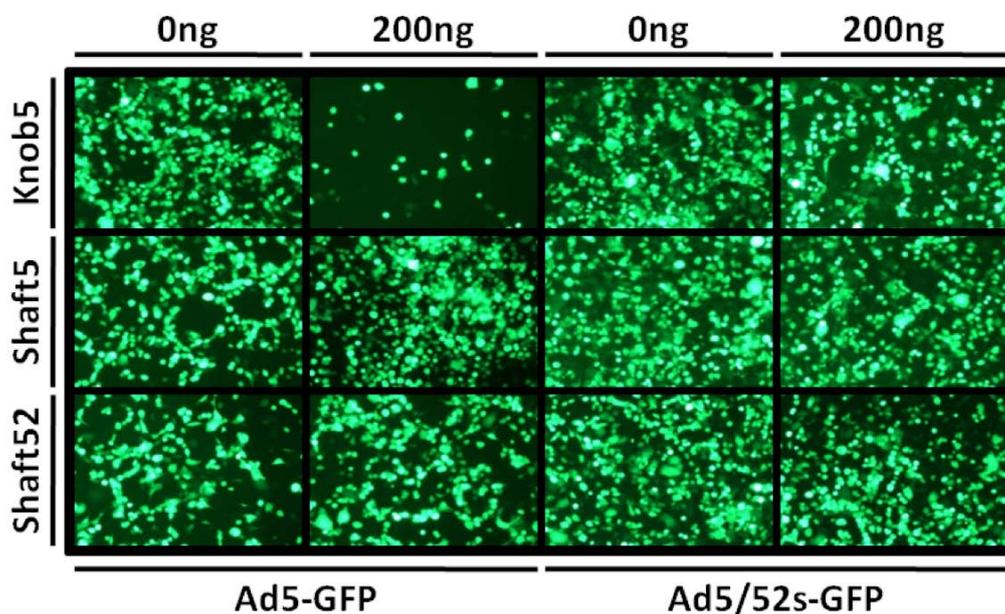


Figura 46. Transducción células HEK293 con los adenovirus Ad5-GFP o Ad5/52s-GFP a 50PP/célula. Las cultivos se incubaron previamente con 0 ó 200ng de las proteínas *knob* recombinante de Ad5 (Knob5), GST-Shaft5Knob52 (Shaft5) o GST-Shaft52Knob52 (Shaft52)

Para descartar que el problema se debiese a una diferencia en las modificaciones postraduccionales de la proteína asociadas a un sistema de expresión procariota, clonamos los insertos de DNA de las proteínas Shaft5Knob52 y Shaft52Knob52 en un vector de expresión eucariota que también incorpora un *tag* GST en el extremo N-terminal (pEBG-2T). Una vez clonados los genes y producidas las proteínas en células HEK293, se repitieron tanto el ensayo de *pull down* como el de inhibición de la transducción, obteniendo los mismos resultados que en el sistema de expresión procariota. Por lo tanto, la no funcionalidad de las proteínas GST-*knob* no era debida a su producción en cultivos bacterianos.

Otra posible explicación podría ser debida a una trimerización ineficiente de las proteínas recombinantes. Para comprobar esta hipótesis, se incubaron 10µg de las proteínas GST-Shaft5Knob52 y GST-Shaft52Knob52 durante 30 minutos con glutaraldehído a una concentración de 0, 100, 500 ó 1000nM lo que permite formar uniones covalentes intramoleculares entre las tres subunidades del trímero, y se realizó el mismo experimento con el *knob* recombinante del Ad5 como control de proteína correctamente trimerizada. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se desnaturalizaron las proteínas y se corrieron en SDS-PAGE, tiñéndose el gel por Coomassie para observar las bandas correspondientes a monómeros, dímeros y trímeros de *knob*. El resultado obtenido para el *knob* recombinante del Ad5 (Figura 47.A) muestra que al incubar esta proteína sin glutaraldehído solo se obtiene la forma monomérica, mientras que conforme se aumenta la concentración de glutaraldehído se observa la aparición de formas diméricas (100nM) y triméricas (500 y 1000nM), así como una

disminución gradual de la forma monomérica. Además, se pudo confirmar que las uniones en los dímeros y trímeros observados eran específicamente intramoleculares haciendo el mismo experimento, pero desnaturizando las muestras previamente a la incubación con glutaraldehído. Por otro lado, en el caso de las proteínas GST-Shaft5Knob52 (Figura 47.B) y GST-Shaft52Knob52 (Figura 47.C) solo se observa su forma monomérica a pesar de ser incubadas con glutaraldehído antes de su desnaturización y, de esta manera, concluimos que las proteínas recombinantes del *knob* del F52s no trimerizan correctamente.

Una diferencia entre el *knob* recombinante del Ad5 que nos cedió el Dr. Lieber y los *knob* del F52s producidos por nosotros es que el primero está unido a un *tag* de histidinas, mientras que los nuestros lo estaban a un *tag* GST. Así pues, se clonaron los mismos insertos de DNA de las proteínas Shaft5Knob52 y Shaft52Knob52 en un plásmido de expresión que incorpora el *tag* de seis histidinas en el extremo N-terminal. Sin embargo, mientras clonábamos los genes, el grupo del Dr. Niklas Arnberg publicó que el receptor del F52s es el ácido siálico [314], por lo que decidimos abandonar esta línea de investigación.

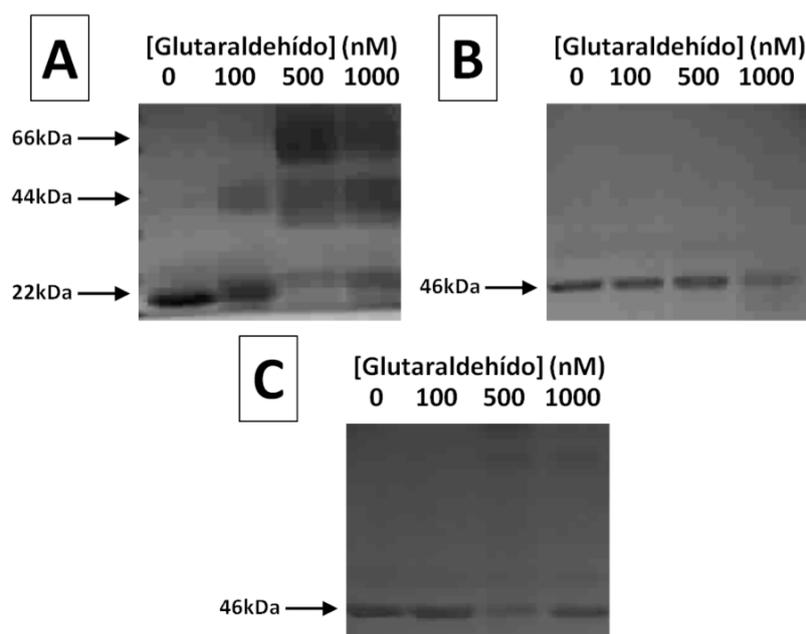


Figura 47. Gel SDS-PAGE teñido por Coomassie para la comprobación de la trimerización de las proteínas recombinantes del *knob* del Ad5 (A), GST-Shaft5Knob52 (B) y GST-Shaft52Knob52 (C). Las proteínas se incubaron en presencia de glutaraldehído a 0, 100, 500 ó 1000nM durante 30min, y posteriormente se corrieron en condiciones desnaturizantes. Las flechas indican el peso molecular de las proteínas observadas

5. TROPISMO INTESTINAL DEL ADENOVIRUS QUIMÉRICO Ad5/52s

El Ad52 fue aislado e identificado a partir de muestras de heces de pacientes humanos con gastroenteritis, y por esta razón es considerado un adenovirus con tropismo intestinal. Para comprobar si el F52s puede conferir tropismo intestinal al adenovirus, también se comparó la transducción del Ad5 y el Ad5/52s en modelos intestinales *in vitro*.

5.1 TRANSDUCCIÓN DEL Ad5/52s EN LÍNEAS CELULARES DE ORIGEN INTESTINAL

Se analizó la eficiencia de los adenovirus Ad5-GFP y Ad5/52s-GFP en cultivos de tres líneas celulares de colon humano (Caco2, SW1116 y LoVo). Además, también se incluyó una línea derivada de macrófagos murinos (RAW264.7) ya que el tropismo intestinal del adenovirus quimérico con el *fiber* corto del Ad40 se debe en parte a la transducción de macrófagos intestinales en ratón [310]. Para ello, se incubaron los cultivos con una dosis de 500PP/célula y 48 horas después se midió el porcentaje de transducción por citometría de flujo. En la Figura 48 se muestra el resultado obtenido, indicando porcentajes de transducción para el Ad5 del 75% (Caco2), 84% (SW1116) y 92% (LoVo), mientras que los valores para el Ad5/52s son el 59% (Caco2), 36% (SW1116) y 35% (LoVo). Así pues, en las tres líneas celulares derivadas de colon humano el Ad5 tiene un porcentaje de transducción mayor que el Ad5/52s. Sin embargo, en la línea de macrófagos RAW264.7, el Ad5/52s sí que tiene una mayor eficiencia de transducción que el Ad5, ya que el virus quimérico transduce el 16% de las células, mientras que el Ad5 tan solo transduce el 2%. Por lo tanto, podemos concluir que el F52s, no solo no aumenta el tropismo del Ad5 hacia células de origen intestinal sino que parece disminuirlo, mientras que por el contrario, sí que confiere a la cápside del Ad5 un nuevo tropismo hacia macrófagos.

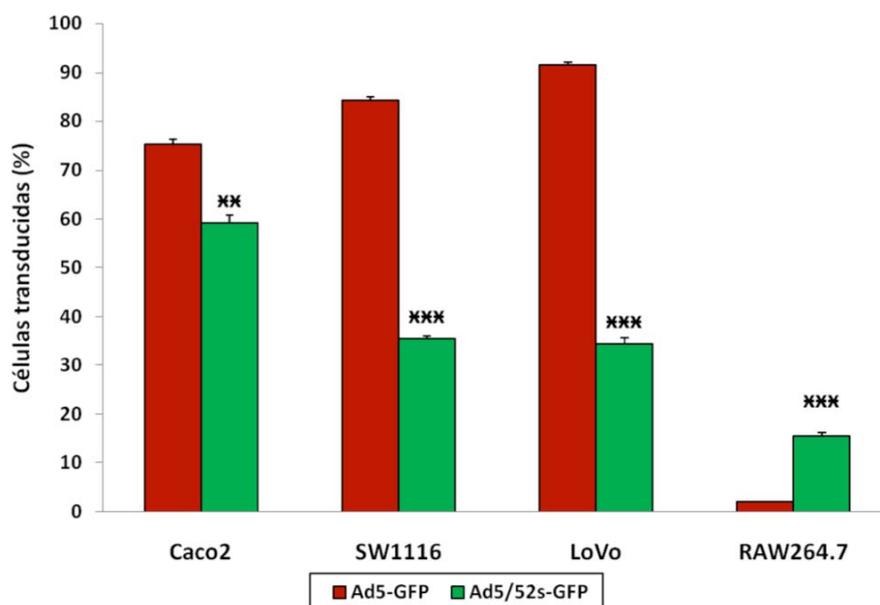


Figura 48. Eficiencia de transducción de los adenovirus Ad5-GFP y Ad5/52s-GFP indicado como % de células GFP positivas. En cada línea celular, se indican las diferencias estadísticamente significativas del Ad5/52s respecto al Ad5. $p < 0,01$ (*) y $p < 0,001$ (***). Se representan también las barras de error estándar

5.2 TRANSDUCCIÓN DEL Ad5/52s EN ORGANOIDES INTESTINALES

En cultivos de células Caco2, SW1116 y LoVo la eficiencia de transducción del Ad5 es mayor que la del Ad5/52s. No obstante, al tratarse de líneas celulares estables, estos resultados podrían ser diferentes en células obtenidas directamente de intestino. Por esta razón, decidimos comparar la transducción de los adenovirus Ad5 y Ad5/52s en modelos intestinales *in vitro* obtenidos a partir de células madre intestinales (ISCs) en una matriz de Matrigel™, donde proliferan y se diferencian formando organoides tridimensionales que recrean la morfología del epitelio intestinal [447, 448]. Para ello, y gracias a la colaboración con el Dr.

Eduard Batlle del IRB, se cultivaron organoides a partir de células intestinales de ratones Rosa26 transgénicos que expresan el marcador GFP en presencia de la recombinasa Cre, de manera que solo darán señal fluorescente aquellas células transducidas con adenovirus que contengan el gen Cre. Una vez crecidos los organoides, se incubaron durante 2 horas con los adenovirus Ad5-Cre o Ad5/52s-Cre a una dosis estimada de 200PP/célula, y 72 horas después se tomaron imágenes de los cultivos. Los resultados muestran que ambos virus transducen eficientemente las células de los organoides y, aunque no pudimos cuantificar el porcentaje de transducción, las imágenes de la Figura 49 no muestran grandes diferencias entre los dos virus, de manera que la incorporación del F52s en la cápside del Ad5 no altera su capacidad de transducir células intestinales cultivadas en organoides *in vitro*.

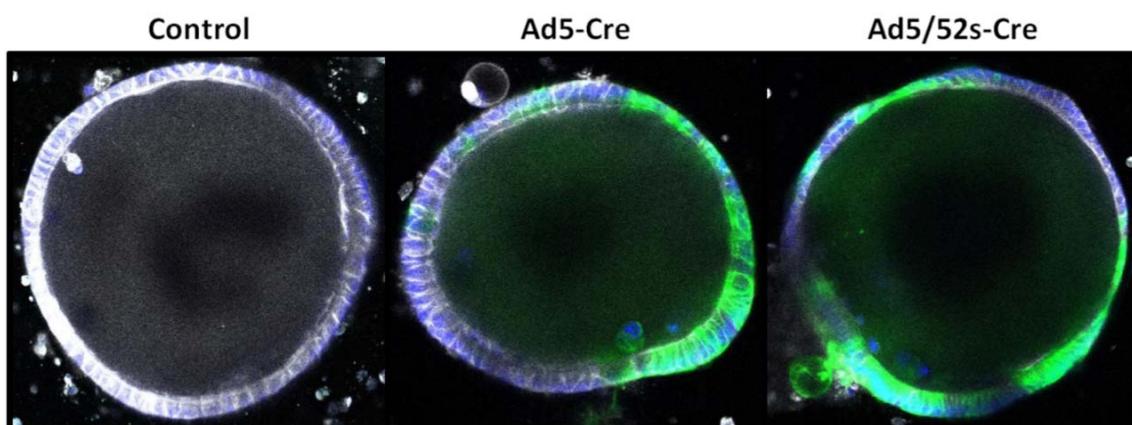


Figura 49. Imágenes representativas de los organoides de células intestinales, donde se observa la señal fluorescente de las células transducidas por los adenovirus Ad5-Cre o Ad5/52s-Cre 72 horas después de ser incubados con los virus. La imagen control corresponde a un organoide sin incubar con virus

Debido a que no fue posible determinar que el F52s aumente el tropismo del Ad5 en cultivos de células intestinales, decidimos administrar el virus en ratones por vía oral. Para ello, se administraron conjuntamente los adenovirus Ad5-RFP y Ad5/52s-GFP a una dosis de 5×10^{10} PP de cada virus por animal, y tres días después se extrajeron muestras y se hicieron cortes histológicos de los diferentes tramos del tracto gastrointestinal que son: esófago, estómago, duodeno, íleon, colon y recto. Por microscopía de fluorescencia se comprobó la expresión de los genes marcadores RFP y GFP para observar la transducción por parte del Ad5 y el Ad5/52s, respectivamente. Desafortunadamente, no fue posible observar señal específica de fluorescencia para ninguno de los virus, por lo que no se pudo confirmar que el F52s aumente el tropismo gastrointestinal del Ad5 *in vivo*.

6. BIODISTRIBUCIÓN DEL Ad5/52s ADMINISTRADO POR VÍA INTRAVENOSA

Para comprobar si la incorporación del F52s modifica el perfil de transducción del Ad5, se decidió administrar el Ad5/52s por vía sistémica (intravenosa) y así permitir al virus acceder virtualmente a todo el organismo. Se produjeron los adenovirus Ad5-βgal y Ad5/52s-βgal y se administraron en ratones por vía intravenosa a una dosis de 5×10^{10} PP/animal, y tres días después se sacrificaron los animales y se extrajeron muestras de tejido adiposo, bazo, cerebro, nervio ciático, corazón, hígado, músculo esquelético, páncreas, pulmón, riñón y testículo, para

medir la actividad β galactosidasa por luminometría. En los resultados obtenidos, ilustrados en la Figura 50, se observa como con el principal órgano transducido por el Ad5 es el hígado, con una expresión de 22,4ng de β galactosidasa/mg de proteína. En niveles menores, también se detecta expresión estadísticamente significativa de β galactosidasa respecto a los animales no tratados en bazo (2,1ng/mg), corazón (2,7ng/mg) y páncreas (2,8ng/mg). En cuanto al Ad5/52s, las diferencias significativas respecto a los animales no tratados se dan en hígado (1,4ng/mg), páncreas (1,8ng/mg), pulmón (1,9ng/mg) y riñón (1,2ng/mg). Aunque el Ad5/52s también transduce hígado, los niveles de expresión de β galactosidasa son 16 veces inferiores a los obtenidos por el Ad5, por lo que se puede considerar que el Ad5/52s no se ve sometido secuestro hepático. No obstante, a pesar de la poca transducción en hígado, ninguno de los otros órganos analizados tiene unos niveles destacables de expresión de marcador con el Ad5/52s.

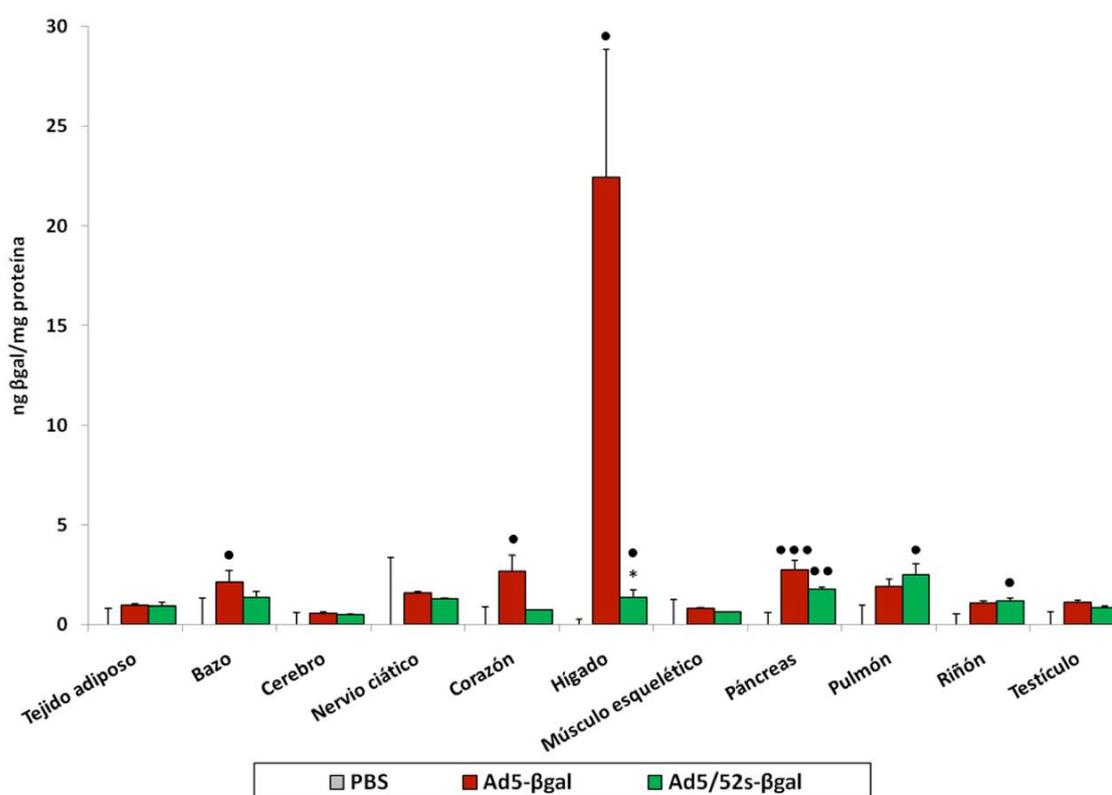


Figura 50. Expresión del marcador β galactosidasa determinada por luminometría de los diferentes órganos y tejidos analizados de los animales administrados por vía intravenosa con los adenovirus Ad5- β gal, Ad5/52s- β gal o sin tratar con virus (PBS). La expresión está expresada en ng de β galactosidasa/mg de proteína. Se indican las diferencias estadísticamente significativas de: 1) los animales tratados con virus respecto a los no tratados como $p < 0,05$ (●), $p < 0,01$ (●●) y $p < 0,001$ (●●●); 2) los animales tratados con Ad5/52s- β gal respecto a los tratados con Ad5- β gal como $p < 0,05$ (*). Se representan también las barras de error estándar

7. ADMINISTRACIÓN LOCAL *IN VIVO* DEL Ad5/52s

Debido a que la administración del Ad5/52s por vía intravenosa no permitió observar niveles elevados de expresión del gen marcador en ninguno de los órganos analizados, se decidió administrarlo por vía local, tanto intramuscular como intranasal. De esta manera, se comprobaría si la poca infectividad del virus quimérico era un problema del virus, como puede

ser la estabilidad de los viriones, o si en su lugar es un efecto que se observa solo por vía intravenosa.

7.1 ADMINISTRACIÓN POR VÍA INTRAMUSCULAR DEL Ad5/52s

Para realizar este experimento, se administraron los adenovirus Ad5- β gal y Ad5/52s- β gal por vía intramuscular en el músculo *tibialis* de ratones, a una dosis de 10^{10} PP/animal. A los tres días, se sacrificaron los animales y se cuantificó la expresión del marcador β galactosidasa en músculo *tibialis*, hígado y bazo por luminometría (Figura 51). De los tres órganos analizados, solo se detectó una expresión significativa de β galactosidasa en relación a los animales no tratados en el propio músculo *tibialis*, dónde se administraron ambos virus, obteniéndose unos niveles de 54,8ng de β galactosidasa/mg de proteína para el Ad5, y de 30,2ng de β galactosidasa/mg de proteína para el Ad5/52s, siendo en ambos casos unos niveles de expresión mucho mayores a los obtenidos en músculo por vía intravenosa (Figura 50). En cambio, no se observan diferencias significativas entre los dos virus.

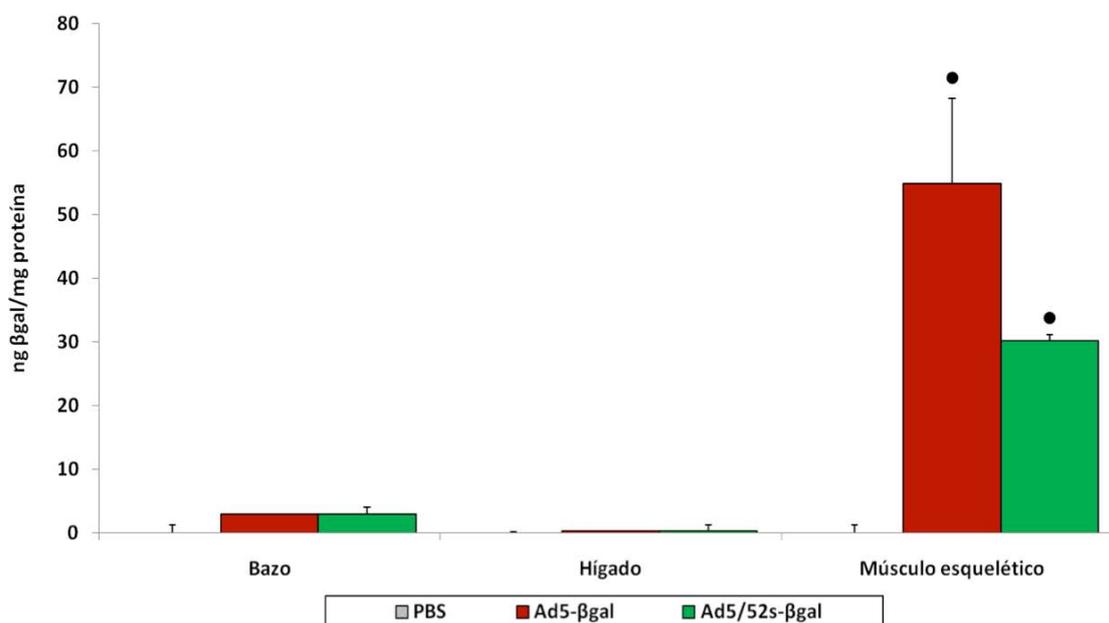


Figura 51. Expresión del marcador β galactosidasa determinada por luminometría en bazo, hígado y músculo esquelético (*tibialis*) de los animales administrados por vía intravenosa con los adenovirus Ad5- β gal, Ad5/52s- β gal o sin tratar con virus (PBS). La expresión está expresada en ng de β galactosidasa/mg de proteína. Se indican las diferencias estadísticamente significativas de los animales tratados con virus respecto a los no tratados como $p < 0,05$ (●). Se representan también las barras de error estándar

7.2 ADMINISTRACIÓN POR VÍA INTRANASAL DEL Ad5/52s

Además de por vía intramuscular, también se administraron los virus Ad5- β gal y Ad5/52s- β gal por vía intranasal a una dosis de 3×10^{10} PP/animal. A los tres días, se sacrificaron los animales y se cuantificó la expresión del marcador β galactosidasa en pulmón e hígado por luminometría (Figura 52). Igual que en la vía muscular, no se observa expresión significativa del gen marcador en hígado cuando los virus se administran por vía local, pero la expresión sí es significativa respecto a los animales no tratados en pulmón para ambos virus, siendo de 4,0ng de β galactosidasa/mg de proteína para el Ad5, y de 1,8ng de β galactosidasa/mg de proteína

para el Ad5/52s. Sin embargo, en este caso las diferencias entre los dos virus en pulmón sí son significativas, siendo aproximadamente el doble para el Ad5.

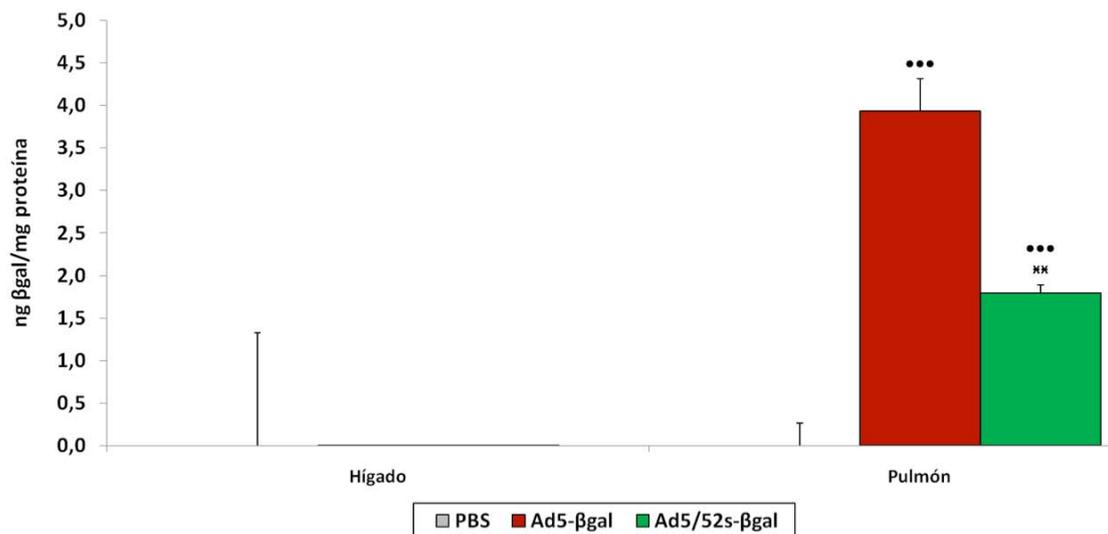


Figura 52. Expresión del marcador βgalactosidasa determinada por luminometría en hígado y pulmón de los animales administrados por vía intranasal con los adenovirus Ad5-βgal, Ad5/52s-βgal o sin tratar con virus (PBS). La expresión está expresada en ng de βgalactosidasa/mg de proteína. Se indican las diferencias estadísticamente significativas de: 1) los animales tratados con virus respecto a los no tratados $p < 0,001$ (●●●); 2) los animales tratados con Ad5/52s-βgal respecto a los tratados con Ad5-βgal como $p < 0,01$ (**). Se representan también las barras de error estándar

8. ELIMINACIÓN DEL Ad5/52s ADMINISTRADO POR VÍA INTRAVENOSA EN SANGRE

Los niveles elevados de βgalactosidasa producidos en pulmón y sobretodo en músculo esquelético con Ad5 y Ad5/52s cuando son administrados por vía local, demuestran que la poca expresión de gen marcador mediada por el Ad5/52s cuando es administrado por vía intravenosa no se debe a un problema en la estabilidad del virión, sino que es un fenómeno que se observa solo cuando el virus se inyecta en sangre. Por esta razón, se analizó la tasa eliminación de los dos virus en sangre con el objetivo de comprobar si la diferencia de capacidad de transducción de los dos virus está relacionada con una diferencia en su disponibilidad en sangre. Así pues, se administraron conjuntamente por vía intravenosa los adenovirus Ad5-RFP y Ad5/52s-GFP a una dosis de 5×10^{10} PP de cada virus/ratón, y se tomaron muestras de sangre 5, 20 y 60 minutos después de la administración para, posteriormente, titular las IU/mL de sangre en cultivos HEK293. Debido a la diferencia de infectividad de los dos virus en las HEK293, en lugar del título de IU/mL de los virus, en la Figura 53 se muestra el porcentaje de IU de los dos virus que permanece en sangre a diferentes tiempos respecto al administrado, observándose como en ambos virus la mayor parte de las IU se pierden ya en los primeros 5 minutos. No obstante, en el caso del Ad5/52s la pérdida de IU en sangre a 5 minutos es proporcionalmente mucho mayor que la del Ad5, ya que las IU de Ad5/52s que permanecen en sangre suponen el 0,08% de las administradas, mientras que en el caso del Ad5 se trata del 1,91% de las IU administradas en los animales. Esto quiere decir que la proporción de IU Ad5/52s es 24,9 veces mayor que la del Ad5, y esta menor disponibilidad de adenovirus quimérico en relación al Ad5 podría explicar la también menor eficiencia de

transducción del virus quimérico cuando es administrado por vía intravenosa. A partir de los 20 minutos no se observan diferencias entre los dos virus.

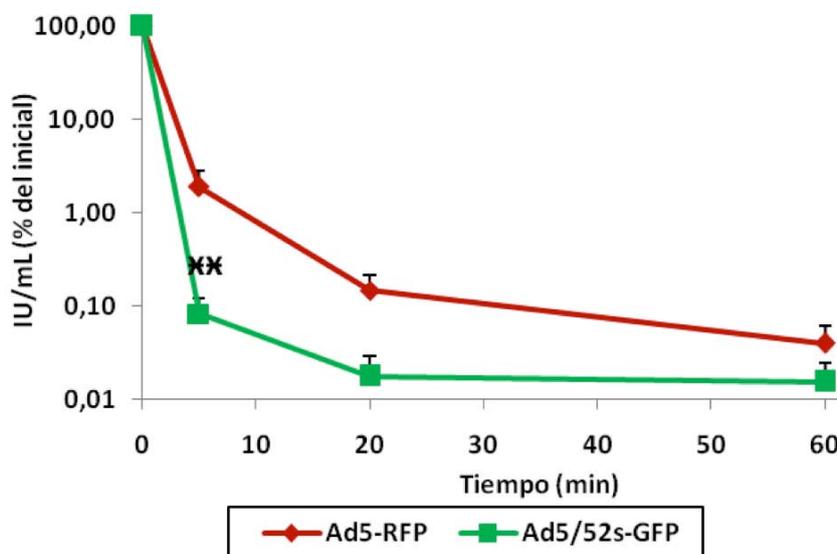


Figura 53. Titulación de las IU que permanecen en sangre en los ratones para los virus Ad5-RFP y Ad5/52s-GFP 5, 20 y 60 minutos después de ser administrados por vía intravenosa. El resultado se indica como porcentaje de las IU en sangre respecto a las administradas inicialmente, para cada virus. Se indican las diferencias estadísticamente significativas del Ad5/52s respecto al Ad5 como $p < 0,01$ (**). Las barras representan el error estándar

9. IMPACTO DE LA ELIMINACIÓN DE LAS CÉLULAS DE KUPFFER EN LA BIODISTRIBUCIÓN DEL Ad5/52s

Las células de Kupffer de hígado representan la mayor parte de los macrófagos residentes de tejido del organismo, y son el principal agente en la rápida eliminación de los adenovirus. Debido a que el Ad5/52s tiene mayor tropismo que el Ad5 por la línea celular RAW264.7 (Figura 48), establecida a partir de macrófagos murinos, hipotetizamos que una mayor afinidad del las células de Kupffer por el adenovirus quimérico podría explicar que este virus sea retirado de sangre más rápido y, por lo tanto, la eliminación de las células de Kupffer permitiría aumentar la disponibilidad del Ad5/52s y su eficiencia de transducción. Para comprobar esto, tratamos ratones con $GdCl_3$, que elimina selectivamente las células de Kupffer, y después se administraron los virus Ad5- β gal y Ad5/52s- β gal por vía intravenosa a una dosis de 5×10^{10} PP/animal. Tres días después se cuantificó por luminometría la expresión de β galactosidasa en tejido adiposo, bazo, cerebro, nervio ciático, corazón, hígado, músculo esquelético, páncreas, pulmón, riñón y testículo.

En cuanto al Ad5, al tratar los animales con $GdCl_3$ no se observan variaciones relevantes en la expresión de marcador de los diferentes órganos respecto a los animales no tratados (Figura 54.A), excepto en bazo dónde la cantidad de β galactosidasa aumenta desde 2,1 hasta 4,4ng/mg de proteína. Por otro lado, la transducción con el Ad5/52s se ve aumentada en pulmón cuando previamente se han eliminado las células de Kupffer, observándose un aumento en la expresión del gen marcador 2,6 veces hasta alcanzar los 6,6ng de β galactosidasa/mg de proteína (Figura 54.B), de manera que el pulmón es el órgano donde se

Resultados

consigue una mayor eficiencia de transducción con el Ad5/52s. Así pues, los resultados indican que las células de Kupffer secuestran el Ad5/52s con mayor eficiencia que el Ad5 ya que, cuando estas células son eliminadas, el virus quimérico puede transducir pulmón con mayor eficiencia. No obstante, en términos absolutos, la expresión de gen marcador con el Ad5/52s en pulmón continúa siendo baja, de manera que concluimos que las células de Kupffer no son la única explicación de la baja eficiencia de transducción del Ad5/52s cuando se administra por vía intravenosa.

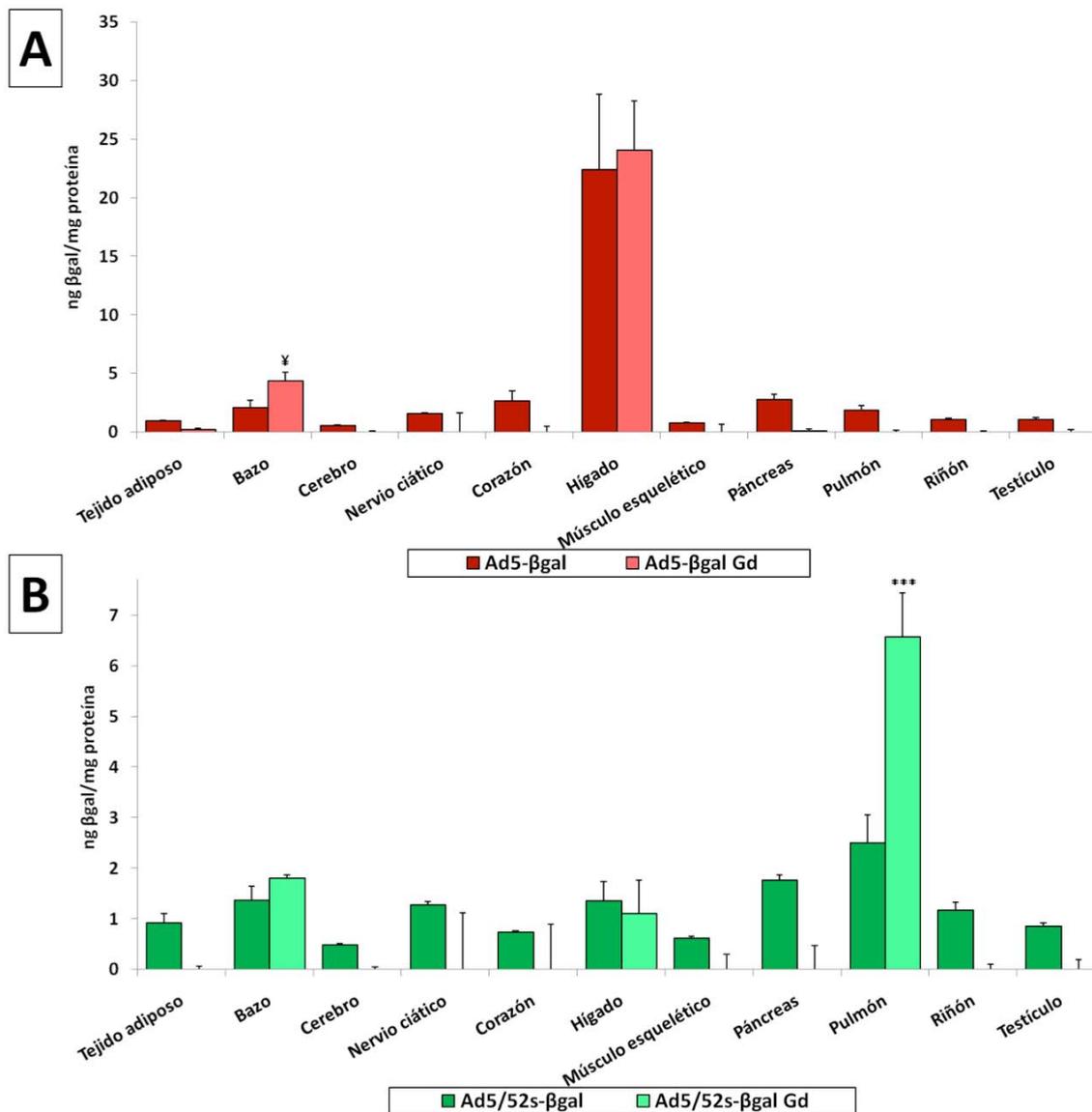


Figura 54. Expresión del marcador βgalactosidasa en ng de βgalactosidasa/mg de proteína de los diferentes órganos analizados de los animales administrados con Ad5-βgal (A) o Ad5/52s-βgal (B). Los animales tratados con GdCl₃ se indican como Gd. Se indican las diferencias estadísticamente significativas de los animales tratados con GdCl₃ respecto a los no tratados, para un mismo virus, como p<0,05 (¥) y p<0,001 (¥¥¥). Se representan también las barras de error estándar

10. CUANTIFICACIÓN DE LOS GENOMAS VIRALES DEL Ad5/52s EN SANGRE

Debido a que la inhibición de las células de Kupffer no aumenta la transducción del Ad5/52s de forma relevante cuando se administra por vía intravenosa, se hipotetizó que la mayor

disminución de las IU en sangre del virus quimérico, en comparación con el Ad5, podría ser a causa de la interacción del Ad5/52s con algún componente en sangre que limite su infectividad, ya sea secuestrando el virus o inactivándolo. Para ello, se cuantificaron por qPCR los genomas virales (VG) del Ad5-RFP y el Ad5/52s-GFP en las muestras de sangre utilizadas para determinar las IU para así, analizar si la disminución de IU se correlaciona con una disminución en el número de genomas. Tal y como se observa en la Figura 55, el resultado indica que la disminución en el número de VG para ambos virus es menor que la que se observaba en IU (Figura 53), ya que a los 5 minutos después de administrar el virus aún se puede detectar el 15% de los genomas del Ad5 y el 27% de los genomas del Ad5/52s. No obstante, a diferencia de lo que pasaba con las IU, en el caso de los genomas virales las diferencias entre los dos virus no son estadísticamente significativas. Este resultado indica que la disminución en el número de viriones de ambos virus es similar, pero el Ad5/52s pierde infectividad más rápido que el Ad5, reforzando la hipótesis de que la pérdida de infectividad del adenovirus quimérico en sangre es debida a la interacción con alguno de sus componentes.

