



**CONSTRUCCIÓN DE FAGOS FILAMENTOSOS
TRANSPORTADORES DE UN SISTEMA CRISPR-Cas9
CONTRA EL VIRUS DEL *Herpes simplex* tipo 1.**

ENMANUEL ETELVINO CÉSPEDES CHAVES

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico-Biológicas. Mención: Biotecnología.

San Lorenzo – Paraguay

Septiembre, 2021

**CONSTRUCCIÓN DE FAGOS FILAMENTOSOS
TRANSPORTADORES DE UN SISTEMA CRISPR-Cas9
CONTRA EL VIRUS DEL *Herpes simplex* tipo 1.**

ENMANUEL ETELVINO CÉSPEDES CHAVES

Orientador: Prof. Dr. **PABLO HERNÁN SOTELO TORRES**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico-Biológicas. Mención: Biotecnología.

San Lorenzo – Paraguay

Septiembre, 2021

Céspedes Chaves, Enmanuel Etelvino.

Construcción de fagos filamentosos transportadores de un sistema CRISPR-Cas9 contra el virus del *Herpes simplex* tipo 1 / Enmanuel Etelvino Céspedes Chaves. -- Asunción: Facultad de Ciencias Químicas, UNA, 2021.

123 p.; 30 cm.

Tesis (Magíster en Ciencias Químico-Biológicas. Mención: Biotecnología). -- Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas.

1. Bacteriófagos filamentosos. 2. Sistema CRISPR-Cas9. 3. Virus del *Herpes simplex* tipo 1. 4. Terapia génica. 5. Vectores virales. 6. Tesis y Disertaciones Académicas – Paraguay. I. Título.

**CONSTRUCCIÓN DE FAGOS FILAMENTOSOS
TRANSPORTADORES DE UN SISTEMA CRISPR-Cas9
CONTRA EL VIRUS DEL *Herpes simplex* tipo 1.**

ENMANUEL ETELVINO CÉSPEDES CHAVES

Aprobado en fecha 28 de septiembre de 2021.

Tribunal Examinador:

Prof. Dr. Julio César Masaru Iehisa Ouchi	FCQ/UNA
Prof. Dra. María Luisa Kennedy Rolón	FCQ/UNA
Prof. MSc. Danilo Fernández Ríos	FACEN/UNA
MSc. Bioq. Silvia Susana Trigüis Vargas	UPPSALA UNIVERSITY

Prof. Dr. Pablo Hernán Sotelo Torres
Orientador.

Prof. Dra. Fátima Yubero
Directora de Postgrado

DEDICATORIA

A mamá, por animarme a hacer realidad mis sueños y darme su apoyo incondicional.

A papá⁺, por incentivarne a estudiar y por bendecirme desde otra dimensión.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme soñar, disfrutar y hacer realidad mis sueños.

A mamá y papá⁺, por la bendición de la vida, por el amor, el cariño y el apoyo.

Al Prof. Dr. Pablo Sotelo, mi admiración y gratitud por la confianza y oportunidad de crecimiento y formación científica. Gracias por las gestiones, la orientación, las enseñanzas, las críticas, las sugerencias, la paciencia, por la motivación y ser un modelo de inspiración para los jóvenes paraguayos que soñamos con hacer ciencias en el país.

A mis compañeros del Departamento de Biotecnología de la FCQ-UNA, Guada, Adri, Emilio, Miguel y Marquitos, por su amistad, apoyo emocional y por hacer que los días de estudios y experimentos en el laboratorio sean un sinfín de momentos constructivos, agradables y divertidos. Un agradecimiento especial a Guada por sus consejos, aliento, paciencia y ayuda incondicional. Muchas gracias a todo el equipo de Biotec.

A la mesa examinadora, por sus críticas, sugerencias y paciencia.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para cursar esta Maestría y ejecutar el proyecto de tesis.

A la Dra. Nilsa González Brítez, del Departamento de Medicina Tropical del IICS-UNA, por la motivación, los consejos y el aliento para continuar en mi formación como joven investigador. Gracias por confiar en mí.

Al Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN-UNA) y al laboratorio de Bioinformática de la Facultad Politécnica (FP-UNA) por permitirme utilizar algunos equipos.

A Alexandra Elbakyan “La Robin Hood de la ciencia” (guiño).

A todas las personas que de alguna manera me ayudaron a concluir esta Maestría.

**CONSTRUCCIÓN DE FAGOS FILAMENTOSOS
TRANSPORTADORES DE UN SISTEMA CRISPR-Cas9
CONTRA EL VIRUS DEL *Herpes simplex* tipo 1.**

Autor: ENMANUEL ETELVINO CÉSPEDES CHAVES

Orientador: Prof Dr. PABLO HERNÁN SOTELO TORRES

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud estima que dos terceras partes de la población mundial menor de 50 años está infectada por el virus del *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1). El HSV-1 es capaz de infectar las neuronas de los mamíferos, en la cual ingresa en estado de latencia de por vida o pueden reactivarse ante eventos de estrés, lo que conlleva a la replicación del material genético viral y la consecuente producción de nuevos virus infectivos. Los antivirales actualmente disponibles no son capaces de eliminar los herpesvirus latentes y cepas resistentes a las drogas de primera elección.

Debido a ello es necesario buscar nuevos fármacos o estrategias capaces de eliminar la latencia y la producción de nuevos virus en las células infectadas. Una de las estrategias actualmente utilizadas es la terapia génica, basada en el sistema CRISPR-Cas9. Sin embargo, actualmente los vectores virales y no virales utilizados para la administración de los componentes del sistema presentan ciertos retos. Ante esta situación, los vectores virales como los bacteriófagos filamentosos, ofrecen ventajas: no se integran en el genoma de las células eucariotas, son estables, seguros, se los puede modificar genéticamente, poseen mayor capacidad de empaquetamiento de genoma y son fáciles de producir.

En este trabajo se construyeron bacteriófagos filamentosos recombinantes transportadores de un sistema CRISPR-Cas9 con gRNAs únicos y dobles, capaces de inhibir el ciclo viral del HSV-1. Los fagómidos desarrollados fueron evaluados mediante transfección e infección con HSV-1 de las células HEK293T, observándose que independientemente al número de gRNAs, el sistema CRISPR-Cas9 fue capaz de inhibir la producción de nuevos HSV-1. Los vectores derivados del fago M13 fueron capaces de empaquetar fagómidos de hasta 9290 pares de bases (pb) y un rendimiento de 10^{11} a 10^{13} VGC/mL. Sin embargo, las tasas de transducción presentaron una muy baja eficiencia. Esto pudo deberse a problemas en la entrada y el transporte del fago al

núcleo, lo que abre la posibilidad de modificar la superficie del fago para facilitar su entrada.

El vector resultante sirve como punto de partida para una plataforma de desarrollo de vectores que a través de la tecnología de *Phage display* pueda facilitar el transporte dentro de la célula o dirigir de manera específica a algún tipo celular.

Palabras claves: Bacteriófagos filamentosos M13, sistema CRISPR-Cas9, virus del *Herpes simplex* tipo 1, terapia génica, vectores virales.

CONSTRUCTION OF DELIVERY FILAMENTOUS BACTERIOPHAGE OF A CRISPR-CAS9 SYSTEM AGAINST *Herpes simplex* type 1 VIRUS.

Author: ENMANUEL ETELVINO CÉSPEDES CHAVES

Advisor: Prof Dr. PABLO HERNÁN SOTELO TORRES

SUMMARY

The World Health Organization estimates that two-thirds of the world's population under 50 years of age is infected with the *Herpes simplex* virus type 1 (HSV-1). HSV-1 can infect neurons in mammals and enters a state of latency for life. Under stress conditions the virus becomes active, leading to the replication of the viral genetic material and the consequent production of new infective viruses.

Currently, there are not antivirals capable of eliminating latent herpes viruses and strains resistant to first-line drugs. Therefore, it is necessary to search for new drugs or strategies capable of eliminating latency and the production of new viruses in infected cells. One of the strategies being currently used is a gene therapy based on the CRISPR-Cas9 system. However, there are challenges to overcome with respect to the viral and non-viral vectors used for the administration of the components of the system. In this situation, viral vectors, such as filamentous bacteriophages offer certain advantages: they do not integrate into the genome of eukaryotic cells, they are stable, safe, can be genetically modified, have greater genome packaging capacity and are easy to produce.

In this work, recombinant filamentous bacteriophages transporting a CRISPR-Cas9 system with single and double gRNAs, capable of inhibiting the viral cycle of *Herpes simplex* type 1, were constructed. The phagemid developed were evaluated by transfection and infection with HSV-1 of HEK293T cells, observing that regardless of the number of gRNAs, the CRISPR-Cas9 system was able to reduce the production of new HSV-1. Vectors derived from M13 phage were able to package phagemid up to 9290 base pairs (bp) and a yield of 10^{11} to 10^{13} VGC/mL. However, the transduction rates showed a low efficiency. This could be due to problems in the entry and transport of the phage to the nucleus, which opens the possibility of modifying the surface of the phage to facilitate its entry.

The resulting vector serves as a starting point for a vector development platform that, through Phage display technology, can facilitate transport within the cell or specifically target some cell type.

Key words: M13 filamentous bacteriophage, CRISPR Cas9 system, *Herpes simplex* virus type 1, gene therapy, viral vectors.

ÍNDICE

	Página
1. MARCO TEÓRICO.....	21
1.1. Virus del <i>Herpes simplex</i> tipo 1	21
1.1.1. Prevalencia y características de la infección por HSV-1	22
1.1.2. Estructura del virus del <i>Herpes simplex</i> tipo 1.....	22
1.1.3. Genoma del HSV-1	23
1.1.4. Ciclo de replicación viral	24
1.1.5. Tratamiento	31
1.2. Sistema CRISPR-Cas9 como estrategia para tratar las infecciones por el virus del <i>Herpes simplex</i> tipo 1.....	32
1.3. Bacteriófagos filamentosos	37
1.3.1. Estructura del fago M13.....	37
1.3.2. Bacteriófagos filamentosos como herramienta biotecnológica.....	38
2. OBJETIVOS	40
2.1. Objetivo general	40
2.2. Objetivos específicos.....	40
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Construcción de vectores para la expresión de Cas9 y gRNAs.....	41
3.1.1. Diseño <i>in silico</i> de vectores.....	41
3.1.2. Obtención del plásmido PX458	43

3.1.3.	Tamizaje de plásmidos extraídos de clones bacterianos, mediante GFP-qPCR.....	45
3.1.4.	Preparación de bacterias <i>E. coli</i> ER2738 calcio-competentes y determinación de eficiencia.....	46
3.1.5.	Transformación de bacterias <i>E. coli</i> cepa ER2738 calcio-competentes con el plásmido PX458.	47
3.1.6.	Tamizaje de clones <i>E. coli</i> ER2738 transformadas con los plásmidos PX458, mediante PCR de colonias.	47
3.1.7.	Generación de los vectores PX458-UL29, PX458-UL52.....	47
3.1.8.	Tamizaje de clones <i>E. coli</i> ER2738 transformadas con los plásmidos PX458-UL29, PX458-UL52, mediante PCR.....	49
3.1.9.	Generación del vector PX458-UL29/UL52.	50
3.2.	Transfección de células HEK293T con los diferentes constructos e infección con HSV-1.....	52
3.2.1.	Infección de células HEK293T con el virus del <i>Herpes simplex</i> tipo 1..	53
3.2.2.	Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	53
3.3.	Producción de fagos <i>wild type</i> (M13KO7), <i>phPX458</i> , <i>phPX458-UL29</i> , <i>phPX458-UL52</i> , <i>phPX458-UL29-UL52</i>	55
3.4.	Cuantificación absoluta de fagos filamentosos mediante PCR en tiempo real.....	57
3.5.	Transducción de células mamíferas con fagos filamentosos.....	58
4.	RESULTADOS.....	60
4.1.	Diseño de vectores para la expresión de Cas9 y gRNAs.....	60

4.1.1.	Selección de gRNAs y plásmido de expresión	60
4.1.2.	Preparación de un sistema que permita la generación de fagos que transporten el plásmido PX458 como genoma.....	62
4.1.3.	Producción de fagómidos que permitan la expresión de Cas9 y gRNAs individuales dirigidos contra genes del HSV-1.....	63
4.1.4.	Producción de un fagómido que permita la expresión de Cas9 y gRNAs dobles dirigidos contra genes del HSV-1.....	66
4.1.5.	Evaluación de los plásmidos producidos para inhibir la infección por HSV-1.....	69
4.2.	Los fagómidos transportadores del sistema CRISPR-Cas9 son empaquetados en bacteriófagos filamentosos recombinantes.....	73
4.3.	Transducción de células HEK293T con los diferentes constructos	83
5.	DISCUSIÓN	85
6.	CONCLUSIONES	93
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura característica del virión.	23
Figura 2. Representación de la organización del genoma del virus del <i>Herpes simplex</i> tipo 1.	24
Figura 3. Ciclo replicativo del virus del <i>Herpes simplex</i> tipo 1.....	26
Figura 4. Replicación del genoma del HSV-1.	28
Figura 5. Dinámica de la infección del HSV-1 en células neuronales.....	30
Figura 6. Estructura química del Aciclovir y de la Desoxiguanosina.....	32
Figura 7. Sistema de defensa CRISPR-Cas9.....	33
Figura 8. Sistema CRISPR-Cas9 y mecanismos de reparación del ADN.	35
Figura 9. Mapa del genoma del fago M13 y representación esquemática de la partícula viral.	38
Figura 10. Representación esquemática de la clonación de los dúplex de oligonucleótidos, para la expresión de cada gRNA en el plásmido PX458.....	42
Figura 11. Flujo de trabajo para la obtención y verificación del plásmido PX458, a partir de bacterias transformadas <i>E. coli</i> Stbl3.....	43
Figura 12. Ensayo de transfección de células HEK293T e infección con HSV-1.....	55
Figura 13. Ensayo de transducción de células HEK293T e infección con HSV-1... ..	59
Figura 14. Representación esquemática que muestra los principales componentes del plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458), el sitio de corte de <i>BbsI</i> y diseño de gRNAs.....	61

Figura 15. qPCR de colonias para la detección del gen GFP en clones de bacterias transformadas.	63
Figura 16. Clonación de insertos (gRNAs) en el vector PX458	64
Figura 17. Tamizaje de colonias mediante PCR a punto final.	65
Figura 18. Construcción del vector PX458-UL29/UL52.	67
Figura 19. Tamizaje de clones bacterianos UL29/UL52 por PCR de colonias.	69
Figura 20. Transfección de células HEK293T con los diferentes fagómido	70
Figura 21. Imágenes de microscopía de fluorescencia y resultados expresados en gráficos de barras.	72
Figura 22. Curva de calibración de GFP para la cuantificación de fagos filamentosos que poseen el fagómido de interés.	75
Figura 23. Curvas de amplificación de ORI M13.	76
Figura 24. Curva de <i>melting</i> para ORI M13.	77
Figura 25. Curvas de amplificación de GFP.	78
Figura 26. Curva de <i>melting</i> para GFP.	79
Figura 27. Esquema representativo del empaquetamiento de fagómidos tras la infección de bacterias transformadas con el fago <i>helper</i> M13KO7.	81
Figura 28. Curvas de amplificación de ORI M13 y GFP detectados en una segunda producción de los bacteriófagos <i>ph</i> PX458-UL29/UL52.	82
Figura 29. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de células HEK293T transducidas con los bacteriófagos <i>ph</i> PX458-UL29 e infectadas con HSV-1 MOI: 30.	84

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la obtención de gRNAs dirigidos al genoma de HSV-1, en base a lo publicado por (van Diemen <i>et al.</i> , 2016).....	42
Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del promotor U6 + gRNA-UL52 + <i>scaffold</i>	43
Tabla 3. Cebadores para la amplificación de una secuencia parcial del gen GFP por qPCR.	45
Tabla 4. Ecuación de la recta para la cuantificación de genoma de fagos filamentosos <i>wild type</i> (M13KO7) y recombinantes, por qPCR.	58
Tabla 5. Valores de cuantificación de fagos filamentosos utilizando dos curvas de calibración.	80

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AAVP	: <i>Adeno-associated virus/Phage.</i>
ADN	: <i>Ácido desoxirribonucleico.</i>
Amp	: <i>Ampicilina.</i>
ARN	: <i>Ácido ribonucleico.</i>
Cas	: <i>CRISPR associated.</i>
Cbh	: <i>hybrid form of a CB promoter.</i>
Cq	: <i>Quantification cycle.</i>
CRISPR	: <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.</i>
crRNA	: <i>CRISPR RNA/ ARN CRISPR.</i>
ddH ₂ O	: <i>Agua bidestilada.</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium.</i>
dNTPs	: <i>Deoxynucleotide triphosphates.</i>
DO	: <i>Densidad óptica.</i>
DSB	: <i>Double strand DNA breaks.</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid.</i>
EGFP	: <i>Enhanced Green fluorescent protein.</i>
g	: <i>fuerza centrífuga relativa.</i>
gRNA	: <i>guide RNA/ ARN guía.</i>
HDR	: <i>Homology directed repair.</i>
HeBS	: <i>HEPES- Buffered saline.</i>

HEPES	: N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid.
HSV-1	: <i>Herpes simplex</i> virus type 1.
ICP	: <i>Infected Cell Protein</i> .
IFI	: Inmunofluorescencia indirecta.
IRL	: <i>Inverted repeat long</i> / Repetición invertida larga.
IRS	: <i>Inverted repeat short</i> / Repetición invertida corta.
Kan	: Kanamicina.
Kb	: Kilobases.
kDa	: Kilo <i>Daltons</i> .
min.	: minutos.
MOI	: <i>Multiplicity of infection</i> / multiplicidad de infección.
mRNA	: <i>messenger RNA</i> / ARN mensajero.
NHEJ	: <i>Non-homologous end joining</i> .
NLS	: <i>Nuclear localization signal</i> / Señal de localización nuclear.
nm	: nanómetros.
ORF	: <i>Open reading frame</i> / Marco de lectura abierto.
ORI	: Origen de replicación.
PAM	: <i>Protospacer adjacent motif</i> .
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i> .
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i> .
PEG	: <i>Polyethylene glicol</i> .
Pen/Strep	: Penicilina/ Estreptomicina.

Pfu	: <i>Plaque forming units.</i>
qPCR	: <i>Quantitative Polymerase chain reaction.</i>
rpm	: <i>revolutions per minute/</i> revoluciones por minuto.
SFB	: Suero fetal bovino.
ssDNA	: <i>single – stranded DNA/</i> ADN de cadena sencilla.
TAE	: <i>Tris-acetate EDTA/</i> Tris – acetato EDTA.
TBS	: <i>Tris Buffer</i> Salino.
TBS	: <i>Tris buffered saline.</i>
Tet	: Tetraciclina.
Tm	: Temperatura de <i>melting.</i>
tracrRNA	: <i>Trans-activating</i> CRISPR RNA.
TRL	: <i>Terminal repeat long/</i> Repetición terminal larga.
TRS	: <i>Terminal repeat short/</i> Repetición terminal corta.
U	: Unidades.
U6	: promotor U6.
UL	: <i>Unique long/</i> región única larga.
UL29	: gen codificante de la proteína ICP8.
UL52	: gen codificante de la subunidad del complejo primasa-helicasa.
US	: <i>Unique short/</i> región única corta.
VGC	: <i>Viral genome copy.</i>

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Virus del *Herpes simplex* tipo 1

El término herpesvirus es utilizado para referirse a los virus pertenecientes a la familia *Herpesviridae*. La familia *Herpesviridae* se caracteriza por agrupar a virus que poseen la capacidad de establecer una infección lítica en células permisivas y una infección latente en células neuronales (Looker *et al.*, 2015a; Looker *et al.*, 2015b).

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), ha clasificado tres subfamilias en *Herpesviridae*, teniendo en cuenta el tipo de estructura viral, tropismo celular, patogenia y manifestación clínica. Estas subfamilias son denominadas: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae* (Davison, 2010).

Los virus de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* se caracterizan por poseer un amplio rango de huéspedes, un ciclo replicativo relativamente corto, son de fácil producción en diversas líneas celulares de mamíferos, son citolíticos y su genoma tiene la peculiaridad de permanecer en estado episomal en células neuronales, estableciendo un periodo de latencia durante toda la vida (Karasneh & Shukla, 2011; Nicoll *et al.*, 2012). Los *Alphaherpesvirinae* que naturalmente infectan a los humanos son: *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1), *Herpes simplex* tipo 2 (HSV-2) y *Varicela zóster* (VZV) (Davison, 2010). En este trabajo, nos enfocamos principalmente en el HSV-1.

1.1.1. Prevalencia y características de la infección por HSV-1

El HSV-1 es un virus neurotrópico, altamente infeccioso que se transmite principalmente por contacto directo con una lesión o con fluidos corporales infectados, indicando una vía de transmisión predominantemente oral (Arduino & Porter, 2008). Las infecciones causadas por HSV-1 incluyen infecciones leves localizadas y/o recurrentes, formas diseminadas graves e incluso mortales en individuos inmunosuprimidos o recién nacidos. Entre estas infecciones se citan; herpes labial (úlceras orolabiales), panadizo herpético, ceguera corneal por queratitis herpética, encefalitis herpética, incluso, estudios recientes sugieren que HSV-1 también puede causar herpes genital y aumentar el riesgo de contraer HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (Arduino & Porter, 2008; Gill *et al.*, 1988; Haddow *et al.*, 2006).

La infección por HSV-1 es altamente prevalente y endémica en todo el mundo. Generalmente, la infección ocurre durante la infancia y a lo largo del tiempo el genoma viral no puede ser eliminado, debido a la capacidad de generar infecciones latentes. La Organización Mundial de la Salud estimó en el 2012 que 3709 millones de personas menores de 50 años tenían infección por HSV-1, una prevalencia de 67%, lo que representaría las dos terceras partes de la población mundial (Looker *et al.*, 2015a).

1.1.2. Estructura del virus del *Herpes simplex* tipo 1

Los viriones de HSV-1 son partículas esféricas de 150 – 200 nm de diámetro. Su genoma consiste en un segmento único de ADN lineal de doble hebra, envuelto por una nucleocápside icosaédrica (T=16) (Heming *et al.*, 2017). La nucleocápside está recubierta por un tegumento, que contiene proteínas que cumplen diferentes roles, entre ellas: modulación del sistema inmune, focalización de la cápside al núcleo celular, regulación de la transcripción y traducción, y ensamblaje de viriones (Kelly *et al.*, 2009). Finalmente, el tegumento está recubierto por una envoltura lipídica que contiene el complejo de glicoproteínas gB, gC, gD, gH, gE, gI, gL (Cai *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 2014; Trybala *et al.*, 2017) (**Figura 1**).

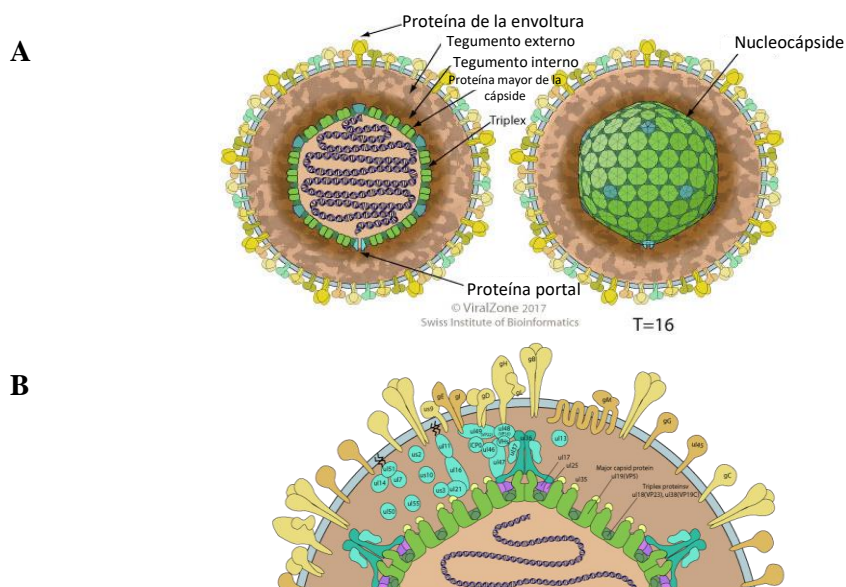


Figura 1. Estructura característica del virión. **A.** En la figura se observa la disposición de los componentes del HSV-1; la nucleocápside que protege el genoma, el tegumento amorfo y finalmente la envoltura viral. **B.** Se observa una imagen ampliada que detalla las proteínas estructurales de la nucleocápside, del tegumento y de la envoltura viral. Imagen adaptada de ©ViralZone, 2017 (Hulo *et al.*, 2011).

1.1.3. Genoma del HSV-1

El genoma del HSV-1 está compuesto por una molécula de ADN lineal de doble hebra y 152 Kb de longitud (Macdonald *et al.*, 2012). El genoma está organizado en dos segmentos de ADN unidos covalentemente, una región única larga (UL) de 126 Kb y una región única corta (US) de 26 Kb. Estos segmentos UL y US se encuentran delimitados por regiones de repeticiones invertidas, denominadas repetición invertida larga (IRL) y repetición invertida corta (IRS). Mientras que los extremos del genoma se encuentran flanqueados por un par de regiones de repeticiones invertidas no traducibles, denominadas repetición terminal larga (TRL) y repetición terminal corta (TRS), quedando de tal manera, las regiones $UL^{TRL-IRL}$ y $US^{IRS-TRS}$ (Figura 2) (Colgrove *et al.*, 2016; Duncan, 1987; McGeoch *et al.*, 1988).

A lo largo de todo el genoma se encuentran 75 genes aproximadamente (o marcos de lectura abiertos, ORF) que codifican alrededor de 75 proteínas (McGeoch *et al.*, 2006). Además de estos genes, el genoma posee tres orígenes de replicación del ADN: una

copia de oriL en la región UL y dos copias de oriS, ubicadas en la región US (**Figura 2**) (Martin *et al.*, 1991; Quinn & McGeoch, 1985).

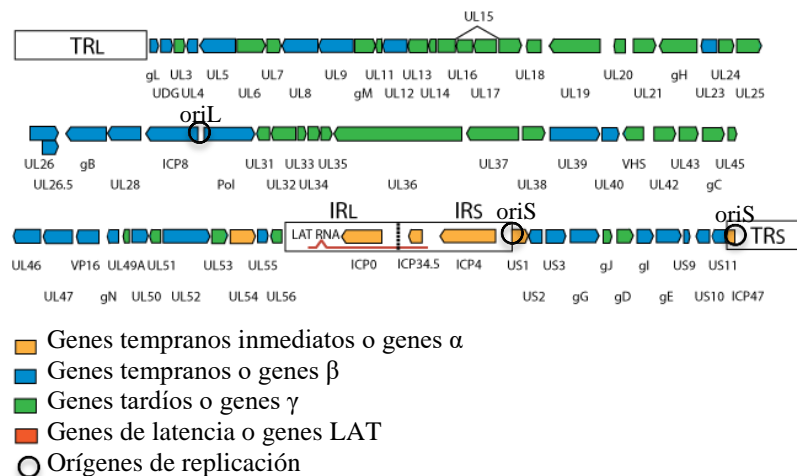


Figura 2. Representación de la organización del genoma del virus del *Herpes simplex* tipo 1. El genoma del HSV-1 tiene una longitud de 152 Kb, y consta de dos regiones únicas largas, UL y US, ambas regiones están flanqueadas por secuencias de repeticiones invertidas (IR), y repeticiones terminales (TR). En la imagen se detallan los genes que componen el genoma viral y la disposición de los tres orígenes de replicación (círculos negros). Adaptada de ©ViralZone (Hulo *et al.*, 2011).

1.1.4. Ciclo de replicación viral

1.1.4.1. Adsorción y fusión de membranas

El ciclo replicativo del HSV-1 durante la infección lítica inicia con la adsorción del virión a la superficie de la membrana de la célula epitelial y la fusión de membranas. La adsorción se lleva a cabo por la interacción de la glicoproteína B (gB) y/o gC a un residuo de proteoglicano de heparán sulfato (HSPG) de la superficie celular (Cai *et al.*, 1988; Herold *et al.*, 1991). Esta interacción promueve la unión específica de gD con uno de sus varios receptores primarios, que incluyen: nectina tipo 1 (PVRL 1; *Poliovirus receptor-related 1*), nectina tipo 2 (PVRL 2; *Poliovirus receptor-related 2*), presentes en células epiteliales y neuronales, HVEM (*Herpesvirus entry mediator*, *TNFRSF14*) presentes en linfocitos T y fibroblastos, o sitios específicos de heparán sulfato generados por ciertas isoformas de 3-sulfotransferasas 3-O-S, expresadas en células neuronales y endoteliales (Geraghty *et al.*, 1998; Montgomery *et al.*, 1996; Shukla *et al.*, 1999; Warner *et al.*, 1998).

La interacción de gD con uno de sus receptores permite una mayor adherencia del virión a la célula huésped e induce un cambio conformacional en gD permitiendo la activación del complejo heterodimérico gH/gL para promover la fusión de membranas, y consecuentemente la liberación de la nucleocápside al citoplasma celular (**Figura 3**) (Atanasiu *et al.*, 2010).

1.1.4.2. Transporte de la cápside al núcleo y liberación del genoma viral

Una vez que la nucleocápside es liberada en el citoplasma, varias proteínas del tegumento se disocian de la nucleocápside, a excepción de las proteínas pUL36, pUL37 y pUS3. De estas tres proteínas, pUL36 junto con pUS3 son las responsables de la focalización nuclear de la nucleocápside, la cual es impulsada a través de la red de microtúbulos (Dohner *et al.*, 2002; Sodeik *et al.*, 1997). Durante este transporte, la proteína quinasa viral pUS3 cumple un papel importante en la modulación de la respuesta inmune del huésped, inhibiendo la ruta NF- κ B inducida por una infección viral, así como la ruta de señalización del receptor tipo Toll II (TLR2) (Sen *et al.*, 2013).

Por otro lado, la unión de la nucleocápside al complejo del poro nuclear está mediada por pUL36 junto con la proteína de la cápside pUL25. La proteína de recubrimiento del ADN viral, pUL25, interactúa con la nucleoporina CAN/Nup214 y Nup358, facilitando la liberación del material genético viral al núcleo celular, a través de la proteína portal de la cápside pUL6 (**Figura 3**) (Copeland *et al.*, 2009; Newcomb *et al.*, 2001; Padeloup *et al.*, 2009).

1.1.4.3. Transcripción de los genes virales

Luego de la liberación del genoma viral en el núcleo de la célula, se da lugar a la transcripción de los genes virales. La transcripción es realizada de forma secuencial y en cascada, en tres fases cinéticas: la primera fase denominada temprana inmediata (IE) en donde ocurre la transcripción de genes tempranos inmediatos o genes α , en la segunda fase, se transcriben los genes tempranos (E) o genes β y finalmente en la fase tardía (L) se transcriben los genes γ (**Figura 3**) (Honess & Roizman, 1974).

El inicio de la expresión de los genes IE, son directamente regulados por la proteína transactivadora del tegumento VP16. La proteína VP16 recluta a dos factores de transcripción celular HCF-1 y Oct-1, para la formación del complejo trimérico regulador transcripcional inducido por VP16 (VIC), que actúa a nivel del promotor viral de los genes IE (La Boissière *et al.*, 1999; O'Hare, 1993).

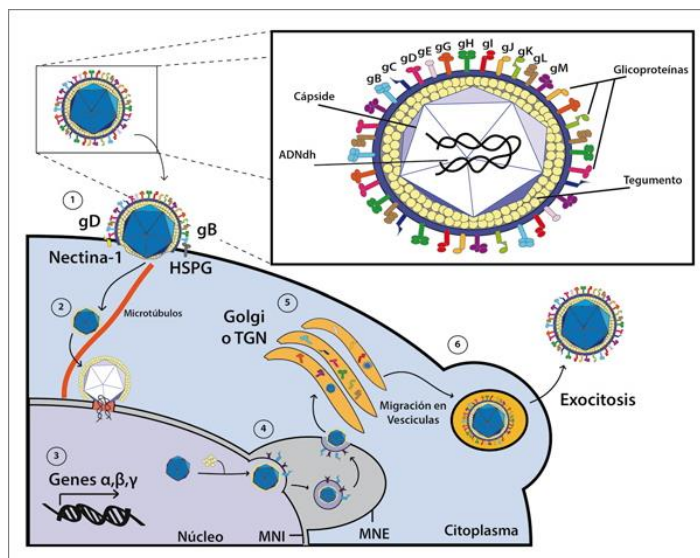


Figura 3. Ciclo replicativo del virus del *Herpes simplex* tipo 1. 1) La interacción de la glicoproteína B (gB) y/o gC a un residuo de proteoglicano de heparán sulfato (HSPG) u otros receptores de la superficie celular, activa el complejo gH/gL y permite la fusión de membranas del virus y de la célula, y la consecuente liberación de la nucleocápside al citoplasma celular, 2) la nucleocápside es transportada a través de la red de microtúbulos hacia el complejo del poro, donde el genoma es liberado en el núcleo celular, 3) los genes virales son transcritos de manera regulada y en cascada para generar ARNm que serán traducidos en el ribosoma y generarán proteínas virales con diferentes funciones. 4) Paralelamente, los genomas virales replicados son encapsidados en el núcleo celular y recubierto parcialmente por proteínas del tegumento que median la salida de la cápside hacia el espacio perinuclear a través de la membrana nuclear interna (MNI) y la membrana nuclear externa (MNE). 5) Posteriormente, esta es liberada al citoplasma para adquirir las glicoproteínas en el aparato de Golgi, 6) y finalmente, el virión es liberado por exocitosis. Imagen tomada de (Retamal-Díaz *et al.*, 2015).