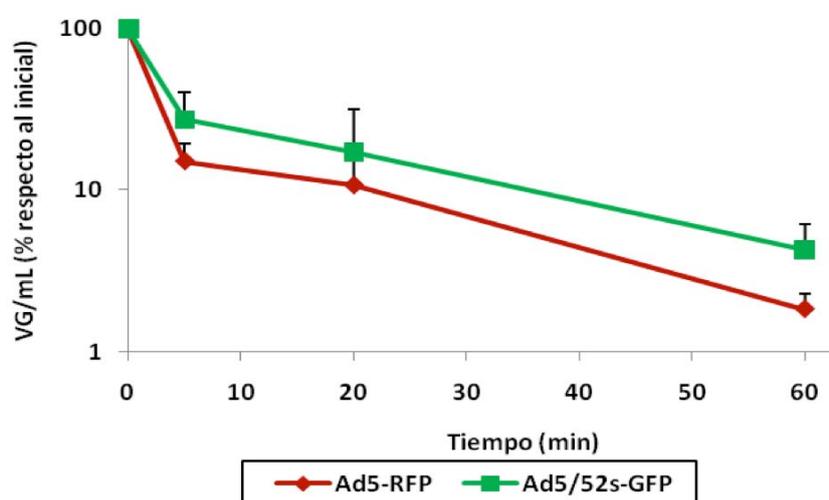


Figura 55. Cuantificación mediante qPCR de los VG que permanecen en sangre en los ratones de los virus Ad5-RFP y Ad5/52s-GFP a los 5, 20 y 60 minutos después de ser administrados por vía intravenosa. El resultado se indica como porcentaje respecto a los VG administrados inicialmente. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los dos virus en cada tiempo. Las barras representan el error estándar

11. INTERACCIÓN DEL Ad5/52s CON LAS DIFERENTES FRACCIONES DE LA SANGRE

Los resultados anteriores muestran que cuando los virus son administrados por vía intravenosa el Ad5/52s pierde infectividad más rápido que el Ad5, lo cual probablemente sea debido al secuestro o la inhibición del adenovirus quimérico por células sanguíneas o algún factor plasmático. Por esta razón, comparamos la interacción de los virus Ad5 y Ad5/52s con diferentes componentes de la sangre.

11.1 INTERACCIÓN *IN VIVO* DEL Ad5/52s CON LAS FRACCIONES DE SANGRE

Para saber si el Ad5/52s está siendo secuestrado e inhibido por las células sanguíneas se administraron conjuntamente los adenovirus Ad5-RFP y Ad5/52s-GFP a una dosis de 5×10^{10} PP

de cada virus por ratón, y a los 5 minutos se sacrificaron los animales y se les extrajo la sangre. Posteriormente, la sangre se separó en las fracciones de plasma/plaquetas, eritrocitos (RBC) y leucocitos mononucleares (WBC), y de cada fracción se midieron las IU y los VG totales de ambos virus.

En cuanto a las IU, solo se recuperó una pequeña parte de los virus administrados (Figura 56.A), ya que la suma de las IU obtenidas en las tres fracciones analizadas representa el 7,3% del Ad5 administrado y el 0,45% en el caso del Ad5/52s, por lo que se observa otra vez que el Ad5/52s ha perdido una mayor proporción de IU que el Ad5. Si se analizan los resultados fracción a fracción, se recupera el 5,8% de las IU iniciales de Ad5 en plasma/plaquetas, el 1,6% en WBC y tan solo un 0,03% en la fracción RBC, mientras que los valores para el Ad5/52s son el 0,4% en plasma/plaquetas, el 0,07% en WBC y el 0,02% en RBC. Así pues, en ambos virus la mayor parte del virus se obtiene en plasma/plaquetas, seguido de WBC mientras que en RBC solo se recupera una pequeña parte de los virus. Estos valores indican que tanto en plasma/plaquetas como en WBC se obtienen más IU de Ad5 que de Ad5/52s, mientras que las diferencias en las IU recuperadas en RBC para ambos virus no son significativas. Para resaltar estas diferencias en las IU recuperadas para cada virus, se calcularon los ratios entre las IU totales recuperadas de Ad5 y las del Ad5/52s (Figura 56.C), obteniéndose un resultado de 93 IU de Ad5 por cada IU de Ad5/52s en plasma/plaquetas y 87 IU de Ad5 por cada IU de Ad5/52s en WBC, mientras que en RBC esta proporción es significativamente menor, reduciéndose a 20 IU de Ad5 por IU de Ad5/52s, la cual se aproxima más a la diferencia de infectividad en HEK293 de los dos virus en las producciones concretas utilizadas en este experimento, que era de 4,7 IU de Ad5 por IU de Ad5/52s.

En lo que se refiere a los genomas virales de los virus (Figura 56.B), también se recupera entre las tres fracciones solo una parte de los VG administrados, que representa el 4,6% para el Ad5 y el 10,1% para el Ad5/52s. Fracción a fracción, se recupera el 4,0% del Ad5 en plasma/plaquetas, el 0,6% en WBC y el 0,03% en RBC, mientras que para el Ad5/52s estos valores son del 9,4% en plasma/plaquetas, el 0,6% en WBC y el 0,04% en RBC. De esta manera, se observa que, igual que pasa en el caso de las IU, la mayor parte de ambos virus se recupera en la fracción plasma/plaquetas, seguida de WBC y en RBC es donde se recupera el menor porcentaje de VG. Sin embargo, a diferencia de lo que pasaba con las IU, no se observan diferencias significativas entre los VG de ambos virus en ninguna fracción. En este caso, cuando se calculan los ratios de VG de Ad5/ VG de Ad5/52s (Figura 56.D) se obtiene un resultado de 1,2 VG de Ad5 por cada VG de Ad5/52s en plasma/plaquetas y una ratio de 1,0 VG de Ad5 por cada VG de Ad5/52s en WBC, mientras que en RBC la proporción se reduce hasta 0,4 VG de Ad5 por cada VG de Ad5/52s. No obstante, las diferencias en los ratios de las tres fracciones no son significativas, siendo cercanas a uno. Así pues, nuevamente las diferencias en IU obtenidas para ambos virus no se deben a una mayor presencia de viriones de Ad5 que de Ad5/52s, ya que hay la misma cantidad de genomas virales para ambos virus, sino a que el Ad5/52s ha perdido infectividad. Esto se ve reflejado también cuando se representa la ratio VG/IU de cada virus (Figura 56.E), donde en las tres fracciones hay entre 2,5 y 7,1 VG de Ad5 por cada IU, mientras que en el caso del Ad5/52s hay más de 200 VG por cada IU.

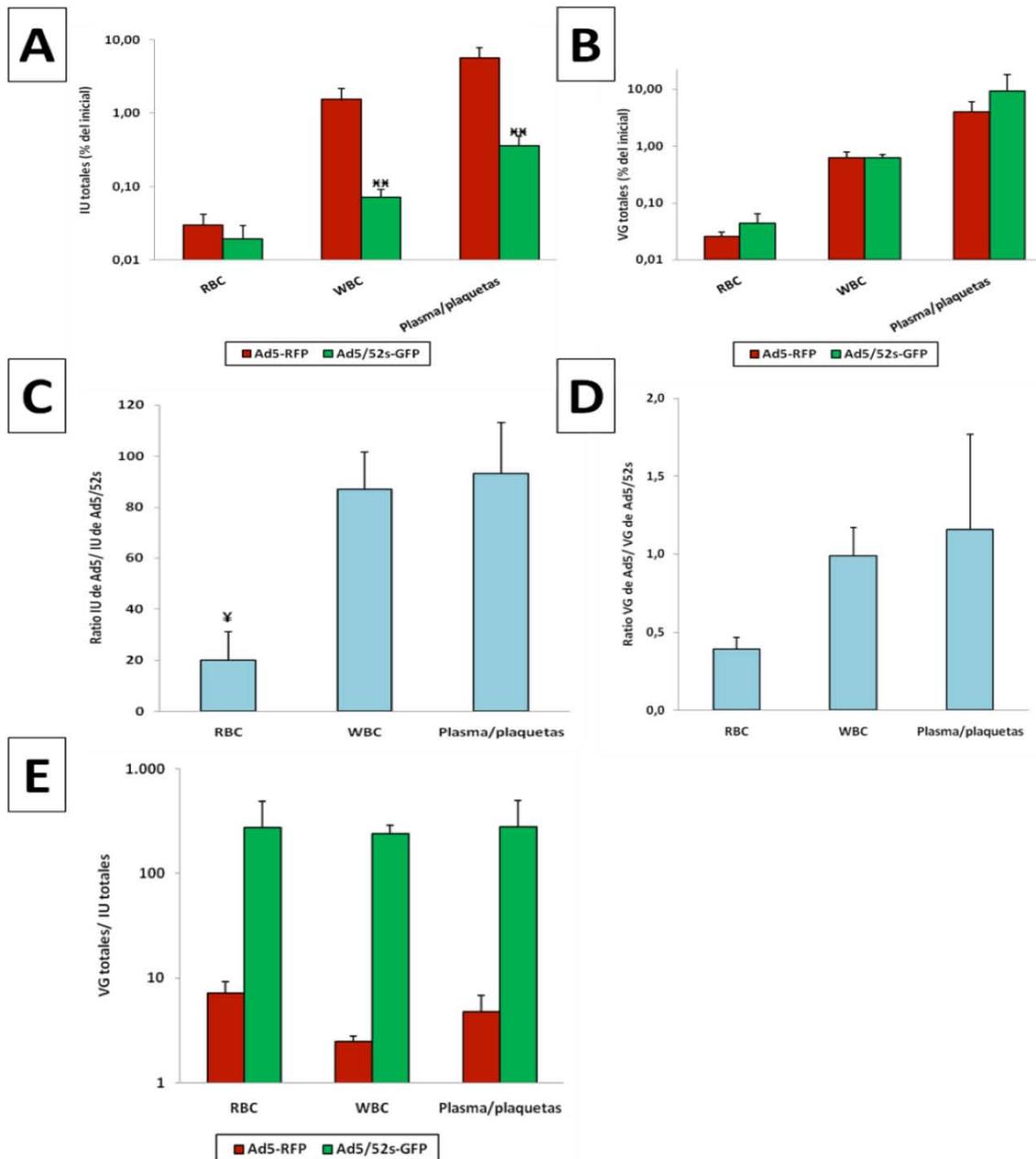


Figura 56. Cuantificación de los virus presentes en las fracciones de sangre de eritrocitos (RBC), leucocitos mononucleares (WBC) y plasma/plaquetas 5 minutos después de administrar los virus. A) Porcentaje de las IU recuperadas de cada virus respecto a las administradas en el animal. B) Porcentaje de los VG recuperados de cada virus respecto a los que se administraron. C) Ratio de las IU (en valor absoluto) recuperadas de Ad5 entre las IU recuperadas de Ad5/52s. D) Ratio de los VG (en valor absoluto) recuperados de Ad5 partido por los del Ad5/52s. E) Ratio VG/IU de cada virus. Se indican las diferencias estadísticamente significativas de: 1) el Ad5/52s y el Ad5 en la misma fracción como $p < 0,01$ (¥¥); 2) la ratio de una fracción respecto al resto como $p < 0,05$ (¥). Se indican las barras que corresponden al error estándar

En resumen, estos resultados muestran que la pérdida de infectividad que se observa a los 5 minutos de administrar el Ad5/52s en sangre no se debe a un mayor secuestro por eritrocitos o por leucocitos mononucleares y, además, esta pérdida de infectividad se observa principalmente en las fracciones de leucocitos y en plasma/plaquetas. Así pues, con este experimento concluimos que el virus quimérico se está inhibiendo principalmente en la fracción plasma/plaquetas.

11.2 INTERACCIÓN EX VIVO DEL Ad5/52s CON LAS FRACCIONES DE SANGRE

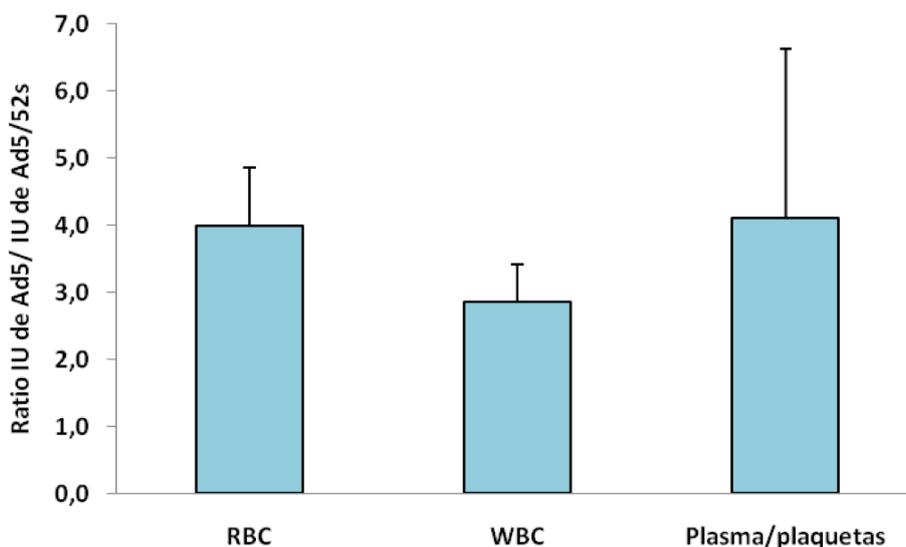


Figura 57. Proporción de partículas infecciosas entre Ad5 y Ad5/52s expresada como IU de Ad5 por cada IU de Ad5/52s. Las barras corresponden al error estándar

Con los resultados obtenidos con las fracciones de sangre *ex vivo*, se decidió incubar ambos virus en las fracciones RBC, WBC y plasma/plaquetas *ex vivo* y titular las IU de cada virus para comprobar si la ratio entre Ad5 y Ad5/52s entre los dos se veía más alterada en plasma/plaquetas que en las otras dos fracciones y, de esta manera, se confirmaría que la pérdida de infectividad del Ad5/52s se da en la fracción plasma/plaquetas. Para ello, se extrajo la sangre de ratones a los que no se les administró virus, se separaron las tres fracciones y cada una de ellas se incubó con los virus Ad5-RFP y Ad5/52s-GFP conjuntamente una dosis de $2,5 \times 10^{10}$ PP/mL de cada virus, durante 5 minutos y a una temperatura de 37°C. Después de la incubación, se titularon los virus para comparar las proporciones de Ad5 y Ad5/52s entre las diferentes fracciones, y el resultado de la ratio de IU de Ad5 por cada IU de Ad5/52s era de 4,0 en RBC, de 2,9 en WBC y de 4,1 en plasma/plaquetas (Figura 57), aunque las diferencias entre las tres fracciones no son estadísticamente significativas. En este experimento *ex vivo*, la ratio de IU entre los dos virus no solo es menor a la observada *in vivo* (Figura 56), sino que es similar a la esperada por la diferencia de infectividad en HEK293 de las producciones de virus utilizadas (4,7 IU de Ad5 por cada IU de Ad5/52s) y, por lo tanto, no hay diferencias en cuanto a la pérdida de infectividad de los dos virus. Así pues, hipotetizamos que el factor de la fracción plasma/plaquetas implicado en la pérdida de infectividad en sangre del Ad5/52s tiene un comportamiento diferente *in vivo* y *ex vivo*.

12. MODIFICACIÓN DEL Ad5/52s PARA AUMENTAR SU SUPERVIVENCIA EN SANGRE

Los experimentos del comportamiento del Ad5/52s en sangre muestran que este virus pierde infectividad en plasma más rápido que el Ad5 cuando el virus es administrado *in vivo* por vía intravenosa, pero no cuando es incubado *ex vivo*.

12.1 IDENTIFICACIÓN DEL FACTOR PLASMÁTICO RESPONSABLE DE LA PÉRDIDA DE INFECTIVIDAD DEL Ad5/52s

MKRTRVDEDFNPVYPYDTTTPAVPFISPPFVNSDGLQE
NPPGVLSLRIAKPLYFDMERKLALSLGR^GLTITANGQL
ESTQSVQTNPPLTVTNNNTLILRYSSPLILTDNNLTVGF
SSPLRVIDNKLTFTFTSPLRYENETLTFNYTEPLTLMNS
NLALNVNSSKGLRVDGGSLGTNLSPLDRFNSSGAIAFGI
QTLWTPPTSNPNCTVYTESDLSLCLTKCGAHVLGSVS
LTGVAGTMTNMAETSLAIEFTFDDTGKLLHSPLVNNTFS
IRQGDSPASNPITYNALAFMPNSTLYARGGSGEPRNNYYV
QTYLRGNVQRPITLTVTFNSAATGYSLSFKWTAVVREKF
AAPATSFCYITEQ

Figura 58. Secuencia de aminoácidos del F52s. En gris se resalta la posible diana proteolítica para el enzima trombina (GRG), así como la posición de corte entre los residuos R67 y G68 (^), que separa los fragmentos N-terminal de 7,6 kDa (subrayado en rojo) y C-terminal de 32,0 kDa (subrayado en verde)

La diferencia de infectividad en fracciones de sangre observada entre el Ad5/52s administrado por vía intravenosa y el incubado en las fracciones *ex vivo* se podría deber a la forma de procesar las muestras, como por ejemplo el uso de los anticoagulantes. Cuando los virus se administran a los animales por vía intravenosa, los virus se encuentran en una sangre completamente donde las vías de coagulación no han sido bloqueadas, mientras que en el experimento *ex vivo* la sangre se trató con citrato de sodio antes del fraccionamiento para prevenir la coagulación y, por lo tanto, cuando se incubaron los virus en las fracciones de la sangre la vía de coagulación estaba bloqueada por los anticoagulantes. Así pues, nos preguntamos si los enzimas de la coagulación podrían participar en la pérdida de infectividad del Ad5/52s *in vivo*. La acción anticoagulante del citrato de sodio se debe a que éste es un quelante de cationes divalentes que secuestra los iones Ca^{2+} necesarios para la activación de diversos pasos de la cascada de coagulación, como por ejemplo la conversión del zimógeno protrombina en la forma activa de la proteasa trombina. Por esta razón, quisimos comprobar si el F52s contenía alguna diana proteolítica para la enzima trombina. Para ello, utilizamos la aplicación *PeptideCutter* que permite predecir la presencia de dianas de proteólisis utilizando una amplia base de datos de proteasas (http://web.expasy.org/peptide_cutter/). El resultado obtenido para el F52s fue que su secuencia de aminoácidos sí contiene una posible diana proteolítica GRG reconocida por trombina, de manera que la proteólisis se daría entre el residuo R67 y G68, separando un fragmento N-terminal de 7,6 kDa de un fragmento C-terminal de 32,0 kDa (Figura 58). Esta diana se localiza en el *shaft* del F52s, concretamente en el giro β que conecta las dos hojas β antiparalelas del segundo motivo repetitivo del *shaft* (Figura 31). Por otro lado, esta misma aplicación no detecta ninguna diana proteolítica de trombina en el *fiber* del Ad5, ni tampoco en el *hexon* ni el *penton base* del Ad5. Este resultado refuerza nuestra hipótesis de la interacción de la trombina con el Ad5/52s podría ser la responsable de la pérdida de infectividad del virus, y este efecto sería específico del adenovirus quimérico ya que ninguna de las tres proteínas mayoritarias de la cápside del Ad5 (*fiber*, *hexon* y *penton base*) contienen dianas proteolíticas para esta proteasa.

12.2 EFECTO DE LA ELIMINACIÓN DE LA DIANA TROMBINA DEL F52s SOBRE LA SUPERVIVENCIA DEL Ad5/52s EN SANGRE

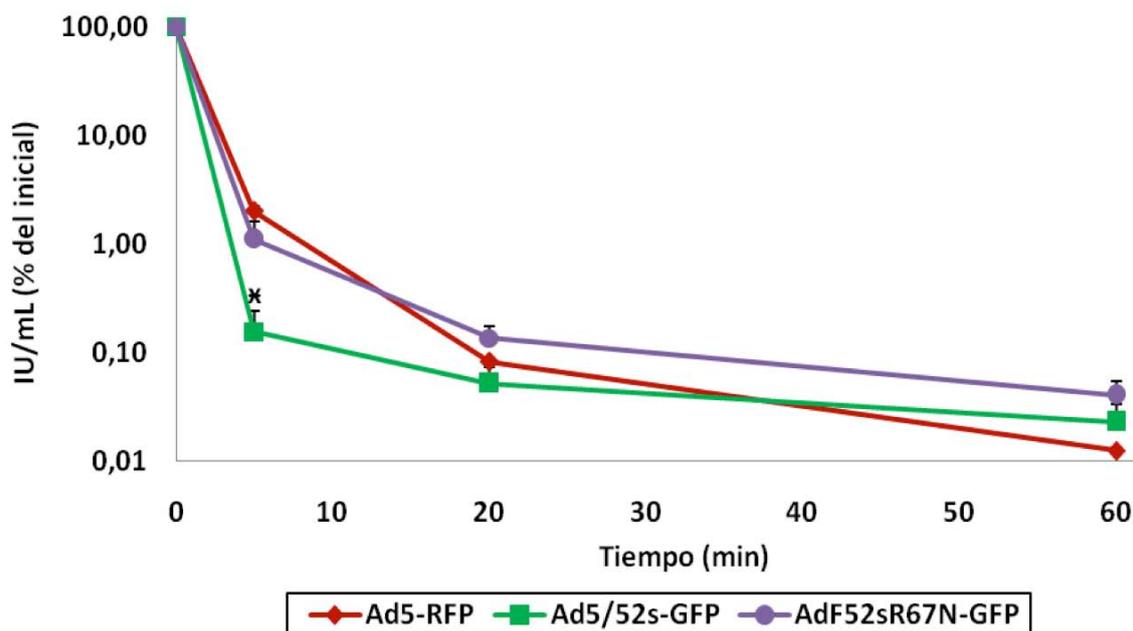


Figura 59. Titulación de las IU que permanecen en sangre para los virus Ad5-RFP, Ad5/52s-GFP y AdF52sR67N-GFP a 5, 20 y 60 minutos después de ser administrados por vía intravenosa. El resultado se indica como porcentaje de las IU en sangre respecto a las administradas inicialmente, para cada virus. Se indican las diferencias estadísticamente significativas respecto al Ad5 como $p < 0,05$ (*). Las barras representan el error estándar

Basándonos en la secuencia de aminoácidos del F52s, identificamos la proteasa trombina como un posible factor plasmático implicado en la pérdida de infectividad del Ad5/52s en sangre. A partir de este resultado, se decidió mutar la diana trombina del F52s para evaluar el impacto de estos residuos en la supervivencia del Ad5/52s en sangre. Para ello, se introdujo una mutación R67N en el F52s, y este *fiber* mutante se incorporó en la cápside del Ad5 para obtener el genoma del adenovirus quimérico AdF52sR67N, utilizando el mismo sistema de recombinación que para generar el Ad5/52s (Figura 32), y posteriormente se le incorporó el gen marcador GFP. La decisión de substituir la arginina de la diana trombina GRG por un residuo asparagina se debió a que la N66 del F5 es el residuo homólogo a la R67 del F52s, ambos se encuentran flanqueados por dos glicinas (GNG para el Ad5), y localizados en el giro β que conecta las dos hojas β del segundo motivo repetitivo del *shaft*, que en ambos casos es la repetición anterior a la región bisagra del *fiber*. Una vez obtenido el genoma, se produjo y se purificó el virus AdF52sR67N-GFP, y se administró en ratones por vía intravenosa conjuntamente con el Ad5-RFP a una dosis de 5×10^{10} PP de cada virus. En paralelo, como control se administraron también los virus Ad5/52s-GFP y Ad5-RFP en las mismas condiciones. Después de administrar los virus, se extrajeron muestras de sangre a los 5, 20 y 60 minutos, y se titularon las IU en células HEK293. Los títulos en sangre obtenidos de los tres adenovirus administrados muestran que a los 5 minutos se ha eliminado más del 95% de las IU iniciales (Figura 59), permaneciendo en sangre solo un 2,02% del Ad5-RFP administrado, un 0,16% del Ad5/52s-GFP y un 1,11% en el caso del AdF52sR67N-GFP. Estos valores indican que el Ad5/52s se elimina significativamente más rápido que el Ad5 ya que su título relativo en sangre 12,6 veces inferior, pero en el caso del AdF52sR67N su título relativo tan solo es 1,8 veces menor

que el del Ad5 y, además, esta diferencia no es estadísticamente significativa. Por otro lado, al comparar los adenovirus Ad5/52s y AdF52sR67N, se obtiene que el virus con el *fiber* mutado pierde menos infectividad en sangre que el no mutado, ya que su título relativo es 6,9 veces superior. No obstante, a pesar de las diferencias entre los dos virus quiméricos, las diferencias no son estadísticamente significativas. Así pues, con estos resultados confirmamos la conclusión anterior de que el Ad5/52s pierde infectividad en sangre más rápido que el Ad5, mientras que esto no sucede cuando se muta el residuo arginina de la diana trombina predicha. No podemos concluir definitivamente que esta mutación sea la responsable de la mayor supervivencia del AdF52sR67N respecto al Ad5/52s porque, a pesar de haber una gran diferencia entre sus títulos relativos, éstas no son estadísticamente significativas. Aún así, si se observa una tendencia clara en esta línea que se debería confirmar con más experimentos.

IV. DISCUSIÓN

El adenovirus humano Ad52 es considerado un virus gastrointestinal porque fue identificado a partir de heces de pacientes con gastroenteritis [114], e igual que los otros adenovirus humanos con tropismo intestinal, Ad40 y Ad41, contiene dos proteínas *fiber* de diferentes longitudes. En estos dos últimos serotipos, el *fiber* largo tiene afinidad por el receptor CAR, mientras que se desconoce el receptor con el que interacciona su *fiber* corto, del que se especula que podría ser el responsable del tropismo intestinal de estos virus. Al inicio de esta tesis se desconocían los receptores para los *fibers* del Ad52, y nosotros hipotetizamos que, de forma análoga a Ad40 y Ad41, el *fiber* corto del Ad52 (F52s) tendría afinidad por un receptor diferente a CAR y, por lo tanto, su incorporación a la cápside de un Ad5 podría conferir a ésta un tropismo hacia el tracto gastrointestinal, u otros tejidos.

Para empezar, comparamos las secuencias de aminoácidos del *knob* del F52s con las de otros serotipos que representan las siete especies de adenovirus humanos. La secuencia de aminoácidos no es una buena herramienta para predecir relaciones filogenéticas, pero sí puede dar una orientación sobre la función de las proteínas. Según nuestros resultados, la mayor similitud de residuos del F52s se da con los *knobs* de los otros *fibers* cortos de los serotipos Ad40, Ad41 y SAdV1, mientras que, el *knob* del *fiber* largo del Ad52 tiene una secuencia de residuos que se asemeja más a la del *knob* de los *fibers* largos de los mismos adenovirus Ad40, Ad41, SAdV1 y Ad12. De éstos últimos, la función del *fiber* largo del SAdV1 no ha sido estudiada, pero en los otros tres serotipos sí es conocida su capacidad de unión al receptor CAR. En general, nuestro resultado va en la misma línea que otros publicados anteriormente, como por ejemplo en un artículo publicado por Roelvink *et al.* donde también se comparan las secuencias de aminoácidos de los *knob* de varios serotipos representativos las especies A-F [316]. Su resultado es similar al obtenido por nosotros, con la excepción de que, en su caso, los *knob* se dividen en una rama formada por las especies A, C, D y E, y otra formada por B y F, mientras que en nuestro caso las especies B y A se encuentran intercambiadas. Nuestro resultado no demuestra la función de los *fibers* del Ad52, pero sí que respalda nuestra hipótesis inicial de que el *fiber* largo conferiría al virus afinidad por el receptor CAR, mientras que el corto lo haría por un receptor diferente y, por lo tanto, la incorporación de éste último en la cápside de un Ad5 le podría conferir un tropismo independiente de CAR. Durante el transcurso de esta tesis, se publicaron otros artículos con resultados similares. Por ejemplo, Darr *et al.* publicaron una comparación de los *shaft* y los *knob* de varios serotipos de adenovirus, aunque basándose en la secuencia de nucleótidos del gen [130]. En este caso, sí que incluyen los adenovirus de la especie G SAdV1 y Ad52, aunque para éste último solo tienen en cuenta el *fiber* largo. Aún así, el resultado también es similar al nuestro en cuanto a la similitud de los *knob* de los *fibers* largos de SAdV1 y Ad52, y el del *fiber* corto de SAdV1.

El dominio flexible *tail* del *fiber* está altamente conservado entre las diferentes especies y serotipos, especialmente la secuencia consenso FNVYPY que interacciona con el *penton base* [80, 129], lo que ha facilitado la generación de adenovirus pseudotipados por sustitución del *fiber*. No obstante, como teníamos la intención de construir un adenovirus quimérico basado en la cápside del Ad5, nos pareció importante asegurarnos de que, *a priori*, no habría diferencias importantes entre el *tail* del F52s y el *tail* del F5 (que es el reconocido de forma natural por el *penton base* del Ad5) que pudiesen comprometer la interacción entre las dos

proteínas del vértice. Por un lado, el *tail* del F52s contiene la secuencia FNVYPY de unión a *penton base*, igual que en el *fiber* del Ad5 y el resto de secuencias analizadas, a excepción de Ad4 y Ad12. Por otro lado, en cuanto a la distancia en la secuencia de residuos de todo el *tail*, el F52s tiene un menor número de cambios/residuo respecto al F5 que los *fibers* de los adenovirus Ad40 y Ad41 (los *fibers* cortos), Ad9, Ad37, Ad35 y Ad3. Es importante destacar éstos últimos serotipos porque hay publicada suficiente literatura donde se utilizan sus *fibers* para pseudotipar la cápside del Ad5 y, en estos casos, no se ve comprometida la viabilidad de los viriones resultantes [126, 305, 306, 310, 449, 450]. Así que, teniendo en cuenta que el F52s tiene la misma secuencia conservada de unión a *penton base* que el Ad5, y que la secuencia de aminoácidos del F52s tiene una distancia igual o menor a la del Ad5 que otros *fibers* con los que se han construido adenovirus quiméricos, hipotetizamos que deberíamos ser capaces de producir viriones viables de Ad5/52s.

La longitud y la flexibilidad del *shaft* son dos parámetros a tener en cuenta ya que afectan a la infectividad del virus [126, 133, 136]. El *shaft* del *fiber* corto del Ad52 está formado por 153 residuos, y si se tiene en cuenta que cada motivo pseudorepetitivo del *shaft* de los adenovirus tiene unos 15-16 residuos de media [131, 132], se podrían predecir entre 9,6-10,2 repeticiones en el *shaft* del *fiber* corto del Ad52. A partir de la secuencia de aminoácidos del F52s, hemos propuesto un modelo para este *shaft* basado en el que propusieron van Raaij *et al.* a partir de la estructura del *shaft* del Ad2 [132]. Según nuestro modelo del, los 153 residuos del *shaft* del Ad52s se estructuran en 9,5 motivos pseudorepetitivos, que es un número ligeramente inferior a los 9,6-10,2 propuestos debido a la presencia de residuos extra en alguna de las repeticiones. De entre estas, es destacable la inserción de cuatro residuos VQTN entre las dos hojas β del tercer motivo repetitivo. Esta inserción se da también en otros adenovirus y se considera que es la responsable de la flexibilidad del *fiber* observada en este punto [132] y, en su ausencia, de la rigidez del *fiber* de algunos serotipos [136]. Sin embargo, el *shaft* del *fiber* corto del Ad52 carece de la secuencia KLGXGLXFD/N en la última repetición entera del *shaft*, que también se ha descrito como un motivo de flexibilidad que permite la inclinación del *knob* [136]. Además, según nuestro modelo, parece que la segunda hoja de la novena repetición es diferente ya que no sigue el patrón de P/G en la posición j, y residuos hidrofóbicos en las posiciones k y m. En este caso, en la posición k se encuentra un residuo D y los hidrofóbicos están en las posiciones l y n, y tampoco hay ningún residuo en la posición h. También se podría desplazar el alineamiento de manera que la secuencia SPDLRFNS se sitúe en las posiciones h i j k l m n o, y así se recuperaría el residuo de la posición h, que es ausente en nuestro modelo, y los residuos hidrofóbicos L y F quedarían localizados en las posiciones k y m para formar las interacciones hidrofóbicas. No obstante, cualquiera de las dos localizaciones de la secuencia SPDLRFNS podría alterar la estructura de la novena repetición del *shaft* ya que representa una organización diferente al resto de repeticiones. No podemos descartar que haya errores en el modelo, debido a que está basado en la estructura de otro *fiber*, aunque en general es coherente con la información disponible de otros *fibers*. Por ejemplo, respecto al *fiber* corto del Ad52, el *shaft* de Ad5 y el corto de Ad40 son 202 y 36 residuos más largos, y el de Ad3 es 65 residuos más corto. Teniendo en cuenta que cada repetición tiene 15-16 residuos, eso supone aproximadamente 13 repeticiones más para el *fiber* de Ad5, y 2 más para el *fiber* corto de Ad40, y 4 repeticiones menos para Ad3, respecto a las 9,5 repeticiones del *fiber* corto del Ad52. Estos valores coinciden con los observados para estos *fibers* (Tabla 1).

Una vez analizada la secuencia del F52s, se encargó su síntesis y se clonó en el plásmido pKP1.4ΔCMV que contiene el genoma del Ad5 para obtener el genoma del adenovirus quimérico Ad5/52s. La decisión de utilizar una cápside pseudotipada en lugar de un Ad52 *wild type* se tomó porque uno de los objetivos de esta tesis era analizar el papel del F52s, de manera que utilizando un Ad5 pseudotipado todas las diferencias observadas en el comportamiento de Ad5 y Ad5/52s se podrían atribuir al *fiber*. Por otro lado, esta tesis también tenía como objetivo evaluar el uso de un vector de terapia génica con el tropismo otorgado por el F52s, y las cápsides pseudotipadas basadas en Ad5 presentan ventajas respecto a los adenovirus *wild type* en cuanto a bioseguridad y productividad.

Sin embargo, a pesar de las ventajas que ofrecen los vectores pseudotipados, la incorporación de un *fiber* heterólogo en la cápside del Ad5 puede afectar a la infectividad y la productividad y, por esta razón el primer Ad5/52s que produjimos fue el Ad5/52s-GFP para, así, poder monitorizar fácilmente el virus durante las rondas de amplificación por microscopía de fluorescencia. Guiándonos por el efecto citopático, recogimos el virus a las 40 horas después de infectar el cultivo de la última amplificación, y después de purificarlo obtuvimos un título de $3,3 \times 10^{11}$ PP/mL y $4,5 \times 10^9$ IU/mL y, por lo tanto, una ratio una IU por cada 73,3 viriones.

Los dos títulos de la producción son inferiores a los que obtenemos habitualmente para el Ad5, especialmente el de las IU, lo cual podría ser explicado por varias razones. En primer lugar, en ese momento desconocíamos el tropismo del Ad5/52s hacia las células HEK293 utilizadas tanto en la producción como en la titulación del virus. Si este tropismo fuese bajo, la infección de los cultivos durante la amplificación del virus sería ineficiente y, por lo tanto, también la cantidad de viriones que se generan en cada célula. Además, una baja afinidad hacia las células HEK293 explicaría también que se necesiten 73 PP para transducir una célula 293, mientras que con el Ad5 solo hacen falta unas 10PP. Debido a que uno de los *fiber* más cercanos al F52s es el *fiber* corto del Ad40, nos podemos fijar en la información publicada sobre la productividad de los Ad5 pseudotipados con este *fiber* para compararla con la del Ad5/52s. Nakamura *et al.* han trabajado con los adenovirus quiméricos Ad5/40s para compararlos con el Ad5 y, en su caso, obtienen 2,5 veces menos PP del virus quimérico que del Ad5, y unas ratios PFU/PP de 1/9,7 y 1/1393 para Ad5 y Ad5/40s, respectivamente [435]. Nuestro grupo ha publicado resultados con el Ad5/40s, y las ratios IU/PP obtenidas también eran diferentes, siendo de 1/18 y 1/430 para Ad5 y Ad5/40s, respectivamente. Más importante, se demostró que la diferencia de ratio es debida a la poca afinidad del virus por las HEK293, y no por problemas en la viabilidad del virus [310]. Sin embargo, en el caso del Ad5/52s el bajo rendimiento de su producción no se puede explicar solo por una baja infectividad en 293, ya que tiene una mejor ratio que los Ad5/40s.

Una segunda razón podría ser que la sustitución del F5 por el F52s en un Ad5 ralentice su ciclo viral, de manera que la recolección del Ad5/52s a 40 horas haya sido prematura y, por lo tanto, no haya tenido tiempo de generar suficientes viriones. Para comprobar esta hipótesis se estudió el ciclo viral del adenovirus quimérico Ad5/52s donde observamos que la generación de nuevos viriones viables a las 36-40 horas después de infectar representa tan solo un 10% del título máximo, que se obtiene a las 44-48 horas. Este resultado puede explicar el bajo rendimiento de nuestra primera producción de Ad5/52s-GFP ya que entonces recogimos el virus 40 horas después de infectar el cultivo, desaprovechando el incremento súbito en la

productividad que se produce a las 44 horas después de infectar las HEK293. Este ciclo viral es 8 horas más largo que las 36 horas del Ad5 nativo, pero 12 horas más corto que el del Ad5/40s [183, 310, 312]. Es conocido que el *fiber* puede afectar a diferentes pasos del ciclo viral, como por ejemplo determinar la ruta de que sigue el virus después de ser internalizado en la célula [200, 201], pero con la información que tenemos no podemos determinar las causas de las diferencias entre el ciclo del Ad5/52s y el del Ad5 nativo, o el cercano Ad5/40s.