El complejo regulador transcripcional (VIC) activado, recluta a la ARN polimerasa II celular, para iniciar la transcripción de los cinco genes α , cuyos productos dan lugar a cinco proteínas ICP (*Infected Cell Protein*), denominadas ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47, que se encargan de actuar como inductores de la transcripción de los genes β , de reprimir la expresión de los genes del huésped y de desviar la maquinaria

transcripcional al genoma viral (Ackermann *et al.*, 1984; Alwine *et al.*, 1974; O'Hare, 1993; Spencer *et al.*, 1997; Strang & Stow, 2005).

Por otro lado, ICP4 reprime la expresión de los genes α al unirse a sitios específicos de ella, de tal forma a que se inicie la transcripción de los genes β (Carrozza & DeLuca, 1996; Sampath & DeLuca, 2008). Los productos de la expresión de los genes β , da lugar a las proteínas β implicadas en la replicación del genoma viral, entre ellas se citan: la proteína principal de unión al ADN de cadena sencilla (DSB o ICP8; producto del gen UL29), la ADN polimerasa viral (Pol-UL42; producto de los genes UL30 y UL42), la proteína de unión al origen (OBP; producto del gen UL9), el complejo primasa-helicasa (producto de los genes UL5, UL8 y UL52), la timidina quinasa viral (tk; producto del gen UL23) (Dracheva *et al.*, 1995; Hamatake *et al.*, 1997; Klinedinst & Challberg, 1994; O'Donnell *et al.*, 1987).

Finalmente, la expresión de los genes γ requiere de las proteínas β , para dar lugar a las proteínas estructurales del virión como: VP23, VP5, VP21, VP24, VP22a, VP26, VP19C, entre otras (**Figura 1B**) (Honest & Roizman, 1974).

1.1.4.4. Replicación del genoma viral

Concomitante a la transcripción, la replicación del genoma viral tiene lugar en el núcleo celular y ésta comienza con la unión de OBP a uno de los tres orígenes de replicación, oriL u oriS. Debido a su actividad helicasa, la proteína OBP también promueve el desenrollamiento del ADN en el origen de replicación viral (rica en AT), generando una horquilla estable (Aslani *et al.*, 2002; Boehmer *et al.*, 1994).

La formación de esta horquilla de replicación, recluta el complejo primasa-helicasa. La subunidad primasa inicia la síntesis del cebador de ARN para su posterior extensión por parte de la ADN polimerasa viral. Mientras que la subunidad helicasa (producto del gen UL5), desenrolla el ADN en las horquillas de replicación. Por otro lado, el producto del gen UL8 que forma parte del complejo primasa-helicasa, no muestra actividad enzimática, pero estimula la actividad de los productos de los genes UL5/UL52 (Falkenberg *et al.*, 1997; Gorbalenya *et al.*, 1988; Klinedinst & Challberg, 1994).

La ADN polimerasa viral contiene dos subunidades: Pol con actividad catalítica, que extiende la doble hélice del ADN, y los polipéptidos UL42 que actúan aumentando la procesividad de polimerización y disminuyendo la probabilidad de que la polimerasa se disocie de la plantilla después de cada ciclo de catálisis (Gottlieb *et al.*, 1990; Gottlieb & Challberg, 1994).

A medida que la doble hebra se extiende, ICP8 se une al ADN de cadena sencilla (ssDNA) impidiendo la formación de bucles, horquillas y otras estructuras secundarias en la molécula de ssDNA (O'Donnell *et al.*, 1987; Weller & Coen, 2012) (**Figura 4**).

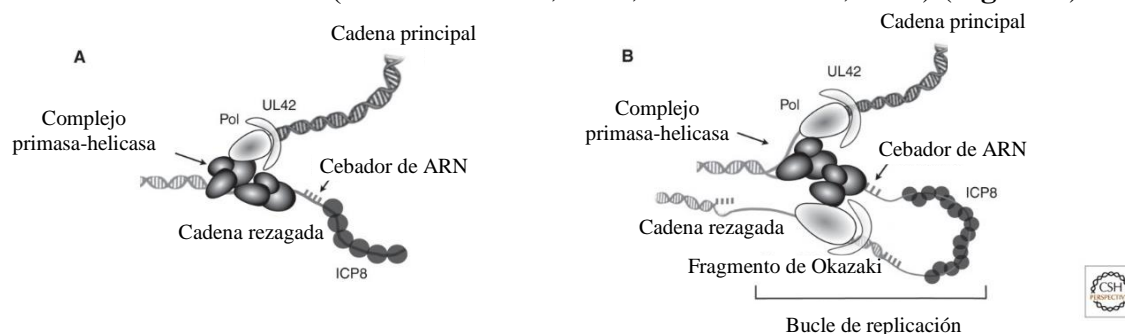


Figura 4. Replicación del genoma del HSV-1. **A.** En la Figura se observa la formación de la horquilla de replicación generada por la actividad del complejo primasa–helicasa. Las moléculas de ssDNA son recubiertas por ICP8, mientras que la primasa genera cebadores de ARN necesarios para el inicio de la síntesis de nuevas moléculas de ADN por actividad de la polimerasa viral (Pol). **B.** A medida que se extiende la cadena principal, en la cadena rezagada, la Pol genera fragmentos de Okazaki. Imagen adaptada de (Weller & Coen, 2012).

1.1.4.5. Empaquetamiento viral

Los herpesvirus preforman una cápside en el núcleo celular. Esta procápside tiene el potencial de madurar, empaquetar ADN genómico viral y ensamblarse en viriones funcionales (Booy *et al.*, 1991; Newcomb *et al.*, 2003; Nicholson *et al.*, 1994; Trus *et al.*, 1996).

Debido a que la síntesis del ADN viral conduce a la formación de concatémeros de genomas unidos de cabeza a cola, se deben generar genomas de longitud unitaria adecuada para la encapsidación. Este proceso de escisión y empaquetamiento de ADN es realizado por el complejo proteico terminasa (subunidades proteicas pUL15, pUL28 y pUL33) (Higgs *et al.*, 2008). El modelo de empaquetamiento actual, sugiere que luego de la translocación de la terminasa al núcleo celular, la misma, reconoce la señal específica para la escisión conocida como sitio *pac*, se une a pUL6, transfiere el

genoma a la procápside y finalmente la actividad nucleasa de la terminasa escinde el ADN bicatenario, generando genomas individuales, en rondas adicionales de escisión y empaquetamiento (Adelman *et al.*, 2001; Dasgupta & Wilson, 1999; Hodge & Stow, 2001; Newcomb *et al.*, 2001; Sheaffer *et al.*, 2001; White *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2019).

Finalmente, la cápside con el genoma se traslada hacia el espacio perinuclear mediante gemación de la membrana interna, adquiere una envoltura inicial, la cual se pierde nuevamente al fusionarse a la membrana nuclear externa, para su liberación al citoplasma celular (Guay & Lippe, 2006; Poliquin *et al.*, 1985). Las cápsides adquieren las proteínas del tegumento, las glicoproteínas virales y su membrana, probablemente en endosomas o en el aparato de Golgi (Turcotte *et al.*, 2005). Consecuentemente, la partícula viral es transportada en vesículas hacia el exterior, donde inicialmente ocurre la fusión de membranas de la vesícula a la membrana celular y la liberación mediante exocitosis (**Figura 3**) (Owen *et al.*, 2015).

1.1.4.6. Infección latente

Las nuevas partículas del HSV-1, que emergen del ciclo lítico infectan las neuronas sensoriales (p. ej., ganglios de la raíz dorsal y trigémino) y autónomas (p. ej., ganglios pélvicos mayores y cervicales superiores) del sistema nervioso periférico, que inervan el sitio de infección primaria del huésped. La infección de las células neuronales se inicia con la fusión de la membrana del HSV-1 a la membrana de la célula neuronal en el axón terminal (**Figura 5**). Esta fusión está mediada por la interacción de gD al receptor nectin-1, promoviendo la liberación de la nucleocápside al citoplasma celular (Richart *et al.*, 2003).

La nucleocápside es transportada a lo largo del axón al cuerpo de la célula neuronal, por un mecanismo conocido como transporte retrógrado. El transporte retrógrado está mediado por la interacción de la proteína del tegumento VP26 con la dineína citoplasmática (Dohner *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2004). Al igual que en el ciclo lítico, el genoma viral es liberado en el núcleo de la célula neuronal, donde éste ingresa en un estado no replicativo asociado a cromatina (Deshmane & Fraser, 1989).

Dentro del núcleo, los genomas permanecen en estado episomal donde no existe producción de virus infecciosos entre periodos de replicación lítica activa. Este evento es conocido como infección latente. El establecimiento de la latencia en el núcleo de la célula puede estar regulada por ICP0 (Chen *et al.*, 2000). En ausencia de ICP0, se sugiere que los cuerpos ND10 reconocen los extremos de la doble hélice de ADN como rotura de doble cadena, reparándola y generando un estado de latencia-episomal persistente por circularización del genoma (Everett & Maui, 1994; Jackson & DeLuca, 2003).

Diferentes estímulos tales como inmunodepresión, estrés sistémico, trauma local por cirugía, tensión mental, fatiga, daño en la piel que afecta las terminaciones nerviosas, exposición a luz UV, cambios hormonales, entre otros, inducen su reactivación (Grinde, 2013). Tras la reactivación se producen viriones infecciosos, los cuáles se trasladan mediante transporte anterógrado de regreso al sitio de infección, causando infecciones cutáneas recurrentes y la transmisión a nuevos huéspedes (**Figura 5**) (Mangold & Szpara, 2019).

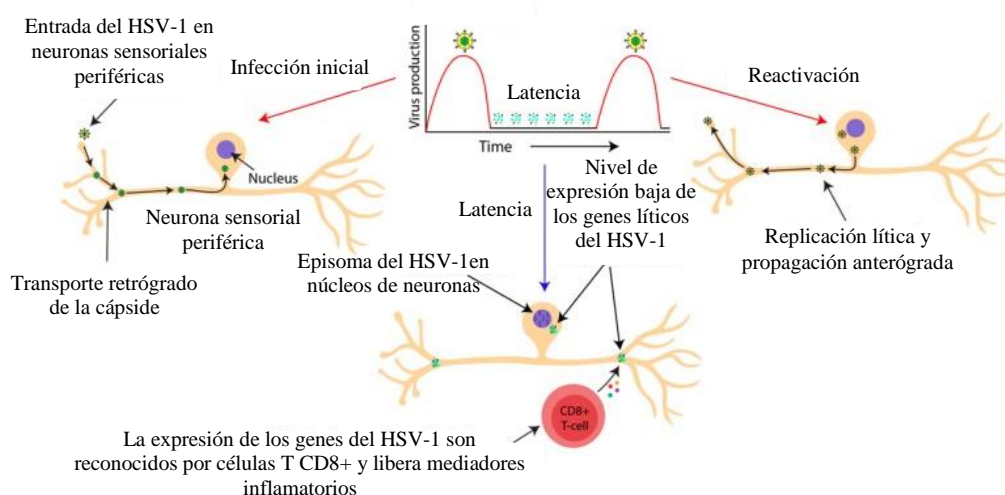


Figura 5. Dinámica de la infección del HSV-1 en células neuronales. El HSV-1 ingresa a las células neuronales a través de las terminaciones nerviosas sensoriales que inervan los tejidos de infección primaria. El genoma permanece en estado episomal dentro del núcleo, estableciendo una infección latente. Tras su reactivación, pueden producirse nuevas partículas infectivas, las cuáles trafican en dirección anterógrada de regreso al sitio de infección. Imagen adaptada de (Mangold & Szpara, 2019).

1.1.5. Tratamiento

En la actualidad no se dispone de una vacuna aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) para la prevención de infecciones causadas tanto por el HSV-1 como por el HSV-2. Por lo tanto, se utilizan medicamentos antivirales para tratar estas infecciones.

Los antivirales utilizados y aprobados por la FDA se clasifican en dos grupos. En el primer grupo se encuentra una variedad de análogos de nucleósidos que compiten por su incorporación en la síntesis de ADN viral. Ejemplos de estos análogos son: el Aciclovir (ACV), Penciclovir (PCV), Valaciclovir y Famciclovir (FMV). Mientras que en el segundo grupo se encuentra al análogo de pirofosfato, Foscarnet, el cual inhibe la síntesis del material genético viral luego de interactuar con la ADN polimerasa viral.

Entre estos medicamentos, el ACV es la droga de primera elección para tratar las infecciones por el HSV-1. El ACV es un profármaco análogo de la desoxiguanosina (dGTP), que carece de un grupo 3'-hidroxilo (**Figura 6**) (Boyd *et al.*, 1987; Elion *et al.*, 1977).

El mecanismo de acción del ACV requiere inicialmente de una trifosforilación selectiva en células infectadas. La primera fosforilación es catalizada por la timidina quinasa viral (HSVtk), mientras que la segunda y tercera fosforilación son catalizadas por las quinasa celulares GMP y NDP, respectivamente (Miller & Miller, 1980). El aciclovir trifosforilado compite con la dGTP por su incorporación en la cadena de ADN viral sintetizada. La incorporación del aciclovir trifosforilado resulta en una inhibición selectiva de la replicación del ADN al bloquear la introducción del siguiente desoxinucleósido trifosfato por la ADN polimerasa viral (Fyfe *et al.*, 1978; Miller & Miller, 1980).

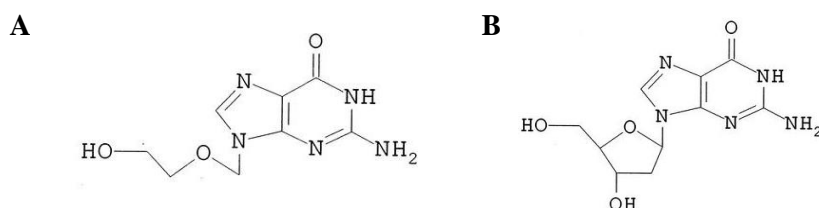


Figura 6. Estructura química del Aciclovir y de la Desoxiguanosina. A. Aciclovir B. Desoxiguanosina. Obsérvese que el Aciclovir carece de un grupo hidroxilo 3', a diferencia de la desoxiguanosina.

Si bien los antivirales contra HSV-1 son útiles para acortar la duración o reducir la incidencia de infecciones primarias o recurrentes, no existe un tratamiento eficaz que pueda eliminar completamente los genomas del HSV-1 latentes en las células nerviosas, por lo tanto, solo sirven para evitar los síntomas provocados por la reactivación, y no para curar definitivamente la enfermedad.

Debido a que el ACV sigue siendo utilizado como medicamento de primera línea para tratar estas infecciones, su uso masivo ha llevado a la aparición de virus resistentes a ellas. Se han reportado mutaciones en el gen codificante de la timidina quinasa viral, la cual se encarga inicialmente de la fosforilación selectiva del ACV (Christophers *et al.*, 1998; Gaudreau *et al.*, 1998), lo cual constituye un motivo adicional para buscar nuevos fármacos o estrategias de tratamiento que puedan interrumpir la latencia y la generación de nuevos virus infectivos.

1.2. Sistema CRISPR-Cas9 como estrategia para tratar las infecciones por el virus del *Herpes simplex* tipo 1.

Un enfoque novedoso y prometedor, actualmente estudiado para la interrupción o eliminación de genomas latentes y de virus infectivos, es el uso de la terapia génica basada en el sistema CRISPR-Cas9.

El sistema CRISPR-Cas fue postulado como un sistema inmune adaptativo de bacterias y *archaea*, que confiere inmunidad frente a virus y plásmidos (Chylinski *et al.*, 2014). El sistema CRISPR-Cas tipo II, está codificado por los loci CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) y los genes *Cas*. Los

loci CRISPR contiene secuencias repetitivas y secuencias espaciadoras intercaladas, mientras que los genes *Cas* (*CRISPR associated genes*) codifican las enzimas Cas que poseen actividad nucleasa (**Figura 7A**) (Jansen *et al.*, 2002; Mojica *et al.*, 2000).

La hipótesis sugiere que, luego de una infección por un bacteriófago, fragmentos cortos de ADN viral son integrados por Cas1/Cas2 en el genoma de la bacteria en el locus CRISPR (**Figura 7A**). Posteriormente, se transcriben las secuencias repetitivas y espaciadoras como una única molécula, conocida como precursor de ARN CRISPR (pre-ARN) (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005). Los pre-ARN son escindidos mediante enzimas para producir los ARN CRISPR cortos (crRNA) (McGinn & Marraffini, 2019). Una vez transcritos y procesados en ARN pequeños e individuales, los crRNA se alinean con el ARN transactivador (tracrRNA) (Haurwitz *et al.*, 2010). La interacción del crRNA:tracrRNA forman el llamado ARN guía (gRNA), que juntamente con la Cas9 forman el complejo CRISPR-Cas9 (**Figura 7B**). El crRNA contiene la secuencia guía de 20 nucleótidos cuya secuencia es complementaria con el blanco a ser editado, el tracrRNA cumple una función estructural al interactuar con Cas9 (Mojica *et al.*, 2000).

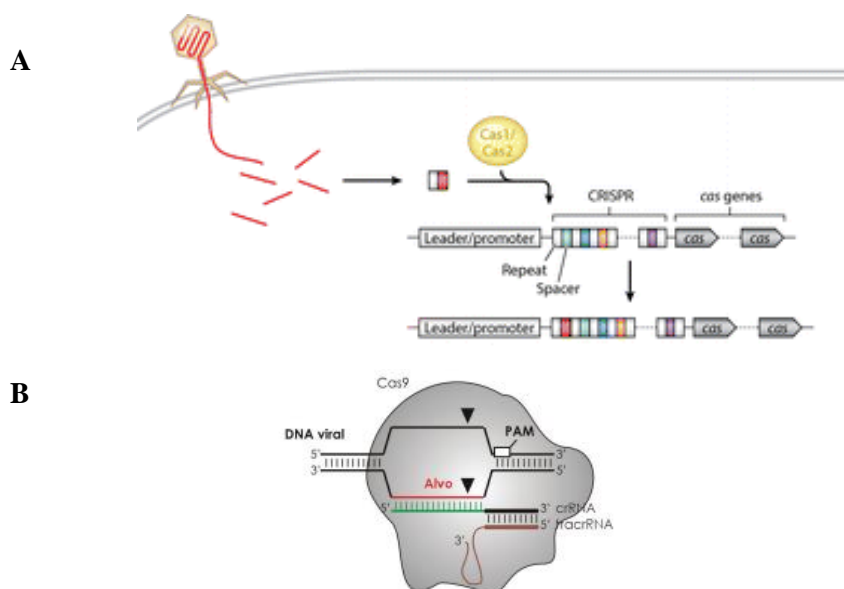


Figura 7. Sistema de defensa CRISPR-Cas9. **A.** Fragmentos de secuencias de ADN derivados de plásmidos o bacteriófagos son insertados como espaciadores en el locus CRISPR (Jiang & Marraffini, 2015). **B.** El sistema CRISPR-Cas9 está conformado por la enzima Cas9, por el ARN guía (crRNA:tracrRNA) y la secuencia blanco a ser editada. Imagen tomada de (Vieira *et al.*, 2016).

Basado en este mecanismo de acción natural bacteriana, fue desarrollada la técnica CRISPR-Cas9. La técnica consiste en utilizar una endonucleasa SpCas9 (generalmente Cas9 de tipo silvestre de *Streptococcus pyogenes*), un ARN guía y el blanco a ser editado (Ran *et al.*, 2013).

La endonucleasa SpCas9 posee una estructura bilobulada: un lóbulo de reconocimiento (REC), un lóbulo con actividad nucleasa (NUC), el cual contiene dos dominios catalíticos: RuvC y HNH y un dominio de interacción con PAM (PI) (Jinek *et al.*, 2012). Para que Cas9 pueda ser activada y direccionada al blanco, ella debe ser guiada por un ARN. Dos moléculas de ARN han sido fusionadas en el laboratorio de manera a facilitar el diseño del gRNA; ellas son el crRNA (~20 nucleótidos de longitud en el extremo 5') y el tracrRNA o también conocido como *scaffold* de unos ~80 nucleótidos de longitud en el extremo 3' (**Figura 8A**) (Cong *et al.*, 2013).

La secuencia a ser editada en el genoma es reconocida mediante la interacción de residuos conservados de arginina, presentes en el dominio PI de Cas9, con GG¹ del motivo PAM "5'-NGG-3'" (donde N puede ser cualquier nucleótido). Esta acción resulta en una separación de la doble hebra del ADN blanco y la interacción de una de las hebras con el gRNA complementario. La interacción del gRNA con la secuencia blanco inicia con el apareamiento perfecto del *seed* de ~ 8 nucleótidos de extensión y finalmente el resto de la secuencia del gRNA (**Figura 8A**) (Anders *et al.*, 2015; Semenova *et al.*, 2011).

La interacción estable entre el gRNA y Cas9 habilita a la enzima a escindir la secuencia blanco de la doble hebra del ADN, por medio de sus dominios catalíticos HNH (que escinde la hebra complementaria al gRNA) y RuvC (que escinde la otra hebra). Cabe resaltar que la escisión de la secuencia blanco ocurre cerca de 3-4 pb corriente arriba de PAM, provocando una ruptura de doble hebra (DSB) que podría repararse mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ), induciendo una alteración del gen blanco

¹ GG: dos guaninas consecutivas

por inserción/delección y el consecuente cambio en el marco de lectura (**Figura 8B**) (Jinek *et al.*, 2012).

Alternativamente, se puede incorporar un segmento de ADN que posea extremos complementarios con el gen blanco (ADN donador), de esta manera es posible que ocurra la reparación del gen blanco por medio del sistema de recombinación HDR (*Homology directed repair*) (**Figura 8B**). Utilizando esta estrategia es posible la edición de la secuencia del material genético en diferentes huéspedes (**Figura 8B**) (Lin *et al.*, 2014; Nambiar *et al.*, 2019).

El impacto que ha generado esta tecnología en la ingeniería genética ha sido tal que las investigadoras Charpentier y Doudna han sido galardonadas con el premio Nobel de Química 2020 por el descubrimiento del mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas9 (Ledford & Callaway, 2020).

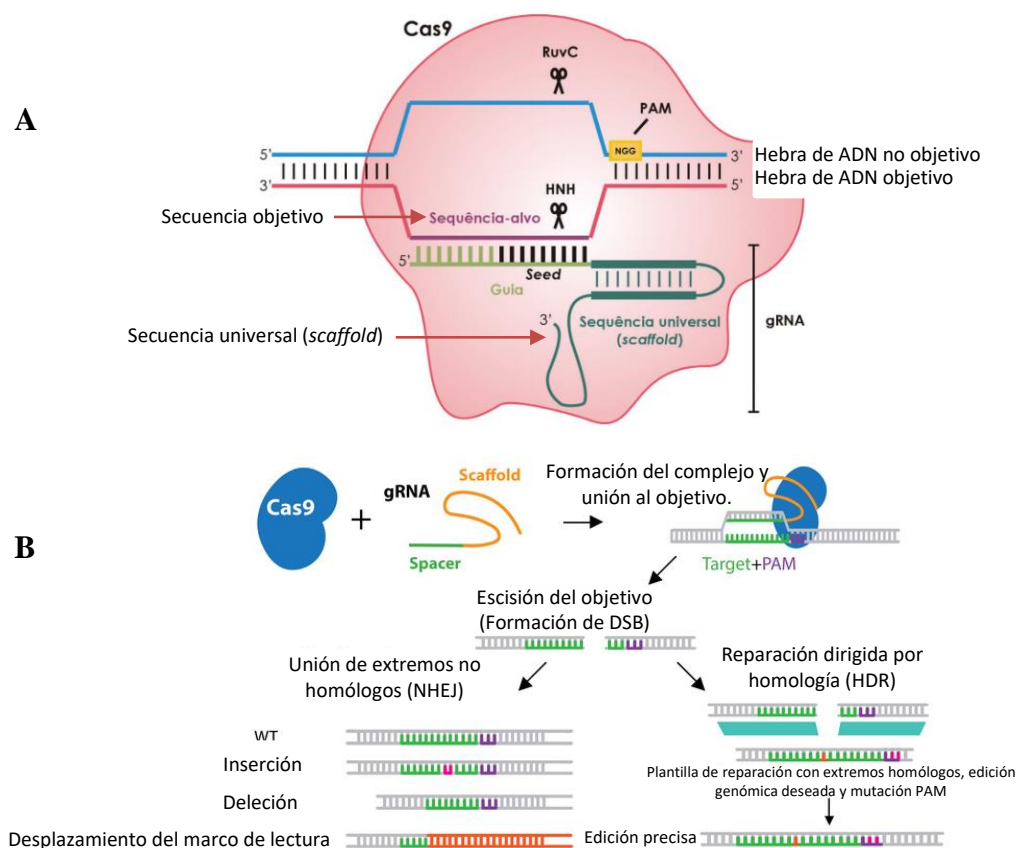


Figura 8. Sistema CRISPR-Cas9 y mecanismos de reparación del ADN. A. Representación esquemática del complejo Cas9/gRNA y blanco. **B.** Sistemas de reparación del ADN. Adaptada de Viera *et al* 2016. p. 39-49.

Recientemente, se ha utilizado el sistema CRISPR-Cas como herramienta para disminuir la replicación o eliminación del HSV-1 en modelos de infección lítica y latente. Para ello, se han diseñado gRNAs dirigidos a diferentes genes esenciales y/o no esenciales del HSV-1, tales como ICP0, ICP4, ICP27, UL7, UL8, UL19, UL23, UL24, UL29, UL30, UL52, entre otros (Aubert *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2016; Roehm *et al.*, 2016; van Diemen *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016).

Numerosas aproximaciones en modelos de infección lítica *in vitro* han demostrado resultados auspiciosos en reducir o eliminar la producción de nuevas partículas virales, suministrando el *cassette* de expresión transiente o estable del gen Cas9 y gRNAs dirigidos a los genes α , β y/o γ (Chen *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2016; van Diemen *et al.*, 2016). Además, se han obtenido resultados prometedores en modelos de infección latente *in vivo* e *in vitro* de HSV-1, ofreciendo la oportunidad de apuntar directamente el sistema CRISPR-Cas9 a genomas latentes para su disrupción o eliminación, preservando las neuronas y eliminando la posibilidad de reactivación viral (Aubert *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2020; van Diemen *et al.*, 2016).

Hasta la actualidad, los vectores como los virus adenoasociados recombinantes (rAAV) y lentivirus son los más utilizados en ensayos de terapia génica en HSV-1 (Aubert *et al.*, 2020; van Diemen *et al.*, 2016). Sin embargo, los rAAV aún presentan retos a vencer para mejorar los niveles de edición de genes, como: redirigirlos hacia tejidos específicos, limitada capacidad de empaquetamiento de genoma (menos de 5 Kb), baja tasa de transducción, inmunogenicidad y la acción de anticuerpos neutralizantes pre-existentes en personas previamente infectadas con AAV, lo cual representa un problema sobre la eficacia de la transferencia génica (Aubert *et al.*, 2016; Ronzitti *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2010). Por otro lado, el uso de vectores lentivirales para la expresión estable de la Cas9 y gRNAs anti-HSV-1, no son seguros para su uso en humanos, debido a su integración aleatoria en el genoma (Moiani A, Paleari, Y, 2012; van Diemen *et al.*, 2016).

Para mejorar la edición de genes en un modelo de infección lítica y utilizarlo a futuro en un modelo de infección latente, proponemos el suministro del sistema CRISPR-

Cas9 a células infectadas por el virus del *Herpes simplex* tipo 1, mediante el uso de fagos filamentosos tipo M13.

1.3. Bacteriófagos filamentosos

Los bacteriófagos (fagos) son virus que infectan exclusivamente bacterias. Los fagos filamentosos (Ff), pertenecientes a la familia *Inoviridae*, presentan una forma tubular semiflexible. Dentro del género *Inovirus*, los fagos filamentosos M13, f1, fd y ZJ/2 comparten un 98,5% de identidad genómica y sus mecanismos de replicación son idénticos (Rakonjac *et al.*, 2011; Wezenbeek *et al.*, 1980).

Estos fagos se caracterizan por ser no patogénicos, no líticos y se replican de manera exclusiva en bacterias *Escherichia coli* Gram negativas, que poseen un episoma F'(pili) (Jacobson, 1972).

1.3.1. Estructura del fago M13

El fago M13 posee un ssDNA circular de 6407 nucleótidos de longitud (Wezenbeek *et al.*, 1980). Su genoma contiene 11 genes superpuestos, y una región intergenómica no codificante que incluye un promotor, un terminador, los orígenes de replicación del ssDNA de hebra positiva y negativa (*ori*), así como la señal de empaquetamiento viral que forman horquillas de doble hebra en el ssDNA (**Figura 9A**) (Dotto *et al.*, 1981).

Las 11 proteínas estructurales y funcionales de la partícula viral son: a) proteínas implicadas en el ensamblaje del fago (pI, pIV y pXI); b) proteínas implicadas en la replicación del ADN viral (pII, pV y pX) y c) proteínas de la cápside viral (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX). Las proteínas de la cápside recubren al genoma por medio de interacción proteína - ácido nucleico, incluyendo 2750 unidades de la proteína mayoritaria pVIII, 3 a 5 unidades de las proteínas minoritarias pIII, pVI en el extremo proximal, y 3 a 5 unidades de pVII y pIX en el extremo distal, dando a la partícula viral un aspecto cilíndrico de ~ 900 nm de longitud (1 μ m) y ~ 6-6,5 nm de diámetro (**Figura 9B**) (Hay & Lithgow, 2019).

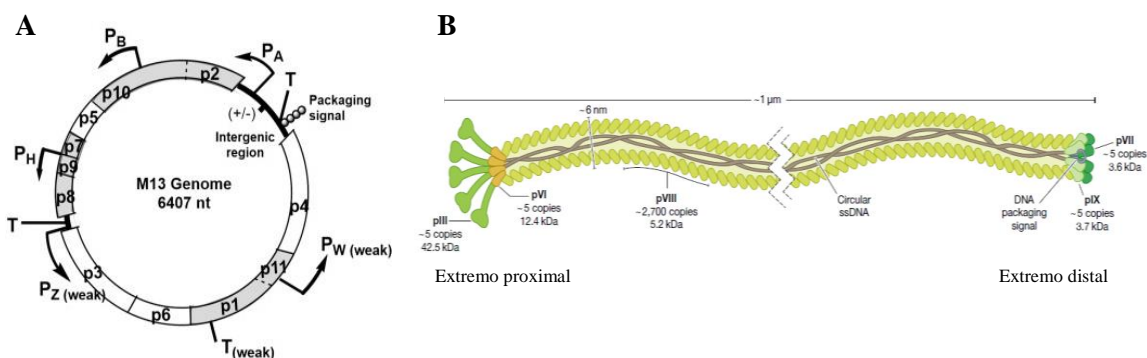


Figura 9. Mapa del genoma del fago M13 y representación esquemática de la partícula viral. **A.** El genoma está organizado en dos unidades de transcripción separadas; una región codificante que contiene 11 genes superpuestos y una región intergénica que contiene la señal de empaquetamiento viral. **B.** El genoma se encuentra recubierto por alrededor de 2700 copias de la proteína pVIII. En el extremo proximal se encuentran ~ 5 copias de las proteínas pVI y pIII, mientras que, en el extremo distal, ~ 5 copias de las proteínas pVII y pIX. Imagen tomada de (Hay & Lithgow, 2019).

1.3.2. Bacteriófagos filamentosos como herramienta biotecnológica

Hasta la actualidad, los fagos M13 han sido los más estudiados y explotados como herramientas biotecnológicas, con aplicaciones que van desde andamios de ingeniería de tejidos para simular la matriz extracelular en las que se albergan las células *in vivo* (Yoo *et al.*, 2014), la exposición de péptidos antigénicos en la superficie de las proteínas pIII, pVIII como plataforma para el desarrollo de vacunas (González-Mora *et al.*, 2020), el descubrimiento de epítomos (Scott & Smith, 1990), humanización de anticuerpos (Rader *et al.*, 1998), tratamiento potencial para la adicción a cocaína (Carrera *et al.*, 2004), potencial biotecnológico para combatir enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (Messing, 2016), hasta el desarrollo de biosensores (Moon *et al.*, 2019).

En el campo de la biomedicina los fagos filamentosos son usados como nanoportadores de fármacos y genes reporteros en células mamíferas, pues ofrecen ventajas como por ejemplo: 1) a diferencia de los retrovirus los bacteriófagos no poseen señales de integración en el genoma humano, esto es particularmente relevante debido a que se han observado casos donde al insertarse los virus han alterado genes humanos provocando la aparición de células cancerosas (Moiani A, Paleari, Y, 2012;

Schlimgen *et al.*, 2016); 2) carecen de tropismo intrínseco para células de mamíferos (Barrow, P A, Soothill, 1997); 3) sin embargo, pueden ser modificados genéticamente de tal manera a exponer en su superficie pequeñas proteínas o péptidos, tecnología denominada *Phage display* (Clackson *et al.*, 1991; Smith, 1985); 4) son estables bajo una variedad de duras condiciones químicas y ambientales (Branston *et al.*, 2013; Brigati & Petrenko, 2005; Moghimian *et al.*, 2016); 5) poseen mayor capacidad de empaquetamiento de ADN en comparación a otros vectores virales (Lundstrom, 2003); 6) incluso, hasta la actualidad existe registro que los fagos filamentosos M13 han sido utilizados como portadores inmunológicos (vacuna idiotípica) para un ensayo clínico de fase I/II dirigido a pacientes con mieloma múltiple avanzado, así como su uso en pacientes con cáncer para identificar ligandos dirigidos a tumores, con resultados prometedores, gracias a la simplicidad de los fagos, rentabilidad en tiempo y costo, seguridad y factibilidad (Krag *et al.*, 2006; Roehnisch *et al.*, 2014).