Una vez determinado que el punto óptimo de recogida del virus era a las 44 horas después de infectar el cultivo, todas las producciones siguientes de Ad5/52s con los diferentes marcadores que se han utilizado en esta tesis fueron recogidas a esa hora, lo que permitió aumentar la producción de IU/célula en 11,5 veces. Este valor concuerda con nuestro experimento de ciclo, ya que de 40 horas a 44 horas hay un incremento aproximado de 10 veces en el número de IU producidas. Por otro lado, también hemos aumentado 2,8 veces la producción de PP/célula, y al aumentar más la producción de partículas infecciosas que de partículas físicas, la ratio IU/PP también aumenta una media de 3,5 veces, pasando de 1/73 a 1/21, aproximadamente. El hecho de que hayamos incrementado más la productividad en IU que en PP nos indica que el problema de recoger el virus a 40 horas no solo es la poca producción de viriones, sino que probablemente estos aún son inmaduros. Este resultado remarca la importancia de estudiar el ciclo los nuevos virus quiméricos para conocer su tiempo óptimo de recogida tanto para aumentar la productividad sin incrementar los costes, como para asegurarse de obtener el máximo número de viriones viables, ya que un exceso de viriones no maduros podría impactar en el análisis de los resultados que se obtengan con ellos. No obstante, aún con el protocolo optimizado, la producción de PP/célula sigue siendo menor que con un Ad5, aproximadamente la mitad. Esto podría estar relacionado con la menor infectividad del Ad5/52s en HEK293, que se ve reflejada en la ratio IU/PP que sigue siendo 2,5 veces menor que con el Ad5, aunque no podemos afirmarlo con nuestros resultados. La ratio IU/PP en HEK293 también es mucho mayor para el Ad5/52s que la que se ha mencionado antes para el Ad5/40s, lo que nos indica que los *fibers* cortos de estos dos virus podrían estar utilizando diferentes vías de entrada en las células.

Uno de los objetivos de esta tesis es conferir al Ad5 un nuevo tropismo a través de la incorporación del F52s, y para ello comparamos el tropismo de ambos virus por nueve líneas celulares de diferentes orígenes animales y tisulares que teníamos en el laboratorio. Las imágenes de fluorescencia y, sobretudo, los resultados de citometría ponen de manifiesto que los dos virus tienen un tropismo diferente, ya que hay líneas que son transducidas eficientemente por el Ad5/52s (S16, RT4, HepG2 y C2C12), líneas que son transducidas de forma eficiente por los dos virus (HeLa y A549), y otras donde el Ad5/52s no puede transducir eficientemente ni en la dosis más alta, mientras que el Ad5 sí lo hace (DKZeo, Jurkat E6.1 y PC12). No podemos comparar nuestros resultados sobre el tropismo del Ad5/52s con la literatura publicada ya que hasta la fecha nadie ha trabajado con este virus, pero sí que podemos hacerlo con el Ad5 en la mayoría de líneas celulares.

En cuanto a las líneas epiteliales humanas HeLa y A549, dónde ambos virus presentan una elevada eficiencia de transducción, nuestro resultado con el Ad5-GFP está de acuerdo con la información publicada, ya que ambas expresan tanto CAR como integrinas, y son líneas

consideradas permeables para la transducción por parte de los adenovirus Ad2 y Ad5, entre otros [137, 316, 451].

En el grupo de líneas celulares donde la transducción por parte del Ad5-GFP es eficiente, pero no lo es la del Ad5/52s-GFP se encuentran las DKZeo, que aunque son células de riñón de perro utilizadas habitualmente para la propagación de vectores adenovirales caninos, pueden ser transducidas por el Ad5 debido a la presencia del receptor CAR [452]. En este grupo de líneas transducidas solo por el Ad5 también se encuentran la PC12, que proviene de feocromocitoma de rata, un tumor de las glándulas suprarrenales y presenta características neuronales, especialmente en respuesta al factor de crecimiento NGF [453], y la literatura publicada también indica que son permisivas para su transducción por el Ad5 [454]. En lo que se refiere a la línea Jurkat E6.1 parece que haya una contradicción en nuestros resultados, ya que según la citometría el Ad5 a 1000PP/célula transduce el 39% de las células, mientras que en las fotografías apenas se ve señal fluorescente. La explicación a esta aparente contradicción se debe a que, a pesar de que las células han sido transducidas, dan poca señal de fluorescencia y son difícilmente observables por microscopía, pero esta señal sí es suficiente para ser detectada por citometría. La baja fluorescencia puede ser debida a la presencia de pocas copias de Ad5 por célula, ya que las Jurkat expresan CAR, pero no expresan integrinas $\alpha_v\beta_5$ y en bajos niveles las $\alpha_v\beta_3$ [455].

En cuanto a las líneas donde nuestros resultados muestran que el Ad5/52s es mucho más eficiente que el Ad5 (S16, RT4, C2C12 y HepG2), las C2C12 y HepG2 son las líneas con las que hay más literatura publicada sobre su interacción con el Ad5. En el caso de las HepG2, una línea derivada de hepatoma humano, se observa la misma discrepancia entre fotografía y citometría que en Jurkat E6.1, y también se podría explicar por las diferencias de sensibilidad de las dos técnicas. Sin embargo, en este caso esperábamos un mayor porcentaje de transducción ya que en numerosos artículos se ha utilizado el Ad5 para transducir HepG2 [456, 457]. De entre ellos, destacamos un artículo publicado por Schagen *et al.* porque en él se incubaban las HepG2 con Ad5 en las mismas condiciones de dosis (1000PP/célula) y tiempo (48 horas) que nosotros, y ellos sí detectan unos niveles elevados de expresión de transgén [458]. No obstante, en este caso concreto utilizan el marcador luciferasa y miden su actividad por luminometría, por lo que al utilizar un método de detección diferente es difícil comparar su resultado con el nuestro. Aún así, repetimos el experimento con esta línea celular y obtuvimos los mismos resultados, por lo que las diferencias podrían ser debidas a la metodología utilizada o a diferencias entre los clones de HepG2. Y por último, la línea C2C12 es una línea de mioblastos murinos que se utiliza como modelo de célula de músculo esquelético, tanto en su forma indiferenciada como en su forma diferenciada a miocito. A pesar de que hay trabajos publicados donde se ha utilizado el Ad5 para transducir esta línea celular [459], éstos requieren una elevada dosis de virus ya que las C2C12 no expresan CAR y, por lo tanto, su eficiencia de transducción es baja [459].

En resumen, aún si no tenemos en cuenta las HepG2, nuestro resultado nos permite concluir que el F52s modifica el tropismo del Ad5, ya que le permite transducir células que le son resistentes cuando tiene el F5 y, a su vez, pierde afinidad por otras.

El Ad5/52s también presenta una mayor eficiencia de transducción que el Ad5 en cultivos de S16 y RT4, que son dos líneas celulares derivadas de células de Schwann de rata [460]. Sin embargo, S16 y RT4 son modelos de líneas indiferenciadas y, por lo tanto, la capacidad de transducción de los virus podría ser diferente a la obtenida en células de Schwann diferenciadas. Por esta razón se decidió evaluar la capacidad de transducción del Ad5/52s tanto en células S16 sometidas a un protocolo de diferenciación, como en cultivos de células de Schwann primarias obtenidas del nervio ciático de ratones post-natales. Los resultados obtenidos muestran que el Ad5/52s también tiene una mayor eficiencia de transducción que el Ad5 ya que incluso a la dosis más baja de Ad5/52s se obtiene un mayor porcentaje de células GFP positivas que con el Ad5 a la dosis más alta, lo que coloca al virus quimérico como un potencial vector de transducción dirigido a sistema nervioso periférico. No obstante, para validar esta hipótesis se deberían realizar más experimentos para comprobar cuál es la capacidad de transducción del vector *in vivo* por administración local, por ejemplo por inyección intracránea o intratecal, ya que los resultados *in vivo* de esta tesis muestran que el virus quimérico pierde infectividad cuando es administrado por vía sistémica.

A partir de los resultados *in vitro* se puede concluir que la sustitución del F5 por el F52s modifica el tropismo del Ad5 porque interacciona con receptores diferentes a los del F5. En primer lugar, realizamos un experimento para determinar el efecto del bloqueo de los receptores del *knob* del Ad5 en la eficiencia de transducción del Ad5/52s. Nuestros resultados muestran que la incubación de células HEK293 con 50ng de *knob* recombinante del F5 bloquea su posterior transducción por parte del Ad5, lo que ya se había observado otros autores [461]. Sin embargo, en las mismas dosis de proteína recombinante y virus, el bloqueo de los receptores del F5 no tiene ningún efecto en la eficiencia de transducción del Ad5/52s. Por otro lado, también comparamos la eficiencia de transducción de los dos virus en la línea celular CHO, que es utilizada en numerosos estudios como un modelo de células no permisivas para la transducción de Ad5 porque no expresan el receptor CAR [462, 463]. Como era de esperar, el Ad5 es incapaz de transducir esta línea celular de forma eficiente, cosa que sí hace el Ad5/52s. Esto confirma el resultado anterior de que el F52s permite al adenovirus transducir células en ausencia de CAR. Así pues, en conjunto estos resultados demuestran que el receptor del F52s interacciona con receptores que no son reconocidos por el *knob* del F5, como CAR [315] o MHC de clase I [464]. Paralelamente, también se podría deducir que el Ad5/52s no interacciona con CD46, que es un receptor descrito para algunos adenovirus, como los de la especie B [341], ya que las células CHO no expresan este receptor [465].

Al analizar los resultados se ha de tener en cuenta que los experimentos realizados demuestran que el Ad5/52s transduce células utilizando receptores diferentes a los del *knob* del F5, lo cual no invalida necesariamente que el F52s tenga capacidad de unirse, en mayor o menor medida, a estos receptores.

A priori, tampoco se podría descartar que el Ad5/52s transduzca las células por interacción directa del *penton base* con las α_v -integrinas, lo cual ha sido descrito en otros serotipos de adenovirus con *fiber* corto, como el Ad9 [113]. Sin embargo, la literatura publicada también demuestra que los adenovirus quiméricos basados en la cápside del Ad5 no pueden transducir células por interacción directa entre *penton base* e integrinas, a pesar de que el virus contenga el *shaft* del *fiber* del Ad9 [126]. A partir de nuestros resultados también se puede descartar

que el Ad5/52s transduzca las células a través de unión directa a integrinas. Por ejemplo, en HEK293 la ratio IU/PP del Ad5/52s es aproximadamente 1/20, la cual es superior a la que obtenemos cuando producimos el adenovirus quimérico Ad5/40s, que contiene un *fiber* de una longitud similar a la del F52s [310]. Por lo tanto, si la transducción se debiese a la unión del *penton base* a integrinas, y no a un reconocimiento específico entre *fiber* y receptor, la ratio IU/PP del Ad5/52s debería ser igual o inferior a la del Ad5/40s.

Otro factor que se ha de tener en cuenta es que la interacción entre *fiber* y receptor no se da siempre a través del dominio *knob*, sino que también se dan casos de interacción entre el dominio *shaft* y el receptor celular, como por ejemplo el *shaft* del Ad5 que contiene una secuencia KKTK que se ha descrito como un motivo de unión a HSPGs [386, 387]. Para determinar si el *knob* del F52s es el responsable de la transducción del Ad5/52s, se generó un adenovirus quimérico AdS5K52 que contiene el *shaft* del F5 y el *knob* del F52s, y se comparó su eficiencia de transducción con la del Ad5 y el Ad5/52s en las líneas celulares A549, S16 y CHO. El resultado fue que tanto Ad5/52s como AdS5K52 pueden transducir eficientemente los tres tipos celulares, mientras que el Ad5 solo lo hace en A549. Así pues, queda claro que el *shaft* del F52s no es necesario para la entrada del adenovirus quimérico en las células y, por lo tanto, la interacción entre *fiber* y receptor se da a través del *knob*. Más aún, la eficiencia de transducción del AdS5K52 es significativamente superior a la del Ad5/52s, especialmente a una dosis de 100PP/célula. Esto indicaría que, a una misma interacción entre *knob* y receptor, el *shaft* del F5 aumenta la infectividad del adenovirus quimérico, lo cual probablemente se deba a que la longitud del *fiber* del AdS5K52 se acerca más a la óptima para una cápside basada en el Ad5. A pesar de tener longitudes similares, la eficiencia de transducción en A549 del AdS5K52 también es significativamente mayor que la del Ad5, lo cual se podría explicar por una diferencia de abundancia en los sitios de unión de ambos virus.

Una vez reconocido el *knob* del F52s como responsable de la unión del Ad5/52s a su receptor celular, se trató de identificar cual era este receptor celular utilizando la técnica de *pull down* mediante la incubación de del *knob* del F52s recombinante junto con extractos de proteína de membrana de células S16. A pesar de que el *knob* se trimeriza espontáneamente *in vitro*, es necesario incluir el último motivo repetitivo del *shaft* para su correcta trimerización [140]. Sin embargo, de acuerdo a nuestro modelo del *shaft* del F52s, esta repetición es 5 residuos más corta que la del Ad5 lo cual podría afectar al plegamiento del *knob* recombinante. Por esta razón, se clonó en un vector de expresión que incorpora el *tag* GST la secuencia de DNA del *knob* del F52s junto con la última repetición del *shaft* del F52s, o bien del *shaft* del F5. Aunque las proteínas GST-Shaft5Knob52 y GST-Shaft52Knob52 se producían correctamente, ninguna de las dos era funcional, tanto si se producían en sistemas de expresión procariotas como eucariotas. Para saber si las proteínas recombinantes se trimerizaban correctamente, nos basamos en un experimento publicado por Louis *et al.* donde comprueban la trimerización del *knob* del Ad2 utilizando glutaraldehído, que une los grupos amino de diferentes residuos de forma covalente [137]. El resultado nos confirmó que los *knob* recombinantes del F52s no trimerizan, lo que explica que pudiesen unirse a sus receptores. En la mayor parte de los artículos publicados donde se utilizan *knob* recombinantes funcionales, éstos van unidos a *tags* más pequeños que el GST que utilizamos nosotros, como por ejemplo el *tag* de seis histidinas, y, además, se producen indistintamente en sistema procariota o eucariotas [113, 137, 316,

320, 461]. De hecho, el *knob* recombinante del F5 que nos cedió el Dr. André Lieber, que sí era funcional, también contiene un *tag* de histidinas y fue producido en bacterias. Por esta razón, clonamos los genes en un vector de expresión procariota que incorpora el *tag* histidinas. Sin embargo, durante todo el proceso el grupo del Dr. Niklas Arnberg descubrió el receptor del F52s [314]. En este artículo, ellos producen el *knob* recombinante del F52s en procariontes y unido a un *tag* de seis histidinas. Además, la proteína funcional que producen contiene el último motivo del *shaft* del F52s, empleando la misma secuencia exacta de residuos que clonamos nosotros. El receptor que utiliza el F52s es el ácido siálico unido a glicoproteínas, al cual se une a través de un motivo RGN del *knob* que no se encuentra conservado en el resto de adenovirus humanos, ni siquiera en los *knob* de los virus Ad8, Ad19a y Ad37, que también reconocen el ácido siálico [353, 354]. Por otro lado, en este mismo artículo también se confirma experimentalmente nuestra hipótesis inicial de que el *fiber* largo del Ad52 reconoce el receptor CAR.

El Ad52 fue identificado en muestras de heces de pacientes con gastroenteritis, y debido a ello ha sido propuesto como un virus con tropismo intestinal. Por esta razón, comprobamos si la substitución del F5 por el F52s aumentaba la eficiencia de transducción del Ad5 en cultivos de las líneas de epitelio intestinal humano Caco2, SW1116 y LoVo. Sin embargo, el resultado obtenido fue que el Ad5 transduce estas tres líneas con una eficiencia notablemente superior a la del Ad5/52s. Sorprendentemente, este resultado contrasta con el que nuestro grupo publicó acerca del virus quimérico Ad5/40s, donde la incorporación del F40s en la cápside del Ad5 aumenta su transducción en la línea Caco2 [310]. Una posible explicación a la diferencia entre estos dos *fibers*, que tienen unos *knob* similares, se debería a la utilización de un receptor diferente, ya que el dominio RGN de unión a ácido siálico no se encuentra en el *knob* del F40s, del cual se desconoce su receptor. Así pues, con este experimento no se pudo concluir que el F52s aumente el tropismo intestinal del Ad5, aunque se ha de tener en cuenta que las tres líneas celulares intestinales utilizadas no se encuentran diferenciadas. Por esta razón, se realizó también un experimento en colaboración con el Dr. Eduard Batlle para comparar la transducción de ambos virus en un modelo *in vitro* tridimensional de organoides, obtenidos a partir de células madre intestinales (ISCs) de ratón, y que recrean la morfología del epitelio intestinal [447, 448]. En las condiciones utilizadas, la incubación de los organoides con los adenovirus Ad5-Cre o Ad5/52s-Cre dio lugar a eficiencias de transducción similares.

En conjunto, los resultados obtenidos al comparar la eficiencia de transducción de los vectores Ad5 y Ad5/52s en modelos intestinales *in vitro*, tanto en cultivos de líneas estables como en organoides, no nos permiten confirmar nuestra hipótesis de que el F52s aumenta el tropismo intestinal del Ad5. No obstante, en el caso de las líneas celulares Caco2, SW1116 y LoVo se ha de tener en cuenta que se trataba de cultivos no diferenciados ni polarizados, de manera que todos los receptores son igual de accesibles para los virus. En condiciones fisiológicas, las células epiteliales de intestino expresan CAR e integrinas en la membrana basolateral, de manera que no es accesible para los adenovirus. Esto se ha observado en la línea Caco2, que cuando no está diferenciada es transducida por el Ad5, mientras que cuando se induce su polarización el Ad5 solo puede transducirlas si es administrado directamente en la región basal de las células [307]. En estas condiciones, el F52s podría ofrecer una mayor eficiencia de transducción desde la membrana apical si su receptor se encontrase localizado en ésta

membrana. En esta línea, el descubrimiento del ácido siálico como receptor del F52s refuerza esta hipótesis, ya que esta molécula se localiza preferentemente en la membrana apical de las líneas de epitelio intestinal cuando se encuentran polarizadas [466], de manera que sería fácilmente accesible para los adenovirus, a diferencia de lo que sucede con CAR. Así pues, sería interesante realizar más experimentos *in vitro* para confirmar si el Ad5/52s tiene mayor eficiencia de transducción que el Ad5 en células epiteliales diferenciadas cuando los virus son administrados en la región apical.

Adicionalmente, se intentó comprobar el tropismo intestinal del Ad5/52s-GFP *in vivo* administrándolo por vía oral e intrarrectal, y comparando su eficiencia de transducción con la de un Ad5-RFP con el que fue coadministrado. Lamentablemente, los elevados niveles de autofluorescencia no permitieron observar ninguna señal específica fluorescente para ninguno de los dos virus.

En el caso del Ad5/40s, una parte de su tropismo intestinal en ratones se debe a la transducción de macrófagos residentes [310]. Por esa razón, también analizamos la eficiencia de transducción del Ad5/52s y el Ad5 en la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7. En este caso, el Ad5/52s transduce 8 veces más células que el Ad5, de manera que el F52s sí que aumenta el tropismo del virus hacia macrófagos murinos, igual que en el caso del F40s.

Esta tesis también tenía como finalidad estudiar el potencial del adenovirus Ad5/52s como vector de terapia génica. Por eso, se administró el virus quimérico en ratones por vía intravenosa para estudiar su biodistribución *in vivo* y compararla con la del Ad5. Los resultados de este experimento muestran que el principal órgano transducido por el Ad5 es el hígado, lo cual es un fenómeno ya conocido [376-378] y que implica una disminución en la cantidad de virus disponible para transducir otros tejidos. Aún así, también se observa un nivel significativo de transducción en bazo, corazón y páncreas, aunque con unos niveles de expresión de transgén aproximadamente 10 veces inferiores a los obtenidos en hígado. En el caso del Ad5/52s, se detecta un nivel significativo de expresión de gen marcador en hígado, páncreas, pulmón y riñón, aunque los valores eran muy cercanos a los observados en animales no administrados con virus. De entre estos órganos, vale la pena destacar el hígado ya que, a pesar de ser un órgano donde los adenovirus quedan retenidos, la transducción con el Ad5/52s es 16 veces inferior a la obtenida con el Ad5. Esta reducción en el secuestro hepático de los virus también se da en otros adenovirus quiméricos que contienen *fibers* cortos independientemente del receptor que reconozca su *knob* [388, 390, 435, 436, 449]. Sin embargo, a pesar de que el Ad5/52s queda menos retenido en hígado que el Ad5, este teórico aumento en la cantidad de virus disponible no se ve reflejado en un incremento marcado en la expresión de gen marcador en ninguno de los otros órganos analizados, lo que se podría explicar por varias razones. En primer lugar, podría suceder que el adenovirus quimérico no fuese estable en condiciones *in vivo*. Por otro lado, los resultados también coincidirían con una mayor eliminación o inhibición del Ad5/52s en sangre. También podría suceder que el adenovirus esté transduciendo algún otro órgano o tejido que no hayamos analizado, como por ejemplo en endotelio, por el que tienen afinidad los virus quiméricos Ad5/19p, Ad5/37 y Ad5/35 [449, 467], o médula ósea donde la tienen los virus Ad5/35 y Ad5/11 [437]. Una última explicación sería que el F52s no pueda transducir tejidos en ratón, ya sea por la ausencia de su receptor [341] o porque la proteína murina homóloga a la humana no sea reconocida por el

adenovirus [352]. Sin embargo, la identificación del ácido siálico como receptor del F52s descarta esta hipótesis ya que éste receptor es una molécula de distribución ubicua en el organismo.

Además de por vía intravenosa, también se analizó la capacidad de transducción del vector pseudotipado Ad5/52s cuando es administrado localmente, en concreto por las vías intramuscular e intranasal. En cuanto a la administración intramuscular, ambos virus transducen eficientemente el propio músculo esquelético, alcanzando incluso unos niveles de expresión superiores a los del Ad5 en hígado por vía intravenosa. No obstante, la actividad β galactosidasa detectada con el Ad5 es aproximadamente el doble de la detectada con el Ad5/52s, aunque las diferencias no son significativas. Respecto a la administración intranasal, también se detecta expresión de gen marcador en pulmón con los dos virus, aunque solo en niveles cercanos al límite de detección. Igual que se observaba en músculo por vía intramuscular, la transducción con el Ad5 también produce aproximadamente el doble de expresión de gen marcador que la transducción con el Ad5/52s, aunque en este caso las diferencias sí son significativas. En resumen, cuando el Ad5/52s es administrado por vía local se detecta expresión del gen marcador, especialmente en músculo por vía intramuscular donde los niveles detectados son elevados, lo que nos permite descartar que el Ad5/52s tenga problemas de estabilidad de la cápside *in vivo*.

Así pues, una vez descartado un problema en estabilidad del virus quimérico como la razón para los bajos niveles de transducción cuando el Ad5/52s se administra por vía intravenosa, se comparó la velocidad de eliminación de sus IU en sangre con la del Ad5. En los dos virus se observa una rápida disminución de las IU en sangre, ya que a los 5 minutos después de administrarlos ya se ha eliminado más de un 98% de las IU de Ad5 administradas, y más de un 99,9% en el caso de las IU del Ad5/52s. Es conocido que los adenovirus se eliminan rápidamente en sangre porque son fagocitados por las células de Kupffer hepáticas [367], que constituyen más del 90% de los macrófagos residentes del organismo, de manera que limitan la disponibilidad del virus. Sin embargo, los dos virus no son eliminados a la misma velocidad, ya que se observa que la permanencia de IU de Ad5 en sangre es aproximadamente 24 veces superior a la del Ad5/52s y, por lo tanto, el adenovirus quimérico es inactivado en sangre a mayor velocidad que el Ad5. En cuanto a la interacción de las KC con adenovirus pseudotipados, se ha descrito que la substitución del *fiber* modifica la tasa de fagocitosis del virus por KC [436]. Además, en esta tesis también se demuestra que el Ad5/52s también tiene un mayor tropismo por macrófagos murinos que el Ad5. Por lo tanto, con esta información se hipotetizó que la mayor tasa de eliminación de IU puede ser debida a que el Ad5/52s es fagocitado por las KC de forma más eficiente que el Ad5.

Para comprobar el impacto de las KC en la biodistribución de los adenovirus, se administraron los virus Ad5 y Ad5/52s en ratones tratados con $GdCl_3$, que es una sal que elimina las KC, pero no otros macrófagos residentes, como los esplénicos [468]. En cuanto al Ad5, el tratamiento de los animales con $GdCl_3$ prácticamente no altera la biodistribución del virus, observándose tan solo un incremento de la expresión de gen marcador en bazo. Se ha de tener en cuenta que las KC tienen una capacidad de fagocitosis de adenovirus limitada a aproximadamente 3×10^{10} PP en ratón [373], mientras que en este experimento se administraron 5×10^{10} PP en cada animal por lo que el aumento de dosis efectiva del Ad5 se ve incrementada tan solo de

2×10^{10} PP por animal a 5×10^{10} PP y, debido al tropismo hepático del Ad5, la mayor parte de la carga extra de virus extra puede estar siendo absorbida por el hígado. Por otro lado, en el caso del Ad5/52s sí que se observa un incremento significativo en la transducción de pulmón, destacando por encima del resto de órganos. Sin embargo, la expresión del gen marcador en este órgano continúa siendo baja en términos absolutos, y más aún si se tiene en cuenta que el vector quimérico no es secuestrado en hígado ni en ningún otro tejido analizado. Por lo tanto, aunque la eliminación de las KC permite aumentar significativamente la transducción en pulmón con el Ad5/52s, estas células no son las principales responsables de la mayor tasa de eliminación de IU del Ad5/52s en sangre. Así pues, una vez descartadas las KC, se comprobaron otras hipótesis que expliquen la diferencia de comportamiento de los dos virus en sangre.

Debido a que la cuantificación de las IU solo tiene en cuenta el virus infeccioso y no el virus total presente, podría ser que la diferencia de infectividad de los virus Ad5 y Ad5/52s no se correlacione con una diferencia en la cantidad de virus total en sangre. Por esta razón, se cuantificaron por qPCR los genomas virales de ambos virus en sangre después de su administración por vía intravenosa. El resultado obtenido fue que, al contrario de lo observado en las IU, no se observan diferencias significativas en el número de genomas en sangre de ambos virus. Este resultado refuerza la observación anterior de que la mayor pérdida de infectividad del Ad5/52s en sangre no se debe a una mayor tasa de eliminación del virus por KC y, a su vez, también descarta la hipótesis de que el virus transduzca algún órgano no analizado de forma significativa ya que, en ambas situaciones, la mayor disminución en IU del Ad5/52s se correlacionaría con una mayor disminución también en genomas virales. Así pues, este resultado indicaba que el Ad5/52s estaba siendo inactivado en la misma sangre.

La literatura publicada sobre el comportamiento de los adenovirus en sangre indica que estos interactúan con factores solubles en plasma, como por ejemplo factores de coagulación [390-392], y también con células sanguíneas, como por ejemplo eritrocitos [405, 406], y estas interacciones condicionan la distribución y la supervivencia del virus. En el caso del Ad5/52s, este adenovirus está siendo inhibido en sangre en mayor medida que el Ad5, así que se administraron ambos virus por vía intravenosa y se separaron las fracciones celular y plasmática para delimitar dónde se estaba produciendo esta pérdida de infectividad del Ad5/52s. En primer lugar, el resultado de este experimento confirmó que el Ad5/52s pierde más infectividad en sangre que el Ad5, pero no más partículas virales. Analizando los resultados por fracciones, la mayor parte de IU y genomas virales de ambos virus se detectan en plasma/plaquetas, seguida de la fracción de leucocitos mononucleares, y en estas dos fracciones también se observa la diferencia de infectividad entre Ad5 y Ad5/52s. En cuanto a la fracción de eritrocitos, a pesar de suponer aproximadamente el 40% del volumen de sangre circulante, tan solo se detecta una cantidad residual de los dos virus, pero en este caso las diferencias entre Ad5 y Ad5/52s no son significativas. Es importante remarcar que estos resultados obtenidos en ratón no serían válidos para predecir el comportamiento de los adenovirus en sangre cuando son utilizados como vectores virales en humanos, ya que hay diferencias interespecíficas en cuanto a la expresión de receptores adenovirales en las células sanguíneas [407, 408]. Aun así, la finalidad de este experimento era determinar qué compartimento era el responsable de la pérdida de infectividad del Ad5/52s, y a partir de los

resultados obtenidos se puede concluir que esto sucede por interacción con algún factor de la fracción plasma/plaquetas.

Para confirmar estos resultados, se incubaron *ex vivo* los virus Ad5 y Ad5/52s en fracciones de sangre obtenidas de ratones no tratados con virus para analizar el efecto de las tres fracciones sobre la infectividad de los virus. Sorprendentemente, en este experimento la diferencia de IU de Ad5 y Ad5/52s en las tres fracciones es similar a la esperada si ambos virus conservan su infectividad inicial en HEK293, de manera que *ex vivo* no se reproduce la pérdida de infectividad del Ad5/52s, contradiciendo así los resultados *in vivo*. Esta diferencia podía ser debida a un artefacto debido a las diferencias de metodología entre los experimentos *in vivo* y *ex vivo*, y en este sentido nos fijamos en el uso de los anticoagulantes ya que es la única diferencia metodológica destacable. En el caso del experimento *in vivo*, los virus fueron administrados en sangre y a los 5 minutos se extrajo la sangre y se trató con anticoagulantes para prevenir la coagulación de las muestras antes de su fraccionamiento, de manera que los virus estaban expuestos a la acción de los factores de coagulación plasmáticos durante este tiempo. Sin embargo, en el experimento *ex vivo* la sangre extraída también se trató con anticoagulantes, pero los virus fueron incubados después del fraccionamiento de manera que en este caso no estuvieron expuestos a la acción de los factores de coagulación. Además, los resultados *in vivo* demostraban que la mayor parte de virus no infeccioso se encontraba en la fracción plasma/plaquetas, que contiene los factores de coagulación. Por esta razón, se decidió estudiar si la actividad de las proteínas de la coagulación podría ser la responsable de la pérdida de infectividad del Ad5/52s.

La trombina es una serina proteasa que se encuentra principalmente en su forma de zimógeno inactivo protrombina hasta que se activa la cascada de coagulación, y es entonces cuando la protrombina es procesada por el factor de coagulación FXa para obtener la forma activa de la trombina que, a su vez, proteolizará el fibrinógeno a su forma insoluble fibrina que precipita en sangre para formar el coágulo [469]. Debido a que la trombina también es una endopeptidasa que se utiliza durante la producción de proteínas recombinantes con *tags* GST [470], hay disponibles herramientas informáticas que permiten predecir la presencia posibles dianas trombina en las proteínas. Al analizar la secuencia del F52s con la herramienta *Peptide Cutter*, se detectó la presencia de una secuencia GRG que, a pesar de no ser la diana óptima de trombina, también puede ser reconocida por esta, proteolizando la arginina en posición P1 [471]. Esta secuencia GRG se encuentra en el giro β que conecta las dos hojas antiparalelas del segundo motivo repetitivo del *shaft* del F52s, que es la repetición inmediatamente anterior a la región bisagra del *fiber*. Por otra parte, no se detecta ninguna diana proteolítica de trombina en el F5, ni tampoco en las secuencias del *hexon* y *penton base* del Ad5. Así pues, este resultado situó a la trombina como un candidato a ser el factor plasmático que inhibe selectivamente al Ad5/52s, ya que la única diferencia con el Ad5 es la presencia del F52s en lugar del F5.

La predicción de dianas proteolíticas a través del análisis de la secuencia se debe confirmar empíricamente, ya que esta diana podría no ser accesible debido al plegamiento de la proteína. Lamentablemente, no se pudo confirmar la acción de la trombina sobre el F52s de forma directa por motivos metodológicos. En primer lugar, como no disponíamos de proteína recombinante del F52s, se incubó el Ad5/52s con trombina recombinante para,

posteriormente, determinar si este tratamiento reducía su eficiencia de transducción en HEK293. Sin embargo, el protocolo de proteólisis con trombina requiere incubaciones a temperatura ambiente durante un tiempo entre 2 y 16 horas, y con tan solo 2 horas de incubación a temperatura ambiente tanto Ad5 como Ad5/52s perdían más del 98% de su infectividad independientemente de que fueran tratados con trombina o no. También se podría determinar la actividad proteolítica de la trombina sobre el F52s observando mediante *western blot* una disminución en el tamaño de la banda correspondiente al F52s. Sin embargo, tampoco disponíamos de ningún anticuerpo apropiado para realizar este experimento, ya que el que se ha utilizado en esta tesis es el anticuerpo monoclonal 4D2 que reconoce el dominio *tail* del *fiber*. Así pues, con este anticuerpo únicamente podríamos detectar el fragmento N-terminal obtenido con la proteólisis, que tiene un peso molecular de tan solo 7,6 kDa.

Por esta razón, se analizó el efecto que produciría la eliminación de la diana trombina del *fiber* en cuanto a la supervivencia del adenovirus quimérico en sangre, y para ello se generó un Ad5/52s con una mutación que substituye la diana trombina GRG por la secuencia GNG presente en el F5 (AdF52sR67N). Nuevamente, aunque la mayor parte de las IU administradas son eliminadas durante los primeros 5 minutos independientemente del serotipo del virus, permanece un mayor porcentaje de IU en sangre del Ad5 que del Ad5/52s. Sin embargo, si se comparan los virus Ad5/52s y AdF52sR67N se observa que el virus mutado presenta unos niveles de IU en sangre aproximadamente 7 veces mayor que el Ad5/52s, lo que sitúa la permanencia del AdF52sR67N en niveles cercanos a los del Ad5. Así pues, aunque las diferencias entre Ad5/52s y AdF52sR67N no llegan a ser estadísticamente significativas, sí que se observa una tendencia que apunta en la dirección de que la mutación del residuo arginina de la diana proteolítica trombina del F52s permite aumentar la disponibilidad de IU en sangre del virus quimérico.

Con los experimentos llevados a cabo en esta tesis aún no se puede concluir rotundamente que la pérdida de infectividad del Ad5/52s en sangre sea debida a la acción de la trombina, por lo que sería necesario realizar más experimentos. En primer lugar, sería necesario complementar el resultado de la eliminación de IU con la cuantificación de los genomas virales para confirmar que la mayor permanencia de IU del AdF52sR67N respecto al Ad5/52s no se debe a que la cantidad de virus total en sangre también es mayor. En segundo lugar, también sería necesaria la realización de experimentos *in vitro* para comprobar la actividad proteolítica de la trombina sobre el F52s o su efecto en la infectividad del Ad5/52s. También sería de interés el estudio del efecto de la introducción de la diana trombina en el F5 para estudiar su impacto en la supervivencia del Ad5 en sangre.

Independientemente de que la causa sea la pérdida de una diana proteolítica trombina o no, si se confirma que la mutación R67N del *shaft* aumenta la disponibilidad del virus quimérico en sangre, sería interesante analizar la biodistribución del vector AdF52sR67N. Una mayor disponibilidad del vector permitiría aumentar la eficiencia de transducción y su efecto terapéutico sin necesidad de aumentar la dosis de vector, lo que implicaría una mejora de la seguridad de la terapia y reduciría también los costes.

V. CONCLUSIONES

1. Se ha creado el sistema de plásmidos que permite generar los genomas de vectores quiméricos pseudotipados Ad5/52s, así como la incorporación de transgenes en dicho genoma. Con este sistema de plásmidos se han producido los diferentes vectores Ad5/52s utilizados en los experimentos de esta tesis.
2. La sustitución del F5 por el F52s comporta un enlentecimiento moderado en el ciclo replicativo del virus (pasando de 36 a 44 horas), por lo que se adaptó el protocolo de producción del vector Ad5/52s para maximizar la obtención de cápsides maduras.
3. El F52s modifica el tropismo del Ad5 en cultivos *in vitro*, permitiéndole transducir líneas celulares no permisivas para el Ad5, pero limitando a su vez su eficiencia de transducción en otras líneas que sí son transducibles por el Ad5.
4. Se ha determinado que el Ad5/52s utiliza receptores diferentes a CAR mediante un mecanismo en el que participa principalmente el dominio *knob* del F52s.
5. El F52s no aumenta el tropismo intestinal del Ad5 en modelos intestinales *in vitro*.
6. En comparación con el Ad5, el Ad5/52s muestra una elevada eficiencia de transducción tanto en cultivos primarios de células de Schwann como en líneas celulares de macrófagos.
7. A diferencia del Ad5, cuando el Ad5/52s es administrado por vía intravenosa no queda secuestrado en hígado, aunque esto tan solo se traduce en unos niveles modestos de transducción en pulmón.
8. El Ad5/52s tiene una elevada eficiencia de transducción en músculo esquelético cuando es administrado por vía local, por lo que la baja transducción observada por vía intravenosa no es debida a la inestabilidad de la cápside.
9. El Ad5/52s pierde infectividad en sangre más rápido que el Ad5 debido a su inactivación en plasma, lo que limita la disponibilidad del vector.
10. Se ha identificado una diana proteolítica trombina en el *shaft* del F52s y con su mutación se observa un aumento de la supervivencia del vector quimérico en sangre.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 PLÁSMIDOS

Todos los plásmidos utilizados en esta tesis contienen un origen de replicación procariota para su propagación en cultivos de bacterias, así como un gen de resistencia al antibiótico ampicilina para la selección positiva de las células que contienen el plásmido.

1.1.1 PLÁSMIDOS UTILIZADOS PARA GENERAR LOS PLÁSMIDOS NECESARIOS PARA ESTA TESIS

- **pKP1.4ΔCMV:** Contiene el genoma del vector adenoviral de primera generación (ΔE1/ΔE3) Ad5 sin ningún inserto.
- **p8900.F5:** Vector *shuttle* que contiene un fragmento SpeI-SpeI de 8,9kb del plásmido pKP1.4ΔCMV que contiene el gen de la proteína F5.
- **pK18:** Vector *shuttle* que contiene un fragmento SnaBI-SnaBI de 18kb del plásmido pKP1.4ΔCMV que incluye el gen de la proteína F5.
- **pTG6600-CMV-GFP/βgal/Cre:** Vector *shuttle* que contiene un fragmento del genoma del vector Ad5ΔE1ΔE3 e incluye la ITR 5' del virus, la señal de encapsidación y los insertos GFP, βgalactosidasa o Cre substituyendo la región E1 viral. Los insertos se expresan bajo control del promotor constitutivo eucariota CMV.
- **pGEX-6P-1:** Vector de expresión procariota bajo control de un promotor *tac* (inducible por IPTG) que permite incorporar un *tag* GST en el extremo N-terminal de la proteína recombinante clonada. Incluye además una diana proteolítica para la proteasa PreScission que permite separar el GST de la proteína recombinante.
- **pEBG-2T:** Vector de expresión eucariota bajo control del promotor constitutivo EF1a que permite incorporar un *tag* GST en el extremo N-terminal de la proteína recombinante clonada. Incluye además una diana proteolítica trombina que permite separar el GST de la proteína recombinante.

1.1.2 NUEVOS PLÁSMIDOS GENERADOS DURANTE ESTA TESIS

- **p8900.F52s:** Vector *shuttle* derivado del plásmido p8900.F5 donde se ha substituido el F5 por el F52s por ligación. También se han añadido las dianas de restricción XbaI y MluI flanqueando el gen del *fiber*.
- **pK18.F52s:** Vector *shuttle* obtenido por recombinación homóloga de los plásmidos p8900.F52s y pK18.