Esto permite que los fagos M13 sean altamente versátiles para su uso como vectores seguros en terapia génica, para la entrega de genes en células eucariotas y tejidos específicos (Lundstrom, 2003; Poul & Marks, 1999; Yata *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta estas ventajas y aplicaciones, generamos fagos recombinantes transportadores de un sistema CRISPR-Cas9, con el fin de abolir la replicación viral del HSV-1 en un modelo *in vitro* de infección lítica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general:

1. Construir fagos filamentosos recombinantes transportadores de un sistema CRISPR-Cas9 capaz de inhibir el ciclo viral del *Herpes simplex* tipo 1.

2.2. Objetivos específicos:

Desarrollar vectores tipo fagómico que permitan la expresión de Cas9 y gRNAs dirigidos contra el genoma del virus del *Herpes simplex* tipo 1.

1. Producir fagos recombinantes transportadores del sistema CRISPR-Cas9 dirigidos contra el genoma del virus del *Herpes simplex* tipo 1.
2. Analizar la capacidad de los fagos recombinantes de inhibir el ciclo viral del *Herpes simplex* tipo 1.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Construcción de vectores para la expresión de Cas9 y gRNAs

3.1.1. Diseño *in silico* de vectores

Del artículo publicado por (van Diemen *et al.*, 2016), se seleccionaron los gRNAs dirigidos a los genes esenciales del HSV-1, UL29 y UL52, codificantes de la proteína mayor de unión a ssDNA (ICP8) y de la subunidad ADN primasa del complejo heterotrimérico primasa-helicasa, respectivamente. Los gRNAs seleccionados a partir de un conjunto fueron gRNA-UL29 #1 y gRNA-UL52 #1, cuyas secuencias se detallan en la **Tabla 1**.

Seguidamente, se realizó una búsqueda del plásmido que permita la expresión transiente del complejo Cas9/gRNAs en células eucariotas, en el repositorio Addgene (www.addgene.org). El plásmido seleccionado fue el pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) de 9288 pb, que incluye todos los elementos de un vector de tipo fagómico. Éste fue rediseñado por Ran y colaboradores (Ran *et al.*, 2013), tomando como base al plásmido pX330-U6-chimeric_BB-CBh-hSpCas9 diseñado por Cong y colaboradores (Cong *et al.*, 2013).

Las secuencias de los diferentes elementos que componen el plásmido fueron descargadas del repositorio Addgene (*Plasmid* #48138) en formato *GenBank* y analizadas en el editor de secuencias ApE 2.0.49 (*A plasmid Editor*) (Disponible en; <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>).

El diseño *in silico* de dos vectores con un único gRNA, requirió en un primer paso, diseñar el dúplex de oligonucleótidos, agregando en los extremos de este, secuencias complementarias con los extremos cohesivos generados por *Bbs*I (isoesquizómero de *Bpi*I) en PX458 (**Tabla 1**). El esquema de cómo se insertan estos fragmentos en el vector puede observarse en la **Figura 10**.

De esta manera se diseñaron dos vectores, denominados en adelante PX458-UL29 y PX458-UL52.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la obtención de gRNAs dirigidos al genoma de HSV-1, en base a lo publicado por (van Diemen *et al.*, 2016).

Nombres de los gRNAs	Nombres de los oligonucleótidos	Secuencias de oligonucleótidos ^a (5'→3')
gRNA-UL29	UL29gRNA_Fw	<u>CACCGCGAGCGTACACGTATCCC</u>
	UL29gRNA_Rv	<u>AAACGGGATACGTGTACGCTCGC</u>
gRNA-UL52	UL52gRNA_Fw	<u>CACCGCCGTCGGTCGCATAAAGCG</u>
	UL52gRNA_Rv	<u>AAACCGCTTTATGCGACCGACGGC</u>

^a Se añadió el nucleótido guanina (resaltado en negrita “G”) al inicio de las secuencias de los gRNAs dirigidos a los genes UL29 y UL52, ya que comúnmente es necesaria para iniciar la transcripción y expresión eficiente de gRNAs y otros RNA pequeños no codificantes, a través del promotor U6. Los nucleótidos subrayados indican las secuencias adicionales añadidas que son complementarias con los extremos cohesivos del vector digerido con *Bbs*I.

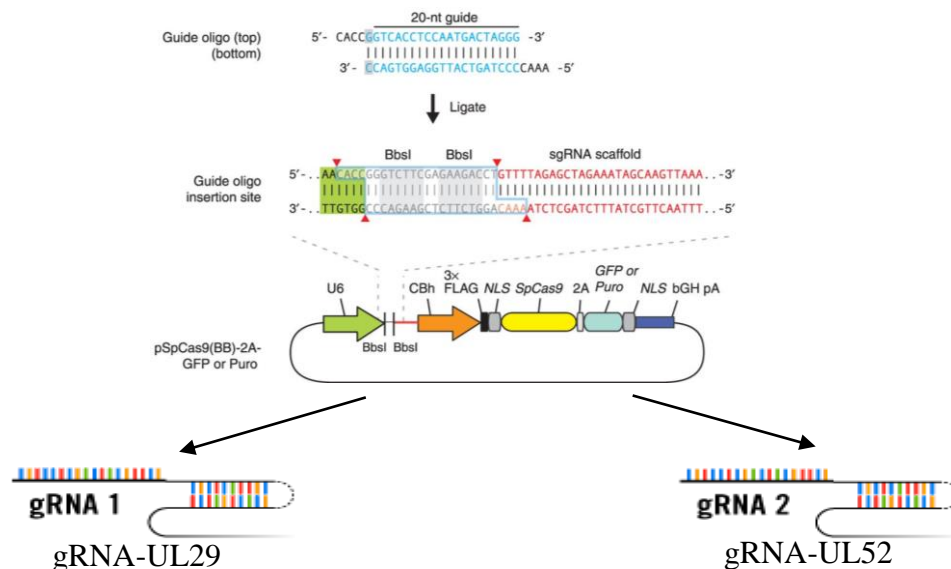


Figura 10. Representación esquemática de la clonación de los dúplex de oligonucleótidos, para la expresión de cada gRNA en el plásmido PX458. Adaptada de (Ran *et al.*, 2013).

Seguidamente, se diseñó un vector múltiplex con doble gRNA. Para el mismo, se diseñó un par de cebadores que amplifican a partir de la construcción PX458-UL52, la secuencia del promotor U6 + gRNA-UL52 + *scaffold*, de 449 pb de longitud (**Tabla 2**).

El amplicón generado fue clonado en el vector PX458-UL29 en los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *Xba*I y *Kpn*I. La construcción obtenida fue denominada PX458-UL29/ UL52.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del promotor U6 + gRNA-UL52 + scaffold.

Nombres de los oligonucleótidos	Secuencias de nucleótidos ^a (5'→3')	Tamaño del amplicón (pb)
U6_XbaI_Fw	GGGG <u>TCTAGAG</u> AGGGCCTATTCCCATGAT	449
tracRNA_KpnI_Rv	GGGG <u>GGTACCGC</u> ATTGTCTGCAGAATTG	

^a Las secuencias subrayadas indican el sitio de reconocimiento de las enzimas de restricción *Xba*I y *Kpn*I, respectivamente. Mientras que las “G” (en negrita) fueron añadidas para mejorar la escisión de corte de las enzimas de restricción.

3.1.2. Obtención del plásmido PX458

El plásmido PX458 solicitado a Addgene, fue proporcionado en *Escherichia coli* cepa Stb13 transformadas con el plásmido de interés. El ADN plasmidial fue extraído para verificar la presencia de PX458 y posteriormente utilizarlo para transformar bacterias *E. coli* cepa ER2738. En la **Figura 11**, se detalla el flujo de trabajo seguido.



Figura 11. Flujo de trabajo para la obtención y verificación del plásmido PX458, a partir de bacterias transformadas *E. coli* Stb13.

A partir del stock original de bacterias *E. coli* Stb13 transformadas con el plásmido PX458, se procedió a realizar un sub-cultivo mediante estriado por agotamiento en agar LB (Luria Bertani) en presencia de 100 µg/mL de ampicilina. El sub-cultivo se incubó a 37 °C por 16 h. Transcurrido este tiempo, se seleccionaron 5 colonias aisladas y se extrajo ADN plasmidial siguiendo el protocolo de *Miniprep*, con algunas modificaciones del laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción.

Brevemente, se sembró individualmente cada uno de los 5 clones de bacterias en 4 mL de medio líquido LB, en presencia de 100 µg/mL de ampicilina. El cultivo se incubó

a 37 °C por un máximo de 16 h., con agitación constante. Luego se procedió a centrifugar alícuotas de 2 mL del cultivo a 8000 rpm por 5 min. a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 200 µL de solución fría P1 (50 mM Tris- HCl, pH 8; 10 mM de EDTA, 100 µg/mL de RNAsa A). Posteriormente se agregó 200 µL de solución P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) y 200 µL de solución fría P3 (3M de acetato de potasio pH 5,5). Entre agregado de soluciones, se invirtió 4 veces cada tubo para homogeneizar. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. a 4 °C. Se recuperó 500 µL del sobrenadante al cual se agregó 350 µL de isopropanol (0,7 volúmenes), se homogeneizó por inversión, y se incubó a -20 °C por 30 min. Seguidamente, se centrifugó a 13000 rpm por 20 min. a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 300 µL de etanol 70%. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a 65 °C para eliminar el resto de etanol. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 30 µL de agua ultrapura grado molecular (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Thermo Fisher Scientific).

El producto de la *Miniprep* se purificó mediante un *kit* comercial basado en columnas de membrana de sílice, siguiendo las indicaciones del fabricante (PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit, Thermo Fisher Scientific).

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se determinó mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia de las muestras a tres longitudes de onda; 230 nm, 260 nm y 280 nm. Para determinar la concentración, se tuvo en cuenta la **Fórmula 1** y la relación 1 DO_{260 nm} equivale a 50 ng/µL de ADN de doble hebra. Mientras que, la pureza de los ácidos nucleicos fue determinada mediante la relación de los valores de absorbancia a 260/230 y 260/280. Se consideraron como valores óptimos, relaciones de 260/230= $x \geq 2$ y relaciones 260/280= $1,8 \leq x \leq 2$.

Fórmula 1.

$$\text{Concentración de ADN (ng/µL)} = \text{Absorbancia}_{260 \text{ nm}} \times 50 \times \text{factor de dilución.}$$

3.1.3. Tamizaje de plásmidos extraídos de clones bacterianos, mediante GFP-qPCR.

Con la finalidad de verificar la presencia del gen GFP en los plásmidos purificados anteriormente, se amplificó una secuencia parcial de 201 pb del gen GFP, mediante PCR en tiempo real (qPCR). Para lo cual, se utilizaron los cebadores genéricos GFP_qPCR_Fw y GFP_qPCR_Rv (Gaudin & Kirchhausen, 2015), cuyas secuencias se detallan en la **Tabla 3**. La qPCR de dos pasos se llevó a cabo utilizando el *kit* comercial SSO Advanced Universal SYBR® Green Supermix (Bio - Rad, USA) el cual contiene dNTPs, *Sso7d fusión polymerase*, MgCl₂, SYBR Green I dye, potenciadores y estabilizadores.

La mezcla de reacción contenía 1x de la *Supermix*, 5 µM de cada cebador *forward* y *reverse*, 50 ng del plásmido y el volumen final de reacción de 10 µL se ajustó con agua ultrapura grado molecular. El esquema de termociclado, se estandarizó en función a las indicaciones propuestas por el fabricante del *kit* comercial citado anteriormente junto con lo reportado por (Gaudin & Kirchhausen, 2015). Los parámetros utilizados fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 s., hibridación de cebadores y extensión a 61 °C por 60 s.

La recolección de datos de fluorescencia se realizó al final de cada ciclo, mediante una curva de fusión (*melting*) de los amplicones, para verificar la especificidad del cebador al final de cada reacción, iniciando a 60 °C para luego continuar con tiempos de rampa de 0,1 °C/s hasta 95 °C por 20 s.

Tabla 3. Cebadores para la amplificación de una secuencia parcial del gen GFP por qPCR.

Nombre de los oligonucleótidos	Secuencias de nucleótidos (5'→3')	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura de <i>melting</i> (°C)
GFP_qPCR_Fw	AAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC	201	65,3
GFP_qPCR_Rv	CTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAA		65,3

Los clones de *E. coli* Stb13 positivos por GFP-qPCR, fueron criopreservados a -80 °C, en 10% de glicerol estéril. Así mismo, los plásmidos extraídos fueron guardados a -20 °C hasta su posterior uso para transformación bacteriana.

3.1.4. Preparación de bacterias *E. coli* ER2738 calcio-competentes y determinación de eficiencia.

Se produjeron bacterias *E. coli* ER2738 competentes, mediante el método de Cloruro de calcio (CaCl₂), siguiendo la metodología estandarizada en el laboratorio. Estas bacterias fueron criopreservadas a -80 °C en glicerol estéril a una concentración porcentual del 10% y volumen final de 100 µL.

Posteriormente, se calculó la eficiencia de transformación. El cálculo de la eficiencia se basó en determinar la cantidad de colonias bacterianas transformadas en función a la cantidad de µg de ADN con el cual son transformadas. El método consistió en utilizar tres *stocks* de bacterias calcio-competentes, dos sometidas a transformación con 100 ng del plásmido pcDNA 3.1. A (+), el cual contiene un *cassette* genético de resistencia a ampicilina. El tercer *stock* se utilizó como control del proceso, reemplazando el plásmido por 2 µL de agua ultrapura grado molecular.

Brevemente, luego de la adición del plásmido, la mezcla se incubó en hielo por 30 min, posteriormente se realizó un choque térmico a 42 °C por 1 min. 30 s. con una posterior incubación en hielo por 2 min. Se adicionó 900 µL de medio líquido LB a 37 °C, y se recuperaron las bacterias por incubación a 37 °C por 1 h., sin agitación. Mediante centrifugación a 7000 rpm, se obtuvo un precipitado. Se retiró 900 µL del sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en los 100 µL restantes del medio líquido LB. Los 100 µL de bacterias resuspendidas fueron distribuidas uniformemente con la espátula de Drigalski, sobre agar LB en presencia de 100 µg/mL de ampicilina.

Finalmente, las placas fueron incubadas a 37 °C por un máximo de 16 h. Transcurrido este tiempo, se contabilizaron y se promediaron las colonias obtenidas en las placas de ensayo y control para determinar la eficiencia, aplicando la **Fórmula 3**.

Fórmula 3

$$\varepsilon = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} \times 10}{\text{concentración de ADN en } \mu\text{g}/\mu\text{L}}$$

Donde: ε representa la eficiencia de transformación, medida en col/µg de ADN.

3.1.5. Transformación de bacterias *E. coli* cepa ER2738 calcio-competentes con el plásmido PX458.

Se transformaron dos *stocks* de bacterias *E. coli* ER2738 calcio-competentes con 100 ng del plásmido PX458 extraído del clon bacteriano 1 (**sección 3.1.2. y 3.1.3.**). Mientras que, un tercer *stock* de bacterias se utilizó como control del proceso, reemplazando el plásmido por 2 μL de agua ultrapura grado molecular. La metodología de transformación bacteriana fue la descrita anteriormente en la **sección 3.1.4.** Las bacterias ER2738 transformadas con el plásmido PX458 y el control, fueron distribuidas uniformemente en agar LB en presencia de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. Las placas fueron incubadas a 37 °C por un máximo de 16 h.

Transcurrido este tiempo, se contabilizaron y se procedió a realizar el tamizaje de colonias por PCR a punto final, para la verificación de la transformación exitosa.

3.1.6. Tamizaje de clones *E. coli* ER2738 transformadas con los plásmidos PX458, mediante PCR de colonias.

Para el tamizaje de bacterias transformadas con PX458, se amplificó una secuencia parcial del gen GFP por PCR en tiempo real, utilizando los oligonucleótidos detallados en la **Tabla 3**. Los parámetros seguidos de qPCR, se detallaron anteriormente en la **sección 3.1.3.**

Se aislaron 5 colonias de bacterias que crecieron en las placas del ensayo de transformación. Cada colonia se resuspendió en 50 μL de agua bidestilada estéril, y se utilizó 4 μL de la misma como templado en la reacción de PCR.