- **pMG:** Contiene el genoma del vector adenoviral pseudotipado de primera generación ($\Delta E1/\Delta E3$) Ad5/52s sin ningún inserto, obtenido por recombinación homóloga de los plásmidos pK18.F52s y pKP1.4 Δ CMV.
- **pMG-GFP/ β gal/Cre:** Contiene el genoma del vector adenoviral Ad5/52s con los insertos GFP, β galactosidasa o Cre substituyendo la región E1 viral. Se obtiene por recombinación homóloga de los plásmidos pMG y pTG6600-CMV (con el inserto correspondiente).
- **p8900.Stu:** Plásmido intermedio de clonación para generar el p8900.S5K52. Se obtiene a partir del p8900.F5.
- **p8900.S5K52:** Vector *shuttle* obtenido a partir del p8900.Stu que contiene el *fiber* con el *shaft* del F5y el *knob* del F52s (S5K52).
- **pK18.S5K52:** Vector *shuttle* obtenido por recombinación homóloga de los plásmidos p8900.S5K52 y pK18.
- **pMG.S5K52:** Contiene el genoma del vector adenoviral AdS5K52 sin ningún inserto, obtenido por recombinación homóloga de los plásmidos pK18.S5K52 y pKP1.4 Δ CMV.
- **pMG.S5K52-GFP:** Contiene el genoma del vector adenoviral AdS5K52 con el gen marcador GFP substituyendo la región viral E1. Se obtiene por recombinación homóloga de los plásmidos pMG.S5K52 y pTG6600-CMV-GFP.
- **p8900.F52sR67N:** Vector *shuttle* obtenido a partir del p8900.F52s que contiene la mutación R67N.
- **pK18.F52sR67N:** Vector *shuttle* obtenido por recombinación homóloga de los plásmidos p8900.F52sR67N y pK18.
- **pMG.F52sR67N:** Contiene el genoma del vector adenoviral AdF52sR67N sin ningún inserto, obtenido por recombinación homóloga de los plásmidos pK18.F52sR67N y pKP1.4 Δ CMV.
- **pMG.F52sR67N-GFP:** Contiene el genoma del vector adenoviral AdF52sR67N con el gen marcador GFP substituyendo la región viral E1. Se obtiene por recombinación homóloga de los plásmidos pMG.F52sR67N y pTG6600-CMV-GFP.
- **pGEX/Shaft5Knob52:** Plásmido derivado del pGEX-6P-1 para la expresión de la proteína recombinante GST-Shaft5Knob52 en cultivos procariotas.
- **pGEX/Shaft52Knob52:** Plásmido derivado del pGEX-6P-1 para la expresión de la proteína recombinante GST-Shaft52Knob52 en cultivos procariotas.

- **pEBG/Shaft5Knob52:** Plásmido derivado del pEBG-2T para la expresión de la proteína recombinante GST-Shaft5Knob52 en cultivos HEK293.
- **pEBG/Shaft52Knob52:** Plásmido derivado del pEBG-2T para la expresión de la proteína recombinante GST-Shaft52Knob52 en cultivos HEK293.

1.2 PRIMERS

Tabla 6: Lista de <i>primers</i> utilizados en esta tesis		
Nombre	Secuencia (5'→3')	Notas (en los <i>primers</i> utilizados para clonación)
dF52e	TTATTCAGCAGCACCTCCTTG	
rF52e	ATAAACACGTTGAAACATAACAC	
qPCR F5 Fwd2	TTACCTCAGAAGCCCTAACT	
qPCR F5 Rv2	TGGCAATGCTAAGTTTGGAG	
qPCR F52 Fwd3	TTTACCTCACCTCTCCGTTA	
qPCR F52 Rv3	AGGACTTAGGTTTGTACCTA	
StuS5K52 Fwd	TTGGATATTA ACTACAACAAAGGC CTTACTTGTTTAC	
S5BstzK52 Rv	atctgatcgt CAATTG tcgatagtac GTAT ACTGTAATGGCACCTGTGCTGTC	Se resaltan en amarillo las dianas de restricción MfeI y BstZ17I, y en negrita los nucleótidos que hibridan en el p8900.F5
SmaS5K52 Fwd	tcagatgat CCCGGG AACAAAAATAA <u>TGATAAGCTAACTTTGTGGACACCC</u> CCGACCTCAAATC	Se resaltan en amarillo la diana de restricción SmaI, en subrayado la secuencia 3' del <i>shaft</i> del F5 y en negrita los nucleótidos que hibridan en el p8900.F52s
Fiber híbrido Rv	atgacttgaaatcttg CAATTG AAAAA TAAACACGTTGAAACATAACACAA ACGCGTCTTTA	Se resaltan en amarillo la diana de restricción MfeI, y en negrita los nucleótidos que hibridan en el p8900.F52s

Tabla 6 (continuación): Lista de <i>primers</i> utilizados en esta tesis		
Nombre	Secuencia (5'→3')	Notas (en los <i>primers</i> utilizados para clonación)
Shaft5 Fw2	catcacGGATCCGGTGCCATTACAGT AGGAAACAAAAATAATGATAAGCT AACTTTGTGGACACCCCGACCTCA	Se resaltan en amarillo la diana de restricción BamHI, en subrayado la última repetición del <i>shaft</i> del F5 y en negrita los nucleótidos que hibridan en el p8900.F52s
Shaft52 Fw	catcacGGATCCGGAGCCATAGCTT TTGGTATACA	Se resaltan en amarillo la diana de restricción BamHI y en negrita los nucleótidos que hibridan en el p8900.F52s
rF52NotI	taggtagaCGGCCGCTTATTGTTCCG GTAATGTAGC	Se resaltan en amarillo la diana de restricción EagII y en negrita los nucleótidos que hibridan en el p8900.F52s

1.3 SECUENCIAS DE PROTEÍNA FIBER UTILIZADAS

Las secuencias de DNA y proteína utilizadas en esta tesis se han obtenido de la base de datos GenBank (NCBI) con las siguientes referencias:

- **Genomas de adenovirus:** Ad5 (AC_000008.1) y Ad52 (DQ923122.2).
- **Secuencias de residuos de *fiber*:** Ad12 (CAA51900.1), Ad3 (ABB17809.1), Ad35 (AP_000601.1), Ad2 (AP_000190.1), Ad5 (AP_000226.1), Ad9 (CAI05985.1), Ad37 (BAH19194.1), Ad4 (YP_068048.1), Ad40s (NP_040875.1), Ad40L (NP_040876.1), Ad41s (AIC33162.1), Ad41L (AIC33163.1), Ad52s (ABK35058.1), Ad52L (ABK35059.1), SAdV1s (YP_213988.1), SAdV1L (YP_213989.1).

1.4 CEPAS DE BACTERIAS (*E. coli*)

- **TOP10:** Cepa de bacterias utilizada para procedimientos generales de manipulación de DNA recombinante, como la amplificación de plásmidos. Es la cepa utilizada por defecto en esta tesis, salvo que se indique lo contrario. **Genotipo:** F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80/*lacZ*ΔM15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ(*araleu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*. **Cultivo:** Medio LB (líquido) o LB-Agar (sólido). El medio se complementa con ampicilina (Fisher Scientific) a 100μg/mL cuando se les incorpora un plásmido.
- **BJ5183:** Cepa de bacteria utilizada para la clonación de fragmentos de DNA mediante recombinación homóloga. **Genotipo:** *endA1 sbcBC galK met thi-1 bioT hsdR* (Str^r).

Cultivo: Medio LB (líquido) o LB-Agar (sólido). El medio se complementa con estreptomycin (Fisher Scientific) a 30µg/mL durante la generación de bacterias quimiocompetentes. El medio se complementa con ampicilina (Fisher Scientific) a 100µg/mL cuando se les incorpora un plásmido.

- **BL21-CodonPlus(DE3)-RP:** Cepa de bacterias utilizada para la producción de proteínas recombinantes. **Genotipo:** *E. coli* B F⁻ *ompT hsdS(r_B⁻ s_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal endA Hte [argU proL Cam^r]. **Cultivo:** Medio LB (líquido) o LB-Agar (sólido). El medio se complementa siempre con cloranfenicol (Calbiochem) a 34µg/mL. El medio se complementa con ampicilina (Fisher Scientific) a 100µg/mL cuando se les incorpora un plásmido.*

1.5 LINEAS CELULARES

- **HEK293-QB (HEK293):** Utilizadas para la producción de los vectores virales y de proteína recombinante. También se han utilizado en experimentos *in vitro*. **Medio de crecimiento:** DMEM suplementado con un 10% (v/v) de FBS (Biowest) y un 1% (v/v) de P/S (Biowest).
- **293F:** Línea HEK293 acondicionada para su cultivo en suspensión, utilizada para la obtención de proteínas de membrana. **Medio de crecimiento:** SFMII (Gibco) suplementado con glutamina 4mM (PAA), 1% (v/v) de P/S (Biowest) y un 1% de pluronics.
- **RT4-D6P2T (RT4):** Se han utilizado en experimentos de tropismo *in vitro*. **Medio de crecimiento:** DMEM suplementado con un 10% (v/v) de FBS (Biowest) y un 1% (v/v) de P/S (Biowest).
- **S16:** Se han utilizado en experimentos de tropismo *in vitro*. **Medio de crecimiento:** DMEM suplementado con un 10% (v/v) de FBS (Biowest) y un 1% (v/v) de P/S (Biowest).
- **C2C12:** Se han utilizado en experimentos de tropismo *in vitro*. **Medio de crecimiento:** DMEM suplementado con un 10% (v/v) de FBS (Biowest) y un 1% (v/v) de P/S (Biowest).
- **HepG2:** Se han utilizado en experimentos de tropismo *in vitro*. **Medio de crecimiento:** DMEM suplementado con un 10% (v/v) de FBS (Biowest) y un 1% (v/v) de P/S (Biowest).
- **A549:** Se han utilizado en experimentos de tropismo *in vitro*. **Medio de crecimiento:** DMEM suplementado con un 5% (v/v) de FBS (Biowest) y un 1% (v/v) de P/S (Biowest).

- **HeLa:** Se han utilizado en experimentos de tropismo *in vitro*. **Medio de crecimiento:** DMEM suplementado con un 10% (v/v) de FBS (Biowest) y un 1% (v/v) de P/S (Biowest).
- **DKZeo:** Se han utilizado en experimentos de tropismo *in vitro*. **Medio de crecimiento:** DMEM suplementado con un 10% (v/v) de FBS (Biowest), un 1% (v/v) de P/S (Biowest) y un 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales (PAA).
- **Jurkat E6.1:** Se han utilizado en experimentos de tropismo *in vitro*. **Medio de crecimiento:** RPMI-1640 (PAA) suplementado con un 10% (v/v) de FBS (Biowest), un 1% (v/v) de P/S (Biowest) y glutamina 4mM (PAA).
- **PC12:** Se han utilizado en experimentos de tropismo *in vitro*. **Medio de crecimiento:** DMEM suplementado con un 7% (v/v) de FBS (Biowest), un 7% de HS (v/v) (PAA), un 1% (v/v) de P/S (Biowest) y un 1% (v/v) de HEPES 1M a pH= 6,8. Las placas de cultivo se deben tratar previamente con solución de colágeno (BD Biosciences).
- **CHO-K1 (CHO):** Se han utilizado en experimentos de tropismo *in vitro*. **Medio de crecimiento:** Ham's F-12 (Biowest) suplementado con un 7,5% (v/v) de FBS (Biowest) y un 1% (v/v) de P/S (Biowest).

1.6 ANIMALES

Los animales utilizados en esta tesis son ratones Crl:CD-1(ICR) machos adultos de 8 semanas de edad, de la casa comercial Charles River. Los animales siguieron una alimentación *ad libitum* con una dieta estándar, y un ciclo de luz/oscuridad de 12h/12h.

Tanto el mantenimiento de los animales como los experimentos *in vivo* se han realizado en las instalaciones del Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona, y los animales fueron manipulados de acuerdo a las normas de bienestar animal.

1.7 SOLUCIONES

1.7.1 SOLUCIONES PARA CULTIVOS BACTERIANOS Y TÉCNICAS DE CLONACIÓN

- **Medio LB:** Se prepara disolviendo 25g de LB (Luria Broth, Conda) en 1L de agua destilada, y se esteriliza con autoclave.
- **Medio LB-Agar:** Se prepara como el medio LB, suplementándolo con 15g de Agar Bacteriológico (Conda). Se esteriliza con autoclave y se deja enfriar hasta unos 45-50°C para repartirlo en placas de petri estériles (25mL/placa). Opcionalmente, se le puede añadir el antibiótico de interés a la concentración final deseada antes de verter el medio en las placas.

- **Ampicilina 1000x:** Se disuelve en agua destilada a una concentración de 100mg/mL de ampicilina monosódica (Fisher Scientific), y se esteriliza con un filtro de 0,22µm (Millipore).
- **Cloranfenicol 1000x:** Se disuelve en metanol (Panreac) a una concentración de 34mg/mL de cloranfenicol (Calbiochem), y se esteriliza con un filtro de 0,22µm (Millipore).
- **Estreptomicina 1000x:** Se disuelve en agua destilada a una concentración de 30mg/mL de sulfato de estreptomicina (Fisher Scientific), y se esteriliza con un filtro de 0,22µm (Millipore).
- **TFB1:**
 - 100mM RbCl (Sigma)
 - 50mM MgCl₂ (Panreac)
 - 30mM acetato de potasio (Sigma)
 - 10mM CaCl₂ (Panreac)
 - 15% (v/v) de glicerol (Sigma)
 - pH=5,8
 - Se esteriliza con un filtro de 0,22µm (Millipore)
- **TFB2:**
 - 10mM RbCl (Sigma)
 - 10mM MOPS (Fluka)
 - 75mM CaCl₂ (Panreac)
 - 15% (v/v) de glicerol (Sigma)
 - pH=6,8
 - Se esteriliza con un filtro de 0,22µm (Millipore)
- **P1:**
 - 50mM Tris-HCl (Sigma)
 - 10mM EDTA (USB)
 - 100mg/mL RNAsa A (Qiagen)
 - pH=8,0
- **P2:**
 - 200mM NaOH (Panreac)
 - 1% (w/v) SDS (Amresco)
- **P3:**
 - 3M Acetato de potasio (Sigma)
 - pH=5,5

- **TAE 1X:**
 - 40mM Tris-acético (Sigma)
 - 1mM EDTA (USB)
 - pH=8,5
- **Tampón de carga de DNA 10X:**
 - 100mM EDTA (USB)
 - 1% (w/v) SDS (Amresco)
 - 0,1% (w/v) Azul de bromofenol (Sigma)
 - 50% (v/v) Glicerol (Sigma)

1.7.2 SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

- **PBS (D-PBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline):**
 - 137mM NaCl (Panreac)
 - 3mM KCl (Panreac)
 - 10mM Na₂HPO₄ (Panreac)
 - 1,7mM KH₂PO₄ (Panreac)
 - pH=7,4
 - Se esteriliza con autoclave
- **Medio de transfección:**
 - 1% (v/v) P/S (marca) en DMEM (Lonza)
- **Medio de diferenciación (células S16):**
 - 1% (v/v) P/S (Biowest) en DMEM Low glucose 1g/L (PAA)
- **Solución de colágeno:**
 - 0,02M Ácido acético glacial (Panreac)
 - 50µg/mL Colágeno (BD Biosciences)
 - Se debe preparar en agua destilada esterilizada con autoclave
- **Medio DF-10 (para 0,5L):**
 - 250mL DMEM/Ham's F12 (PAA)
 - 200mL MEM with Earle's salts (PAA)
 - 50mL FBS (Biowest)
 - 5mL MEM vitamins 100X (PAA)
 - 1mL Aminoácidos no esenciales (PAA)
 - 2,5mL Gentamicina (PAA)
 - 5mL P/S (Biowest)
 - Se filtra el medio con filtro Stericup de 0,5L

1.7.3 SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ADENOVIRUS Y SU MANIPULACIÓN IN VITRO

- **Solución TE:**
 - 10mM Tris-HCl (Sigma)
 - 1mM EDTA (USB)

- **Medio de infección:**
 - El medio de crecimiento de la línea celular con 2% (v/v) de FBS

- **Solución de tinción X-gal:**
 - 5mM $K_3Fe(CN)_6$ (Sigma)
 - 5mM $K_4Fe(CN)_6$ (Sigma)
 - 2mM $MgCl_2$ (Panreac)
 - 1mg/mL X-gal (Thermo Fisher Scientific)
 - Se disuelve en PBS

1.7.4 SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LA MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

- **Solución 4x Tris-HCl SDS pH=8,8:**
 - 1,5M Tris-HCl (Sigma)
 - 0,4% (w/v) SDS (Amresco)
 - pH=8,8

- **Solución 4x Tris-HCl SDS pH=6,8:**
 - 0,5M Tris-HCl (Sigma)
 - 0,4% (w/v) SDS (Amresco)
 - pH=6,8

- **Tampón de electroforesis (1L):**
 - 3,02g Tris (Sigma)
 - 14,4g Glicina (Sigma)
 - 1g SDS (Amresco)

- **Tampón de carga de proteínas 6X:**
 - 375mM Tris-HCl (Sigma)
 - 48% (v/v) Glicerol (Sigma)
 - 9% (v/v) β -mercaptoetanol (Sigma)
 - 6% (w/v) SDS (Amresco)
 - 0,03% (w/v) Azul de bromofenol (Sigma)

- **Tampón de transferencia (1L):**
 - 5,02g Tris (Sigma)
 - 14,4g Glicina (Sigma)
 - 200mL Metanol (Panreac)

- **TBS-T:**
 - 50mM Tris (Sigma)
 - 136mM NaCl (Panreac)
 - 40mM KCl (Panreac)
 - 0,1% (v/v) Tween-20 (Sigma)
 - pH=7,5

- **Tampón de bloqueo:**
 - 5% (w/v) Leche desnatada y descremada
 - Se disuelve en TBS-T

- **RIA:**
 - 50mM Tris-HCl (Sigma)
 - 150mM NaCl (Panreac)
 - 5mM EDTA (USB)
 - 1% (v/v) Nonidet P40 Substitute (Fluka)
 - 0,25% (w/v) Deoxicolato de sodio (Sigma)

- **Solución de lisis de bacterias:**
 - 50mM Tris-HCl (Sigma)
 - 2mM EDTA (USB)
 - 2mM EGTA (AppliChem)
 - 0,25M NaCl (Panreac)
 - 1% (v/v) Tritón X-100 (Sigma)
 - pH=7,5

- **Solución de lavado:**
 - 50mM Tris-HCl (Sigma)
 - 2mM EDTA (USB)
 - 2mM EGTA (AppliChem)
 - 0,5M NaCl (Panreac)
 - 1% (v/v) Tritón X-100 (Sigma)
 - pH=7,5

- **Solución de elución:**
 - 50mM Tris-HCl (Sigma)
 - 0,1mM EGTA (AppliChem)
 - 0,275M Sacarosa (Panreac)
 - 0,1% (v/v) β -mercaptoetanol (Sigma)
 - 40mM Glutación (se añade en el momento de utilizarlo)
 - pH=8

- **Solución de homogenización:**
 - 20mM Hepes (Sigma)
 - 1,5mM MgCl₂ (Panreac)
 - 5mM KCl (Panreac)
 - 150mM NaCl (Panreac)
 - 15% (v/v) Glicerol (Sigma)
 - 0,25M Sacarosa (Panreac)
 - 0,1mM EDTA (USB)
 - 2mM β-mercaptoetanol (Sigma)
 - 1mM PMSF

- **Solución de solubilización:**
 - 50mM Hepes (Sigma)
 - 5mM MgCl₂ (Panreac)
 - 5mM KCl (Panreac)
 - 150mM NaCl (Panreac)
 - 15% (v/v) Glicerol (Sigma)
 - 0,25M Sacarosa (Panreac)
 - 0,1mM EDTA (USB)
 - 2mM β-mercaptoetanol (Sigma)
 - 1mM PMSF
 - 0,5% Brij O10 (Sigma)

- **Solución de Tinción de Coomassie:**
 - 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blute G-250 (Bio-Rad)
 - Se disuelve en Solución *de-stainer*

- **Solución *de-stainer*:**
 - 40% (v/v) Metanol (Panreac)
 - 10% (v/v) Ácido acético glacial (Panreac)

2. MÉTODOS

2.1 TÉCNICAS DE CLONACIÓN, MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA

2.1.1 PREPARACIÓN DE BACTERIAS QUIMICOMPETENTES

Protocolo para el tratamiento de las células bacterianas con la finalidad de hacerlas permisivas para la transformación de DNA por el método del choque térmico en sales de rubidio. Todo el protocolo se ha de seguir en condiciones de esterilidad.

A partir de un *stock* de bacterias de la cepa deseada conservado a -80°C de temperatura, se inoculan 5μL de bacterias en 3mL de medio LB (cepa TOP10), LB+Estreptomycin (cepa BJ) o LB+Cloranfenicol (cepa BL21), y se dejan crecer o/n en agitación a 37°C. Al día siguiente, se

inoculan los 3mL de cultivo en 200mL de medio LB (el correspondiente para cada cepa), previamente atemperado a 37°C, hasta que el cultivo alcanza una densidad óptima (OD_{600}) de 0,5 (habitualmente entre 2 y 3 horas). Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, se incuba el cultivo 5 minutos en hielo y se centrifuga durante 5 minutos a 4.000xg en una centrífuga previamente atemperada a 4°C. Después de centrifugar, se decanta el sobrenadante y se resuspenden las células en solución TFB1 enfriada a 4°C a una razón de 30mL de solución por cada 100mL de cultivo. El cultivo resuspendido se mantiene en hielo durante 90 minutos, tras los cuales se vuelve a centrifugar el cultivo en una centrífuga a 4°C durante 5 minutos a 4.000xg y se descarta el sobrenadante por decantación. Ahora, las células se resuspenden en solución TFB2 enfriada a 4°C utilizando 4mL de solución por cada 100mL de cultivo, y así se obtienen las bacterias quimiocompetentes. Finalmente, se hacen alícuotas de 100µL (de uso individual) y se congelan rápidamente en nieve carbónica para su almacenaje a -80°C hasta que se necesite utilizar las bacterias para transformar DNA.

Una vez obtenidas las células competentes, se comprobaba su eficiencia de transformación de por choque térmico utilizando un 10pg de un plásmido pUC19 comercial (Invitrogen) de concentración conocida.

2.1.2 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR CHOQUE TÉRMICO

Método para introducir DNA en bacterias quimiocompetentes tanto para la propagación del plásmido como para clonar genes por recombinación homóloga en el interior de las bacterias. La utilización de antibióticos permitirá una selección positiva de aquellas células que hayan incorporado el DNA.

Para empezar, las alícuotas de bacterias quimiocompetentes se descongelan lentamente en hielo durante 10-15 minutos. Una vez descongeladas, se añade la cantidad de DNA deseada en el vial de células, se mezcla con un vórtex rápido y se incuba durante 20-30 minutos. Transcurrido este tiempo, se incuban los viales en un baño a 42°C durante 90 segundos para realizar el choque térmico para permeabilizar las células y permitir la entrada del DNA, y rápidamente se sumergen en hielo durante 2 minutos para minimizar la muerte celular. A cada vial se le añaden 200µL de medio LB sin ningún antibiótico y se incuban durante 1 hora a 37°C en agitación, y así se da a las células el tiempo necesario para expresar una cantidad suficiente de las proteínas implicadas a la resistencia al antibiótico que será utilizado después para la selección de los clones positivos. Finalmente, todo el vial de células se extiende en placas de Petri con medio LB-Agar (junto con el antibiótico de interés) previamente atemperadas a 37°C hasta que todo el líquido haya sido absorbido por el medio, y se dejan secar las placas durante 10-15 minutos, tras los cuales se incubarán las placas o/n en una estufa a 37°C para permitir el crecimiento de las colonias.

2.1.3 MINIPREPARACIONES DE DNA PLASMÍDICO

Técnica basada en la lisis alcalina para la obtención y purificación de pequeñas cantidades de DNA plasmídico a partir de 1,5mL de cultivo bacteriano. Se utiliza habitualmente para la identificación de los clones positivos de entre todas las colonias crecidas.

Previamente, se ha de inocular cada una de las colonias que se desee analizar en 3mL de medio LB junto con los antibióticos necesarios, y estos cultivos se dejan crecer o/n a 37° en agitación. Una vez crecidos, se centrifugan 1,5mL de cultivo durante 1 minuto a 18.000xg para precipitar las bacterias y se decanta el sobrenadante, intentando eliminar la mayor parte posible. El precipitado de bacterias se resuspende completamente con 200µL de solución P1, y a continuación se añaden 400µL de solución alcalina P2, se agita la mezcla por inversión y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente para lisar las células. Transcurrido este tiempo, se añaden rápidamente 400µL de la solución ácida P3 y se agita por inversión para neutralizar el pH y se incuban los viales en hielo durante otros 5 minutos. Durante este tiempo se observará la aparición de un precipitado blanco que corresponde a los restos celulares que se quieren eliminar como DNA genómico, membranas celulares y proteínas. A los 5 minutos de incubación, se centrifugan los viales a 18.000xg durante 10 minutos para precipitar los restos celulares, y se recupera el sobrenadante que contiene el DNA plasmídico. Al recuperar el sobrenadante es importante asegurarse de que no se arrastra precipitado de restos celulares que contaminarían el DNA plasmídico. Una vez recuperado el sobrenadante, se le añaden 0,6 volúmenes de isopropanol (Panreac), se mezcla por inversión y se deja incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente para precipitar el DNA plasmídico. Transcurrido este tiempo, se centrifuga nuevamente a 14.000xg durante 10 minutos para separar el DNA precipitado del sobrenadante. Después de centrifugar se observa la aparición de un precipitado blanco en el fondo del tubo de centrífuga que corresponde al DNA plasmídico. Así pues, se descarta el sobrenadante por decantación, se añaden 400µL de etanol (Panreac) al 70% (v/v) y se agita el tubo para lavar el exceso de sales que se encuentran junto con el DNA precipitado. Se vuelve a centrifugar la mezcla a 18.000xg durante 5 minutos para precipitar de nuevo el DNA, y se descarta el sobrenadante y se deja secar el precipitado a 37°C para eliminar el etanol. Finalmente, se resuspende el DNA plasmídico en 30µL de agua miliQ con RNAsa A (Qiagen).

2.1.4 MAXIPREPARACIONES DE DNA PLASMÍDICO

Protocolo de extracción y purificación de grandes cantidades de DNA plasmídico a partir de 200mL de cultivo bacteriano en medio LB, junto a los antibióticos necesarios. Se utiliza para, a partir de un clon bacteriano ya correctamente caracterizado, obtener una cantidad suficiente de plásmido y con un nivel de pureza óptimo para proceder en pasos siguientes en el proceso de clonación de DNA recombinante, y también para su transfección en cultivos celulares.

El cultivo bacteriano de 200mL se inocula a partir de un precultivo de menor volumen (200-500µL) crecido a partir del clon de interés. Una vez inoculado el cultivo de 200mL, se deja crecer o/n a 37°C en agitación y, al día siguiente, se procede a la extracción y purificación del DNA plasmídico utilizando el kit comercial E.Z.N.A.TM Fastfilter (Omega Bio-Tek) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Después de purificar el plásmido, cuantifica la concentración de DNA por espectrofotometría midiendo su absorbancia a 260nm (Nanodrop ND-1000).

2.1.5 DIGESTIONES DE DNA PLASMÍDICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para las digestiones con enzimas de restricción se utiliza una cantidad de 1-2 μ g de DNA plasmídico, en el caso de las maxipreparaciones, o bien 5-8 μ L si se trata de minipreparaciones. Este DNA se incuba con 3-10U del enzima de restricción de interés (de las casas comerciales New England Biolabs o Thermo Fisher Scientific) en presencia del *buffer* de reacción (suministrado por el fabricante), y a la temperatura óptima del enzima (habitualmente 37°C). El tiempo de incubación varía entre 2 y 16 horas dependiendo de las indicaciones del fabricante, así como también de nuestra experiencia previa con cada enzima.

2.1.6 DEFOSFORILACIÓN DE VECTORES

En el caso de las digestiones con enzimas de restricción que tengan como finalidad aislar fragmentos de DNA para su posterior ligación, es conveniente defosforilar los extremos del fragmento correspondiente al vector de clonación, que contiene el origen de replicación y el gen de resistencia a antibiótico. De esta manera, se previene la recircularización de los vectores en los que no se haya ligado el inserto, reduciendo así el crecimiento de falsos clones positivos.

Para defosforilar el vector, se añade 1U de la fosfatasa FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific) sobre la reacción de digestión del vector, utilizando el *buffer* de defosforilación suministrado por el fabricante. Se incuba la fosfatasa junto al vector digerido durante 10 minutos a 37°C, y transcurrido este tiempo se inhibe la reacción incubándola a 75°C durante 5 minutos. Si el vector se va a correr inmediatamente en un gel de electroforesis de agarosa, se puede omitir la inhibición de la fosfatasa.

2.1.7 ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Para la visualización del tamaño de los fragmentos de DNA (obtenidos a partir de una digestión enzimática, o bien de una PCR), se deben correr las muestras en un gel de electroforesis de agarosa.

Los geles de agarosa se obtienen disolviendo en tampón TAE la cantidad de agarosa (Lonza) necesaria para que la concentración final sea del 1-2% de agarosa (w/v). Para disolver la agarosa, se debe calentar la mezcla hasta que se tenga una apariencia totalmente líquida y, al llegar a este punto, se enfría ligeramente y se añade el colorante RedSafe (iNtRON) en una proporción 1:20.000 (v/v) para poder visualizar las bandas de DNA. Una vez añadido el colorante, se coloca la mezcla en un soporte para geles de acrilamida junto a los peines que permitirán la formación de los pozos de carga, y se deja enfriar hasta su gelificación.

Cuando ya se tiene el gel, se coloca en una cubeta de electroforesis, que contiene solución TAE, y se introducen las muestras de DNA, previamente mezcladas con tampón de carga de DNA, en los pozos del gel. Para determinar el peso molecular de los fragmentos visualizados, se debe cargar también un marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder o GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific). Cuando están todas las muestras

cargadas, se aplica una tensión de 70-110V durante el tiempo necesario para la correcta separación de los fragmentos de DNA.

2.1.8 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Protocolo para extraer los fragmentos de DNA de interés a partir de un gel de agarosa. También es válido para la purificación de DNA amplificado por PCR y, así, eliminar los reactivos de la PCR que podrían interferir en los pasos siguientes de clonación.

Para ambas finalidades, se utiliza el kit de purificación comercial GeneClean (MPBio), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En caso de que sea necesaria la cuantificación de DNA obtenido, se puede correr una alícuota de la muestra purificada en un gel de electroforesis de agarosa, junto con una cantidad conocida de DNA. El fabricante no recomienda la cuantificación de estas muestras por espectrofotometría.

2.1.9 CLONACIÓN DE DNA EN VECTORES PLASMÍDICOS POR LIGACIÓN

La ligación se utiliza para clonar una secuencia de DNA de interés (inserto) en un vector plasmídico, siempre y cuando este vector tenga un tamaño máximo de 10kb.

Para la ligación se incuban 50ng del fragmento de DNA correspondiente al vector, previamente defosforilado, junto a la cantidad suficiente de inserto para obtener una proporción vector/inserto equimolar (1:1), o de tres moléculas de inserto por cada molécula de vector (1:3). A las mezclas de vector e inserto, se les añade 10U de T4 DNA Ligasa (New England Biolabs) y la cantidad de *buffer* de reacción indicada por el fabricante, y se incuban las muestras a 16°C o/n, tras lo cual se inhibirá la reacción a 65°C durante 20 minutos.

Después de la ligación, se transforma una alícuota de cada muestra en células TOP10 quimiocompetentes mediante el protocolo de choque térmico, y se realiza una extracción de DNA plasmídico de las colonias crecidas (minipreparación) para identificar un clon positivo para el vector ligado con el inserto.

2.1.10 CLONACIÓN DE DNA EN VECTORES PLASMÍDICOS POR RECOMBINACIÓN

Si los insertos de DNA se han de clonar en vectores plasmídicos mayores de 10kb es preferible utilizar el método de la recombinación homóloga.

Para ello, se transforman 50ng de vector y 50ng de inserto en una misma alícuota de células BJ5183 quimiocompetentes, siguiendo el protocolo del choque térmico. Al día siguiente, se cultiva cada uno de los clones crecidos en medio líquido, y se realiza una extracción de DNA plasmídico (minipreparación). Dada la poca capacidad de replicación de plásmidos de la cepa BJ5183, el DNA obtenido de estas células se debe transformar en bacterias de la cepa TOP10, y son estas células las que se crecerán para extraer su DNA (minipreparación) y, así, identificar los clones positivos para la recombinación.

2.1.11 SECUENCIACIÓN DE DNA

Las secuenciaciones de DNA se han realizado en el Servicio de Genómica Bioinformática de la Universitat Autònoma de Barcelona, siguiendo las indicaciones del propio servicio en cuanto a la preparación de las muestras de DNA y los *primers* utilizados.

2.1.12 AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE PCR

Las PCR (reacción en cadena de la polimerasa) no cuantitativas de esta tesis se han realizado utilizando DNA plasmídico como molde. Para la realización de la PCR, se incuban 10pg del plásmido en un volumen final de reacción 25uL que contiene los *primers* directo y reverso a una concentración de 0,2μM (cada uno), los cuatro tipos de dNTPs (Invitrogen) a una concentración de 0,2mM (cada dNTP), 1,5U de DreamTaq DNA Polimerasa (Thermo Fisher Scientific) y la cantidad de *buffer* de polimerasa indicada por el fabricante. Las PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf).

El protocolo de amplificación consta de 35 ciclos formados por una etapa de 30 segundos de desnaturalización a 95°C, una segunda etapa de 30 segundos de hibridación de los *primers* (a la temperatura óptima de cada pareja de *primers*), y una tercera etapa de extensión a 72°C durante un tiempo calculado como 1minuto por cada kb amplificada.

2.1.13 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DEL GEN DEL *FIBER* POR PCR

Esta PCR se utilizó para confirmar la clonación del gen del F52s en el plásmido pKP1.4ΔCMV para generar el plásmido pMG. En ella se utilizaron los *primers* dF52e y rF52e, con una temperatura de hibridación de 57°C y una fase de elongación de 2 minutos.

2.1.14 CUANTIFICACIÓN DE GENOMAS VIRALES MEDIANTE PCR CUANTITATIVA

El cálculo de genomas virales se determina por PCR cuantitativa (qPCR) utilizando *primers* específicos para el Ad5 (qPCR F5 Fwd2 y qPCR F5 Rv2) y para el Ad5/52s (qPCR F52 Fwd3 y qPCR F52 Rv3). Cada muestra se prepara sobre un volumen total de 10μL de la siguiente manera: 5μL de SYBR Green (Bio-Rad), 4pmol de *primer* directo, 4pmol de *primer* reverso, 2μL de extracto de DNA y el resto del volumen con agua estéril inyectable (B. Braun). Para la calibración se utilizan cantidades conocidas de genomas virales.

La qPCR se realiza en el Laboratori d'Anàlisi i Fotodocumentació de la Facultat de Biociències de la UAB en un termociclador C1000 Touch CFX384 (Bio-Rad) y los datos son procesados informáticamente por el *software* Bio-Rad CFX Manager. Posteriormente, para el cálculo de los genomas virales se utiliza el *software* kPCR desarrollado por el Dr. Miguel Chillón.

2.2 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

2.2.1 MANTENIMIENTO Y PASE DE LOS CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES

La mayoría de las líneas celulares utilizadas en esta tesis crecen en adherencia (excepto Jurkat E6.1 y 293F), por lo que su cultivo se realiza en placas de 15cm en el medio de crecimiento necesario para cada tipo celular, en un incubador a 37°C y con un 5% de CO₂, hasta que el cultivo alcanza una confluencia del 70-80%, momento en el que se debe proceder al pase del cultivo. Para ello, se aspira el medio de crecimiento, se añaden 10mL de solución PBS para lavar el cultivo y se aspira el PBS. Después, se añaden 2mL de Tripsina-EDTA (Biowest) para desenganchar las células de la placa, y se incuba durante 5 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se agita suavemente el cultivo para saltar las células y se inhibe la acción de la tripsina añadiendo 8mL de medio de crecimiento. Las células resuspendidas se transfieren a un tubo de centrifuga del tamaño óptimo, y se centrifugan durante 5 minutos a 200xg para precipitarlas. Después de la centrifugación, se aspira el sobrenadante y se resuspende el precipitado celular con medio de crecimiento para sembrar nuevas placas de 15cm con la cantidad de células suficientes para obtener la confluencia deseada, y se vuelven a cultivar las células en el incubador.

Este protocolo general descrito cuenta con algunas excepciones. En el caso de la línea HEK293QB, no es necesaria la tripsinización para el pase de los cultivos, por lo que se puede proceder directamente a la centrifugación después de lavar las células con PBS. Debido a la elevada adherencia de la línea DKZeo, su tripsinización se debe hacer con un volumen de 5mL de tripsina y durante 20 minutos. Y en el caso de las células PC12, se utiliza el mismo protocolo general, pero se ha de tener en cuenta que las placas donde se vayan a sembrar las células deben ser previamente tratadas con solución de colágeno para su correcta adherencia a la superficie de la placa.

Por otro lado, la línea Jurkat E6.1 no se adhiere a las placas, por lo que los primeros pasos del protocolo son diferentes. En este caso, esta línea se debe pasar cuando la concentración de células alcanza los 2×10^6 células/mL de cultivo, para lo cual es necesario el conteo de las células mediante un hemocitómetro. Cuando alcanzan esta concentración, se recoge todo el contenido del cultivo y se transfiere a un tubo de centrifuga apropiado para centrifugarlo 5 minutos a 200xg. Se aspira el sobrenadante y se resuspende el precipitado celular en medio de crecimiento, tras lo cual se vuelve a contar la concentración de células. Finalmente, sabiendo la concentración de células, se siembra el volumen de resuspendido suficiente en nuevas placas para obtener una concentración de 5×10^5 células/mL.

La línea 293F es una línea HEK293 adaptada a su crecimiento en suspensión, por lo que el protocolo de su cultivo es diferente al de las HEK293 en adherencia. Esta línea se cultiva en 200mL de su medio de crecimiento en frascos estériles de policarbonato de 2L (Corning), que se mantienen en agitación a 100rpm en un incubador a 37°C y un 5% de CO₂. Cuando el cultivo alcanza una concentración máxima de 2×10^6 células/mL (determinado con hemocitómetro) y en este momento se debe proceder a su pase para evitar la muerte celular por exceso de concentración. Para ello, se centrifuga el cultivo durante 5 minutos a 200xg y se resuspende el precipitado celular con 10mL de medio de crecimiento para, nuevamente, determinar la

concentración de células resuspendidas. Finalmente, se inocula en medio de cultivo fresco la cantidad suficiente de células para alcanzar una concentración final mínima de 5×10^5 células/mL.

2.2.2 TRANSFECCIÓN DE DNA EN CULTIVOS HEK293

Esta técnica se utiliza para la introducción de DNA plasmídico en células HEK293 y así permitir la expresión de los genes que codifica. Aquí se detalla el protocolo para la transfección en pozo de placa de 6 (aproximadamente 10^6 células HEK293), por lo que las cantidades deben escalarse en caso de querer transfectar una cantidad de células diferente.

En primer lugar, se prepara (por cada pozo a transfectar) una mezcla de $6 \mu\text{g}$ del plásmido de interés junto a $100 \mu\text{L}$ de solución NaCl al 0,9% (B. Braun). En paralelo, se prepara (por cada pozo) una mezcla de $13,5 \mu\text{L}$ de polietilenimina 10mM (PEI, PolyScience) en $100 \mu\text{L}$ de NaCl al 0,9%. Una vez preparadas las dos soluciones, se dejan atemperar a temperatura ambiente y se transfiere, gota a gota y en agitación constante, el contenido de la solución PEI/NaCl sobre la solución DNA/NaCl, y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Mientras transcurre la incubación, se substituye el medio de crecimiento del pozo de 6 que contiene el cultivo HEK293 a una confluencia del 70% por $700 \mu\text{L}$ de medio de transfección y, cuando finaliza la incubación, se añade la mezcla PEI/DNA/NaCl sobre el medio de transfección. Finalmente, se incuba el cultivo durante 3-4 horas en un incubador a 37°C y pasado este tiempo se substituye todo el sobrenadante por medio de crecimiento.

2.2.3 DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS S16

Para la diferenciación de la línea S16 a un fenotipo similar a células de Schwann, se siembran las células en placas de 6 pozos calculando una confluencia final aproximada del 50%, y se dejan adherirse o/n. Al día siguiente, se elimina el medio de crecimiento y se substituye por medio de diferenciación, que consiste en DMEM Low Glucose (1g/L), suplementado con un 1% (v/v) de P/S y sin suero. Se incuba el cultivo durante 72 horas, tras las cuales las células habrán adoptado la morfología de células de Schwann. Este protocolo conlleva una elevada mortandad celular.

2.2.4 CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN PRIMARIAS

Las células de Schwann primarias se obtuvieron a partir del nervio ciático de dos camadas de ratones de 4-5 días (aproximadamente 20 ratones). Los ratones neonatales se sacrificaron por dislocación cervical y se desinfectaron con etanol 70%, tras lo cual se extrajeron los nervios ciáticos en una campana de flujo laminar, manteniéndolos en una solución HBSS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (PAA) en hielo hasta acabar la disección de todos los animales. Una vez extraídos todos los nervios, se transfieren a una solución HBSS sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (PAA) suplementada con $0,11 \text{mg/mL}$ de DNasa I (Sigma), $0,89 \text{mg/mL}$ de colagenasa (Sigma) y $0,11\%$ de Tripsina 0,25% (Invitrogen). En esta solución de digestión, se incuban los nervios a 37°C durante 40 minutos, agitando los nervios por inversión cada 10 minutos, y después de la incubación se disgrega mecánicamente el tejido de los nervios pasándolos 10-15 veces a través de una pipeta Pasteur de vidrio.

Después, se deja reposar durante 2 minutos para que sedimenten los fragmentos no disgregados y se recupera el sobrenadante que contiene las células individuales. Al sedimento de tejido no disgregado se le añaden 2mL de medio DF-10 y se repite la disgregación mecánica para recuperar el máximo número posible de células individuales. Se juntan los dos sobrenadantes con células y se centrifugan 10 minutos a 100xg, tras lo cual se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado celular con 2mL de medio DF-10. Ya resuspendidas las células, se calcula la concentración con una hemocitómetro y se siembran 120.000 células por pozo en una placa de 24 pozos, que previamente ha sido tratada durante un mínimo de 1 hora a 37°C con una solución de Poly-D-Lysine (Sigma) a una concentración de 0,2mg/mL de PBS.

Al cabo de 20-24 horas después de sembrar los cultivos, se retira el sobrenadante y se substituye por un volumen de medio DF-10 equivalente a la mitad del volumen total del pozo. El sobrenadante del cultivo retirado se centrifuga a 100xg durante 5 minutos para precipitar restos celulares, y se recupera el sobrenadante (llamado medio condicionado). Se rellena la mitad de volumen que faltaba en los pozos con medio condicionado, y se reserva el medio condicionado sobrante a -20°C. Finalmente, se añade en el cultivo el antimetabólico AraC (Cytosine β -D-arabinofuranoside, Sigma) para obtener una concentración final en los pozos de 10 μ M, y se incuban los cultivos con el antimetabólico durante 24-30 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación con el antimetabólico, se descarta todo el medio de los pozos y se substituye por una mezcla 50%/50% de medio DF-10 fresco con medio condicionado guardado del día anterior. A esta mezcla se le deberá añadir, además, extracto de pituitaria bovina (PEX, Sigma) a una concentración de 20 μ g/mL y forskolin (Sigma) a una concentración 0,5 μ M.

A partir de este punto, cada 2-3 días se substituye la mitad del medio de cultivo por DF-10 fresco con PEX y forskolin hasta que las células estén confluentes y listas para su utilización (5-10 días).

2.2.5 CUANTIFICACIÓN DE LA FLUORESCENCIA EN CÉLULAS POR CITOMETRÍA

El primer paso consiste en la preparación de las muestras. En el caso de cultivos crecidos en adherencia, se aspira el sobrenadante de las placas y se lavan los cultivos con PBS. A continuación, se retira el PBS y se tripsinizan los cultivos para individualizar las células, tras lo cual se inhibe la tripsina añadiendo medio de crecimiento y se recoge todo el contenido para su centrifugación a 200xg durante 5 minutos. Después de la centrifugación, se descarta el sobrenadante, se fijan las células resuspendiéndolas en una solución PBS con p-formaldehído al 4% (marca) y se incuban durante 1 hora a 4°C en oscuridad. Una vez finalizada la incubación, se centrifugan nuevamente a 200xg durante 5 minutos y se resuspende el precipitado celular en 300-500 μ L de PBS y analiza la fluorescencia en un citómetro.

Para determinar el porcentaje de células GFP positivas, así como la intensidad de su señal, se ha utilizado el citómetro BD FACSCanto (BD Biosciences) del Servei de Cultius Cel·lulars, Producció d'Anticossos i Citometria (SCAC) de la UAB, y el análisis de los datos se realizó mediante el *software* FACSDiva 4.0 (BD Biosciences).

2.3 PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES

2.3.1 GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS *SHUTTLE* PARA PSEUDOTIPAR LOS VECTORES

En este apartado se detalla el procedimiento mediante el cual se generaron los vectores *shuttle* p8900 con cada uno de los *fibers* de interés. Al final, también se explica el protocolo para clonar los *fibers* en el vector *shuttle* intermedio pK18 y cómo, a partir de este último, se clonaron los *fibers* en el genoma completo del vector adenoviral.

- **p8900.F52s:** Para generar el plásmido p8900.F52s se encargó la síntesis del fragmento de DNA BamHI/Mfel del plásmido p8900.F5 (GeneArt), pero substituyendo la región correspondiente al gen F5 por la secuencia de DNA del F52s. Además, se mutaron los extremos del gen del *fiber* para generar las dianas de restricción XbaI (5') e MluI (3'), sin alterar a la traducción del gen, y estas mutaciones fueron TGCAGA→TCTAGA (XbaI) y AATCGT→ACGCGT (MluI). Una vez obtenido este DNA, se clonó en el vector p8900.F5 utilizando las dianas de restricción BamHI y Mfel.
- **p8900.S5K52:** El gen del *fiber* mixto, con *shaft* del F5 y *knob* del F52s, se generó mediante dos etapas de clonación de fragmentos de PCR. En la primera etapa, se realizó una PCR utilizando los *primers* StuS5K52 Fwd y S5BstzK52 Rv, utilizando como cadena molde el p8900.F5, obteniendo un amplicón que corresponde a la parte final del *shaft* del F5, que contiene una diana HpaI interna y, además, una diana BstZ171 introducida en su extremo 3' con el *primer* reverso. Este amplicón se clonó en el plásmido p8900.F5 utilizando las dianas de restricción HpaI y Mfel, obteniéndose un plásmido intermediario de clonación p8900.Stu, y se secuenció para descartar posibles mutaciones. Una vez finalizada la primera etapa de esta clonación, se procedió a la PCR de la segunda etapa. En esta PCR se utilizaron los *primers* SmaS5K52 Fwd y Fiber híbrido Rv, y para la PCR se utilizó como DNA molde el p8900.F52s. De esta manera, se obtiene un amplicón que contiene el *knob* del F52s (con una diana de restricción Mfel en el extremo 3'), y en su extremo 5' se encuentran la diana de restricción SmaI y la parte distal del *shaft* del F5 (ambas secuencias forman parte del *primer* directo). Una vez amplificado el inserto se digiere con los enzimas SmaI y Mfel, y se clona en el plásmido p8900.Stu abierto con los enzimas BstZ171 y Mfel, obteniéndose así la secuencia completa del *fiber* híbrido. Nuevamente, se confirmó la ausencia de mutaciones por secuenciación.
- **p8900.F52sR67N:** El primer paso para generar este vector *shuttle* fue encargar una secuencia de DNA sintética correspondiente al fragmento XbaI-StuI del p8900.F52s, pero con la mutación AGA→AAC para substituir el residuo arginina por asparagina. Además, se añadió una mutación adicional en el nucleótido 15 del gen del F52s (CCCGAG→CCCGGG) que incorpora una diana de restricción XmaI, de esta manera se facilita la identificación de clones positivos sin alterar la secuencia de la proteína traducida. Una vez obtenido el DNA sintético, se clonó en el vector p8900.F52s utilizando las dianas de restricción XbaI y StuI para, así, substituir el F52s por el F52sR67N en el vector *shuttle*.

Los tres vectores *shuttle* pK18 con los tres *fibers* se clonaron a partir de los vectores p8900 con el *fiber* correspondiente. Para ello, se linealizó el p8900 con *SpeI* y se clonó en un fragmento *NdeI-XmnI* de 11,5kb del pK18 por recombinación homóloga.

Finalmente, se clonaron los tres *fiber* en el genoma completo del adenovirus, linealizando sus respectivos vectores pK18 con el enzima *SnaBI* y, posteriormente, recombinándolo con el vector pKP1.4 Δ CMV linealizado con el enzima *SpeI*.

2.3.2 PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES A PARTIR DE PLÁSMIDO

Para producir los vectores virales a partir de la transfección de plásmido, se digieren 100 μ g del plásmido de interés durante 4 horas con 15U del enzima *PacI* en un volumen final de 200 μ L, y se corre una alícuota de 4 μ L de la digestión en un gel de agarosa al 1% para comprobar la digestión. Si la digestión da los productos esperados, se purifica el DNA de la digestión para su transfección en HEK293. Para ello, se añaden 20 μ L de una solución de acetato de sodio 3M a pH=5,2 y se mezcla el contenido. Después, se añaden otro 550 μ L de etanol absoluto frío y se vuelve a mezclar, tras lo cual se incuba la muestra durante al menos 30 minutos a -80°C. Transcurrido este tiempo, se precipita el DNA por centrifugación durante 25 minutos a una velocidad de 18.000xg y a una temperatura de 4°C. Se elimina el sobrenadante y se lava el precipitado con 500 μ L de etanol 70%. Se vuelve a precipitar el DNA por centrifugación durante 15 minutos a una velocidad de 18.000xg y a una temperatura de 4°C, se elimina el sobrenadante y se deja secar el DNA a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspende el DNA en 100 μ L de TE, se mide la concentración por espectrofotometría y se guarda hasta el momento de la transfección.

Una vez purificado el DNA digerido con *PacI*, se transfectan 4 pozos de cultivos HEK293 crecidos hasta el 70% de confluencia en placa de 6 pozos, a razón de 6 μ g de DNA por pozo. Tres días después de la transfección, se recoge todo el contenido de los pozos (células y sobrenadante) y se somete a tres ciclos de congelación y descongelación para lisar las células, tras lo cual se centrifuga el lisado a 4500xg durante 5 minutos para precipitar los restos celulares. Se recupera el sobrenadante, se transfiere la mitad del contenido a una placa de 10cm que contiene células HEK293 en medio de infección, y se incuba el cultivo a 37°C. A partir de este punto, se deberá observar el cultivo diariamente hasta que aparezca efecto citopático en las HEK293 (habitualmente entre 5-10 días), momento en el cual se debe recoger todo el contenido de la placa y someterlo a tres ciclos de congelación y descongelación. Nuevamente, se centrifuga el lisado a 4500xg durante 5 minutos y se transfieren 500 μ L del sobrenadante a una placa de 15cm con células HEK293 en medio de infección, y se incuba hasta la aparición de efecto citopático. En este momento, se vuelve a recoger y centrifugar el cultivo en las mismas condiciones que antes, se transfieren 100 μ L del sobrenadante a placas de 15cm con HEK293 en medio de infección hasta un total de 20 ó 40 placas, y se incuba hasta la aparición de efecto citopático. Cuando alcance el efecto citopático deseado, se reservan 15mL de sobrenadante del cultivo, se recogen las células con el sobrenadante restante, y se centrifugan a 200xg durante 5 minutos para precipitar las células, tras lo cual, se descarta el sobrenadante y se resuspende todo el precipitado celular con los 15mL de sobrenadante reservados anteriormente. Finalmente, las células resuspendidas se someten a tres ciclos de congelación y

descongelación, se centrifugan a 4500xg durante 5 minutos y se recupera el sobrenadante que contiene los vectores virales, que se guardará a -80°C hasta el momento de su purificación.

2.3.3 PURIFICACIÓN DE VECTORES VIRALES POR ULTRACENTRIFUGACIÓN

La purificación de los vectores adenovirales se realiza mediante dos ultracentrifugaciones seriadas en gradiente de CsCl. La primera centrifugación se da en un gradiente discontinuo de CsCl y para su preparación se colocan en un tubo de centrifugación (Beckman Coulter) 10mL de CsCl de densidad 1,40g/mL y, sobre estos, se colocan lentamente otros 10mL de CsCl de densidad 1,25g/mL evitando la mezcla de las dos fases. A continuación, se añade el sobrenadante que contiene los adenovirus teniendo cuidado de no distorsionar la separación entre las dos fases de CsCl y se añade la cantidad de PBS necesaria para rellenar completamente el tubo. Se centrifugan los virus durante 1 hora y 42 minutos a una velocidad de 32.000rpm en un rotor SW32 Ti (Beckman Coulter) a 18°C, y después de la centrifuga se extrae la banda correspondiente a las partículas virales con una aguja hipodérmica de 18G, teniendo en cuenta de aspirar un volumen máximo de 7-8mL, para proceder a la segunda centrifugación. Para preparar la segunda centrifugación, se colocan 5mL de CsCl de densidad 1,34g/mL en un tubo de centrífuga y, sobre estos, se añaden los vectores virales recuperados de la primera centrifugación. Nuevamente, se rellena la cantidad restante del tubo con PBS y se centrifuga durante 18 horas a 35.000rpm en un rotor SW40 Ti (Beckman Coulter) a 18°C. Después de la centrifugación, se aspira la banda correspondiente a los vectores virales maduros con una aguja hipodérmica de 18G en un volumen máximo de 2,5mL. Finalmente, se transfieren los vectores a una solución PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (PAA) utilizando una columna Sephadex PD-10 (Amersham Biosciences), y se añade un 10% (v/v) de glicerol para su criopreservación.

2.3.4 TITULACIÓN DE LAS PARTÍCULAS FÍSICAS VIRALES PURIFICADAS

Para titular las partículas físicas virales (PP/mL), se añade una cantidad de virus purificado de 5-10 μL en una solución TE con un 0,1% de SDS (Amresco) y se desnaturalizan las cápsides incubándolas a 56°C durante 10 minutos, tras lo cual se mide la absorbancia a 260nm y se aplica la fórmula $\text{PP/mL} = \text{Abs}_{260} \times 1,1 \times 10^{12}$ [73] para determinar la concentración de virus, valor que se deberá corregir por el volumen de muestra utilizado.

2.3.5 TÍTULACIÓN DE LAS UNIDADES INFECCIOSAS VIRALES

La titulación de las unidades infecciosas (IU/mL) se realiza mediante la preparación de diluciones seriadas del virus en medio de infección. Después, se transfieren 100 μL de cada dilución a un cultivo de HEK293 en placa de 96 para infectar las células, y se incuba el cultivo 48 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se cuenta el número de células transducidas y, teniendo en cuenta el volumen inicial de virus utilizado y los factores de dilución, se corrigen los cálculos para obtener las IU/mL.

Para todos los virus utilizados en esta tesis se ha utilizado el mismo protocolo para la determinación de las IU/mL, sin embargo el procedimiento de identificación de las células transducidas es varía en función del gen marcador que contengan los virus. En el caso de los

adenovirus con GFP, la identificación de células transducidas se hace mediante microscopía de fluorescencia. Cuando el gen marcador es β gal, se realiza una tinción del cultivo con X-gal y, para ello, se aspira el sobrenadante y se lavan las células con PBS, tras lo cual se añade una solución de fijación de p-formaldehído (Panreac) al 2% (w/v) en PBS y se incuba durante al menos 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se retira la solución de fijación, se vuelve a lavar el cultivo con PBS y se añade la solución de tinción X-gal, que se incubará durante 2 horas a 37°C en un incubador sin CO₂, tras lo cual se contará el número de células teñidas por microscopía de campo claro. En el caso de los virus que llevan como marcador la recombinasa Cre, la identificación de las células transducidas se hace por inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo anti-*hexon* del kit comercial AdEasy Viral Titer (Stratagene) y siguiendo el protocolo del fabricante.

Debido a la cantidad de lavados a los que se someten los cultivos para las titulaciones de los virus β gal y Cre, las placas de 96 fueron colagenadas antes de la siembra de las HEK293 para evitar la pérdida de células.

2.4 TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

2.4.1 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES SDS-PAGE

Las electroforesis de proteínas en SDS-PAGE de esta tesis se realizaron utilizando un gel separador con un 10% de acrilamida y un gel concentrador con un 4% de acrilamida. El separador se prepara utilizando 1mL de Acrilamida/bisacrilamida 29:1 al 40% (Amresco), 1mL de solución 4x Tris-HCl SDS pH=8,8 y 2mL de agua, y se induce su polimerización añadiendo 25 μ L de APS 10% y 5 μ L de tetrametiletilendiamina (TEMED, Sigma). La solución se deposita en los vidrios de electroforesis y se deja polimerizar mientras se prepara el gel concentrador. Para el gel concentrador se utilizan 0,195 μ L de Acrilamida/bisacrilamida 29:1 al 40%, 0,5mL de solución 4x Tris-HCl SDS pH=6,8 y 1,305mL de agua, y se añaden 25 μ L de APS 10% y 5 μ L de tetrametiletilendiamina (TEMED, Sigma) para inducir su polimerización. La solución del gel concentrador se deposita sobre el gel separador (ya polimerizado en los vidrios) y se coloca encima el peine para formar los pozos hasta su polimerización.

Por otro lado, se preparan las muestras de proteínas añadiéndole tampón de carga de proteínas y calentándolas durante 10 minutos a 100°C.

Ya con los geles polimerizados y las muestras de proteína preparadas se procede a la electroforesis. Se introducen los geles en la cubeta de electroforesis (Bio-Rad), se añade tampón de electroforesis y se cargan las muestras de proteína junto a un marcador de peso molecular de 10 a 180kDa (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific), que se corren durante 10 minutos a 90V, tras los cuales se aumenta el voltaje a 120V.

2.4.2 DETECCIÓN DE *FIBER* DE VIRUS PURIFICADO MEDIANTE WESTERN-BLOT

Para la detección del *fiber* en vectores adenovirales purificados mediante Western-Blot se corren 10¹⁰PP en un gel SDS-PAGE, y se transferirán las proteínas a una membrana para su detección.

Para preparar la transferencia, se cortan papeles *Whatman* (Thermo Fisher Scientific) y una membrana de PVDF (Amersham Hybond-P, GE Healthcare) del tamaño del gel. La membrana se activa sumergiéndola en metanol (Panreac) y se lava el exceso de metanol incubándola en agua destilada durante 5 minutos, tras los cuales se incuba la membrana con tampón de transferencia durante 10 minutos. Los papeles *Whatman* y el gel de acrilamida con las proteínas se incuban también en tampón de transferencia durante 10 minutos (*Whatman*) o 20 minutos (gel de acrilamida). Una vez preparados todos los elementos, se procede a la transferencia utilizando el sistema Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) durante 45 minutos a 30V.

Después de la transferencia de las proteínas separadas en el gel a la membrana de PVDF, se bloquea incubándola en tampón de bloqueo durante 1 hora en agitación. Tras bloquear la membrana, se incuba o/n en agitación a 4°C con el anticuerpo primario, que en este caso es el anticuerpo monoclonal 4D2 (*Anti-Adenovirus Fiber monomer and trimer antibody*, Abcam) y se prepara mediante una dilución en tampón de bloqueo en una proporción 1:500. Al día siguiente, se retira el anticuerpo primario y se realizan tres lavados de la membrana incubándola en tampón TBS-T durante 10 minutos en agitación, tras lo cual se incuba la membrana durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa Amersham ECL Anti-Mouse IgG (GE Healthcare), diluido en una proporción 1:10.000 en tampón de bloqueo. Finalmente, se hacen otros tres lavados de la membrana con TBS-T (en las mismas condiciones que los anteriores) y se procede a la detección de las bandas de proteína *fiber* utilizando los reactivos Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore) y una lámina fotosensible Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) para revelar las bandas de proteína *fiber*.

2.4.3 GENERACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

La generación de los vectores de expresión de proteína recombinante en procariontes se realizó por clonación de fragmentos de PCR. Para obtener la secuencia de DNA de la proteína con la última repetición *shaft* del F5 y el *knob* del F52s se usaron los *primers* Shaft5 Fw2 y rF52NotI, utilizando el p8900.F52s como DNA molde. Finalmente, el amplicón obtenido se clonó en el plásmido pGEX-6P-1 mediante las enzimas de restricción BamHI y EagI para, así, obtener el vector de expresión pGEX/Shaft5Knob52. Una vez clonado el gen, se comprobó la ausencia de mutaciones por secuenciación. Para generar el vector pGEX/Shaft52Knob52 se siguió el mismo protocolo, pero utilizando el *primer* directo Shaft52 Fw.

Los vectores de expresión de proteína recombinante en eucariotas (pEBG/Shaft5Knob52 y pEBG/Shaft52Knob52) se generaron obteniendo los insertos a partir de los vectores de expresión procariontes y clonándolos en el vector pEBG-2T a través de las dianas de restricción BamHI y EagI.

2.4.4 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN BACTERIAS

Protocolo utilizado para la obtención de proteínas recombinantes unidas a un *tag* GST producidas en cultivos bacterianos. El primer paso consiste en transformar los plásmidos pGEX/Shaft5Knob52 o pGEX/Shaft52Knob52 en bacterias de la cepa BL21, se inocula una de las colonias en 3mL de medio LB+Ampicilina+Cloranfenicol y se incuba o/n a 37°C en agitación.

Al día siguiente, se inocula todo el precultivo en 2L de medio LB+Ampicilina+Cloranfenicol y se deja crecer en agitación a 37°C hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,6 (3-5 horas), momento en el que se procede a la inducción de la expresión de la proteína recombinante. Para ello, se añade IPTG (Thermo Fisher Scientific) a una concentración final de 100µM y se crece el cultivo o/n a 28°C en agitación. Transcurrido este tiempo, se centrifugan los cultivos a 3.000xg durante 5 minutos, se descarta el sobrenadante y el precipitado de bacterias se somete a tres ciclos de congelación y descongelación, tras lo cual se resuspenden en 20mL de solución de lisis de bacterias a 4°C y se sonica el resuspendido para lisar las células. Este lisado se centrifuga a 4°C durante 10 minutos a 18.000xg y se recupera el sobrenadante que contiene las proteínas.

A partir del sobrenadante anterior se purificará la proteína recombinante unida a GST. Primero, se centrifugan 200µL de la resina Glutathione Sepharose 4B al 50% (GE Healthcare) durante 5 minutos a 500xg y se descarta el sobrenadante (solución conservante de la resina). Esta resina se lava con 1mL de solución de lisis de bacterias y se centrifuga otros 5 minutos a 500xg para, después, descartar el sobrenadante y repetir el lavado en las mismas condiciones. En este momento, se incuba la resina precipitada con el sobrenadante con el extracto de proteínas bacterianas durante 1-2 horas a 4°C en agitación continua por inversión para permitir la unión específica de la proteína recombinante a la resina. Después de esta incubación, se centrifuga la muestra 1 minuto a 500xg para precipitar la resina unida a la proteína recombinante y se descarta el sobrenadante. Este precipitado se lava con 1mL de solución de lavado y se precipita la resina con un pulso de centrifuga, tras lo cual se descarta el sobrenadante y se repite el procedimiento de lavado hasta un total de 4 veces. Se realiza un último lavado en 1mL de solución de elución para eliminar los restos de solución de lavado, y se repite tantas veces como sea necesario hasta que no aparezcan burbujas de detergente (contenido en la solución de lavado) y, una vez lavada la resina, se resuspende en 1mL de solución de elución y se le añade glutatión a una concentración final de 40mM, tras lo cual se incubará la mezcla durante 25 minutos en agitación a 1.000rpm. Finalmente, se centrifuga la muestra durante 1 minuto a 18.000xg y se recupera el sobrenadante, donde se encuentran las proteínas recombinantes purificadas.

Adicionalmente, se transfiere la proteína purificada a solución de elución fresca sin glutatión mediante un filtro de diálisis Slide-A-Lyzer 10K (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez dializadas, se cuantificó su concentración corriendo una alícuota de la muestra en un gel de acrilamida y tiñéndola mediante solución de Coomassie, utilizando también cantidades conocidas de BSA como referencia.

2.4.5 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN CULTIVOS CELULARES

Este es el protocolo que se utilizó para la obtención de proteínas recombinantes unidas a un *tag* GST producidas en cultivos de HEK293.

El primer paso consiste en transfectar los plásmidos pEBG/Shaft5Knob52 o pEBG/Shaft52Knob52 en 5 placas de cultivo de 15cm de células. A las 48 horas después de la transfección, se procede a la extracción de las proteínas celulares para lo que se retira el medio de crecimiento y se lavan los cultivos con PBS para, posteriormente, resuspender las células en 10mL de PBS fresco por cada placa. El resuspendido celular se centrifuga a 200xg

durante 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células nuevamente en la solución de lisis RIA, utilizando 1mL de solución por cada placa de cultivo inicial (5mL). Se sonicen las células en RIA para lisar las células y se centrifuga el lisado a 4°C durante 20 minutos a una velocidad de 18.000xg. Finalmente, se recupera el sobrenadante con el contenido proteico y se procede a la purificación y diálisis de la proteína recombinante unida a GST siguiendo el mismo procedimiento utilizado en el caso de los cultivos bacterianos.

2.4.6 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE MEMBRANA DE CULTIVOS 293F

La extracción de proteínas de membrana celulares para la identificación del receptor del F52s se realizó a partir de 10^9 células 293F (1L de cultivo). Primero se centrifuga el cultivo durante 5 minutos a 200xg, se resuspende el precipitado celular en 50mL de PBS frío (con inhibidores de proteasas) y se centrifuga a 4°C durante 5 minutos a 200xg. Después, se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en solución de homogenización fría para, a continuación, proceder a la ruptura mecánica en mortero para lisar las células, lo cual se debe hacer en hielo. Cuando el lisado está totalmente homogeneizado, se centrifuga a 400xg durante 15 minutos a 4°C para precipitar los restos celulares indeseados. Posteriormente, se centrifuga el sobrenadante a 200.000xg durante 1 hora en un rotor SW40 Ti (Beckman Coulter), tras lo cual se resuspende el precipitado en 3mL de solución de solubilización fría para solubilizar las proteínas de membrana.

Adicionalmente, se concentraron las proteínas hasta un volumen final de 500µL utilizando un filtro Amicon Ultra 10K (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4.7 ENSAYO DE PULL DOWN PARA IDENTIFICAR EL RECEPTOR DEL F52s

Este es el protocolo que se siguió para identificar el receptor de membrana del F52s utilizando las proteínas recombinantes GST-Shaft5Knob52 o GST-Shaft52Knob52 como cebo.

Primero, se centrifugan 50µL de la resina Glutathione Sepharose 4B al 50% (GE Healthcare) durante 5 minutos a 500xg y se descarta el sobrenadante (solución conservante de la resina). Esta resina se lava con 1mL de solución de solubilización y se centrifuga otros 5 minutos a 500xg para, después, descartar el sobrenadante y repetir el lavado en las mismas condiciones. En este momento, se incuban la resina precipitada con todo el extracto de proteínas de membrana solubilizadas obtenidas a partir de 10^9 células 293F durante 1-2 horas a 4°C en agitación continua por inversión para eliminar todas aquellas proteínas que se puedan unir a la resina de forma inespecífica. Después de esta incubación, se centrifuga la muestra 1 minuto a 500xg para precipitar la resina junto a las proteínas inespecíficas y se recupera el sobrenadante. A este sobrenadante se le añaden 25µg de la proteína recombinante cebo y 50µL de resina (previamente lavada y equilibrada en solución de homogenización) y se vuelve a incubar durante 1-2 horas a 4°C en agitación continua por inversión para permitir la unión del posible receptor celular a la proteína cebo que, a su vez, se une a la resina. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifuga el contenido durante 1 minuto a 500xg y se descarta el sobrenadante que contiene todas las proteínas no unidas a la resina. Se lava el precipitado con 1mL de solución de lavado y se precipita la resina con un pulso de centrifuga, tras lo cual se descarta el sobrenadante y se repite el procedimiento de lavado hasta un total de 4 veces. Se

realiza un último lavado en 1mL de solución de elución para eliminar los restos de solución de lavado, y se repite el lavado tres veces. Una vez lavada la resina, se resuspende en 50 μ L de solución de elución y se le añade glutatión a una concentración final de 40mM, tras lo cual se incubará la mezcla durante 25 minutos en agitación a 1.000rpm. Finalmente, se centrifuga la muestra durante 1 minuto a 18.000xg y se recupera el sobrenadante, donde se encuentran la proteína cebo purificadas junto a las proteínas de membrana que se hayan unido a ellas.

Para analizar las proteínas purificadas se corrió todo el contenido en un SDS-PAGE en gradiente de acrilamida (Bio-Rad) y se revelaron las bandas de proteína mediante tinción de Coomassie.

2.4.8 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE ACRILAMIDA POR TINCIÓN DE COOMASSIE

Para detectar bandas de proteínas en geles de acrilamida por tinción de Coomassie se sumerge el gel en la solución de tinción Coomassie y se incuba durante 1-2 horas en agitación a temperatura ambiente. Después de la incubación, se retira la solución de tinción y se realizan tres lavados rápidos con solución *de-stainer* tras los cuales se añade solución *de-stainer* fresca cubriendo el gel. A partir de este punto se incuba el gel en agitación a temperatura ambiente substituyendo la solución *de-stainer* cada 20-30 minutos hasta que solo se puedan distinguir las bandas de proteína.

2.4.9 ANÁLISIS DE LA TRIMERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA KNOB RECOMBINANTE

Este experimento se realizó para comprobar la trimerización de las proteínas recombinantes unidas a GST, basándose en la capacidad del glutaraldehído de reaccionar con los grupos amino de las proteínas para crear uniones covalentes intramoleculares. Sin embargo, esta reacción se puede ver inhibida por el tampón de pH Tris presente en la solución de elución que contiene las proteínas recombinantes purificadas, por lo que el primer paso consistió en substituir la solución de elución por PBS. Para hacer esto, se incubaron 10 μ g de proteína recombinante junto a 20 μ L de resina Glutathione Sepharose 4B (previamente lavada y equilibrada con PBS) durante 1 hora a 4°C en agitación por inversión constante, tras lo cual se centrifugó el contenido durante 5 minutos a 500xg y se descartó el sobrenadante. Después de la centrifugación, se lavó la resina precipitada con 1mL de PBS y se centrifugó durante 1 minuto a 500xg, repitiendo el proceso otras tres veces. Finalmente, se resuspendió la resina en 50 μ L de PBS con glutatión 40mM y se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos en agitación a 1000rpm, tras lo cual se centrifugó durante 1 minuto a 18.000xg para recuperar el sobrenadante de PBS con la proteína recombinante eluída, por lo que se procedió al experimento de trimerización.

Para el tratamiento de las proteínas recombinantes nos basamos en las condiciones de incubación utilizadas por Louis *et al.* [137], y consistía en añadir una solución de glutaraldehído (Panreac) diluido en PBS sobre las muestras de proteína recombinante hasta obtener una concentración final de 0, 100, 500 ó 1000nM de glutaraldehído. Una vez preparadas las muestras, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se desnaturalizaron las proteínas añadiendo incubándolas a 100°C durante 10 minutos con tampón de carga de

proteínas. Finalmente, se corrieron las muestras en un gel de acrilamida al 10% y se visualizaron las proteínas mediante tinción de Coomassie.

2.4.10 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE TEJIDOS PARA EL ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD BGALACTOSIDASA

El protocolo que se siguió para la extracción de proteínas de tejido fue el siguiente. Se seccionaba una muestra del tejido y se introducía en 100 μ L de una solución fría GalactoLysis Solution (Tropix) suplementada con DTT 1mM, PMSF 0,2mM y leupeptina 5 μ g/mL, y a partir de este punto siempre se trataba la muestra incubada en hielo. La pieza de tejido se homogeneizaba por sonicación y se añadía un volumen adicional de 100-300 μ L de solución fría GalactoLysis Solution. Posteriormente, se sometía el lisado a un ciclo de congelación y descongelación, y se centrifugaba a 4°C durante 5 minutos a 18.000xg, tras la cual se recuperaba el sobrenadante con las proteínas y se volvía a centrifugar en las mismas condiciones para acabar de precipitar restos de tejido no homogeneizados. Finalmente, se recuperaba el sobrenadante y se cuantificaba la concentración de proteína.

Para la determinación de la concentración de proteína se utilizó el kit comercial BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante para, posteriormente, medir la señal obtenida por luminometría. Se utilizaban estándares de BSA a una concentración conocida como referencia.

2.4.11 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD BGALACTOSIDASA EN EXTRACTOS DE PROTEÍNAS DE TEJIDOS MEDIANTE LUMINOMETRÍA

La cuantificación de la actividad β galactosidasa de los extractos de proteína de tejidos de ratón se realizó por luminometría utilizando el kit comercial Galacto-Light Plus (Tropix) siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de la señal se realizó en un luminómetro Victor III (Perkin Elmer) del Laboratori d'Anàlisi i Fotodocumentació de la Facultat de Biociències de la UAB. La lectura se realizaba pozo por pozo, incubando la muestra con 100 μ L de Light Emission Accelerator (Tropix) durante 1 segundo y, a continuación, leyendo la señal emitida durante 0,1 segundos.

Para poder comparar los resultados de diferentes ensayos se utilizó un estándar β galactosidasa de E.coli con una actividad 768U/mg (G4155-1KU, Sigma), preparándola según las recomendaciones del fabricante del kit Galacto-Light Plus.

2.5 EXPERIMENTOS *IN VITRO* CON VECTORES ADENOVIRALES

2.5.1 DETERMINACIÓN DEL CICLO VIRAL DEL Ad5/52s

En este protocolo se sembraron células HEK293 en placas de 24 pozos a una confluencia del 70% (aproximadamente 150.000 células), y se infectaron con el Ad5/52s-GFP a una MOI de 1 en 500 μ L de medio de infección. A las 12 horas p.i, se aspiró el sobrenadante y se lavaron los cultivos con PBS para, a continuación, añadir medio de infección fresco. A partir de este punto, se recogieron los cultivos a 22, 36, 40, 44, 48 y 60 horas p.i (tres pozos para cada tiempo),

recuperando tanto el sobrenadante como las células, y se sometieron a tres rondas de congelación y descongelación para lisar las células. Finalmente, se centrifugaron los lisados crudos durante 5 minutos a 4500xg y se recogió el sobrenadante para titular las IU mediante diluciones seriadas en cultivos HEK293 en placa de 96 pozos.

2.5.2 TRANSDUCCIÓN DE VECTORES EN CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES

Los experimentos de comparación de eficiencia de transducción en líneas celulares estables se hicieron sembrando cada línea en placas de 12 pozos en medio de crecimiento y dejándolas adherirse a la placa o/n. Al día siguiente, se tripsiniza un pozo de cada línea celular y se cuenta el número de células por pozo con un hemocitómetro para, a continuación, infectar cada pozo con los adenovirus Ad5-GFP, Ad5/52s-GFP o Ad5K52-GFP a la dosis deseada (10, 100 ó 1000PP/célula) en 1mL de medio de infección. Pasadas 48 horas, se observa la señal de fluorescencia por microscopía y se recogieron las células para cuantificar la señal fluorescente por citometría de flujo. Se utilizaron cultivos sin infectar de cada línea celular para determinar el nivel basal de fluorescencia.

En el caso de las células Jurkat E6.1, al ser cultivos no adherentes, se sembraron y se infectaron el mismo día, utilizando 10^6 células en 1mL de medio de infección.

2.5.3 TRANSDUCCIÓN DE VECTORES EN CÉLULAS S16 DIFERENCIADAS

Para la realización de este experimento se sembraron células S16 en placas de 12 pozos y se siguió el protocolo de diferenciación. A los tres días, las células tenían la morfología de S16 diferenciadas y se tripsinizó un pozo para contar las células con un hemocitómetro. Una vez determinado el número de células por pozo, se incubaron con los adenovirus Ad5-GFP o Ad5/52s-GFP a la dosis deseada (10, 100 ó 1000PP/célula) en 1mL de medio de infección, utilizando tres pozos para cada condición, y otros tres pozos sin incubar con virus como control negativo. Pasadas 48 horas, se observó la señal de fluorescencia por microscopía.

2.5.4 TRANSDUCCIÓN DE VECTORES EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE SCHWANN

El primer paso de este experimento fue el cultivo de células de Schwann primarias obtenidas a partir de nervio ciático de ratón en placas de 24 pozos, y cuando el cultivo llegó a confluencia se saltó un pozo para contar el número de células y se incubaron los cultivos con los vectores A5-GFP o Ad5/52s-GFP a la dosis deseada (50, 500 ó 5.000PP/célula) en 500 μ L de medio de crecimiento, utilizando tres pozos por cada condición, y otros tres sin virus. A las 48 horas, se observó la fluorescencia de las células por microscopía.

2.5.5 TRANSDUCCIÓN DE VECTORES EN ORGANOIDES INTESTINALES

El cultivo de los organoides intestinales lo hizo el grupo del Dr. Eduard Batlle de l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB) a partir de células madre intestinales (ISCs) de ratones Rosa26-CAG-loxP-mTomato/3x polyA-loxP-mEGFP. Una vez formados los organoides, se retiraron de la matriz tridimensional donde crecen para facilitar el contacto con los vectores adenovirales [472], y se incubaron durante 2 horas con los adenovirus Ad5-Cre o Ad5/52s-Cre a una dosis

estimada de 200PP/células. A continuación, se volvieron a sembrar los organoides en la matriz tridimensional y a las 72 horas se analizó la expresión de GFP por microscopía de confocal. En paralelo, se hizo el mismo proceso con organoides sin incubar con vector para tener control negativo de transducción.