Los clones de *E. coli* ER2738 positivos por GFP-qPCR, fueron criopreservados a -80 °C, en 10% de glicerol estéril.

3.1.7. Generación de los vectores PX458-UL29, PX458-UL52.

El paso previo para la construcción de los vectores PX458-UL29 y PX458-UL52 consistió en llevar a cabo una reacción de digestión del plásmido PX458 (extraído, purificado y cuantificado como se indica en la **sección 3.1.2.**), con la enzima de restricción *BpiI* (GAAGAC(2/6)^), con la finalidad de generar los extremos cohesivos

necesarios para la clonación del dúplex de oligonucleótidos de la secuencia guía (gRNA) **Tabla 1**.

Para cada constructo la reacción de digestión se llevó a cabo con 5 µg del plásmido PX458 purificado, 1 U de la enzima *BpiI* (Thermo Fisher Scientific), 1x del *Buffer G* y el volumen final de reacción de 30 µL se ajustó con agua ultrapura grado molecular. La incubación se realizó a 37 °C por 3 h. 30 min. en el termociclador de PCR de punto final SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific).

El producto de la restricción se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1x (40 mM de Tris, 200 mM de ácido acético y 10 mM de EDTA), a 100 Voltios por 45 min. El marcador de peso molecular utilizado fue de 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific). Para verificar la escisión del plásmido, en uno de los carriles se agregó el producto de la *Miniprep* sin digerir con la enzima de restricción.

La tinción del gel se realizó mediante el empleo de 1x de SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific). El gel se visualizó bajo luz UV y se fotodocumentó.

La banda esperada de 9266 pb correspondiente al vector linearizado, se purificó a partir del gel siguiendo las indicaciones del fabricante del *kit* comercial (PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit, Thermo Fisher Scientific), y el eluato se cuantificó mediante espectrofotometría, aplicando la **Fórmula 1**.

Una vez obtenido el vector linearizado purificado, se llevó a cabo la reacción de ligación del inserto en el vector. Para lo cual, cada inserto se diseñó como oligonucleótidos, como se indicó en la **sección 3.1.1**. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa (Macrogen, Korea) y parcialmente hibridados (*overlapping primers*) en el laboratorio.

La hibridación de oligonucleótidos se realizó preparando dos mezclas, una para el gRNA-UL29 y la otra para el gRNA-UL52. Cada mezcla contenía 3,75 µM de cada par de oligonucleótidos detallados en la **Tabla 1**, y el volumen final de 20 µL se ajustó con agua ultra pura grado molecular. El tubo contenedor, se incubó a 100 °C por 5 min. en el termociclador de punto final. Se retiró el tubo contenedor y se dejó enfriar

a temperatura ambiente para favorecer la hibridación parcial de los oligonucleótidos, a fin de obtener el inserto de doble hebra.

Cada inserto fue clonado en el vector PX458 digerido y purificado. La reacción de ligación se llevó a cabo mediante la actividad de 1 U de la enzima T4 DNA ligasa (Promega), en presencia de 1x *Buffer* T4 ligasa, 100 ng del vector linearizado PX458, mientras que la cantidad del inserto se calculó teniendo en cuenta la razón molar 5:1 y aplicando la **Fórmula 2**, en un volumen final de reacción de 10 µL. La reacción se llevó a cabo a 22 °C por 3 h. 30 min., en el termociclador de punto final.

Como control negativo, se utilizó la misma mezcla de reacción, excepto sin el agregado del inserto, cuyo volumen fue sustituido por agua ultra pura grado molecular.

Fórmula 2.

$$ng \text{ del inserto} = \frac{ng \text{ vector} \times kb \text{ inserto}}{kb \text{ vector}} \times \text{razón molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}}$$

El producto de la ligación se utilizó en su totalidad, para transformar bacterias calcio-competentes *E. coli* ER2738, siguiendo la metodología de transformación descrita en la **sección 3.1.4**.

3.1.8. Tamizaje de clones *E. coli* ER2738 transformadas con los plásmidos PX458-UL29, PX458-UL52, mediante PCR.

Se aislaron 5 colonias de bacterias que crecieron en las placas del ensayo de transformación correspondiente a cada plásmido (PX458-UL29 y PX458-UL52). Cada colonia se resuspendió en 50 µL de agua bidestilada estéril, para utilizarla como templado en la reacción de PCR en punto final.

La mezcla de reacción de la PCR contenía; 1x del *Buffer TopTaq*, 1x de Coral Load, 0,3 mM de dNTPs, 0,3 µM de cada uno de los cebadores (Para ambas construcciones, se utilizaron el mismo cebador *forward* BLA_fw1 5'-TGATAACACTGCGGCCAACT-3', mientras que el cebador *reverse* fue diferente para cada constructo: UL29gRNA_Rv 5'-AAACGGGATACGTGTACGCTCGC-3', para PX458-UL29; UL52gRNA_Rv 5'-AAACCGCTTTATGCGACCGACGGC-3'

para PX458-UL52), 1 U de *TopTaq DNA polymerase* (Qiagen), 2 μ L de las bacterias resuspendidas y el volumen final de reacción de 10 μ L se ajustó con agua ultrapura grado molecular. En todos los casos, el control negativo de PCR, contenía todos los reactivos de la mezcla de reacción, excepto el agregado de bacterias resuspendidas, cuyo volumen fue reemplazado con agua bidestilada estéril (ddH₂O). Además, como control de especificidad de la PCR, se utilizó el plásmido PX458 sin inserto.

Las condiciones de amplificación en el termociclador fueron; desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min., seguidos de 35 ciclos de los pasos de desnaturalización a 95 °C por 1 min., hibridación de cebadores a 63 °C por 1 min., extensión a 72 °C por 2 min. y extensión final a 72 °C por 10 min.

Los productos de PCR, fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, siguiendo las mismas condiciones descritas en la **sección 3.1.7**. El amplicón esperado para PX458-UL29 fue de 1570 pb y 1571 pb para PX458-UL52, aproximadamente.

Todos los clones positivos para PX458-UL29, PX458-UL52, fueron criopreservados a -80°C, en presencia de 10% de glicerol estéril.

3.1.9. Generación del vector PX458-UL29/UL52.

Posteriormente se construyó el vector con doble gRNA. Para lo cual se amplificó la secuencia del promotor U6 + secuencia del gRNA-UL52 + *scaffold*, a partir del plásmido PX458-UL52, seguido de la clonación del inserto generado en PX458-UL29.

La reacción de amplificación se realizó en una mezcla que contenía; 1x del *Buffer Plat Pfx*, 1 mM de MgSO₄, 0,3 mM de dNTPs, 0,3 μ M de cada uno de los cebadores detallados en la **Tabla 2**, 1 U de la ADN polimerasa de alta fidelidad *Platinum™ Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen) y 100 ng del plásmido PX458-UL52 clon 5. El volumen final de reacción de 50 μ L se ajustó con agua ultrapura grado molecular. El control negativo de PCR contenía todos los reactivos de amplificación, excepto el ADN molde, el cual fue sustituido por agua ultrapura.

Las condiciones de PCR a punto final fueron; desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min., seguidos de 35 ciclos de los pasos de desnaturalización a 94 °C por 1 min.,

hibridación de cebadores a 56 °C por 1 min., extensión a 68 °C por 45 s. y extensión final a 68 °C por 10 min.

El producto de PCR se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% siguiendo las mismas condiciones descritas en la **sección 3.1.7**. El fragmento esperado de aproximadamente 449 pb, se purificó a partir del gel y el ácido nucleico fue cuantificado aplicando la **Fórmula 1**.

Con la finalidad de generar los extremos cohesivos en el inserto, aproximadamente 3,6 µg del amplicón purificado fueron digeridos con 10 U de cada una de las enzimas de restricción *XbaI* y *KpnI* (Thermo Fisher Scientific), cuya mezcla de reacción contenía 1x del *Buffer* Tango. El volumen final de reacción de 50 µL se ajustó con agua ultrapura grado molecular y la incubación se realizó a 37 °C por 3 h. 30 min. en el termociclador de PCR a punto final.

El producto de la restricción se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% siguiendo las mismas condiciones descritas en la **sección 3.1.7**, la banda fue purificada a partir del gel y el ácido nucleico se cuantificó aplicando la **Fórmula 1**.

Posteriormente, 2,4 µg del plásmido PX458-UL29 purificado fue digerido con las enzimas de restricción *XbaI* y *KpnI* en las mismas condiciones anteriormente descritas. El producto fue resuelto mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% siguiendo las mismas condiciones descritas en la **sección 3.1.7**, la banda se purificó a partir del gel y el ácido nucleico se cuantificó aplicando la **Fórmula 1**.

La reacción de ligación se llevó a cabo como se describió anteriormente en la **sección 3.1.7**, utilizando razón molar 4:1.

El producto de la ligación se utilizó en su totalidad para transformar bacterias *E. coli* ER2738 calcio-competentes, siguiendo la metodología anteriormente descrita en la **sección 3.1.4**.

El tamizaje de clones se realizó mediante PCR de colonias, siguiendo la metodología descrita en la **sección 3.1.8**, pero utilizando los cebadores UL29_gRNA_Fw y UL52_gRNA_Rv, cuyas secuencias se detallan en la **Tabla 1**. El producto de 462 pb se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% siguiendo las mismas condiciones descritas en la **sección 3.1.7**.

Todos los clones positivos para PX458-UL29/UL52, fueron criopreservados a -80 °C, en presencia de 10% de glicerol estéril.

3.2. Transfección de células HEK293T con los diferentes constructos e infección con HSV-1.

Para el ensayo de transfección, se extrajeron y se purificaron los plásmidos de cada constructo al igual que el control PX458, siguiendo la metodología descrita en la **sección 3.1.2.**

Las células adherentes HEK293T se transfectaron con los diferentes constructos (PX458, PX458-UL29, PX458-UL52, PX458-UL29/UL52), con la finalidad de verificar que el sistema CRISPR-Cas9 generado, es capaz de eliminar la producción de nuevas partículas del HSV-1, en un modelo de infección lítica.

Para lo cual, en 6 pocillos de una placa de 24 se cultivaron células HEK293T en un porcentaje de confluencia del 90% (~45.000 células/pocillo) en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, aminoácidos no esenciales, penicilina y estreptomicina (Pen/Strep). Las células fueron mantenidas en estufa a 37 °C en una atmósfera humedecida con CO₂ al 5%, hasta observar adherencia de las células en el porcentaje de confluencia indicado anteriormente.

El ensayo de transfección se realizó siguiendo el método de alta eficiencia con precipitado de fosfato de calcio y ADN formado en HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) reportado por (Kingston *et al.*, 1996). El método consistió en preparar una solución estéril que contenía 0,125 M de CaCl₂, 1x del *Buffer* HeBS pH 7,2 (0,28 M NaCl, 0,05 M HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄), 1 µg del plásmido purificado (para cada grupo de ensayo) y el volumen final de 100 µL se ajustó con agua bidestilada estéril. Esta solución se agitó manualmente y luego pre-incubó por 20 min. a temperatura ambiente, para favorecer la formación de un complejo de fosfato de calcio-ADN. Posterior a ésta pre-incubación, los 100 µL de la solución fue agregada gota a gota a la monocapa de células. La placa se incubó por 16 h. a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Transcurridas las 16 h., el medio de cultivo se reemplazó por medio completo en todos los grupos, previo lavado con PBS 1x pH 7,4, y nuevamente se incubó a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ (**Figura 12**).

Luego de 46 h. post-transfección, las células HEK293T fueron tripsinizadas y se volvieron a sembrar por triplicado 15000 células/pocillo para cada condición (~30% de confluencia) en una placa de 24 pocillos que contenían *coverslips* de vidrio (12 mm de diámetro y 0.13 mm ~ 0.16 mm de grosor) recubierto con gelatina al 0,1% en PBS estéril. Las células fueron mantenidas en estufa a 37 °C en una atmósfera humedecida con CO₂ al 5% por 24 h. para permitir la adherencia de las células.

Los grupos de ensayo fueron: células infectadas con HSV-1 y transfectadas con: PX458, PX458-UL29, PX458-UL52 y PX458 UL29/UL52. Los controles fueron: control de células sin infectar y control de células infectadas con HSV-1.

3.2.1. Infección de células HEK293T con el virus del *Herpes simplex* tipo 1.

La cepa F de HSV-1 utilizada, fue proporcionada amablemente por el Dr. Jonás Chnaiderman de la Universidad de Chile y el Dr. Bernard Roizman Sc. D. de la Universidad de Chicago (Ejercito *et al.*, 1968). El virus se propagó en células Vero utilizando técnicas de cultivo estándar, cosechado a partir del sobrenadante y se tituló en el laboratorio mediante el ensayo de reducción de placa (PRA). Para la infección de las células, se utilizó un *stock* de HSV-1 de título viral 7×10^7 Pfu/mL.

Luego de las 70 h. post-transfección, los grupos de ensayo y el control infectado fueron infectados con el virus del *Herpes simplex* tipo 1. Primeramente, las células fueron lavadas con PBS 1x y seguidamente la infección se realizó adsorbiendo el virus a una multiplicidad de infección (MOI) de 30 por 1 h. a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se retiró el inóculo y las células fueron lavadas dos veces con PBS 1x y nuevamente se agregó medio DMEM 1x + Pen/Strep suplementado con SFB 10% y posteriormente se incubó a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ hasta completar 100 h. post-transfección (30 h. adicionales).

Finalmente, los *coverslips* con las células adheridas a ellas fueron retiradas y se utilizaron para el ensayo de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (**Figura 13**).

3.2.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Las células adheridas a los *coverslips* fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 min. a temperatura ambiente, y se permeabilizaron con Tritón X-100 al

0,2% en PBS 1x pH 7,4 por 5 min. Seguidamente, las células se incubaron con una solución de gelatina 0,2% en PBS 1x pH 7,4, por 1 h. a temperatura ambiente. Posteriormente, las células adheridas fueron incubadas con una dilución 1:100 del anticuerpo primario monoclonal de ratón Anti - *Herpes simplex virus Glycoprotein D* clon LP14 (Merck) a 37 °C durante 30 min. Los *coverslips* fueron lavados con PBS 1x, para luego incubar con una dilución 1:250 del anticuerpo secundario Alexa Fluor® 555, a 37 °C durante 30 min., bajo oscuridad.

Finalmente, las láminas fueron montadas utilizando líquido de montaje (Mowiol-488, agua ultrapura grado molecular, Glicerol y DABCO) e incubadas a 60 °C por 20 min, en oscuridad.

Para observar la emisión de fluorescencia de la GFP_{Exc/Em λ 475/509 nm}, las células fueron excitadas con luz azul en el microscopio invertido de fluorescencia, mientras que, para determinar la presencia de la gD, las células fueron excitadas con luz verde (**Figura 12**).

Para determinar el porcentaje de infección en el grupo control infectado, se contabilizó 100 células con luz blanca y se observó cuántas de ellas se encontraban infectadas con HSV-1. Por otro lado, en los diferentes grupos de tratamiento, se contabilizaron 100 células GFP positivas y de ellas se observaron si se encontraban infectadas o no. Los resultados fueron expresados en % de células infectadas y se elaboró gráficos de barras con el programa *GraphPad Prism*. Se tomaron imágenes de las células y se analizaron con el software ImageJ.

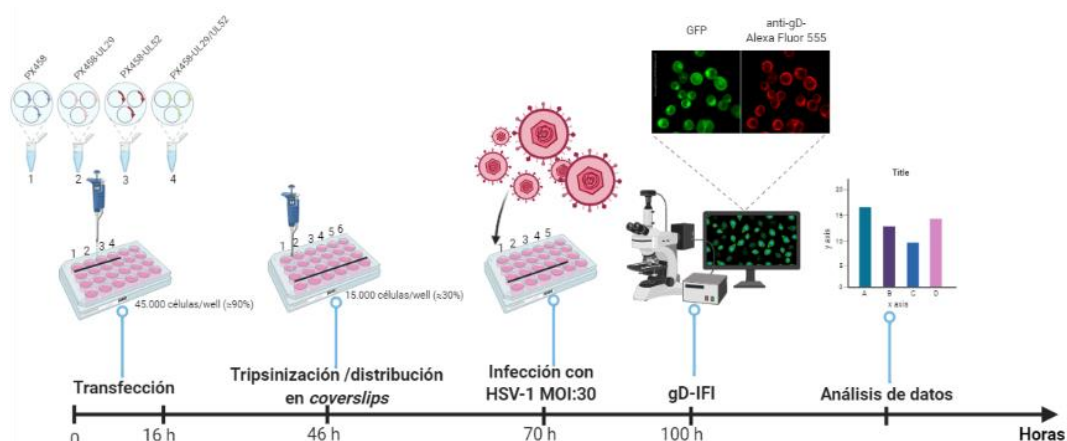


Figura 12. Ensayo de transfección de células HEK293T e infección con HSV-1. En 6 pocillos de la placa de 24 se sembraron 45000 células HEK293T/pocillo (primera fila completa de la placa de 24). Las células de los pocillos 1 al 4, fueron transfectadas con los constructos correspondientes (tubos 1-4) siguiendo el método de fosfato de calcio. A las 16 h. post-transfección, las células de todos los pocillos fueron lavadas y el medio de cultivo se reemplazó. Transcurridas las 46 h. post-transfección, las células transfectadas (pocillos 1-4) y controles (pocillos 5^{no infectado} - 6^{infectado}) fueron tripinizadas y distribuidas equitativamente en 3 pocillos que contenían *coverslips* recubiertos con gelatina al 0,1%. A las 70 h. post-transfección, las células (pocillos 1-4 y 6), fueron infectadas con HSV-1 MOI: 30 por 30 h. para finalmente determinar la presencia de la glicoproteína gD de HSV-1 mediante IFI. Se indica la duración en horas (h.) para cada procedimiento experimental. Figura elaborada con BioRender.com.