2.5.6 INHIBICIÓN DE LA TRANSDUCCIÓN POR COMPETENCIA CON *KNOB* RECOMBINANTE

Este tipo de experimentos se realizaron tanto para analizar la independencia del F52s respecto a los receptores del F5, como para determinar la funcionalidad de las proteínas recombinantes unidas a GST.

Para analizar la de transducción de los adenovirus en cultivos con los receptores del F5 bloqueados, se sembraron células HEK293 en placas de 24 pozos, y al día siguiente se tripsinizó uno de los pozos para calcular el número de células totales con un hemocitómetro. Una vez contadas las células, se incubaron durante 2 horas con 0, 50, 100 ó 200ng de la proteína recombinante del *knob* del F5 (cedido por el Dr. André Lieber de la Universidad de Washington) y en un volumen de 500µL de medio de infección. Transcurrido este tiempo, se añadieron los vectores Ad5-GFP o Ad5/52s-GFP a una dosis de 0, 10 ó 20PP/célula y se incubaron los cultivos durante una hora, tras la cual se retiró el sobrenadante de los pozos, se lavaron los cultivos con PBS y se añadieron 500µL de medio de infección. Finalmente, se incubaron los cultivos durante 24 horas y se analizó la señal de fluorescencia por microscopía y por citometría de flujo. Se utilizaron tres pozos para cada condición de dosis de proteína y de virus.

En el caso del estudio de funcionalidad de las proteínas recombinantes unidas a GST se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente, pero la dosis utilizada de los adenovirus se incrementó a 50PP/célula, y solo se utilizaron las dosis de proteína recombinante de 0 y 200ng, que en este caso fueron GST-Shaft5Knob52, GST-Shaft52Knob52 y el *knob* recombinante del F5. Solo se observó la señal de fluorescencia por microscopía.

2.6 EXPERIMENTOS *IN VIVO* CON VECTORES ADENOVIRALES

2.6.1 BIODISTRIBUCIÓN DE LOS VECTORES POR ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA

En estos experimentos, se inyectaron 5×10^{10} PP de los vectores Ad5-βgal o Ad5/52s-βgal disueltos en 200µL de solución salina NaCl 0,9% estéril (B.Braun) a través de la vena caudal, utilizando 8 animales para cada vector. Tres días después, se sacrificaron los animales y se extrajeron los órganos deseados para la cuantificación de la expresión de gen marcador, que fueron los siguientes: tejido adiposo, bazo, cerebro, nervio ciático, corazón, hígado, músculo (*tibialis*), pulmón, páncreas, testículo y riñón.

2.6.2 ADMINISTRACIÓN INTRAMUSCULAR DE VECTORES

Para este experimento, se inyectaron 10^{10} PP de los vectores Ad5-βgal o Ad5/52s-βgal disueltos en 30µL de solución salina NaCl 0,9% estéril (B.Braun) directamente en el músculo *tibialis*, utilizando 8 animales para cada vector, previamente anestesiados con una mezcla de

ketamina/xilacina (10mg/1mg por kg, Bayer) administrada por vía intraperitoneal. Tres días después, se sacrificaron los animales y se extrajeron el propio músculo *tibialis*, hígado y para la cuantificación de la expresión de gen marcador.

2.6.3 ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE VECTORES

En este procedimiento, se inyectaron 3×10^{10} PP de los vectores Ad5- β gal o Ad5/52s- β gal disueltos en 50 μ L de solución salina NaCl 0,9% estéril (B.Braun) utilizando 8 animales para cada vector, previamente anestesiados con isoflurano (Esteve). Para la administración, se deposita el volumen de vector en el orificio nasal, permitiendo así su aspiración por el mecanismo de ventilación del animal. Tres días después, se sacrificaron los animales y se muestras de pulmón e hígado para la cuantificación de la expresión de gen marcador.

2.6.4 ELIMINACIÓN DE LAS CÉLULAS DE KUPFFER HEPÁTICAS CON CLORURO DE GADOLINIO

Las células de Kupffer hepáticas de los ratones se eliminaron administrando por vía intravenosa tres inyecciones de 200 μ L de solución salina NaCl 0,9% estéril (B.Braun) con GdCl₃ (Sigma) a 2mg/mL. Las tres inyecciones se realizaron a 6, 30 y 54 horas antes de la administración de los vectores.

2.6.5 DETERMINACIÓN DE LA ELIMINACIÓN EN SANGRE DE VECTORES

Para este experimento se inyectaron conjuntamente los vectores Ad5-RFP y Ad5/52s-GFP a través de la vena caudal en 8 animales, utilizando una dosis de 5×10^{10} PP/animal de cada vector en un total de 200 μ L de solución salina NaCl 0,9% estéril (B.Braun). Una vez administrados los vectores, se recogieron muestras de sangre a los 5, 20 y 60 minutos mediante punción en la vena facial de los ratones que se depositaron en tubos heparinizados para, a continuación, añadir 5 volúmenes de DMEM con 10% de FBS, y se congelaron inmediatamente. Una vez recogidas todas las muestras se procedió a la titulación de las IU y los genomas virales (VG) de ambos vectores en cada muestra.

La titulación de las IU se hizo mediante diluciones seriadas de las muestras, y estas diluciones se incubaron en cultivos de HEK293 en placas de 96 pozos, incubándolas durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se contaron el número de células transducidas por ambos virus observando por microscopía las señales fluorescentes roja y verde mediada por los genes marcadores de los adenovirus Ad5 y Ad5/52s, respectivamente.

La cuantificación de los VG hizo a partir de una alícuota de 10 μ L de muestra a los que se le añadieron 10 μ g de DNA de esperma de salmón y se llevó la mezcla a un volumen final de 200 μ L con PBS estéril. Posteriormente, realizó una extracción del DNA de las muestras utilizando el kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) y se siguieron las instrucciones del fabricante, eluyendo las muestras en 50 μ L de volumen para aumentar la concentración. Una vez extraído el DNA, se cuantificaron los VG de ambos vectores mediante PCR cuantitativa (qPCR).

2.6.6 CUANTIFICACIÓN DE LOS VECTORES EN FRACCIONES DE SANGRE

La separación de las fracciones de sangre plasma/plaquetas, RBC y WBC se realizó mediante centrifugaciones seriadas, utilizando 2mL de sangre (dos ratones) para cada muestra. Así pues, se coadministraron los vectores Ad5-RFP y Ad5/52s-GFP a través de la vena caudal de 12 ratones, a una dosis de 5×10^{10} PP de cada vector disueltos en un volumen total de 200 μ L y, 5 minutos después, se sacrificaron los animales y se exanguinaron. La sangre obtenida de dos ratones (aproximadamente 2mL) se recogió en un tubo de centrifuga en presencia de citrato de sodio (Panreac) a una concentración final de 11mM, y se procedió a su fraccionamiento.

El primer paso del fraccionamiento consiste en la centrifugación de las muestras a 100xg durante 10 minutos, tras lo cual se recoge el sobrenadante para obtener la fracción plasma/plaquetas y se guarda a -80°C. El precipitado celular obtenido de la centrifugación se resuspende en 2mL de PBS con de citrato de sodio a 11mM, se añaden otros 2mL de solución Hank's BSS (PAA) y se mezcla por inversión. A continuación, se pipetea 3mL de Ficoll-Paque Premium 1,084 (GE Healthcare) en un tubo de centrifuga nuevo, y se deposita el resuspendido celular encima del Ficoll con cuidado de que no se mezclen. Las muestras se centrifugan a 300xg durante 40 minutos, y en este punto es importante configurar la centrifuga para que se acelere y frene a la velocidad mínima posible para no alterar las diferentes fases. Finalmente, con esta centrifugación se consigue aislar las fracciones RBC y WBC, que quedan separadas por el Ficoll. Así pues, se recogen las dos fracciones y se resuspende cada una en 2mL de PBS con citrato de sodio a 11mM y se guardan a -80°C.

El cálculo de las IU de Ad5/52s-GFP y Ad5-RFP se hizo por titulación en HEK293 de diluciones seriadas de las muestras. En el caso de los VG, se utilizaron 200 μ L de muestra y se le añadieron 10 μ g de DNA de esperma de salmón para, posteriormente, extraer el DNA mediante el kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), y se cuantificaron los VG por qPCR.

2.6.7 INTERACCIÓN DE LOS VECTORES CON FRACCIONES DE SANGRE DE RATÓN *EX VIVO*

Para este experimento se fraccionó la sangre de dos ratones no tratados con virus, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Una vez obtenidas las fracciones plasma/plaquetas, RBC y WBC se atemperaron a 37°C y se incubaron por triplicado conjuntamente con los adenovirus Ad5-RFP y Ad5/52s-GFP a una concentración de $2,5 \times 10^9$ PP/mL de cada virus, durante 5 minutos a 37°C. Finalmente, se titularon las IU de ambos virus mediante diluciones seriadas de las muestras incubadas en cultivos HEK293 durante 48 horas, tras las cuales se contaron las células transducidas con cada virus por microscopía de fluorescencia.

3.7 ANÁLISIS INFORMÁTICO DE DATOS

2.7.1 COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LOS *FIBER*

Para comparar las secuencias de los dominios *tail* y *knob* de los *fibers* de varios serotipos se ha utilizado el *software* MEGA6 [473], con un algoritmo de reconstrucción filogenética de *Neighbour-joining*, un modelo de substitución basado en la *p-distance* y un tratamiento de los *Gaps* de *Pairwise deletion*.

2.7.2 CÁLCULOS ESTADÍSTICOS

Los gráficos de las imágenes de resultados se representan como la media de los valores obtenidos para cada grupo más el error estándar ($SEM = \sigma/\sqrt{n}$). Las diferencias entre grupos se analizaron con el *software* IBM SPSS Statistics (IBM) siguiendo el test estadístico adecuado a las condiciones del experimento (t-student o ANOVA de una vía). En cada gráfico se indica el nivel de significancia obtenido para las diferencias entre las medias, considerándose siempre que las éstas son significativas cuando $p < 0,05$.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Perdomini, M., et al., *Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich's ataxia*. Nat Med, 2014. **20**(5): p. 542-7.
2. Dudek, H., et al., *Knockdown of beta-catenin with dicer-substrate siRNAs reduces liver tumor burden in vivo*. Mol Ther, 2014. **22**(1): p. 92-101.
3. Adam, V.S., et al., *AAV9-mediated airway expression of antibody protects old and immunodeficient mice against influenza*. Clin Vaccine Immunol, 2014.
4. Blaese, R.M., et al., *T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years*. Science, 1995. **270**(5235): p. 475-80.
5. Cavazzana-Calvo, M., et al., *Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease*. Science, 2000. **288**(5466): p. 669-72.
6. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy*. N Engl J Med, 2002. **346**(16): p. 1185-93.
7. Sugamura, K., et al., *The common gamma-chain for multiple cytokine receptors*. Adv Immunol, 1995. **59**: p. 225-77.
8. He, Y.W., et al., *The common gamma-chain of cytokine receptors regulates intrathymic T cell development at multiple stages*. J Immunol, 1997. **158**(6): p. 2592-9.
9. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1*. Science, 2003. **302**(5644): p. 415-9.
10. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 3132-42.
11. Howe, S.J., et al., *Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 3143-50.
12. Pearson, S., H. Jia, and K. Kandachi, *China approves first gene therapy*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(1): p. 3-4.
13. Guo, J. and H. Xin, *Chinese gene therapy. Splicing out the West?* Science, 2006. **314**(5803): p. 1232-5.
14. Sandmair, A.M., et al., *Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses*. Hum Gene Ther, 2000. **11**(16): p. 2197-205.
15. Immonen, A., et al., *AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study*. Mol Ther, 2004. **10**(5): p. 967-72.
16. Mitchell, P., *Ark's gene therapy stumbles at the finish line*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(3): p. 183-4.
17. Gruber, K., *Europe gives gene therapy the green light*. Lancet, 2012. **380**(9855): p. e10.
18. Yla-Herttuala, S., *Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union*. Mol Ther, 2012. **20**(10): p. 1831-2.
19. Buning, H., *Gene therapy enters the pharma market: the short story of a long journey*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(1): p. 1-3.
20. Gaudet, D., et al., *Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial*. Gene Ther, 2013. **20**(4): p. 361-9.
21. Kawabata, K., Y. Takakura, and M. Hashida, *The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake*. Pharm Res, 1995. **12**(6): p. 825-30.
22. Aihara, H. and J. Miyazaki, *Gene transfer into muscle by electroporation in vivo*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(9): p. 867-70.
23. Maruyama, H., et al., *Skin-targeted gene transfer using in vivo electroporation*. Gene Ther, 2001. **8**(23): p. 1808-12.

24. Sakai, M., et al., *Hepatocyte-targeted gene transfer by combination of vascularly delivered plasmid DNA and in vivo electroporation*. *Gene Ther*, 2005. **12**(7): p. 607-16.
25. Pringle, I.A., et al., *Electroporation enhances reporter gene expression following delivery of naked plasmid DNA to the lung*. *J Gene Med*, 2007. **9**(5): p. 369-80.
26. Daud, A.I., et al., *Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(36): p. 5896-903.
27. Jiang, J., E. Yamato, and J. Miyazaki, *Intravenous delivery of naked plasmid DNA for in vivo cytokine expression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **289**(5): p. 1088-92.
28. Miao, C.H., X. Ye, and A.R. Thompson, *High-level factor VIII gene expression in vivo achieved by nonviral liver-specific gene therapy vectors*. *Hum Gene Ther*, 2003. **14**(14): p. 1297-305.
29. Chesnoy, S. and L. Huang, *Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000. **29**: p. 27-47.
30. Porteous, D.J., et al., *Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis*. *Gene Ther*, 1997. **4**(3): p. 210-8.
31. Hortobagyi, G.N., et al., *Cationic liposome-mediated E1A gene transfer to human breast and ovarian cancer cells and its biologic effects: a phase I clinical trial*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(14): p. 3422-33.
32. Matsumoto, K., et al., *A pilot study of human interferon beta gene therapy for patients with advanced melanoma by in vivo transduction using cationic liposomes*. *Jpn J Clin Oncol*, 2008. **38**(12): p. 849-56.
33. Ruiz, F.E., et al., *A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis*. *Hum Gene Ther*, 2001. **12**(7): p. 751-61.
34. Coll, J.L., et al., *In vivo delivery to tumors of DNA complexed with linear polyethylenimine*. *Hum Gene Ther*, 1999. **10**(10): p. 1659-66.
35. Konstan, M.W., et al., *Compacted DNA nanoparticles administered to the nasal mucosa of cystic fibrosis subjects are safe and demonstrate partial to complete cystic fibrosis transmembrane regulator reconstitution*. *Hum Gene Ther*, 2004. **15**(12): p. 1255-69.
36. Louis, M.H., et al., *Intraperitoneal linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery to ovarian carcinoma nodes in mice*. *Cancer Gene Ther*, 2006. **13**(4): p. 367-74.
37. Pantarotto, D., et al., *Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004. **43**(39): p. 5242-6.
38. Gao, L., et al., *Carbon nanotube delivery of the GFP gene into mammalian cells*. *ChemBiochem*, 2006. **7**(2): p. 239-42.
39. Podesta, J.E., et al., *Antitumor activity and prolonged survival by carbon-nanotube-mediated therapeutic siRNA silencing in a human lung xenograft model*. *Small*, 2009. **5**(10): p. 1176-85.
40. Al-Jamal, K.T., et al., *Functional motor recovery from brain ischemic insult by carbon nanotube-mediated siRNA silencing*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(27): p. 10952-7.
41. Poland, C.A., et al., *Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study*. *Nat Nanotechnol*, 2008. **3**(7): p. 423-8.
42. Wang, L., et al., *Carbon nanotubes induce malignant transformation and tumorigenesis of human lung epithelial cells*. *Nano Lett*, 2011. **11**(7): p. 2796-803.
43. Nagai, H., et al., *Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(49): p. E1330-8.
44. Ellis, J. and A. Bernstein, *Gene targeting with retroviral vectors: recombination by gene conversion into regions of nonhomology*. *Mol Cell Biol*, 1989. **9**(4): p. 1621-7.

45. Laufs, S., et al., *Insertion of retroviral vectors in NOD/SCID repopulating human peripheral blood progenitor cells occurs preferentially in the vicinity of transcription start regions and in introns*. Mol Ther, 2004. **10**(5): p. 874-81.
46. Miller, D.G., M.A. Adam, and A.D. Miller, *Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(8): p. 4239-42.
47. Roe, T., et al., *Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis*. EMBO J, 1993. **12**(5): p. 2099-108.
48. Gallay, P., et al., *HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9825-30.
49. Bouyac-Bertoia, M., et al., *HIV-1 infection requires a functional integrase NLS*. Mol Cell, 2001. **7**(5): p. 1025-35.
50. Melnick, J.L., et al., *Association of 20-Millimicron Particles with Adenoviruses*. J Bacteriol, 1965. **90**(1): p. 271-4.
51. Hoggan, M.D., N.R. Blacklow, and W.P. Rowe, *Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1966. **55**(6): p. 1467-74.
52. Yang, Y. and J.M. Wilson, *Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4+ CTLs in vivo*. J Immunol, 1995. **155**(5): p. 2564-70.
53. Yang, Y., Q. Su, and J.M. Wilson, *Role of viral antigens in destructive cellular immune responses to adenovirus vector-transduced cells in mouse lungs*. J Virol, 1996. **70**(10): p. 7209-12.
54. Cots, D., A. Bosch, and M. Chillon, *Helper dependent adenovirus vectors: progress and future prospects*. Curr Gene Ther, 2013. **13**(5): p. 370-81.
55. GREEN, R.G., et al., *EPIZOOTIC FOX ENCEPHALITIS. I. GENERAL DESCRIPTION*. American Journal of Epidemiology, 1930. **12**(1): p. 109-129.
56. Rowe, W.P., et al., *Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture*. Proc Soc Exp Biol Med, 1953. **84**(3): p. 570-3.
57. Cabasso, V.J., et al., *Propagation of infectious canine hepatitis virus in tissue culture*. Proc Soc Exp Biol Med, 1954. **85**(2): p. 239-45.
58. Doszpoly, A., et al., *Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles*. Infect Genet Evol, 2013. **17**: p. 106-12.
59. Robinson, C.M., et al., *Molecular evolution of human adenoviruses*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 1812.
60. Kajon, A.E., et al., *Molecular epidemiology of adenovirus type 4 infections in US military recruits in the postvaccination era (1997-2003)*. J Infect Dis, 2007. **196**(1): p. 67-75.
61. Metzgar, D., et al., *Abrupt emergence of diverse species B adenoviruses at US military recruit training centers*. J Infect Dis, 2007. **196**(10): p. 1465-73.
62. Radin, J.M., et al., *Dramatic Decline of Respiratory Illness Among US Military Recruits After the Renewed Use of Adenovirus Vaccines*. Clin Infect Dis, 2014. **59**(7): p. 962-8.
63. Uhnoo, I., et al., *Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children*. J Clin Microbiol, 1984. **20**(3): p. 365-72.
64. Shimizu, H., et al., *An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru City, Japan*. Infect Genet Evol, 2007. **7**(2): p. 279-84.
65. de Freitas, E.R., et al., *Molecular characterization of adenovirus detected from fecal samples obtained from children in the Central West region of Brazil*. Arch Virol, 2010. **155**(10): p. 1693-6.

66. Williamson, W.M., et al., *Enteric viruses in New Zealand drinking-water sources*. Water Sci Technol, 2011. **63**(8): p. 1744-51.
67. Hartmann, N.M., et al., *Monitoring of adenovirus serotypes in environmental samples by combined PCR and melting point analyses*. Virol J, 2013. **10**: p. 190.
68. van Oostrum, J. and R.M. Burnett, *Molecular composition of the adenovirus type 2 virion*. J Virol, 1985. **56**(2): p. 439-48.
69. Vellinga, J., S. Van der Heijdt, and R.C. Hoeben, *The adenovirus capsid: major progress in minor proteins*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 6): p. 1581-8.
70. Stewart, P.L., et al., *Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus*. Cell, 1991. **67**(1): p. 145-54.
71. Valentine, R.C. and H.G. Pereira, *Antigens and structure of the adenovirus*. Reprinted from *J. Mol. Biol.* 1965; 13: 13-20. Rev Med Virol, 2003. **13**(2): p. 71-82; discussion 80-3.
72. Rux, J.J. and R.M. Burnett, *Adenovirus structure*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(12): p. 1167-76.
73. Maizel, J.V., Jr., D.O. White, and M.D. Scharff, *The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12*. Virology, 1968. **36**(1): p. 115-25.
74. Giberson, A.N., A.R. Davidson, and R.J. Parks, *Chromatin structure of adenovirus DNA throughout infection*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(6): p. 2369-76.
75. Laver, W.G., N.G. Wrigley, and H.G. Pereira, *Removal of pentons from particles of adenovirus type 2*. Virology, 1969. **39**(3): p. 599-604.
76. Stewart, P.L., S.D. Fuller, and R.M. Burnett, *Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy*. EMBO J, 1993. **12**(7): p. 2589-99.
77. Horne, R., et al., *The icosahedral form of an adenovirus*. J Mol Biol, 1959. **1**(1): p. 84-115.
78. Roberts, M.M., et al., *Three-dimensional structure of the adenovirus major coat protein hexon*. Science, 1986. **232**(4754): p. 1148-51.
79. Rux, J.J., P.R. Kuser, and R.M. Burnett, *Structural and phylogenetic analysis of adenovirus hexons by use of high-resolution x-ray crystallographic, molecular modeling, and sequence-based methods*. J Virol, 2003. **77**(17): p. 9553-66.
80. Zubieta, C., et al., *The structure of the human adenovirus 2 penton*. Mol Cell, 2005. **17**(1): p. 121-35.
81. Fabry, C.M., et al., *A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid*. EMBO J, 2005. **24**(9): p. 1645-54.
82. Saban, S.D., et al., *Visualization of alpha-helices in a 6-angstrom resolution cryoelectron microscopy structure of adenovirus allows refinement of capsid protein assignments*. J Virol, 2006. **80**(24): p. 12049-59.
83. Liu, H., et al., *Atomic structure of human adenovirus by cryo-EM reveals interactions among protein networks*. Science, 2010. **329**(5995): p. 1038-43.
84. Reddy, V.S., et al., *Crystal structure of human adenovirus at 3.5 Å resolution*. Science, 2010. **329**(5995): p. 1071-5.
85. Prage, L., et al., *Structural proteins of adenoviruses. IV. Sequential degradation of the adenovirus type 2 virion*. Virology, 1970. **42**(2): p. 341-58.
86. Crowther, R.A. and R.M. Franklin, *The structure of the groups of nine hexons from adenovirus*. J Mol Biol, 1972. **68**(1): p. 181-4.
87. Everitt, E., et al., *Structural proteins of adenoviruses. X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2*. Virology, 1973. **52**(1): p. 130-47.

88. Furcinitti, P.S., J. van Oostrum, and R.M. Burnett, *Adenovirus polypeptide IX revealed as capsid cement by difference images from electron microscopy and crystallography*. EMBO J, 1989. **8**(12): p. 3563-70.
89. San Martin, C., *Latest insights on adenovirus structure and assembly*. Viruses, 2012. **4**(5): p. 847-77.
90. Grutter, M. and R.M. Franklin, *Studies on the molecular weight of the adenovirus type 2 hexon and its subunit*. J Mol Biol, 1974. **89**(1): p. 163-78.
91. Pereira, H.G., R.C. Valentine, and W.C. Russell, *Crystallization of an adenovirus protein (the hexon)*. Nature, 1968. **219**(5157): p. 946-7.
92. Ginsberg, H.S., et al., *A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits*. Virology, 1966. **28**(4): p. 782-3.
93. Burnett, R.M., M.G. Grutter, and J.L. White, *The structure of the adenovirus capsid. I. An envelope model of hexon at 6 Å resolution*. J Mol Biol, 1985. **185**(1): p. 105-23.
94. Shortridge, K.F. and F. Biddle, *The proteins of adenovirus type 5*. Arch Gesamte Virusforsch, 1970. **29**(1): p. 1-24.
95. Cepko, C.L. and P.A. Sharp, *Assembly of adenovirus major capsid protein is mediated by a nonvirion protein*. Cell, 1982. **31**(2 Pt 1): p. 407-15.
96. Hong, S.S., et al., *The 100K-chaperone protein from adenovirus serotype 2 (Subgroup C) assists in trimerization and nuclear localization of hexons from subgroups C and B adenoviruses*. J Mol Biol, 2005. **352**(1): p. 125-38.
97. Ebner, K., W. Pinsker, and T. Lion, *Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications*. J Virol, 2005. **79**(20): p. 12635-42.
98. Crawford-Miksza, L. and D.P. Schnurr, *Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues*. J Virol, 1996. **70**(3): p. 1836-44.
99. Roberts, D.M., et al., *Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 239-43.
100. Gall, J.G., R.G. Crystal, and E. Falck-Pedersen, *Construction and characterization of hexon-chimeric adenoviruses: specification of adenovirus serotype*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 10260-4.
101. Roy, S., et al., *Circumvention of immunity to the adenovirus major coat protein hexon*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6875-9.
102. Waddington, S.N., et al., *Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer*. Cell, 2008. **132**(3): p. 397-409.
103. Alba, R., et al., *Identification of coagulation factor (F)X binding sites on the adenovirus serotype 5 hexon: effect of mutagenesis on FX interactions and gene transfer*. Blood, 2009. **114**(5): p. 965-71.
104. Fender, P., et al., *Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(1): p. 52-6.
105. Galinier, R., et al., *Adenovirus protein involved in virus internalization recruits ubiquitin-protein ligases*. Biochemistry, 2002. **41**(48): p. 14299-305.
106. Madisch, I., et al., *Phylogenetic analysis and structural predictions of human adenovirus penton proteins as a basis for tissue-specific adenovirus vector design*. J Virol, 2007. **81**(15): p. 8270-81.
107. Stewart, P.L., et al., *Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization*. EMBO J, 1997. **16**(6): p. 1189-98.
108. Bai, M., B. Harfe, and P. Freimuth, *Mutations that alter an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells*. J Virol, 1993. **67**(9): p. 5198-205.

109. Wickham, T.J., et al., *Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment*. Cell, 1993. **73**(2): p. 309-19.
110. Wickham, T.J., et al., *Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization*. J Cell Biol, 1994. **127**(1): p. 257-64.
111. Chiu, C.Y., et al., *Structure of adenovirus complexed with its internalization receptor, alphavbeta5 integrin*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 6759-68.
112. Mathias, P., et al., *Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection*. J Virol, 1994. **68**(10): p. 6811-4.
113. Roelvink, P.W., I. Kovesdi, and T.J. Wickham, *Comparative analysis of adenovirus fiber-cell interaction: adenovirus type 2 (Ad2) and Ad9 utilize the same cellular fiber receptor but use different binding strategies for attachment*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 7614-21.
114. Jones, M.S., 2nd, et al., *New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5978-84.
115. Albinsson, B. and A.H. Kidd, *Adenovirus type 41 lacks an RGD alpha(v)-integrin binding motif on the penton base and undergoes delayed uptake in A549 cells*. Virus Res, 1999. **64**(2): p. 125-36.
116. Liu, H., L. Wu, and Z.H. Zhou, *Model of the trimeric fiber and its interactions with the pentameric penton base of human adenovirus by cryo-electron microscopy*. J Mol Biol, 2011. **406**(5): p. 764-74.
117. Cao, C., et al., *Conserved fiber-penton base interaction revealed by nearly atomic resolution cryo-electron microscopy of the structure of adenovirus provides insight into receptor interaction*. J Virol, 2012. **86**(22): p. 12322-9.
118. Schoehn, G., et al., *Adenovirus 3 penton dodecahedron exhibits structural changes of the base on fibre binding*. EMBO J, 1996. **15**(24): p. 6841-6.
119. Laver, W.G., H.B. Younghusband, and N.G. Wrigley, *Purification and properties of chick embryo lethal orphan virus (an avian adenovirus)*. Virology, 1971. **45**(3): p. 598-614.
120. Hess, M., et al., *The avian adenovirus penton: two fibres and one base*. J Mol Biol, 1995. **252**(4): p. 379-85.
121. Penzes, J.J., et al., *Molecular characterization of a lizard adenovirus reveals the first atadenovirus with two fiber genes and the first adenovirus with either one short or three long fibers per penton*. J Virol, 2014. **88**(19): p. 11304-14.
122. Kidd, A.H., et al., *Adenovirus type 40 virions contain two distinct fibers*. Virology, 1993. **192**(1): p. 73-84.
123. Yeh, H.Y., et al., *Human adenovirus type 41 contains two fibers*. Virus Res, 1994. **33**(2): p. 179-98.
124. Kovacs, G.M., et al., *Complete genome sequence of simian adenovirus 1: an Old World monkey adenovirus with two fiber genes*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 6): p. 1681-6.
125. Philipson, L., K. Lonberg-Holm, and U. Pettersson, *Virus-receptor interaction in an adenovirus system*. J Virol, 1968. **2**(10): p. 1064-75.
126. Shayakhmetov, D.M. and A. Lieber, *Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain*. J Virol, 2000. **74**(22): p. 10274-86.
127. Nicklin, S.A., et al., *The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy*. Mol Ther, 2005. **12**(3): p. 384-93.
128. Legrand, V., et al., *Fiberless recombinant adenoviruses: virus maturation and infectivity in the absence of fiber*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 907-19.
129. Tarassishin, L., et al., *An epitope on the adenovirus fibre tail is common to all human subgroups*. Arch Virol, 2000. **145**(4): p. 805-11.
130. Darr, S., et al., *Phylogeny and primary structure analysis of fiber shafts of all human adenovirus types for rational design of adenoviral gene-therapy vectors*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 12): p. 2849-54.

131. Green, N.M., et al., *Evidence for a repeating cross-beta sheet structure in the adenovirus fibre*. EMBO J, 1983. **2**(8): p. 1357-65.
132. van Raaij, M.J., et al., *A triple beta-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein*. Nature, 1999. **401**(6756): p. 935-8.
133. Seki, T., et al., *Artificial extension of the adenovirus fiber shaft inhibits infectivity in coxsackievirus and adenovirus receptor-positive cell lines*. J Virol, 2002. **76**(3): p. 1100-8.
134. Seki, T., et al., *Fiber shaft extension in combination with HI loop ligands augments infectivity for CAR-negative tumor targets but does not enhance hepatotropism in vivo*. Gene Ther, 2002. **9**(16): p. 1101-8.
135. Chroboczek, J., R.W. Ruigrok, and S. Cusack, *Adenovirus fiber*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **199 (Pt 1)**: p. 163-200.
136. Wu, E., et al., *Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction*. J Virol, 2003. **77**(13): p. 7225-35.
137. Louis, N., et al., *Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber*. J Virol, 1994. **68**(6): p. 4104-6.
138. Henry, L.J., et al., *Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in Escherichia coli*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 5239-46.
139. Xia, D., et al., *Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution*. Structure, 1994. **2**(12): p. 1259-70.
140. Hong, J.S. and J.A. Engler, *Domains required for assembly of adenovirus type 2 fiber trimers*. J Virol, 1996. **70**(10): p. 7071-8.
141. Law, L.K. and B.L. Davidson, *What does it take to bind CAR?* Mol Ther, 2005. **12**(4): p. 599-609.
142. Bewley, M.C., et al., *Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR*. Science, 1999. **286**(5444): p. 1579-83.
143. Roelvink, P.W., et al., *Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae*. Science, 1999. **286**(5444): p. 1568-71.
144. Kirby, I., et al., *Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein*. J Virol, 2000. **74**(6): p. 2804-13.
145. Reddy, V.S. and G.R. Nemerow, *Structures and organization of adenovirus cement proteins provide insights into the role of capsid maturation in virus entry and infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(32): p. 11715-20.
146. Boudin, M.L., et al., *Human adenovirus type 2 protein IIIa. II. Maturation and encapsidation*. Virology, 1980. **101**(1): p. 144-56.
147. San Martin, C., et al., *Localization of the N-terminus of minor coat protein IIIa in the adenovirus capsid*. J Mol Biol, 2008. **383**(4): p. 923-34.
148. D'Halluin, J.C., et al., *Temperature-sensitive mutant of adenovirus type 2 blocked in virion assembly: accumulation of light intermediate particles*. J Virol, 1978. **26**(2): p. 344-56.
149. Chroboczek, J., F. Viard, and J.C. D'Halluin, *Human adenovirus 2 temperature-sensitive mutant 112 contains three mutations in the protein IIIa gene*. Gene, 1986. **49**(1): p. 157-60.
150. van Raaij, M.J., et al., *Structure of the human adenovirus serotype 2 fiber head domain at 1.5 Å resolution*. Virology, 1999. **262**(2): p. 333-43.
151. Ma, H.C. and P. Hearing, *Adenovirus structural protein IIIa is involved in the serotype specificity of viral DNA packaging*. J Virol, 2011. **85**(15): p. 7849-55.
152. Saban, S.D., et al., *CryoEM structure at 9 Å resolution of an adenovirus vector targeted to hematopoietic cells*. J Mol Biol, 2005. **349**(3): p. 526-37.
153. Alestrom, P., et al., *The gene for polypeptide IX of adenovirus type 2 and its unspliced messenger RNA*. Cell, 1980. **19**(3): p. 671-81.

154. Maizel, J.V., Jr., D.O. White, and M.D. Scharff, *The polypeptides of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, top components and the structure of the virion*. *Virology*, 1968. **36**(1): p. 126-36.
155. Colby, W.W. and T. Shenk, *Adenovirus type 5 virions can be assembled in vivo in the absence of detectable polypeptide IX*. *J Virol*, 1981. **39**(3): p. 977-80.
156. Lutz, P., M. Rosa-Calatrava, and C. Keding, *The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator*. *J Virol*, 1997. **71**(7): p. 5102-9.
157. Sargent, K.L., R.A. Meulenbroek, and R.J. Parks, *Activation of adenoviral gene expression by protein IX is not required for efficient virus replication*. *J Virol*, 2004. **78**(10): p. 5032-7.
158. Wodrich, H., et al., *Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear transport signals*. *EMBO J*, 2003. **22**(23): p. 6245-55.
159. Mangel, W.F., et al., *Viral DNA and a viral peptide can act as cofactors of adenovirus virion proteinase activity*. *Nature*, 1993. **361**(6409): p. 274-5.
160. Wiethoff, C.M., et al., *Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly*. *J Virol*, 2005. **79**(4): p. 1992-2000.
161. Maier, O., et al., *An N-terminal domain of adenovirus protein VI fragments membranes by inducing positive membrane curvature*. *Virology*, 2010. **402**(1): p. 11-9.
162. Moyer, C.L., et al., *Functional genetic and biophysical analyses of membrane disruption by human adenovirus*. *J Virol*, 2011. **85**(6): p. 2631-41.
163. Russell, W.C., *Adenoviruses: update on structure and function*. *J Gen Virol*, 2009. **90**(Pt 1): p. 1-20.
164. Burg, J.L., J. Schweitzer, and E. Daniell, *Introduction of superhelical turns into DNA by adenoviral core proteins and chromatin assembly factors*. *J Virol*, 1983. **46**(3): p. 749-55.
165. Vayda, M.E., A.E. Rogers, and S.J. Flint, *The structure of nucleoprotein cores released from adenovirions*. *Nucleic Acids Res*, 1983. **11**(2): p. 441-60.
166. Perez-Vargas, J., et al., *Isolation and characterization of the DNA and protein binding activities of adenovirus core protein V*. *J Virol*, 2014. **88**(16): p. 9287-96.
167. Anderson, C.W., M.E. Young, and S.J. Flint, *Characterization of the adenovirus 2 virion protein, mu*. *Virology*, 1989. **172**(2): p. 506-12.
168. Perez-Berna, A.J., et al., *Structure and uncoating of immature adenovirus*. *J Mol Biol*, 2009. **392**(2): p. 547-57.
169. Christensen, J.B., et al., *Presence of the adenovirus IVa2 protein at a single vertex of the mature virion*. *J Virol*, 2008. **82**(18): p. 9086-93.
170. Webster, A., et al., *Role of preterminal protein processing in adenovirus replication*. *J Virol*, 1997. **71**(9): p. 6381-9.
171. Greber, U.F., et al., *The role of the adenovirus protease on virus entry into cells*. *EMBO J*, 1996. **15**(8): p. 1766-77.
172. Davison, A.J., M. Benko, and B. Harrach, *Genetic content and evolution of adenoviruses*. *J Gen Virol*, 2003. **84**(Pt 11): p. 2895-908.
173. Tribouley, C., et al., *The product of the adenovirus intermediate gene IVa2 is a transcriptional activator of the major late promoter*. *J Virol*, 1994. **68**(7): p. 4450-7.
174. Morris, S.J., G.E. Scott, and K.N. Leppard, *Adenovirus late-phase infection is controlled by a novel L4 promoter*. *J Virol*, 2010. **84**(14): p. 7096-104.
175. Tollefson, A.E., et al., *Identification of a new human adenovirus protein encoded by a novel late I-strand transcription unit*. *J Virol*, 2007. **81**(23): p. 12918-26.
176. Ying, B., A.E. Tollefson, and W.S. Wold, *Identification of a previously unrecognized promoter that drives expression of the UXP transcription unit in the human adenovirus type 5 genome*. *J Virol*, 2010. **84**(21): p. 11470-8.

177. Zhao, H., M. Chen, and U. Pettersson, *A new look at adenovirus splicing*. *Virology*, 2014. **456-457**: p. 329-41.
178. Akusjarvi, G., et al., *Structure of genes for virus-associated RNAI and RNAlI of adenovirus type 2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(5): p. 2424-8.
179. Ma, Y. and M.B. Mathews, *Structure, function, and evolution of adenovirus-associated RNA: a phylogenetic approach*. *J Virol*, 1996. **70**(8): p. 5083-99.
180. Launer-Felty, K. and J.L. Cole, *Domain interactions in adenovirus VAI RNA mediate high-affinity PKR binding*. *J Mol Biol*, 2014. **426**(6): p. 1285-95.
181. Hearing, P., et al., *Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome*. *J Virol*, 1987. **61**(8): p. 2555-8.
182. Grable, M. and P. Hearing, *Adenovirus type 5 packaging domain is composed of a repeated element that is functionally redundant*. *J Virol*, 1990. **64**(5): p. 2047-56.
183. Alba, R., et al., *Altering the Ad5 packaging domain affects the maturation of the Ad particles*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e19564.
184. Nakano, M.Y., et al., *The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol*. *J Virol*, 2000. **74**(15): p. 7085-95.
185. Burckhardt, C.J., et al., *Drifting motions of the adenovirus receptor CAR and immobile integrins initiate virus uncoating and membrane lytic protein exposure*. *Cell Host Microbe*, 2011. **10**(2): p. 105-17.
186. Lindert, S., et al., *Cryo-electron microscopy structure of an adenovirus-integrin complex indicates conformational changes in both penton base and integrin*. *J Virol*, 2009. **83**(22): p. 11491-501.
187. Wang, K., et al., *Adenovirus internalization and infection require dynamin*. *J Virol*, 1998. **72**(4): p. 3455-8.
188. Li, E., et al., *Adenovirus endocytosis via alpha(v) integrins requires phosphoinositide-3-OH kinase*. *J Virol*, 1998. **72**(3): p. 2055-61.
189. Li, E., et al., *Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases*. *J Virol*, 1998. **72**(11): p. 8806-12.
190. Amstutz, B., et al., *Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3*. *EMBO J*, 2008. **27**(7): p. 956-69.
191. Kalin, S., et al., *Macropinocytotic uptake and infection of human epithelial cells with species B2 adenovirus type 35*. *J Virol*, 2010. **84**(10): p. 5336-50.
192. Yousuf, M.A., et al., *Caveolin-1 associated adenovirus entry into human corneal cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e77462.
193. Salinas, S., et al., *CAR-associated vesicular transport of an adenovirus in motor neuron axons*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(5): p. e1000442.
194. Brabec, M., et al., *Opening of size-selective pores in endosomes during human rhinovirus serotype 2 in vivo uncoating monitored by single-organelle flow analysis*. *J Virol*, 2005. **79**(2): p. 1008-16.
195. Seth, P., et al., *Role of a low-pH environment in adenovirus enhancement of the toxicity of a Pseudomonas exotoxin-epidermal growth factor conjugate*. *J Virol*, 1984. **51**(3): p. 650-5.
196. Seth, P., M.C. Willingham, and I. Pastan, *Binding of adenovirus and its external proteins to Triton X-114. Dependence on pH*. *J Biol Chem*, 1985. **260**(27): p. 14431-4.
197. Wohlfart, C., *Neutralization of adenoviruses: kinetics, stoichiometry, and mechanisms*. *J Virol*, 1988. **62**(7): p. 2321-8.
198. Suomalainen, M., et al., *A direct and versatile assay measuring membrane penetration of adenovirus in single cells*. *J Virol*, 2013. **87**(22): p. 12367-79.