3.3. Producción de fagos *wild type* (M13KO7), *phPX458*, *phPX458-UL29*, *phPX458-UL52*, *phPX458-UL29-UL52*.

Para la producción de fagos *helper* M13KO7 se realizó un pre-inóculo de 5 mL de bacterias *Escherichia coli* cepa ER2738 no transformadas, en presencia de 50 µg/mL de tetraciclina. Mientras que, para la producción de fagos *phPX458*, *phPX458-UL29*, *phPX458-UL52*, *phPX458-UL29/UL52* se realizaron pre-inóculo de clones de bacterias transformadas con los diferentes plásmidos utilizados en el ensayo de transfección, en presencia de 50 µg/mL de tetraciclina y 100 µg/mL de ampicilina. Todos los pre-inóculos fueron incubados a 37 °C en agitación constante por 16 h.

Transcurrido este tiempo, se realizaron inóculos en volumen final de 15 mL en medio LB, de tal forma a obtener cultivos bacterianos con una DO_{600 nm} entre 0,4 – 0,8, medido mediante un espectrofotómetro (MultiSkan™ GO, Thermo Scientific, USA).

Se tomaron 10 mL de las bacterias permisivas y se infectaron con 10 μ L de fago *helper* M13KO7 (New England Biolabs, $5,977 \times 10^{11}$ VGC/mL) por 1 h. a 37 °C sin agitación. Unos 5 mL de cada cultivo, se transfirió a dos Erlenmeyer con 500 mL de LB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina y 50 μ g/mL de kanamicina para los fagos recombinantes y sólo con 50 μ g/mL de kanamicina para M13KO7. El cultivo se incubó a 37 °C en agitación constante por 16 h.

Transcurrido este tiempo, el volumen total se fraccionó en botellas estériles Fiberlite 500 mL Bottle (Thermo Fisher Scientific) para su centrifugación a 8000 g por 20 min. a 4 °C en la centrífuga de alta velocidad Sorvall LYNX 4000 (Thermo Fisher Scientific). El sobrenadante se recuperó y se transfirió a tubos que contenía 3% de NaCl y 4% de PEG 8000. La mezcla, se incubó en hielo y a 4 °C durante toda la noche.

Seguidamente se centrifugó a 15000 g a 4 °C por 30 min. Luego se eliminó el sobrenadante y se recuperó el precipitado que contiene los fagos. El precipitado fue resuspendido en 4 mL de TBS 1x pH 7,5 estéril. El volumen obtenido se filtró mediante un filtro estéril de acetato de celulosa sin surfactante (SFCA) de poro 0,45 μ m para jeringa y almacenado a 4 °C, hasta su posterior uso.

3.4. Cuantificación absoluta de fagos filamentosos mediante PCR en tiempo real.

Posteriormente, los fagos fueron cuantificados mediante la curva de calibración de ORI M13 utilizando los cebadores, diseñados y publicados por (Méndez-Scolari *et al.*, 2019). Además, para obtener un valor que indique la cantidad de fagos recombinantes que fueron empaquetados *vs* los fagos *helper*, se diseñó una curva de calibración con GFP utilizando los cebadores detallados en la **Tabla 3**.

La curva de calibración para GFP fue diseñada utilizando el plásmido PX458 purificado y cuantificado como se indica en la **sección 3.1.2**. La misma, consistió inicialmente en calcular la concentración del fagómido PX458 (9288 pb) que contiene una copia del gen GFP. La **Fórmula 3**, permite convertir las unidades de masa de una molécula de PX458 (pg/ μ L) a N° de copias de ADN/ μ L. A partir de este resultado, se realizaron diluciones que contengan 3.0×10^7 , 3.0×10^6 , 3.0×10^5 , 3.0×10^4 , 3.0×10^3 y 3.0×10^2 copias de GFP. Posteriormente, cada dilución seriada fue analizada por duplicado en la qPCR, utilizando 1 μ L de muestra y siguiendo las condiciones de ciclado de la **sección 3.1.3**. Los cálculos, así como la amplificación fue realizada teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante del equipo utilizado StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems™ (Applied Biosystems, 2003). Como control negativo de la qPCR, se utilizó agua ultrapura grado molecular en sustitución del fagómido.

Los valores de Cq para el rango de concentraciones testadas, fueron introducidos en planillas de cálculo del programa *Microsoft Excel*. A partir de estos resultados se trazó la recta de regresión lineal en base a los promedios de Cq obtenidos y el logaritmo de número de copias testadas, obteniendo de esta manera la desviación estándar, la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación Pearson, y adicionalmente se calculó la eficiencia de la qPCR mediante la ecuación $10^{(-\text{pendiente de la recta}) - 1}$. Los resultados fueron considerados reproducibles cuando el $\Delta Cq \leq 0,5$.

Fórmula 3:

$$m = (n) \cdot \left(1,096 \times 10^{-21} \frac{g}{pb} \right) \text{ (Applied Biosystems, 2003).}$$

Donde: m representa la masa y n representa el tamaño del plásmido (pb).

Mediante el empleo de esta curva de calibración, se puede determinar el número de copias del gen GFP presente exclusivamente en el genoma de los fagos recombinantes

(PX458, PX458-UL29, PX458-UL52, PX458 UL29/UL52) y este valor puede ser expresado en VGC/mL (copias de genoma viral por cada mililitro). Adicionalmente, los valores de cuantificación fueron expresados en razón y % de fagómidos que fueron empaquetados. Las ecuaciones de las rectas, tanto para ORI M13 como para GFP se detallan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Ecuación de la recta para la cuantificación de genoma de fagos filamentosos *wild type* (M13KO7) y recombinantes, por qPCR.

Curva de calibración	Ecuación de la recta
ORI M13	$y = -0,2752x + 10,59$ $R^2 = 0,9998$
GFP	$y = -0,2487x + 10,283$ $R^2 = 0,9955$

3.5. Transducción de células mamíferas con fagos filamentosos.

Células HEK293T, fueron incubadas en presencia de los bacteriófagos siguiendo protocolos con modificaciones (Baird, 2011; Hajitou *et al.*, 2007). Brevemente, las células HEK293T fueron cultivadas en una placa de 24 en un porcentaje de confluencia del 90% (45000 células/pocillo) en medio DMEM 1x + Pen/Strep suplementado con SFB 10% siguiendo los pasos de la **sección 3.2**. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS 1x y se agregaron inicialmente 1×10^{12} VGC de los bacteriófagos recombinantes diluidos en medio DMEM 1x + Pen/Strep sin suero SFB, en un volumen final de 250 μ L. Se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ por 4 h. Transcurrido este tiempo, el inóculo se retiró y se reemplazó por medio DMEM 1x + Pen/Strep suplementado con SFB 10% e incubado nuevamente a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ hasta completar 48 h. post-transducción. A las 48 h. post-transducción se verificó la presencia o ausencia de fluorescencia verde emitida por GFP, al microscopio invertido de fluorescencia (**Figura 13**). Seguidamente, a las 48 h. post-transducción, las células HEK293T fueron tripsinizadas y se volvieron a sembrar por triplicado en placa de 24 pocillos (15000 células/pocillo) que contenían *coverslips* de vidrio (12 mm de diámetro y 0.13 mm ~ 0.16 mm de grosor) recubierto con gelatina al 0,1%. Las células fueron mantenidas en estufa a 37 °C en una atmósfera humedecida con CO₂ al 5% por 24 h. para permitir la adherencia de las células.

Luego de 72 h. post-transducción, las células fueron infectadas con HSV-1 a MOI: 30 por 30 h., siguiendo la metodología descrita en la sección 3.2.1. Finalmente, los *coverslips* con las células adheridas a ellas fueron retiradas y se utilizaron para el ensayo de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de la gD del HSV-1 (Figura 13).

Además, se evaluaron experimentos alternativos como; utilizando células Vero y células fagocíticas THP1 para el ensayo de transducción, se ensayaron diferentes porcentaje de confluencia celular, tiempo de exposición de las células a los bacteriófagos, se evaluó el uso de diferentes cantidades de fagos (desde 10^9 - 10^{12} VGC), la combinación de los bacteriófagos con fosfato de calcio (Donnelly *et al.*, 2015), ensayo de transducción utilizando medio de cultivo con SFB, método de *spin infection* (Kodaka *et al.*, 2018) y nuevas producciones de bacteriófagos.

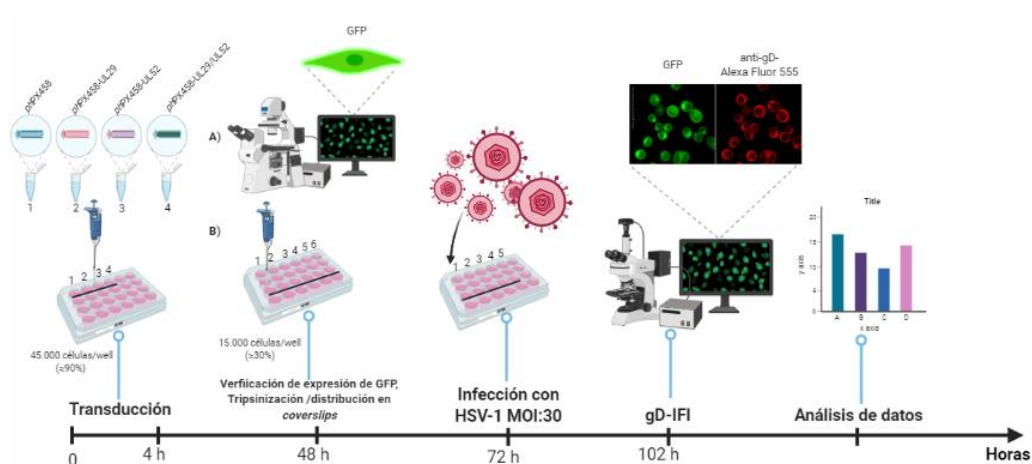


Figura 13. Ensayo de transducción de células HEK293T e infección con HSV-1. En 6 pocillos de la placa de 24 se sembraron 45000 células HEK293T/pocillo (primera fila completa de la placa de 24). Las células de los pocillos 1 al 4, fueron transducidas con los fagos correspondientes (tubos 1-4). A las 4 h. post-transducción, las células de todos los pocillos fueron lavadas y el medio de cultivo se reemplazó. Transcurridas las 48 h. post-transducción, se verificó la presencia o ausencia de emisión de fluorescencia por GFP en las células transducidas y controles, seguido de tripzinización y distribución equitativa en 3 pocillos que contenían *coverslips* recubiertos con gelatina al 0,1%. A las 72 h. post-transducción, las células de los pocillos 1-4 y 6, fueron infectadas con HSV-1 MOI: 30 por 30 h. para finalmente determinar la presencia de la glicoproteína gD de HSV-1 mediante IFI. Se indica la duración en horas (h.) para cada procedimiento experimental. Figura elaborada con BioRender.com.

4. RESULTADOS

4.1. Diseño de vectores para la expresión de Cas9 y gRNAs

4.1.1. Selección de gRNAs y plásmido de expresión

Se seleccionaron gRNAs dirigidos contra los genes UL29 y UL52, por los siguientes motivos; **1)** son dirigidos a genes esenciales cuyos productos son enzimas implicadas en la replicación del material genético viral, **2)** por la efectividad individual y actividad aditiva que presentaron los complejos Cas9/gRNAs para eliminar el genoma del HSV-1 en células epiteliales y neuronales **3)** además de que estos gRNAs en combinación con la Cas9, son capaces de eliminar el genoma del HSV-1 en estado latente como en estado lítico **4)** y finalmente, debido a que estos gRNAs no mostraron actividad hacia sitios potenciales dentro del genoma humano (van Diemen *et al.*, 2016).

Una vez seleccionados los gRNAs, se realizó la búsqueda del plásmido que permita la expresión transiente de Cas9 y gRNAs en una línea celular eucariota. Se seleccionó el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) de 9288 pb, debido a que éste contiene todos los elementos básicos para la expresión del sistema CRISPR-Cas9 en células eucariotas, además de un origen de replicación (*ori fl*) y señal de empaquetamiento del bacteriófago filamentoso *fl*, lo que permite que actúe como un fagómido y pueda ser empaquetado en el fago M13 (**Figura 14A**).

Este plásmido posee un *cassette* para la expresión de gRNAs, el cual se encuentra bajo el control del promotor U6. Rio abajo se encuentran los sitios de restricción de la enzima *BbsI*, para la inserción de un gRNA, seguido del *scaffold* (**Figura 14**).

Por último, el sistema posee el gen de la enzima Cas9, optimizada para su expresión en células mamíferas. La expresión del gen se encuentra bajo el control del promotor Cbh (*hybrid form of a Cb*). El gen de la Cas9 se encuentra fusionado con el gen de la proteína verde fluorescente mejorada EGFP a través del péptido T2A. Luego de la traducción del ARNm, se cree que el mecanismo de autoescisión mediada por el péptido T2A se basa en que el ribosoma omite la formación de un enlace peptídico entre la prolina y la glicina en el extremo C- terminal del péptido T2A, separando a la Cas9 de EGFP (Donnelly *et al.*, 2001). La Cas9 migrará al núcleo por la presencia de dos señales de localización nuclear posicionadas en el extremo N y C terminal del polipéptido (SV40-NLS y *nucleoplasm* NLS), mientras que EGFP se mantendrá en el citoplasma (**Figura 14A**).

De esta manera, al observarse la expresión de EGFP en las células, se puede afirmar que el sistema Cas9 se encuentra activo.

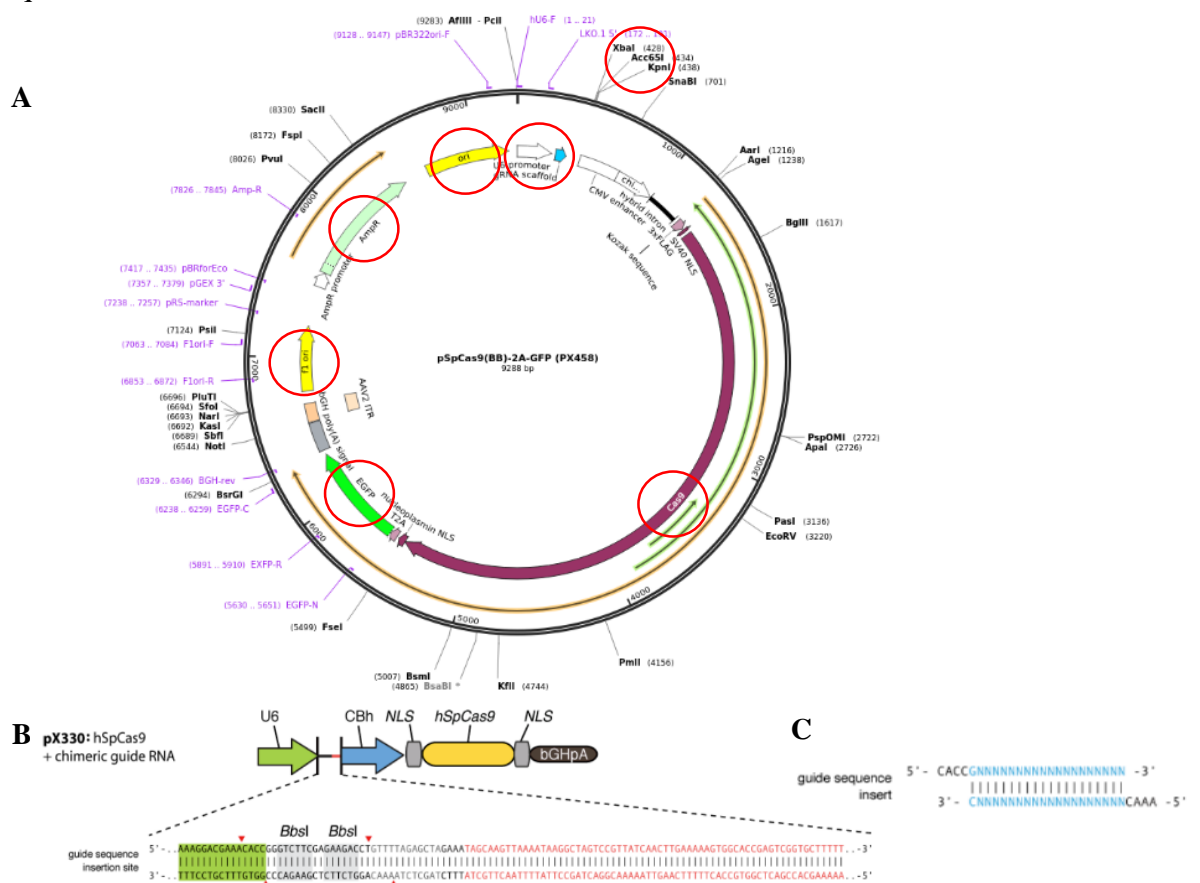


Figura 14. Representación esquemática que muestra los principales componentes del plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458), el sitio de corte de *BbsI* y diseño de gRNAs. A. En círculos rojos, se señalan los diferentes elementos que componen el plásmido PX458 de 9288 pb. **B.** En gris se muestran los dos sitios de reconocimiento de la enzima de restricción

BbsI, para la inserción de un gRNA. Mientras que, en rojo se muestra la secuencia parcial del *scaffold*. Las regiones marcadas con flechas rojas, indican el sitio de escisión de *BbsI*. **C.** Esquema representativo para el diseño de los oligonucleótidos que serán clonados en el plásmido PX458. Las letras negras representan las secuencias que deben ser agregadas para generar el extremo cohesivo del inserto a ser clonado en el vector, mientras que las letras N en azul, representan la secuencia complementaria al gen que quiere ser editado (representa el gRNA).