199. Maier, O. and C.M. Wiethoff, *N-terminal alpha-helix-independent membrane interactions facilitate adenovirus protein VI induction of membrane tubule formation*. *Virology*, 2010. **408**(1): p. 31-8.
200. Miyazawa, N., et al., *Fiber swap between adenovirus subgroups B and C alters intracellular trafficking of adenovirus gene transfer vectors*. *J Virol*, 1999. **73**(7): p. 6056-65.
201. Shayakhmetov, D.M., et al., *The interaction between the fiber knob domain and the cellular attachment receptor determines the intracellular trafficking route of adenoviruses*. *J Virol*, 2003. **77**(6): p. 3712-23.
202. Leopold, P.L., et al., *Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis*. *Hum Gene Ther*, 2000. **11**(1): p. 151-65.
203. Yea, C., et al., *Microtubule-mediated and microtubule-independent transport of adenovirus type 5 in HEK293 cells*. *J Virol*, 2007. **81**(13): p. 6899-908.
204. Suomalainen, M., et al., *Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus*. *J Cell Biol*, 1999. **144**(4): p. 657-72.
205. Bremner, K.H., et al., *Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit*. *Cell Host Microbe*, 2009. **6**(6): p. 523-35.
206. Scherer, J., J. Yi, and R.B. Vallee, *PKA-dependent dynein switching from lysosomes to adenovirus: a novel form of host-virus competition*. *J Cell Biol*, 2014. **205**(2): p. 163-77.
207. Suomalainen, M., et al., *Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus*. *EMBO J*, 2001. **20**(6): p. 1310-9.
208. Scherer, J. and R.B. Vallee, *Adenovirus recruits dynein by an evolutionary novel mechanism involving direct binding to pH-primed hexon*. *Viruses*, 2011. **3**(8): p. 1417-31.
209. Wodrich, H., et al., *A capsid-encoded PPxY-motif facilitates adenovirus entry*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(3): p. e1000808.
210. Greber, U.F., et al., *The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry*. *EMBO J*, 1997. **16**(19): p. 5998-6007.
211. Ribbeck, K. and D. Gorlich, *Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes*. *EMBO J*, 2001. **20**(6): p. 1320-30.
212. Hindley, C.E., F.J. Lawrence, and D.A. Matthews, *A role for transportin in the nuclear import of adenovirus core proteins and DNA*. *Traffic*, 2007. **8**(10): p. 1313-22.
213. Trotman, L.C., et al., *Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(12): p. 1092-100.
214. Cassany, A., et al., *Nuclear import of adenovirus DNA involves direct interaction of hexon with an N-terminal domain of the nucleoporin Nup214*. *J Virol*, 2015. **89**(3): p. 1719-30.
215. Strunze, S., et al., *Kinesin-1-mediated capsid disassembly and disruption of the nuclear pore complex promote virus infection*. *Cell Host Microbe*, 2011. **10**(3): p. 210-23.
216. Wong, C.M., et al., *The role of chromatin in adenoviral vector function*. *Viruses*, 2013. **5**(6): p. 1500-15.
217. Berk, A.J., et al., *Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs*. *Cell*, 1979. **17**(4): p. 935-44.
218. Hearing, P. and T. Shenk, *The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element*. *Cell*, 1983. **33**(3): p. 695-703.
219. Berk, A.J., *Adenovirus promoters and E1A transactivation*. *Annu Rev Genet*, 1986. **20**: p. 45-79.
220. Chellappan, S.P., et al., *The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein*. *Cell*, 1991. **65**(6): p. 1053-61.

221. Bandara, L.R. and N.B. La Thangue, *Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor*. *Nature*, 1991. **351**(6326): p. 494-7.
222. Arroyo, M. and P. Raychaudhuri, *Retinoblastoma-repression of E2F-dependent transcription depends on the ability of the retinoblastoma protein to interact with E2F and is abrogated by the adenovirus E1A oncoprotein*. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(22): p. 5947-54.
223. Kovcsdi, I., R. Reichel, and J.R. Nevins, *Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(8): p. 2180-4.
224. Tamanoi, F. and B.W. Stillman, *Function of adenovirus terminal protein in the initiation of DNA replication*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(7): p. 2221-5.
225. Temperley, S.M. and R.T. Hay, *Recognition of the adenovirus type 2 origin of DNA replication by the virally encoded DNA polymerase and preterminal proteins*. *EMBO J*, 1992. **11**(2): p. 761-8.
226. van Breukelen, B., et al., *Adenovirus type 5 DNA binding protein stimulates binding of DNA polymerase to the replication origin*. *J Virol*, 2003. **77**(2): p. 915-22.
227. Mysiak, M.E., et al., *NFI and Oct-1 bend the Ad5 origin in the same direction leading to optimal DNA replication*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(21): p. 6218-25.
228. King, A.J. and P.C. van der Vliet, *A precursor terminal protein-trinucleotide intermediate during initiation of adenovirus DNA replication: regeneration of molecular ends in vitro by a jumping back mechanism*. *EMBO J*, 1994. **13**(23): p. 5786-92.
229. King, A.J., W.R. Teertstra, and P.C. van der Vliet, *Dissociation of the protein primer and DNA polymerase after initiation of adenovirus DNA replication*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(39): p. 24617-23.
230. Lindenbaum, J.O., J. Field, and J. Hurwitz, *The adenovirus DNA binding protein and adenovirus DNA polymerase interact to catalyze elongation of primed DNA templates*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(22): p. 10218-27.
231. Zijderveld, D.C. and P.C. van der Vliet, *Helix-destabilizing properties of the adenovirus DNA-binding protein*. *J Virol*, 1994. **68**(2): p. 1158-64.
232. Dekker, J., et al., *Multimerization of the adenovirus DNA-binding protein is the driving force for ATP-independent DNA unwinding during strand displacement synthesis*. *EMBO J*, 1997. **16**(6): p. 1455-63.
233. Lechner, R.L. and T.J. Kelly, Jr., *The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules*. *Cell*, 1977. **12**(4): p. 1007-20.
234. Farley, D.C., J.L. Brown, and K.N. Leppard, *Activation of the early-late switch in adenovirus type 5 major late transcription unit expression by L4 gene products*. *J Virol*, 2004. **78**(4): p. 1782-91.
235. Wright, J., et al., *The Human Adenovirus Type 5 L4 Promoter Is Negatively Regulated by TFII-I and L4-33K*. *J Virol*, 2015. **89**(14): p. 7053-63.
236. Wright, J. and K.N. Leppard, *The human adenovirus 5 L4 promoter is activated by cellular stress response protein p53*. *J Virol*, 2013. **87**(21): p. 11617-25.
237. Iftode, C. and S.J. Flint, *Viral DNA synthesis-dependent titration of a cellular repressor activates transcription of the human adenovirus type 2 IVa2 gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(51): p. 17831-6.
238. Zhang, W., et al., *Role for the adenovirus IVa2 protein in packaging of viral DNA*. *J Virol*, 2001. **75**(21): p. 10446-54.
239. Ostapchuk, P., et al., *The L4 22-kilodalton protein plays a role in packaging of the adenovirus genome*. *J Virol*, 2006. **80**(14): p. 6973-81.
240. Wohl, B.P. and P. Hearing, *Role for the L1-52/55K protein in the serotype specificity of adenovirus DNA packaging*. *J Virol*, 2008. **82**(10): p. 5089-92.

241. Zhang, W. and M.J. Imperiale, *Interaction of the adenovirus IVa2 protein with viral packaging sequences*. J Virol, 2000. **74**(6): p. 2687-93.
242. Tyler, R.E., S.G. Ewing, and M.J. Imperiale, *Formation of a multiple protein complex on the adenovirus packaging sequence by the IVa2 protein*. J Virol, 2007. **81**(7): p. 3447-54.
243. Ewing, S.G., et al., *Ternary complex formation on the adenovirus packaging sequence by the IVa2 and L4 22-kilodalton proteins*. J Virol, 2007. **81**(22): p. 12450-7.
244. Wu, K., D. Orozco, and P. Hearing, *The adenovirus L4-22K protein is multifunctional and is an integral component of crucial aspects of infection*. J Virol, 2012. **86**(19): p. 10474-83.
245. Ostapchuk, P. and P. Hearing, *Adenovirus IVa2 protein binds ATP*. J Virol, 2008. **82**(20): p. 10290-4.
246. Ostapchuk, P., M. Almond, and P. Hearing, *Characterization of Empty adenovirus particles assembled in the absence of a functional adenovirus IVa2 protein*. J Virol, 2011. **85**(11): p. 5524-31.
247. Mangel, W.F. and C. San Martin, *Structure, function and dynamics in adenovirus maturation*. Viruses, 2014. **6**(11): p. 4536-70.
248. Tollefson, A.E., et al., *The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants*. Virology, 1996. **220**(1): p. 152-62.
249. Doronin, K., et al., *Overexpression of the ADP (E3-11.6K) protein increases cell lysis and spread of adenovirus*. Virology, 2003. **305**(2): p. 378-87.
250. Scaria, A., et al., *The E3-11.6K protein of adenovirus is an Asn-glycosylated integral membrane protein that localizes to the nuclear membrane*. Virology, 1992. **191**(2): p. 743-53.
251. Tollefson, A.E., et al., *The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells*. J Virol, 1996. **70**(4): p. 2296-306.
252. Subramanian, T., S. Vijayalingam, and G. Chinnadurai, *Genetic identification of adenovirus type 5 genes that influence viral spread*. J Virol, 2006. **80**(4): p. 2000-12.
253. Walters, R.W., et al., *Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape*. Cell, 2002. **110**(6): p. 789-99.
254. Trotman, L.C., et al., *Non-classical export of an adenovirus structural protein*. Traffic, 2003. **4**(6): p. 390-402.
255. Rebetz, J., et al., *Fiber mediated receptor masking in non-infected bystander cells restricts adenovirus cell killing effect but promotes adenovirus host co-existence*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8484.
256. Lu, Z.Z., et al., *Penton-dodecahedral particles trigger opening of intercellular junctions and facilitate viral spread during adenovirus serotype 3 infection of epithelial cells*. PLoS Pathog, 2013. **9**(10): p. e1003718.
257. Harui, A., et al., *Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 6141-6.
258. Stephen, S.L., V.G. Sivanandam, and S. Kochanek, *Homologous and heterologous recombination between adenovirus vector DNA and chromosomal DNA*. J Gene Med, 2008. **10**(11): p. 1176-89.
259. Stephen, S.L., et al., *Chromosomal integration of adenoviral vector DNA in vivo*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 9987-94.
260. Lusky, M., *Good manufacturing practice production of adenoviral vectors for clinical trials*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(3): p. 281-91.
261. McConnell, M.J. and M.J. Imperiale, *Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(11): p. 1022-33.

262. Gallimore, P.H. and A.S. Turnell, *Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience*. *Oncogene*, 2001. **20**(54): p. 7824-35.
263. Wimmer, P., et al., *Adenovirus type 5 early encoded proteins of the E1 and E4 regions induce oncogenic transformation of primary rabbit cells*. *J Gen Virol*, 2010. **91**(Pt 7): p. 1828-33.
264. Kovesdi, I. and S.J. Hedley, *Adenoviral producer cells*. *Viruses*, 2010. **2**(8): p. 1681-703.
265. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. *J Gen Virol*, 1977. **36**(1): p. 59-74.
266. Louis, N., C. Eveleigh, and F.L. Graham, *Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line*. *Virology*, 1997. **233**(2): p. 423-9.
267. Saha, B., C.M. Wong, and R.J. Parks, *The adenovirus genome contributes to the structural stability of the virion*. *Viruses*, 2014. **6**(9): p. 3563-83.
268. Shayakhmetov, D.M., et al., *Genome size and structure determine efficiency of postinternalization steps and gene transfer of capsid-modified adenovirus vectors in a cell-type-specific manner*. *J Virol*, 2004. **78**(18): p. 10009-22.
269. Parks, R.J. and F.L. Graham, *A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging*. *J Virol*, 1997. **71**(4): p. 3293-8.
270. Suzuki, T., et al., *Development of a recombinant adenovirus vector production system free of replication-competent adenovirus by utilizing a packaging size limit of the viral genome*. *Virus Res*, 2011. **158**(1-2): p. 154-60.
271. Fallaux, F.J., A.J. van der Eb, and R.C. Hoeben, *Who's afraid of replication-competent adenoviruses?* *Gene Ther*, 1999. **6**(5): p. 709-12.
272. Yang, Y., et al., *Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(10): p. 4407-11.
273. Zsengeller, Z.K., et al., *Persistence of replication-deficient adenovirus-mediated gene transfer in lungs of immune-deficient (nu/nu) mice*. *Hum Gene Ther*, 1995. **6**(4): p. 457-67.
274. Amalfitano, A., et al., *Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted*. *J Virol*, 1998. **72**(2): p. 926-33.
275. Gorziglia, M.I., et al., *Generation of an adenovirus vector lacking E1, e2a, E3, and all of E4 except open reading frame 3*. *J Virol*, 1999. **73**(7): p. 6048-55.
276. Everett, R.S., et al., *Liver toxicities typically induced by first-generation adenoviral vectors can be reduced by use of E1, E2b-deleted adenoviral vectors*. *Hum Gene Ther*, 2003. **14**(18): p. 1715-26.
277. Amalfitano, A. and J.S. Chamberlain, *Isolation and characterization of packaging cell lines that coexpress the adenovirus E1, DNA polymerase, and preterminal proteins: implications for gene therapy*. *Gene Ther*, 1997. **4**(3): p. 258-63.
278. Kochanek, S., et al., *A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(12): p. 5731-6.
279. Morsy, M.A., et al., *An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(14): p. 7866-71.
280. Ng, P., et al., *Development of a FLP/frt system for generating helper-dependent adenoviral vectors*. *Mol Ther*, 2001. **3**(5 Pt 1): p. 809-15.
281. Umana, P., et al., *Efficient FLPe recombinase enables scalable production of helper-dependent adenoviral vectors with negligible helper-virus contamination*. *Nat Biotechnol*, 2001. **19**(6): p. 582-5.

282. Zhou, H., et al., *A Cre-expressing cell line and an E1/E2a double-deleted virus for preparation of helper-dependent adenovirus vector*. *Mol Ther*, 2001. **3**(4): p. 613-22.
283. Ng, P., et al., *Cre levels limit packaging signal excision efficiency in the Cre/loxP helper-dependent adenoviral vector system*. *J Virol*, 2002. **76**(9): p. 4181-9.
284. Sargent, K.L., et al., *Development of a size-restricted pIX-deleted helper virus for amplification of helper-dependent adenovirus vectors*. *Gene Ther*, 2004. **11**(6): p. 504-11.
285. Soudais, C., N. Skander, and E.J. Kremer, *Long-term in vivo transduction of neurons throughout the rat CNS using novel helper-dependent CAV-2 vectors*. *FASEB J*, 2004. **18**(2): p. 391-3.
286. Kremer, E.J., et al., *Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer*. *J Virol*, 2000. **74**(1): p. 505-12.
287. Soudais, C., et al., *Preferential transduction of neurons by canine adenovirus vectors and their efficient retrograde transport in vivo*. *FASEB J*, 2001. **15**(12): p. 2283-5.
288. Li, X., et al., *Bovine adenovirus serotype 3 utilizes sialic acid as a cellular receptor for virus entry*. *Virology*, 2009. **392**(2): p. 162-8.
289. Sharma, A., et al., *Comparative analysis of vector biodistribution, persistence and gene expression following intravenous delivery of bovine, porcine and human adenoviral vectors in a mouse model*. *Virology*, 2009. **386**(1): p. 44-54.
290. Sharma, A., et al., *Evaluation of innate immunity and vector toxicity following inoculation of bovine, porcine or human adenoviral vectors in a mouse model*. *Virus Res*, 2010. **153**(1): p. 134-42.
291. Bangari, D.S. and S.K. Mittal, *Porcine adenovirus serotype 3 internalization is independent of CAR and alphavbeta3 or alphavbeta5 integrin*. *Virology*, 2005. **332**(1): p. 157-66.
292. Bangari, D.S. and S.K. Mittal, *Porcine adenoviral vectors evade preexisting humoral immunity to adenoviruses and efficiently infect both human and murine cells in culture*. *Virus Res*, 2004. **105**(2): p. 127-36.
293. Capone, S., et al., *Development of chimpanzee adenoviruses as vaccine vectors: challenges and successes emerging from clinical trials*. *Expert Rev Vaccines*, 2013. **12**(4): p. 379-93.
294. Paris, R., et al., *Adenovirus type 4 and 7 vaccination or adenovirus type 4 respiratory infection elicits minimal cross-reactive antibody responses to nonhuman adenovirus vaccine vectors*. *Clin Vaccine Immunol*, 2014. **21**(5): p. 783-6.
295. Farina, S.F., et al., *Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus*. *J Virol*, 2001. **75**(23): p. 11603-13.
296. Quinn, K.M., et al., *Comparative analysis of the magnitude, quality, phenotype, and protective capacity of simian immunodeficiency virus gag-specific CD8+ T cells following human-, simian-, and chimpanzee-derived recombinant adenoviral vector immunization*. *J Immunol*, 2013. **190**(6): p. 2720-35.
297. Ersching, J., et al., *Neutralizing antibodies to human and simian adenoviruses in humans and New-World monkeys*. *Virology*, 2010. **407**(1): p. 1-6.
298. Jian, L., et al., *The prevalence of neutralising antibodies to chimpanzee adenovirus type 6 and type 7 in healthy adult volunteers, patients with chronic hepatitis B and patients with primary hepatocellular carcinoma in China*. *Arch Virol*, 2014. **159**(3): p. 465-70.
299. Zhang, S., et al., *Seroprevalence of neutralizing antibodies to human adenoviruses type-5 and type-26 and chimpanzee adenovirus type-68 in healthy Chinese adults*. *J Med Virol*, 2013. **85**(6): p. 1077-84.
300. Koizumi, N., et al., *Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced IL-6 production*. *J Immunol*, 2007. **178**(3): p. 1767-73.

301. Hong, S.S., et al., *Adenovirus stripping: a versatile method to generate adenovirus vectors with new cell target specificity*. Mol Ther, 2003. **7**(5 Pt 1): p. 692-9.
302. Matthews, Q.L., et al., *HIV antigen incorporation within adenovirus hexon hypervariable 2 for a novel HIV vaccine approach*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11815.
303. Wickham, T.J., et al., *Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies*. J Virol, 1996. **70**(10): p. 6831-8.
304. Dmitriev, I.P., E.A. Kashentseva, and D.T. Curiel, *Engineering of adenovirus vectors containing heterologous peptide sequences in the C terminus of capsid protein IX*. J Virol, 2002. **76**(14): p. 6893-9.
305. Kanerva, A., et al., *Targeting adenovirus to the serotype 3 receptor increases gene transfer efficiency to ovarian cancer cells*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(1): p. 275-80.
306. Sakurai, F., H. Mizuguchi, and T. Hayakawa, *Efficient gene transfer into human CD34+ cells by an adenovirus type 35 vector*. Gene Ther, 2003. **10**(12): p. 1041-8.
307. Lecollinet, S., et al., *Improved gene delivery to intestinal mucosa by adenoviral vectors bearing subgroup B and d fibers*. J Virol, 2006. **80**(6): p. 2747-59.
308. Wang, H., et al., *In vitro and in vivo properties of adenovirus vectors with increased affinity to CD46*. J Virol, 2008. **82**(21): p. 10567-79.
309. Liu, Y., et al., *Transduction of liver metastases after intravenous injection of Ad5/35 or Ad35 vectors with and without factor X-binding protein pretreatment*. Hum Gene Ther, 2009. **20**(6): p. 621-9.
310. Rodriguez, E., et al., *Short-fiber protein of ad40 confers enteric tropism and protection against acidic gastrointestinal conditions*. Hum Gene Ther Methods, 2013. **24**(4): p. 195-204.
311. Von Seggern, D.J., et al., *Complementation of a fibre mutant adenovirus by packaging cell lines stably expressing the adenovirus type 5 fibre protein*. J Gen Virol, 1998. **79** (Pt 6): p. 1461-8.
312. Miralles, M., et al., *Efficient amplification of chimeric adenovirus 5/40S vectors carrying the short fiber protein of Ad40 in suspension cell cultures*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e42073.
313. Arnberg, N., *Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors*. Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(8): p. 442-8.
314. Lenman, A., et al., *Human adenovirus 52 uses sialic acid-containing glycoproteins and the coxsackie and adenovirus receptor for binding to target cells*. PLoS Pathog, 2015. **11**(2): p. e1004657.
315. Bergelson, J.M., et al., *Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5*. Science, 1997. **275**(5304): p. 1320-3.
316. Roelvink, P.W., et al., *The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F*. J Virol, 1998. **72**(10): p. 7909-15.
317. Kirby, I., et al., *Adenovirus type 9 fiber knob binds to the coxsackie B virus-adenovirus receptor (CAR) with lower affinity than fiber knobs of other CAR-binding adenovirus serotypes*. J Virol, 2001. **75**(15): p. 7210-4.
318. Tan, P.K., et al., *Defining CAR as a cellular receptor for the avian adenovirus CELO using a genetic analysis of the two viral fibre proteins*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 6): p. 1465-72.
319. Coyne, C.B. and J.M. Bergelson, *CAR: a virus receptor within the tight junction*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(6): p. 869-82.
320. Freimuth, P., et al., *Coxsackievirus and adenovirus receptor amino-terminal immunoglobulin V-related domain binds adenovirus type 2 and fiber knob from adenovirus type 12*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1392-8.

321. Excoffon, K.J., G.L. Traver, and J. Zabner, *The role of the extracellular domain in the biology of the coxsackievirus and adenovirus receptor*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005. **32**(6): p. 498-503.
322. Wang, X. and J.M. Bergelson, *Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection*. *J Virol*, 1999. **73**(3): p. 2559-62.
323. Loustalot, F., E.J. Kremer, and S. Salinas, *The Intracellular Domain of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Differentially Influences Adenovirus Entry*. *J Virol*, 2015. **89**(18): p. 9417-26.
324. Walters, R.W., et al., *Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(15): p. 10219-26.
325. Cohen, C.J., et al., *Multiple regions within the coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(27): p. 25392-8.
326. Excoffon, K.J., et al., *Isoform-specific regulation and localization of the coxsackie and adenovirus receptor in human airway epithelia*. *PLoS One*, 2010. **5**(3): p. e9909.
327. Excoffon, K.J., J.R. Bowers, and P. Sharma, *1. Alternative splicing of viral receptors: A review of the diverse morphologies and physiologies of adenoviral receptors*. *Recent Res Dev Virol*, 2014. **9**: p. 1-24.
328. Tomko, R.P., R. Xu, and L. Philipson, *HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(7): p. 3352-6.
329. Nalbantoglu, J., et al., *Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells*. *Hum Gene Ther*, 1999. **10**(6): p. 1009-19.
330. Tomko, R.P., et al., *Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob*. *Exp Cell Res*, 2000. **255**(1): p. 47-55.
331. Nemerow, G.R. and P.L. Stewart, *Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999. **63**(3): p. 725-34.
332. Stewart, P.L. and G.R. Nemerow, *Cell integrins: commonly used receptors for diverse viral pathogens*. *Trends Microbiol*, 2007. **15**(11): p. 500-7.
333. Davison, E., et al., *Adenovirus type 5 uptake by lung adenocarcinoma cells in culture correlates with Ad5 fibre binding is mediated by alpha(v)beta1 integrin and can be modulated by changes in beta1 integrin function*. *J Gene Med*, 2001. **3**(6): p. 550-9.
334. Li, E., et al., *Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor*. *J Virol*, 2001. **75**(11): p. 5405-9.
335. Salone, B., et al., *Integrin alpha3beta1 is an alternative cellular receptor for adenovirus serotype 5*. *J Virol*, 2003. **77**(24): p. 13448-54.
336. Davison, E., et al., *Integrin alpha5beta1-mediated adenovirus infection is enhanced by the integrin-activating antibody TS2/16*. *J Virol*, 1997. **71**(8): p. 6204-7.
337. Huang, S., et al., *Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells*. *J Virol*, 1996. **70**(7): p. 4502-8.
338. Liszewski, M.K., T.W. Post, and J.P. Atkinson, *Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster*. *Annu Rev Immunol*, 1991. **9**: p. 431-55.
339. Liszewski, M.K., et al., *Emerging roles and new functions of CD46*. *Springer Semin Immunopathol*, 2005. **27**(3): p. 345-58.
340. Cattaneo, R., *Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet*. *J Virol*, 2004. **78**(9): p. 4385-8.

341. Gaggar, A., D.M. Shayakhmetov, and A. Lieber, *CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses*. *Nat Med*, 2003. **9**(11): p. 1408-12.
342. Wu, E., et al., *Membrane cofactor protein is a receptor for adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis*. *J Virol*, 2004. **78**(8): p. 3897-905.
343. Fleischli, C., et al., *The distal short consensus repeats 1 and 2 of the membrane cofactor protein CD46 and their distance from the cell membrane determine productive entry of species B adenovirus serotype 35*. *J Virol*, 2005. **79**(15): p. 10013-22.
344. Chen, C.Z., et al., *Electrostatic Interactions between Complement Regulator CD46(SCR1-2) and Adenovirus Ad11/Ad21 Fiber Protein Knob*. *Mol Biol Int*, 2015. **2015**: p. 967465.
345. Gaggar, A., et al., *Localization of regions in CD46 that interact with adenovirus*. *J Virol*, 2005. **79**(12): p. 7503-13.
346. Kemper, C., et al., *Membrane cofactor protein (MCP; CD46) expression in transgenic mice*. *Clin Exp Immunol*, 2001. **124**(2): p. 180-9.
347. Sakurai, F., et al., *Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice*. *Gene Ther*, 2006. **13**(14): p. 1118-26.
348. Strauss, R., et al., *Epithelial phenotype confers resistance of ovarian cancer cells to oncolytic adenoviruses*. *Cancer Res*, 2009. **69**(12): p. 5115-25.
349. Ludford-Menting, M.J., et al., *A functional interaction between CD46 and DLG4: a role for DLG4 in epithelial polarization*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(6): p. 4477-84.
350. Schafer, S., P.J. Koch, and W.W. Franke, *Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins*. *Exp Cell Res*, 1994. **211**(2): p. 391-9.
351. Schafer, S., S. Stumpp, and W.W. Franke, *Immunological identification and characterization of the desmosomal cadherin Dsg2 in coupled and uncoupled epithelial cells and in human tissues*. *Differentiation*, 1996. **60**(2): p. 99-108.
352. Wang, H., et al., *Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14*. *Nat Med*, 2011. **17**(1): p. 96-104.
353. Arnberg, N., et al., *Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor*. *J Virol*, 2000. **74**(1): p. 42-8.
354. Arnberg, N., et al., *Initial interactions of subgenus D adenoviruses with A549 cellular receptors: sialic acid versus alpha(v) integrins*. *J Virol*, 2000. **74**(16): p. 7691-3.
355. Arnberg, N., P. Pring-Akerblom, and G. Wadell, *Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor on Chang C cells*. *J Virol*, 2002. **76**(17): p. 8834-41.
356. Arnberg, N., et al., *Adenovirus type 37 binds to cell surface sialic acid through a charge-dependent interaction*. *Virology*, 2002. **302**(1): p. 33-43.
357. Burmeister, W.P., et al., *Crystal structure of species D adenovirus fiber knobs and their sialic acid binding sites*. *J Virol*, 2004. **78**(14): p. 7727-36.
358. Tallone, T., et al., *A mouse model for adenovirus gene delivery*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(14): p. 7910-5.
359. Nalbantoglu, J., et al., *Muscle-specific overexpression of the adenovirus primary receptor CAR overcomes low efficiency of gene transfer to mature skeletal muscle*. *J Virol*, 2001. **75**(9): p. 4276-82.
360. Fechner, H., et al., *Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers*. *Gene Ther*, 1999. **6**(9): p. 1520-35.
361. Davis, B., et al., *Adenovirus-mediated erythropoietin production by airway epithelia is enhanced by apical localization of the coxsackie-adenovirus receptor in vivo*. *Mol Ther*, 2004. **10**(3): p. 500-6.
362. Zabner, J., et al., *Lack of high affinity fiber receptor activity explains the resistance of ciliated airway epithelia to adenovirus infection*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(5): p. 1144-9.

363. Walters, R.W., et al., *Apical localization of the coxsackie-adenovirus receptor by glycosyl-phosphatidylinositol modification is sufficient for adenovirus-mediated gene transfer through the apical surface of human airway epithelia*. J Virol, 2001. **75**(16): p. 7703-11.
364. Pickles, R.J., et al., *Retargeting the coxsackievirus and adenovirus receptor to the apical surface of polarized epithelial cells reveals the glycocalyx as a barrier to adenovirus-mediated gene transfer*. J Virol, 2000. **74**(13): p. 6050-7.
365. Stonebraker, J.R., et al., *Glycocalyx restricts adenoviral vector access to apical receptors expressed on respiratory epithelium in vitro and in vivo: role for tethered mucins as barriers to lumenal infection*. J Virol, 2004. **78**(24): p. 13755-68.
366. Worgall, S., et al., *Role of alveolar macrophages in rapid elimination of adenovirus vectors administered to the epithelial surface of the respiratory tract*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(14): p. 1675-84.
367. Alemany, R., K. Suzuki, and D.T. Curiel, *Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 11): p. 2605-9.
368. Worgall, S., et al., *Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(1): p. 37-44.
369. Waddington, S.N., et al., *Targeting of adenovirus serotype 5 (Ad5) and 5/47 pseudotyped vectors in vivo: fundamental involvement of coagulation factors and redundancy of CAR binding by Ad5*. J Virol, 2007. **81**(17): p. 9568-71.
370. Xu, Z., et al., *Clearance of adenovirus by Kupffer cells is mediated by scavenger receptors, natural antibodies, and complement*. J Virol, 2008. **82**(23): p. 11705-13.
371. Khare, R., et al., *Circulating antibodies and macrophages as modulators of adenovirus pharmacology*. J Virol, 2013. **87**(7): p. 3678-86.
372. Wolff, G., et al., *Enhancement of in vivo adenovirus-mediated gene transfer and expression by prior depletion of tissue macrophages in the target organ*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 624-9.
373. Tao, N., et al., *Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver*. Mol Ther, 2001. **3**(1): p. 28-35.
374. Ziegler, R.J., et al., *Correction of the nonlinear dose response improves the viability of adenoviral vectors for gene therapy of Fabry disease*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(8): p. 935-45.
375. Manickan, E., et al., *Rapid Kupffer cell death after intravenous injection of adenovirus vectors*. Mol Ther, 2006. **13**(1): p. 108-17.
376. Wood, M., et al., *Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse*. Cancer Gene Ther, 1999. **6**(4): p. 367-72.
377. Alemany, R. and D.T. Curiel, *CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors*. Gene Ther, 2001. **8**(17): p. 1347-53.
378. Johnson, M., et al., *Differential biodistribution of adenoviral vector in vivo as monitored by bioluminescence imaging and quantitative polymerase chain reaction*. Hum Gene Ther, 2006. **17**(12): p. 1262-9.
379. Snoeys, J., et al., *Species differences in transgene DNA uptake in hepatocytes after adenoviral transfer correlate with the size of endothelial fenestrae*. Gene Ther, 2007. **14**(7): p. 604-12.
380. Wisse, E., et al., *The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer*. Gene Ther, 2008. **15**(17): p. 1193-9.
381. Jacobs, F., E. Wisse, and B. De Geest, *The role of liver sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer*. Am J Pathol, 2010. **176**(1): p. 14-21.
382. Lievens, J., et al., *The size of sinusoidal fenestrae is a critical determinant of hepatocyte transduction after adenoviral gene transfer*. Gene Ther, 2004. **11**(20): p. 1523-31.

383. Hautala, T., et al., *An interaction between penton base and alpha v integrins plays a minimal role in adenovirus-mediated gene transfer to hepatocytes in vitro and in vivo*. *Gene Ther*, 1998. **5**(9): p. 1259-64.
384. Martin, K., et al., *Simultaneous CAR- and alpha V integrin-binding ablation fails to reduce Ad5 liver tropism*. *Mol Ther*, 2003. **8**(3): p. 485-94.
385. Smith, T.A., et al., *Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences in vivo gene transfer in mice*. *Hum Gene Ther*, 2003. **14**(8): p. 777-87.
386. Bayo-Puxan, N., et al., *Role of the putative heparan sulfate glycosaminoglycan-binding site of the adenovirus type 5 fiber shaft on liver detargeting and knob-mediated retargeting*. *J Gen Virol*, 2006. **87**(Pt 9): p. 2487-95.
387. Koski, A., et al., *Mutation of the fiber shaft heparan sulphate binding site of a 5/3 chimeric adenovirus reduces liver tropism*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e60032.
388. Di Paolo, N.C., O. Kalyuzhniy, and D.M. Shayakhmetov, *Fiber shaft-chimeric adenovirus vectors lacking the KKTK motif efficiently infect liver cells in vivo*. *J Virol*, 2007. **81**(22): p. 12249-59.
389. Coughlan, L., et al., *Tropism-modification strategies for targeted gene delivery using adenoviral vectors*. *Viruses*, 2010. **2**(10): p. 2290-355.
390. Shayakhmetov, D.M., et al., *Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity*. *J Virol*, 2005. **79**(12): p. 7478-91.
391. Parker, A.L., et al., *Multiple vitamin K-dependent coagulation zymogens promote adenovirus-mediated gene delivery to hepatocytes*. *Blood*, 2006. **108**(8): p. 2554-61.
392. Jonsson, M.I., et al., *Coagulation factors IX and X enhance binding and infection of adenovirus types 5 and 31 in human epithelial cells*. *J Virol*, 2009. **83**(8): p. 3816-25.
393. Xu, Z., et al., *Coagulation factor X shields adenovirus type 5 from attack by natural antibodies and complement*. *Nat Med*, 2013. **19**(4): p. 452-7.
394. Doronin, K., et al., *Coagulation factor X activates innate immunity to human species C adenovirus*. *Science*, 2012. **338**(6108): p. 795-8.
395. Eichholz, K., F.J. Mennechet, and E.J. Kremer, *Human coagulation factor X-adenovirus type 5 complexes poorly stimulate an innate immune response in human mononuclear phagocytes*. *J Virol*, 2015. **89**(5): p. 2884-91.
396. Abzug, M.J. and M.J. Levin, *Neonatal adenovirus infection: four patients and review of the literature*. *Pediatrics*, 1991. **87**(6): p. 890-6.
397. Cichon, G., et al., *Intravenous administration of recombinant adenoviruses causes thrombocytopenia, anemia and erythroblastosis in rabbits*. *J Gene Med*, 1999. **1**(5): p. 360-71.
398. Lozier, J.N., et al., *Toxicity of a first-generation adenoviral vector in rhesus macaques*. *Hum Gene Ther*, 2002. **13**(1): p. 113-24.
399. Wolins, N., et al., *Intravenous administration of replication-incompetent adenovirus to rhesus monkeys induces thrombocytopenia by increasing in vivo platelet clearance*. *Br J Haematol*, 2003. **123**(5): p. 903-5.
400. Othman, M., et al., *Adenovirus-induced thrombocytopenia: the role of von Willebrand factor and P-selectin in mediating accelerated platelet clearance*. *Blood*, 2007. **109**(7): p. 2832-9.
401. Gupalo, E., et al., *Platelet-adenovirus vs. inert particles interaction: effect on aggregation and the role of platelet membrane receptors*. *Platelets*, 2013. **24**(5): p. 383-91.
402. Stone, D., et al., *Adenovirus-platelet interaction in blood causes virus sequestration to the reticuloendothelial system of the liver*. *J Virol*, 2007. **81**(9): p. 4866-71.
403. Shimony, N., et al., *Analysis of adenoviral attachment to human platelets*. *Virol J*, 2009. **6**: p. 25.

404. Gupalo, E., L. Buriachkovskaia, and M. Othman, *Human platelets express CAR with localization at the sites of intercellular interaction*. *Virology*, 2011. **8**: p. 456.
405. Mei, Y.F. and G. Wadell, *Epitopes and hemagglutination binding domain on subgenus B:2 adenovirus fibers*. *J Virol*, 1996. **70**(6): p. 3688-97.
406. Pring-Akerblom, P., A. Heim, and F.E. Trijssenaar, *Molecular characterization of hemagglutination domains on the fibers of subgenus D adenoviruses*. *J Virol*, 1998. **72**(3): p. 2297-304.
407. Seiradake, E., et al., *The cell adhesion molecule "CAR" and sialic acid on human erythrocytes influence adenovirus in vivo biodistribution*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(1): p. e1000277.
408. Carlisle, R.C., et al., *Human erythrocytes bind and inactivate type 5 adenovirus by presenting Coxsackie virus-adenovirus receptor and complement receptor 1*. *Blood*, 2009. **113**(9): p. 1909-18.
409. Marshall, E., *Gene therapy death prompts review of adenovirus vector*. *Science*, 1999. **286**(5448): p. 2244-5.
410. Lehrman, S., *Virus treatment questioned after gene therapy death*. *Nature*, 1999. **401**(6753): p. 517-8.
411. Raper, S.E., et al., *Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer*. *Mol Genet Metab*, 2003. **80**(1-2): p. 148-58.
412. Aste-Amezaga, M., et al., *Quantitative adenovirus neutralization assays based on the secreted alkaline phosphatase reporter gene: application in epidemiologic studies and in the design of adenovector vaccines*. *Hum Gene Ther*, 2004. **15**(3): p. 293-304.
413. Wang, X., et al., *Neutralizing antibody responses to enterovirus and adenovirus in healthy adults in China*. *Emerg Microbes Infect*, 2014. **3**(5): p. e30.
414. Kuriyama, S., et al., *Inhibitory effects of human sera on adenovirus-mediated gene transfer into rat liver*. *Anticancer Res*, 1998. **18**(4A): p. 2345-51.
415. Bradley, R.R., et al., *Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection*. *J Virol*, 2012. **86**(1): p. 625-9.
416. Sumida, S.M., et al., *Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein*. *J Immunol*, 2005. **174**(11): p. 7179-85.
417. Wohlfart, C.E., U.K. Svensson, and E. Everitt, *Interaction between HeLa cells and adenovirus type 2 virions neutralized by different antisera*. *J Virol*, 1985. **56**(3): p. 896-903.
418. Mallery, D.L., et al., *Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(46): p. 19985-90.
419. Hauler, F., et al., *AAA ATPase p97/VCP is essential for TRIM21-mediated virus neutralization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(48): p. 19733-8.
420. McEwan, W.A., et al., *Intracellular antibody-bound pathogens stimulate immune signaling via the Fc receptor TRIM21*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(4): p. 327-36.
421. Chen, H.H., et al., *Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(5): p. 1645-50.
422. Lehrer, R.I. and W. Lu, *alpha-Defensins in human innate immunity*. *Immunol Rev*, 2012. **245**(1): p. 84-112.
423. Smith, J.G. and G.R. Nemerow, *Mechanism of adenovirus neutralization by Human alpha-defensins*. *Cell Host Microbe*, 2008. **3**(1): p. 11-9.
424. Nguyen, E.K., G.R. Nemerow, and J.G. Smith, *Direct evidence from single-cell analysis that human {alpha}-defensins block adenovirus uncoating to neutralize infection*. *J Virol*, 2010. **84**(8): p. 4041-9.

425. Smith, J.G., et al., *Insight into the mechanisms of adenovirus capsid disassembly from studies of defensin neutralization*. PLoS Pathog, 2010. **6**(6): p. e1000959.
426. Flatt, J.W., et al., *An intrinsically disordered region of the adenovirus capsid is implicated in neutralization by human alpha defensin 5*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61571.
427. Iacobelli-Martinez, M. and G.R. Nemerow, *Preferential activation of Toll-like receptor nine by CD46-utilizing adenoviruses*. J Virol, 2007. **81**(3): p. 1305-12.
428. Appledorn, D.M., et al., *Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 in vivo*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 2134-44.
429. Lam, E., S. Stein, and E. Falck-Pedersen, *Adenovirus detection by the cGAS/STING/TBK1 DNA sensing cascade*. J Virol, 2014. **88**(2): p. 974-81.
430. Stein, S.C., E. Lam, and E. Falck-Pedersen, *Cell-specific regulation of nucleic acid sensor cascades: a controlling interest in the antiviral response*. J Virol, 2012. **86**(24): p. 13303-12.
431. Liu, Q., et al., *The role of capsid-endothelial interactions in the innate immune response to adenovirus vectors*. Hum Gene Ther, 2003. **14**(7): p. 627-43.
432. Lieber, A., et al., *The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8798-807.
433. Zhang, Y., et al., *Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages*. Mol Ther, 2001. **3**(5 Pt 1): p. 697-707.
434. Di Paolo, N.C., et al., *IL-1alpha and complement cooperate in triggering local neutrophilic inflammation in response to adenovirus and eliminating virus-containing cells*. PLoS Pathog, 2014. **10**(3): p. e1004035.
435. Nakamura, T., K. Sato, and H. Hamada, *Reduction of natural adenovirus tropism to the liver by both ablation of fiber-coxsackievirus and adenovirus receptor interaction and use of replaceable short fiber*. J Virol, 2003. **77**(4): p. 2512-21.
436. Shayakhmetov, D.M., et al., *Analysis of adenovirus sequestration in the liver, transduction of hepatic cells, and innate toxicity after injection of fiber-modified vectors*. J Virol, 2004. **78**(10): p. 5368-81.
437. Ni, S., et al., *Evaluation of biodistribution and safety of adenovirus vectors containing group B fibers after intravenous injection into baboons*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(6): p. 664-77.
438. Shayakhmetov, D.M., et al., *Interference with the IL-1-signaling pathway improves the toxicity profile of systemically applied adenovirus vectors*. J Immunol, 2005. **174**(11): p. 7310-9.
439. Ghebremedhin, B., *Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance*. Eur J Microbiol Immunol (Bp), 2014. **4**(1): p. 26-33.
440. Torres, S., et al., *The revolution in viral genomics as exemplified by the bioinformatic analysis of human adenoviruses*. Viruses, 2010. **2**(7): p. 1367-81.
441. de Jong, J.C., et al., *Human adenovirus type 52: a type 41 in disguise?* J Virol, 2008. **82**(7): p. 3809; author reply 3809-10.
442. Roy, S., et al., *Construction of gene transfer vectors based on simian adenovirus 7*. J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 8): p. 1749-53.
443. Banyai, K., et al., *Searching for HAdV-52, the putative gastroenteritis-associated human adenovirus serotype in Southern Hungary*. New Microbiol, 2009. **32**(2): p. 185-8.
444. Wevers, D., et al., *Novel adenoviruses in wild primates: a high level of genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions*. J Virol, 2011. **85**(20): p. 10774-84.
445. Carstens, E.B., *Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009)*. Arch Virol, 2010. **155**(1): p. 133-46.

446. Roy, S., et al., *Adenoviruses in fecal samples from asymptomatic rhesus macaques, United States*. Emerg Infect Dis, 2012. **18**(7): p. 1081-8.
447. Sato, T., et al., *Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche*. Nature, 2009. **459**(7244): p. 262-5.
448. Merlos-Suarez, A., et al., *The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(5): p. 511-24.
449. Denby, L., et al., *Adenoviral serotype 5 vectors pseudotyped with fibers from subgroup D show modified tropism in vitro and in vivo*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(11): p. 1054-64.
450. Kesisoglou, F., et al., *Chimeric Ad5 vectors expressing the short fiber of Ad41 show reduced affinity for human intestinal epithelium*. Mol Pharm, 2005. **2**(6): p. 500-8.
451. Stevenson, S.C., et al., *Human adenovirus serotypes 3 and 5 bind to two different cellular receptors via the fiber head domain*. J Virol, 1995. **69**(5): p. 2850-7.
452. Soudais, C., et al., *Canine adenovirus type 2 attachment and internalization: coxsackievirus-adenovirus receptor, alternative receptors, and an RGD-independent pathway*. J Virol, 2000. **74**(22): p. 10639-49.
453. Greene, L.A. and A.S. Tischler, *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(7): p. 2424-8.
454. Klesse, L.J., et al., *Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells*. Oncogene, 1999. **18**(12): p. 2055-68.
455. McNees, A.L., et al., *Postinternalization inhibition of adenovirus gene expression and infectious virus production in human T-cell lines*. J Virol, 2004. **78**(13): p. 6955-66.
456. Koo, M.Y., et al., *Selective inhibition of the function of tyrosine-phosphorylated STAT3 with a phosphorylation site-specific intrabody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(17): p. 6269-74.
457. Wang, Z., et al., *Adenoviral delivery of recombinant hepatitis B virus expressing foreign antigenic epitopes for immunotherapy of persistent viral infection*. J Virol, 2014. **88**(5): p. 3004-15.
458. Schagen, F.H., et al., *Replacement of native adenovirus receptor-binding sites with a new attachment moiety diminishes hepatic tropism and enhances bioavailability in mice*. Hum Gene Ther, 2008. **19**(8): p. 783-94.
459. Huard, C., et al., *Transcriptional profiling of C2C12 myotubes in response to SHIP2 depletion and insulin stimulation*. Genomics, 2007. **89**(2): p. 270-9.
460. Hai, M., et al., *Comparative analysis of Schwann cell lines as model systems for myelin gene transcription studies*. J Neurosci Res, 2002. **69**(4): p. 497-508.
461. Farinha-Arcieri, L.E., et al., *Expression and purification of a recombinant adenovirus fiber knob in a baculovirus system*. Intervirology, 2008. **51**(3): p. 189-95.
462. Bergelson, J.M., et al., *The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 415-9.
463. Santis, G., et al., *Molecular determinants of adenovirus serotype 5 fibre binding to its cellular receptor CAR*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 6): p. 1519-27.
464. Hong, S.S., et al., *Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells*. EMBO J, 1997. **16**(9): p. 2294-306.
465. Segerman, A., et al., *Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor*. J Virol, 2003. **77**(17): p. 9183-91.
466. Ciarlet, M., S.E. Crawford, and M.K. Estes, *Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains*. J Virol, 2001. **75**(23): p. 11834-50.

-
467. Parker, A.L., et al., *Pseudotyping the adenovirus serotype 5 capsid with both the fibre and penton of serotype 35 enhances vascular smooth muscle cell transduction*. *Gene Ther*, 2013. **20**(12): p. 1158-64.
 468. Hardonk, M.J., et al., *Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation*. *J Leukoc Biol*, 1992. **52**(3): p. 296-302.
 469. Norris, L.A., *Blood coagulation*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2003. **17**(3): p. 369-83.
 470. Zhao, X., G. Li, and S. Liang, *Several affinity tags commonly used in chromatographic purification*. *J Anal Methods Chem*, 2013. **2013**: p. 581093.
 471. Keil, B., *Specificity of Proteolysis* 2012: Springer Berlin Heidelberg.
 472. Wang, N., et al., *Adenovirus-mediated efficient gene transfer into cultured three-dimensional organoids*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e93608.
 473. Tamura, K., et al., *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*. *Mol Biol Evol*, 2013. **30**(12): p. 2725-9.

VIII. ANEXO

Production of Chimeric Adenovirus

Marta Miralles, Marc Garcia, Marcos Tejero, Assumpció Bosch,
and Miguel Chillón

Abstract

The use of chimeric pseudotyped vectors is a common way to modify the adenoviral tropism by replacing the fiber protein. In this chapter the procedure to generate a chimeric adenovirus pre-stock from a plasmid containing the adenoviral genome is described. Also, the chimeric adenovirus replicative cycle to increase the yield in further productions is determined. Finally, two different protocols, in culture plates and in suspension cultures, to produce the virus at large scale are also detailed.

Key words Adenoviral vector, Chimeric vectors, Adenovirus production

1 Introduction

Although more than 50 serotypes of HAdVs have been described [1], group C (HAdV-2 and HAdV-5) is still the most studied group [2]. Thus, vectors based on human adenovirus serotype 5 (HAdV-5) have been widely employed as vehicles for many strategies because they have several advantages over other gene delivery systems. These vectors can be amplified to very high titers, which is critical for in vivo assays and clinical applications [3]. Moreover, HAdV-5 vectors are relatively safe because HAdV genome does not integrate into the host genome [4, 5]. For these reasons, HAdV-5 and chimeric HAdV-5 derived vectors have been preferably used among other serotypes.

The term “chimeric virus” is generally used for a recombinant virus generated by the combination of two different viral genomes. Thus, the new chimeric virus may display a combination of the biological properties of both parent viruses. Usually, chimeric adenoviruses have been generated by fiber replacement, involving the HAdV-5 backbone and the fiber protein of a different serotype to thus modify the transduction efficiency and/or the transduction

specificity [6, 7]. Combination of other components may also allow to evade the host immune response [8] or to induce different gene expression or gene regulation profiles.

As chimeric adenoviruses maintain most of their original genes, their replication and assembling mechanisms should be maintained. Therefore, chimeric HAdV-5-derived vectors must to be produced in permissible HEK-293 cells. However, since chimerism can alter infectivity, efficiency, virion intracellular trafficking, viral genome replication, and viral assembly, the standard production protocols have to be adjusted for every new chimeric vector. Indeed, as other adenoviral-derived vectors, chimeric adenoviruses are genetically modified organisms (GMO) and have to be produced on a Biosafety Level 2 laboratory.

2 Materials

2.1 Generation of Viral Pre-stock

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10 % or 2 % Fetal Bovine Serum (FBS).
2. HEK-293 cells.
3. *PacI* restriction enzyme.
4. 150 mM NaCl.
5. Polyethylenimine (PEI).

2.2 Purification of Viral Pre-stock

1. Ultracentrifuge: Beckman Coulter Optima L90K o L100XP with rotors SW32 and SW40Ti.
2. Polyallomer centrifuge tubes for SW32 and SW40 rotor.
3. CsCl solutions: 1.4 g/mL, 1.34 g/mL, and 1.25 g/mL in 1× PBS.
4. 18G needles, 2 mL syringes, pipette-aid, 10 mL pipettes.
5. PD-10 columns Sephadex G-25.
6. 1× PBS Ca²⁺/Mg²⁺.
7. Glycerol, anhydrid.

2.3 Titrating and Analysis of Adenoviral Replicative Cycle

1. A viral pre-stock (fully characterized). It is recommended to use vectors carrying a reporter gene.
2. HEK-293 cells.
3. Growing medium: DMEM supplemented with 10 % FBS and 1 % Penicillin–Streptomycin.
4. Infection medium: DMEM supplemented with 2 % FBS and 1 % Penicillin–Streptomycin.
5. 24-well and 96-well plates.

2.4 Chimeric Adenoviral Production from a Pre-stock

1. 150-mm petri dishes (20 plates).
2. HEK-293 cells.
3. Growing and infection medium as described in Subheading 2.3.
4. CsCl solutions: 1.4 g/mL, 1.34 g/mL, and 1.25 g/mL in 1× D-PBS.
5. Ultracentrifuge and rotors: Beckman Coulter Optima L90K or L100XP. Swinging bucket rotors SW32 and SW40ti.
6. Centrifuge tubes for SW32 and SW40ti rotors.
7. 2 and 10 mL syringes, and 18G needles.
8. Glycerol, anhydride.
9. PD-10 columns Sephadex G-25.
10. 1× D-PBS Ca²⁺/Mg²⁺.
11. 96-Well plates.
12. Optional: Polybrene.

2.5 Production in Suspension 211BS Cell Cultures

1. Polycarbonate shake flasks, 125 mL and 1 L.
2. Infection Medium for suspension cells: Freestyle serum-free medium (12338-018, Invitrogen) supplemented with 100 U/mL Penicillin, 0.1 mg/mL Streptomycin, and 1 % Pluronics.
3. 211BS cells [9].
4. Polybrene.
5. Growing medium for suspension cells: SFMII medium (11686-029, GIBCO) supplemented with 4 mM Glutamine, 100 U/mL Penicillin, 0.1 mg/mL Streptomycin, and 1 % Pluronics.
6. Midjet System (GE Healthcare).

3 Methods

3.1 Generation of Viral Pre-stock

It is highly recommended to perform a small pre-stock to generate enough viruses for the following amplification steps. As general trend, for each amplification step it is recommended to wait for cytopathic effect (CPE) to harvest the infected cells. Finally, viral infectivity, viral productivity, and viral cycle must be analyzed to characterize the viral production.

1. Digest 100 µg of the recombinant adenoviral plasmid with 30 Units of *PacI* restriction enzyme in a total volume of 100 µL to remove the plasmid backbone of bacterial origin sequences. Digest for 4 h at 37 °C (*see Note 1*).
2. Add another 30 Units of *PacI* to guarantee a complete digestion. Digest 4 h at 37 °C.
3. Precipitate the digested DNA with 2 volumes of ethanol and resuspend in 50 µL of sterile ddH₂O.

4. Transfect 10^6 HEK-293 cells plated at 60–70 % of confluency with 6 μg of *PacI*-digested plasmid (*see* **Note 2**).
5. After 3 days, scrape the cells. Freeze/thaw three times the crude lysate to release adenoviral particles from the cells.
6. Centrifuge at $4,500 \times g$ for 5 min. Save the supernatant and discard the pellet to remove the cell debris.
7. Seed one 10-cm plate with HEK-293 cells at 60–70 % of confluency. Add 3 mL of DMEM 2 % FBS on the cells as well as all the supernatant from the previous step (*see* **Note 3**).
8. Check the cells during a period of 5–20 days until a 50 % of CPE is observed. Harvest medium and cells and freeze/thaw three times to release adenoviral particles from the cells.
9. Centrifuge at $4,500 \times g$ for 5 min. Save the supernatant and discard the pellet to remove the cell debris.
10. Seed one 150-mm plate with HEK-293 cells at 60–70 % of confluence (15×10^6 HEK-293 cells). Use DMEM 2 % FBS as medium.
11. Add the supernatant from **step 9** to the cells.
12. Follow the cytopathic effect during the first 2–4 days. Unlike the previous amplification step, the CPE should appear in a period of 30–48 h post-infection. Nevertheless, if vector's productivity or infectivity is poor, check the cells during a period of 5–20 days until a 50 % of CPE is observed. Harvest medium and cells, and freeze/thaw three times to release the adenovirus from the cells.
13. Centrifuge at $4,500 \times g$ for 5 min. Keep the supernatant and discard the pellet to remove the cell debris.
14. Seed 10×150 -mm cell plate with HEK-293 cells at 60–70 % of confluency. Use infection medium.
15. Distribute the supernatant from **step 13** among the ten plates.
16. Check the cells during a period of 2–4 days until a 50 % of CPE is observed as previously describe. Harvest medium and cells.
17. Harvest the cells and resuspend the cell pellet in 18 mL of supernatant. Freeze/thaw three times to release the adenovirus from the cells.
18. Titrate the viral pre-stock (*see* Subheading **3.3**).

3.2 Purification of Viral Pre-stock

1. Add 10 mL of 1.25 g/mL CsCl solution in two SW32 centrifuge tubes.
2. Add carefully 10 mL of 1.40 g/mL CsCl solution at the bottom of each SW32 centrifuge tubes to generate two density phases. Take care to not disturb the gradient when removing the pipette.

3. Add the total volume of the cell pellet (18 mL) in one SW32 tube and the precipitated solution from the supernatant in another SW32 tube on the top of the gradient and equilibrate tubes with 1×-PBS.
4. Centrifuge for 1 h 42 min at $125,500\times g$ at 18 °C in a Beckman SW32 rotor with maximum brake.
5. Vector appears as an opaque band at the interface between 1.25 g/mL and 1.4 g/mL CsCl. Collect the band by piercing the SW32 tube about 1 cm below the band using a 2 mL syringe loaded with a 18G needle.
6. Add 5 mL of 1.32 g/mL CsCl solution in one SW40 centrifuge tube and fill a second SW40 tube with 5 mL of the 1.32 g/mL CsCl solution.
7. Add the recovered vector band from the previous step on the top of the 1.32 g/mL CsCl solution. Equilibrate with 1×-PBS.
8. Centrifuge for 22 h at $155,000\times g$ 18 °C in a Beckman SW40 rotor with maximum brake.
9. Vector appears as opaque band in the middle of the tube. Collect the band as above in less than 2 mL of volume.
10. For each band, prepare ten eppendorf tubes to collect the viral fractions.
11. Pass through PD-10 column, 25 mL of 1× PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ to remove the preservation solution and equilibrate the column. Discard the flow-through.
12. Add the total volume of the collected band from **step 9**. Discard the flow-through.
13. Add 500 μL of 1× PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ to the PD-10 column and collect the flow-through in an eppendorf tube.
14. Repeat the previous step until 10 fractions per band are collected.
15. Add glycerol to a final concentration of 10 % to each fraction (approx. 55 μL per fraction).
16. Store the purified viral fractions at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Measurement of Viral Infectivity

The infectivity of a viral particle is the capability to enter into a cell and express its genome. The infectivity depends on multiple factors such as the cell line, its passage, or the properties of the viral particle by itself, and it can be altered in a new chimeric adenovirus. Usually, the infectivity of the Human Adenovirus type 5 in HEK-293 cells ranges between 1/10 and 1/100 (IU/vg; Infection Units per viral genomes). Although the viral backbone may be almost identical, the infectivity of chimeric adenoviruses may differ significantly from HAdV-5. Thus, HAdV-5/40 has a poor IU/vg ratio (between 1/100 and 1/600) [9].

3.3.1 First Titer of the Viral Fractions

1. Seed HEK-293 cells in a 96-well plate at 60–70 % of confluency in a total volume of 100 μL /well of infection medium.
2. Twenty-four hours later, prepare serial dilutions of the ten viral fractions from **step 16** in Subheading **3.2**. Prepare each dilution in a final volume of 500 μL . Use DMEM supplemented with 2 % FBS for the dilutions. Typically, start with a $1/10^6$ dilution and make $1/10$ serial dilutions. Perform 6 dilutions ($n = 2$ per dilution).
3. Carefully, remove the media from the HEK-293 cells and infect with 100 μL of each dilution (*see Note 4*).
4. Two days after infection, count the number of infected cells using your reporter gene (i.e., GFP or β -galactosidase) or by immunocytochemistry using the anti-hexon-antibody-based system as described in Chapter 12. For calculations, consider only dilutions for wells with less than 10 % of positive cells.
5. Calculate the titer expressed in Infection Units/mL (IU/mL) using the following equation:

$$\text{Titer (IU / mL)} = \frac{\text{Positive cells} \times \text{Dilution factor} \times \text{infection volume}}{10^3} \quad (1)$$

6. Pool the three or four most concentrated fractions (usually fractions 4–7) and aliquot the viral pre-stock (*see Note 5*) in 0.5 mL tubes and store at -80°C as quickly as possible.

3.3.2 Final Titer of the Viral Pre-stock

1. Repeat **steps 1–5** from procedure in Subheading **3.3.1**, but start with a $1/10^9$ viral dilution and make $1/2$ serial dilutions as previously explain. Make 12 dilutions.
2. Calculate the titer applying Eq. **1**. When working with a fluorescent reporter gene and using cells in which the vector is replicative, select for calculations the most diluted condition showing positive cells 5–7 days after the infection and consider the number of positive cells as “1” (*see Note 6*).
3. Prepare a $1/20$, $1/10$, and $1/5$ viral dilutions in a total volume of 100 μL . Use $1 \times \text{PBS Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ plus 0.1 % SDS for the dilutions (*see Note 7*).
4. Incubate at 56°C for 10 min to disrupt viral capsids and release viral genomes.
5. Centrifuge the tubes at $4,500 \times g$ for 5 min.
6. Measure the optical density of the supernatants at 260 nm (OD_{260}) (*see Note 8*).
7. Calculate the titer expressed in viral genomes/mL (vg/mL) using the following equation:

$$\text{Titer (vg / mL)} = \text{OD}_{260} \times \text{Dilution factor} \times 1.1 \times 10^{12} \quad (2)$$

3.4 Measurement of Viral Productivity

It is important to analyze viral productivity when a new virus is used. Good productivity of HAdV-5 can be obtained in HEK-293 cells as they express high levels of integrins and CAR receptor. However, chimeric vectors lacking the HAdV-5 fiber protein may not efficiently infect permissive HEK-293 cells, making vector amplification inefficient and viral productivity per cell very low, as it happens for chimeric HAdV-5/40 vectors [9].

$$\text{Productivity (vg / cell)} = \frac{\text{Titer (vg / mL)} \times \text{Total viral volume (mL)}}{\text{Number of cells used}} \quad (3)$$

$$\text{Productivity (IU / cell)} = \frac{\text{Titer (IU / mL)} \times \text{Total viral volume (mL)}}{\text{Number of cells used}} \quad (4)$$

3.5 Analysis of Adenoviral Replicative Cycle

Adenoviral replicative cycle represents the time elapsing between the adenovirus entry and the progeny release from the cell. Since a premature harvest leads to a poor production due to the insufficient virion encapsidation and maturation, it is crucial to know the viral cycle to achieve a high production yield. Similarly, in a late harvest most of the particles may have been released to the culture medium, leading to a harder purification and bigger material expenditure. Therefore, to optimize the adenovirus production is important to determine the optimal harvest time in which the viral particles are mostly mature and still are inside the cells.

Interestingly, as a consequence of the role of the fiber in the entry and trafficking of the virus particle towards the nucleus, replacement of the fiber protein is enough to alter the length of the virus life cycle [9]. For example, the cycle of the chimeric adenovirus HAdV-5/40s is delayed 20–24 h compared to the HAdV-5 cycle. Therefore, before performing a large-scale production, the harvest time for a new chimeric adenovirus should be empirically optimized to maximize the yield.

1. Seed 150,000 HEK-293 cells per well of a 24-well plate. Add 500 μL of growing medium. Samples must be harvested at 24, 36, 40, 44, 48, 52, 56, and 60 h post-infection, with a minimum of $n = 3$ wells per time point (*see Note 9*).
2. Add 3.75×10^6 Infection Units (IU) from your pre-stock to 12.5 mL of infection medium. Mix by inversion. These values allow to infect 25 wells at an MOI of 5 in a volume of 500 μL /well.
3. Replace the growing medium with 500 μL of the medium-virus mix generated in the previous step (*see Note 10*).
4. Fifteen hours later, replace the medium with fresh infection medium to remove the excess of virus used in the infection.

5. Harvest the samples at the indicated times. Collect both supernatant and cells in a tube and store it at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Repeat for all the sampling times.
6. Freeze/thaw three times.
7. Thaw the samples and centrifuge for 5 min at $4,500\times g$. Transfer the supernatant into a new tube and discard the pellet.
8. Plate new HEK-293 cells in a 96-well plate at a 70 % of confluence to titrate the samples (*see Note 11*).
9. From each sample in **step 7** save volumes of 10, 1, 0.1, or 0.01 μL and dilute to a total volume of 100 μL of infection medium.
10. Forty-eight hours after the infection count the infected cells by using the reporter gene or the hexon-antibody immunocytochemistry-based protocol. Calculate the IU/mL per sample, as described in Subheading 3.3.1. The time point with the highest value is the optimal time for harvesting the vector. As observed in Fig. 1, 56 h is the recommended harvesting time for the chimeric HAdV5-40s vector (*see Note 12*).

3.6 Chimeric Adenoviral Production from a Pre-stock

1. Plate twenty 150-mm petri dishes with HEK-293 cells at a confluency of 70 %. Add growing medium up to a final volume of 18 mL.
2. Twenty-four hours later, replace the growing medium with 12 mL of infection medium.
3. Calculate the amount of virus to infect twenty 150-mm plates with an MOI of 5, and dilute in 20 mL of infection medium. Add 1 mL of the mix per plate.

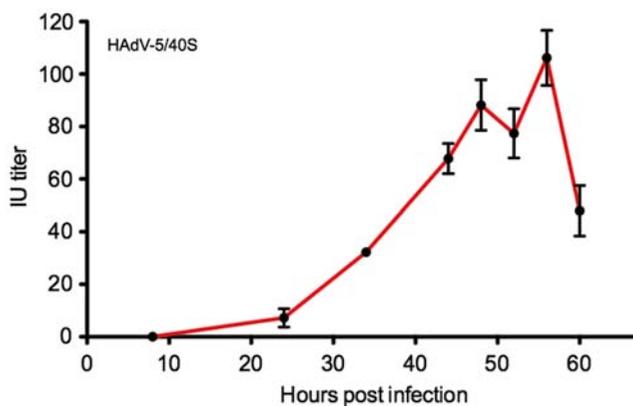


Fig. 1 Replicative cell cycle of the chimeric HAdV-5/40S vector in HEK-293 cells. According to this, the replicative cycle is between 48 and 56 h post-infection. The values are represented as percentage of the highest titer obtained

4. Optional: Add polybrene to a final concentration of 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to facilitate the interaction between cells and adenoviral particles. It is highly recommended when the IU/PP ratio of your pre-stock is worse than 1/100.
5. At the optimal harvest time collect cells and supernatant in 50-mL tubes.
6. Centrifuge for 5 min at $300\times g$. Pool the pellets and resuspend it in 15-18 mL of supernatant.
7. Perform three freeze/thaw rounds ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}/37\text{ }^{\circ}\text{C}$).
8. After the last thaw, centrifuge the cell lysate for 5 min at $4,500\times g$ and recover the supernatant.
9. Purify the virus as described in Subheading 3.2.

3.7 Production in Suspension 211BS Cell Cultures

There are some adenoviral serotypes whose productivity per cell is very inefficient [10, 11]. Therefore classical standard amplification procedures must be avoided and more efficient systems like large-scale production in cell suspension are highly recommended. This is the case of the enteric adenoviruses as the Human Adenovirus 40 serotype (HAdV-40), which due to their inefficient productivity are also known as *fastidious virus*. Interestingly, chimeric Adenovirus 5/40S (HAdV-5/40S) carrying the HAdV-40 short fiber on the HAdV-5 capsid preserves the enteric tropism of the HAdV-5/40S [12] but also the inefficient productivity.

To address this issue we have developed a protocol (*see* Fig. 2) based on the addition of polybrene during the amplification steps in combination with the use of 211BS cells (expressing constitutively HAdV-5 fiber) as producer cells [9]. First, polybrene interacts with negatively charged adenoviral capsids facilitating their interaction with the cell membrane [13, 14], which increases virus transduction. Second, 211BS cells allow to generate mosaic virions containing both F5 and F40S fiber proteins. The fiber mosaicism improves the infectivity of the chimeric virions during the amplification cycles by facilitating an efficient cell entry mediated by the CAR-F5 interaction, which together with the addition of polybrene reduces the number of amplification cycles and the duration of the process. Finally, to further facilitate production of the chimeric vectors, 211B cells are grown in suspension, thus allowing to easily up-scale the production process in bioreactors.

3.7.1 First Viral Amplification Step in 211BS from Pre-stock with Polybrene

The procedure described here has been designed to use a single amplification step in a single flask of 211BS. However, variations in the number of flasks, or the number of amplification steps can be adapted easily.

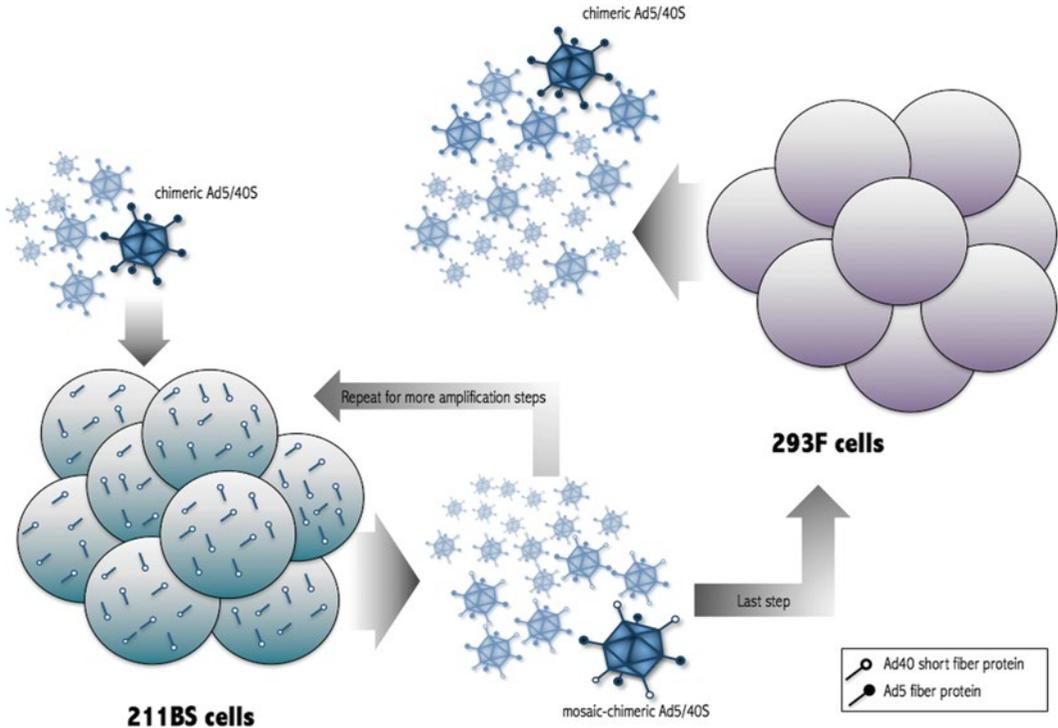


Fig. 2 Amplification strategy of chimeric HA5V-5/40S vectors. The first amplification and intermediate steps are performed in 211BS cells. Last step is carried out in 293F cells to obtain pure chimeric HA5V-5/40S vectors

1. Seed 10^6 211BS cells/mL in one 125 mL shake flask (25 mL working volume) in Infection Medium. Keep the culture in suspension by agitation in an orbital shaker at a speed of 110 rpm, 37 °C and 5 % CO₂.
2. Add polybrene to a final concentration of 9 µg/mL (*see Note 13*).
3. Infect cells with the vector pre-stock at an MOI of 1 (*see Note 14*).
4. Four hours post-infection, supplement the cell culture with 0.5 % FBS.
5. Optional step: if vector expresses a fluorescent marker protein, such as GFP, the infection efficiency can be estimated by fluorescent microscopy at 30 h post-infection (*see Note 15*).
6. Harvest cell cultures at 56 h post-infection and store at -80 °C.
7. Lyse cells by three freeze/thaw cycles in order to release the virus from cells.
8. Centrifuge at $1,620 \times g$ for 5 min to remove cell debris.
9. Store at -80 °C.

3.7.2 Last Viral Amplification Step in 293S Cells

Last amplification step of the chimeric adenovirus should be performed in 293F cells (*see* **Note 16**).

1. Seed 10^6 293F cells/mL in 1 L shake flasks (400 mL working volume) in Infection Medium.
2. Add polybrene to a final concentration of 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
3. Infect cell cultures by adding the cell lysate from **step 9** of the previous amplification procedure.
4. Change the cell culture media to fresh media at 4–6 h post-infection by centrifugation at $180\times g$ for 5 min (*see* **Note 17**).
5. Harvest cells at the optimal harvest time found in Subheading 3.5 (56 h post-infection for HAdV-5/40S) and centrifuge for 5 min at $180\times g$.
6. Resuspend the cell pellet in 20 mL of supernatant and store at $-80\text{ }^\circ\text{C}$.
7. Optional step: If the virus genome carries the Death Protein (ADP) gene, the supernatant should be concentrated down to 20 mL using a Midjet system.
8. Lyse the cell pellet by three freeze/thaw cycles. Remove cell debris by centrifugation for 5 min at $1,150\times g$.
9. Purify the crude viral stock following Subheading 3.2.

4 Notes

1. Before digesting, check if the adenoviral sequence has internal *PacI* cleavage sites. If this is not the case, use another restriction enzyme to digest the bacterial sequences.
2. It is recommended to use a control plate transfected with an irrelevant plasmid to test the PEI's toxicity.
3. Use a control plate to compare the cytopathic effect.
4. It is recommended to use a noninfected plate as control.
5. As freeze/thaw cycles affect the stability of the vectors, we recommend to aliquot vectors in small volumes (e.g., 10, 50, and 100 μL aliquots).
6. To calculate the titer by “end point dilution” do not count the number of infected cells because in the positive wells is possible to find a high number of infected cells if waiting for more than one replicative cycle.
7. When using a different resuspension buffer, add SDS to a final concentration of 0.1 % to disrupt the capsids.
8. The OD_{260} must be within the lineal range of your spectrophotometer. If not, repeat the previous steps with different viral dilutions.

9. The indicated time points are only a suggestion. Different time points may also be used. In addition, it is also recommended to seed three extra noninfected wells as negative controls.
10. HEK-293 cells are poorly attached to the plate surface, especially after being infected by an adenovirus. All media replacements must be done very gently.
11. Avoid working with confluences higher than 80 % because highly confluent cells are poorly infected by the adenovirus, and leads to underestimation.
12. It's recommended to discard the values when the percentage of positive cells is higher than a 10 %. In higher percentages probably some of the positive cells are infected by more than one infectious particle, which will lead to underestimation of the titer. If most of the time points have percentages of infection higher than 10 % adjust the dilutions properly from **step 9** and repeat the experiment.
13. Polybrene-mediated enhancing effects on adenovirus infection are observed only when using Freestyle serum-free medium, whereas SFMII medium completely blocks the effect of polybrene. This has also been described for other cationic molecules such as polyethylenimine (PEI) [15].
14. MOI is the number of viral infection units per cell and it depends on the cell type and the environmental conditions during infections.
15. The time at which the marker protein is visible at the fluorescent microscopy depends on the viral cycle of each vector. For example, 30 h post-infection for Ad5 or 48 h post-infection for Ad5/40.
16. HAdV-5/40S produced by 211BS cells are expected to have both, F5 and F40S proteins (mosaic-chimeric HAdV-5/40S), whereas HAdV-5/40 produced by 293F cells should only display F40S on their surface (chimeric HAdV-5/40S). In order to maximize the amplification of HAdV-5/40S, these vectors should be grown in 211BS. However, to obtain pure chimeric (not mosaic) HAdV-5/40S particles, the last step of amplification has to be performed in 293F cells.
17. Most viral particles infect the cells during the first 4–6 h post-infection. After this time, it is important to change the medium to clear the viral particles that have not entered into the cells and thus, remove the contaminating chimeric-mosaic particles used in the infection from the final step.

References

1. Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS (2003) The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* 13:155–171
2. Haddada H, Cordier L, Perricaudet M (1995) Gene therapy using adenovirus vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 199(Pt 3):297–306
3. Wivel NA, Gao G, Wilson JM (1999) Adenovirus vectors. The development of human gene therapy. Cold Spring Harbor monograph series, pp 87–110
4. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4:346–358
5. Verma IM, Weitzman MD (2005) Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 74:711–738
6. Gall J, Kass-Eisler A, Leinwand L, Falck-Pedersen E (1996) Adenovirus type 5 and 7 capsid chimera: fiber replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes. *J Virol* 70:2116–2123
7. Nakamura T, Sato K, Hamada H (2003) Reduction of natural adenovirus tropism to the liver by both ablation of fiber-coxsackievirus and adenovirus receptor interaction and use of replaceable short fiber. *J Virol* 77:2512–2521
8. Roberts DM, Nanda A, Havenga MJ, Abbink P, Lynch DM, Ewald BA et al (2006) Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. *Nature* 441:239–243
9. Miralles M, Segura MM, Puig M, Bosch A, Chillón M (2012) Efficient amplification of chimeric adenovirus 5/40S vectors carrying the short fiber protein of Ad40 in suspension cell cultures. *PLoS One* 7:e42073
10. Sherwood V, Burgert HG, Chen YH, Sanghera S, Katafigiotis S, Randall RE et al (2007) Improved growth of enteric adenovirus type 40 in a modified cell line that can no longer respond to interferon stimulation. *J Gen Virol* 88:71–76
11. Tiemessen CT, Kidd AH (1994) Adenovirus type 40 and 41 growth in vitro: host range diversity reflected by differences in patterns of DNA replication. *J Virol* 68:1239–1244
12. Rodríguez E, Romero C, Ferrer M, Burgueño JF, Río A, Gil E, Hamada H, Bosch A, Gasull MA, Fernández E, Chillón M (2006) Therapeutic potential of the Chimeric Adenovirus 5/40 as a vector for intestine directed gene therapy. *Mol Ther* 13:S5
13. Arcasoy SM, Latoche JD, Gondor M, Pitt BR, Pilewski JM (1997) Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to epithelial and endothelial cells in vitro. *Gene Ther* 4:32–38
14. Jacobsen F, Hirsch T, Mittler D, Schulte M, Lehnhardt M, Druecke D et al (2006) Polybrene improves transfection efficacy of recombinant replication-deficient adenovirus in cutaneous cells and burned skin. *J Gene Med* 8:138–146
15. Geisse S, Di Maiuta N, Ten Buren B, Henke M (2005) The secrets of transfection in serum-free suspension culture. In: Godia F, Fussenegger M (eds) *Animal cell technology meets genomics*. ESACT Proceedings. Springer, Netherlands, pp 373–376