4.1.2. Preparación de un sistema que permita la generación de fagos que transporten el plásmido PX458 como genoma.

Debido a que las bacterias *Escherichia coli* Stb13 (F^- *mcrB mrr hsdS20* (_{r_B,m_B}) *recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(StrR) xyl-5 λ- leu mtl-1*), no expresan el pilus- F, estructura necesaria para el inicio de la infección bacteriana por los bacteriófagos filamentosos *f1*, *fd* y M13, fue necesario extraer y purificar el plásmido PX458, para posteriormente utilizarlo en la transformación de bacterias *E. coli* ER2738 (F' *proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10(TetR)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5*) las cuales sí expresan el pilus-F y por lo tanto son susceptibles de infección por el fago *helper* M13KO7.

Se obtuvieron 19 colonias bacterianas aisladas resistentes a ampicilina, mientras que en la placa control no se obtuvieron colonias.

Se seleccionaron 5 clones bacterianos y se verificó la presencia del plásmido mediante qPCR de colonias, amplificando una secuencia parcial del gen GFP. En los 5 clones se obtuvo una señal detectable, visto como la curva sigmoidea típica para el sistema, tal como se observa en las curvas de la **Figura 15A**.

En los 5 clones se detectó la misma curva de *melting* a la temperatura de 91 °C, tal como se observa en la **Figura 15B**. En el control negativo (líneas negras), no se detectó señal de amplificación ni pico en la curva de *melting* correspondiente a la *T_m* esperada.

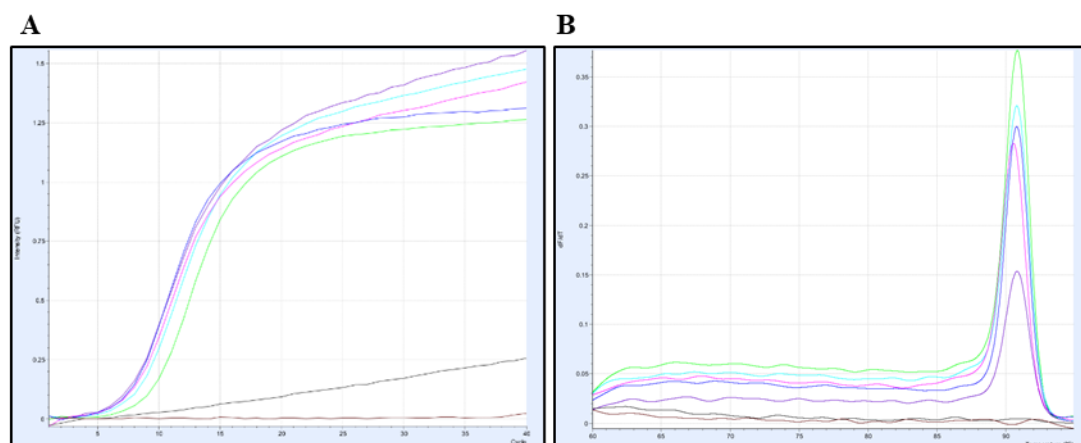


Figura 15. qPCR de colonias para la detección del gen GFP en clones de bacterias transformadas. **A.** Curvas de amplificación del gen GFP a partir de clones de bacterias transformadas. El Eje de las ordenadas corresponde a la intensidad de fluorescencia (RFU), mientras que el eje de las abscisas corresponde al número de ciclos (Cq). **B.** Curva de *melting* de los amplicones. El eje de las ordenadas corresponde a la derivada de la fluorescencia en función a la temperatura (dF/dT), y el eje de las abscisas indica la temperatura ($^{\circ}C$) en aumento. En color verde el clon 1, en turquesa el clon 2, en lila en clon 3, en rosa el clon 4, en azul el clon 5, en negro el control negativo.

4.1.3. Producción de fagómidos que permitan la expresión de Cas9 y gRNAs individuales dirigidos contra genes del HSV-1.

Para la generación de fagómidos que expresan un único gRNA, se seleccionó el clon 1 de *Escherichia coli* ER2738 transformado con PX458. El plásmido extraído y purificado fue digerido por la enzima de restricción *BpiI* para generar extremos cohesivos. El análisis *in silico* del plásmido original, indicó que la digestión enzimática debió generar dos fragmentos, uno de 9266 pb que corresponde al vector linearizado y un remanente de 22 pb.

El tamaño de la banda observada en el carril PX458^{*BpiI*} de la **Figura 16A**, fue verificado con el marcador de peso molecular 1 Kb, y se observó que el mismo fue linearizado y poseía aproximadamente un tamaño de 9266 pb. No se observó el remanente de 22 pb en el mismo carril, ya que el gel de agarosa al 1% no permite distinguirlo. En el carril PX458^{*Plasmid*}, se observan las dos conformaciones espaciales del plásmido sin tratamiento con *BpiI*. La banda de 9266 pb se purificó a partir del gel, y se obtuvo 26,35 ng/ μ L de ácido nucleico.

Para la síntesis de los gRNAs, se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la **Tabla 1**. Los oligonucleótidos se ligaron en el vector PX458 como se muestra en el esquema de la **Figura 16B**. Para cada reacción de ligación se tuvo en cuenta dos condiciones; por un lado, un control del vector linearizado sin inserto (V) y la otra corresponde a la reacción de ligación del vector con el inserto (V+I). El producto de la ligación fue denominado PX458-UL29 y PX458-UL52, respectivamente. La totalidad del producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias calcio-competentes *E. coli* ER2738. En el ensayo de transformación bacteriana, no se tuvo colonias en las placas controles sin inserto, resultado que fue esperado ya que los extremos cohesivos generados por *BpiI* en sus dos sitios de reconocimiento en PX458, no son complementarios. Mientras que, en las placas V+I, correspondiente a los insertos gRNA-UL29 y gRNA-UL52 se obtuvieron 22 colonias y 52 colonias aisladas, respectivamente.

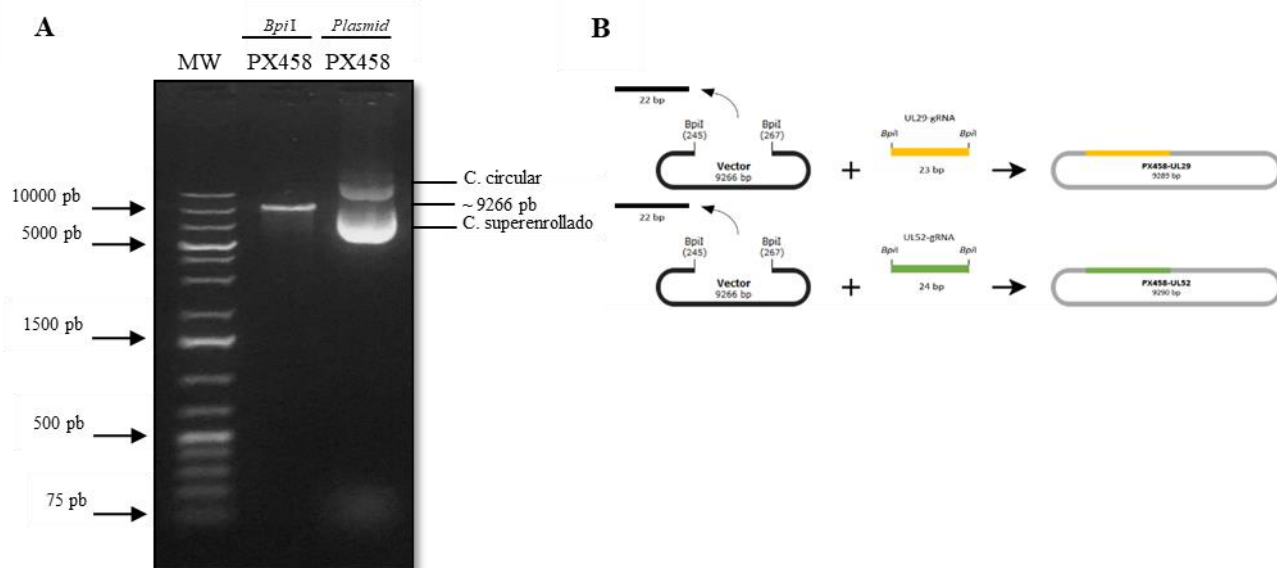


Figura 16. Clonación de insertos (gRNAs) en el vector PX458. **A.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, del producto de la digestión del plásmido PX458 con *BpiI*. En el carril PX458^{*BpiI*} se observa el fragmento de 9266 pb correspondiente al vector linearizado, cuya conformación lineal fue comparado con el producto de la *Miniprep* no tratado con *BpiI* y con el marcador de peso molecular (MW) 1 Kb. **B.** Esquema representativo de la clonación de oligonucleótidos parcialmente superpuestos (inserto) en el vector PX458 linearizado, los insertos corresponden al gRNA-UL29 y al gRNA-UL52. El análisis *in silico*, indicó que el tamaño final del plásmido PX458-UL29 y PX458-UL52, fue de 9289 pb y 9290 pb, respectivamente.

Para confirmar la clonación de los insertos, se realizaron PCRs de colonias utilizando los cebadores indicados en la **sección 3.1.8**. En la **Figura 17A**, se observan los sitios de hibridación de los cebadores *forward* y *reverse*. Los fragmentos esperados, para PX458-UL29 es de 1570 pb, mientras que para PX458-UL52 es de 1571 pb.

Los resultados obtenidos se observan en las **Figuras 17B** y **Figuras 17C**. En los carriles enumerados 1 al 5 de ambos geles se observó la presencia de bandas de tamaños esperados tanto para PX458-UL29, así como para PX458-UL52. No se evidenció amplificaciones en los controles negativos de PCR (ddH₂O), y plásmido PX458 sin inserto.

Estos resultados indicaron que se obtuvieron 5 clones de bacterias positivas para cada constructo, que contenían el inserto deseado. Además, confirmó que la inserción ocurrió en el sentido esperado.

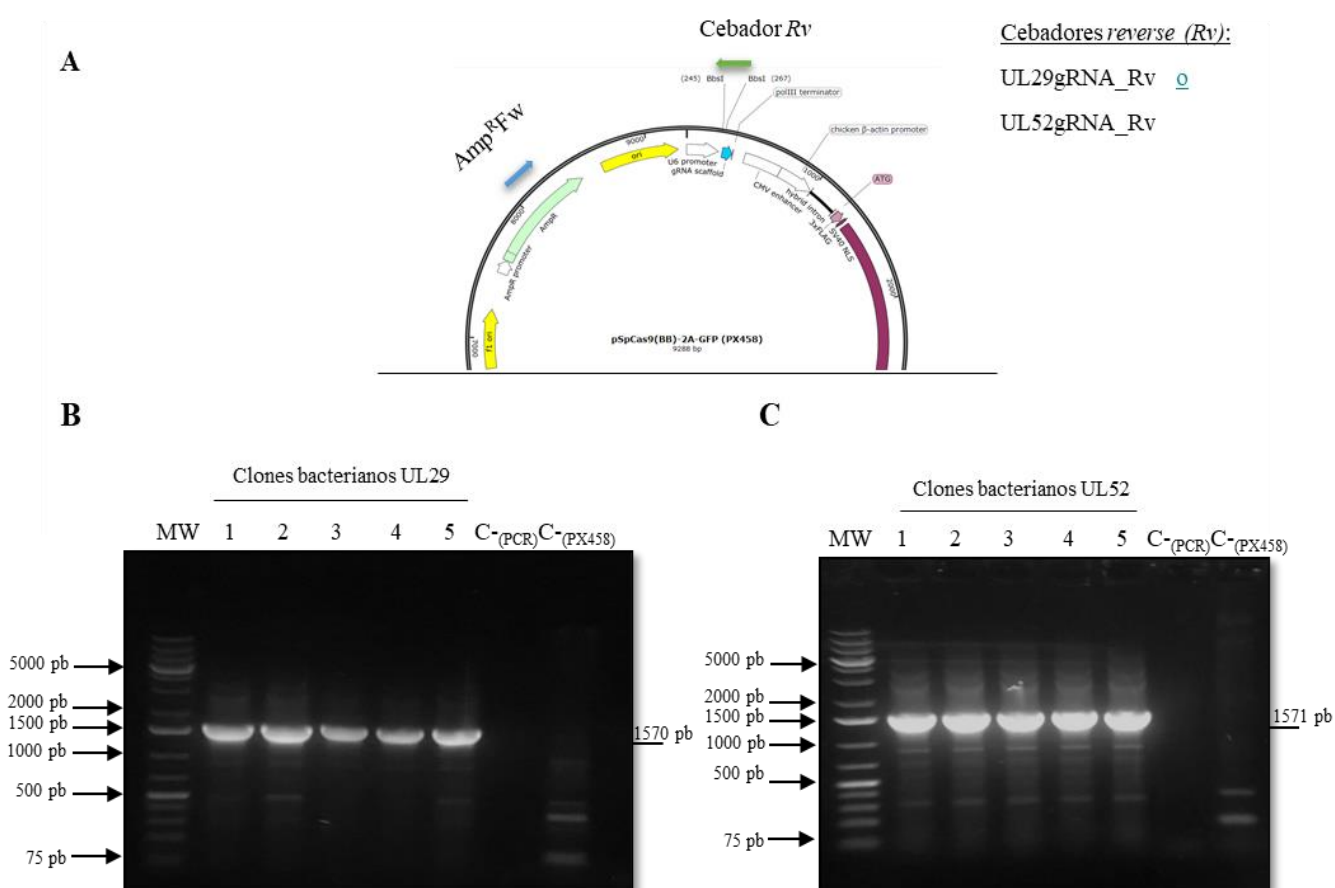


Figura 17. Tamizaje de colonias mediante PCR a punto final. **A.** Esquema representativo que muestra los sitios de hibridación de los cebadores utilizados para el tamizaje de clones bacterianos UL29 y UL52, obsérvese que el cebador sentido fue el mismo para ambas PCRs,

mientras que el cebador *reverse* (cebador *Rv*) fueron diferentes y específicos para ambos casos. **B, C.** El tamizaje de clones bacterianos fue realizado por PCR de colonias, los amplicones fueron corridos en electroforesis en gel de agarosa al 1%. En los carriles enumerados 1 al 5 de ambos geles, se observan presencia de los productos esperados, 1570 pb aproximadamente para UL29, y 1571 pb aproximadamente para UL52, los tamaños de las bandas fueron comparados con el marcador de peso molecular (MW) de 1 Kb. No se evidenciaron amplificaciones en los controles negativos utilizados.

4.1.4. Producción de un fagómido que permita la expresión de Cas9 y gRNAs dobles dirigidos contra genes del HSV-1.

La construcción del vector PX458-UL29/UL52 se realizó a partir de la amplificación de la secuencia del U6 *promoter* + gRNA-UL52 + *scaffold* de la construcción PX458-UL52 clon 5 y clonación del inserto entre los sitios de restricción *XbaI* y *KpnI* en el vector PX458-UL29 (**Figura 18A**). Tras la amplificación, el producto de PCR produjo la banda esperada de 449 pb, la cual fue digerida con las enzimas de restricción *XbaI* y *KpnI* con el objetivo de generar los extremos cohesivos (**Figura 18B**).

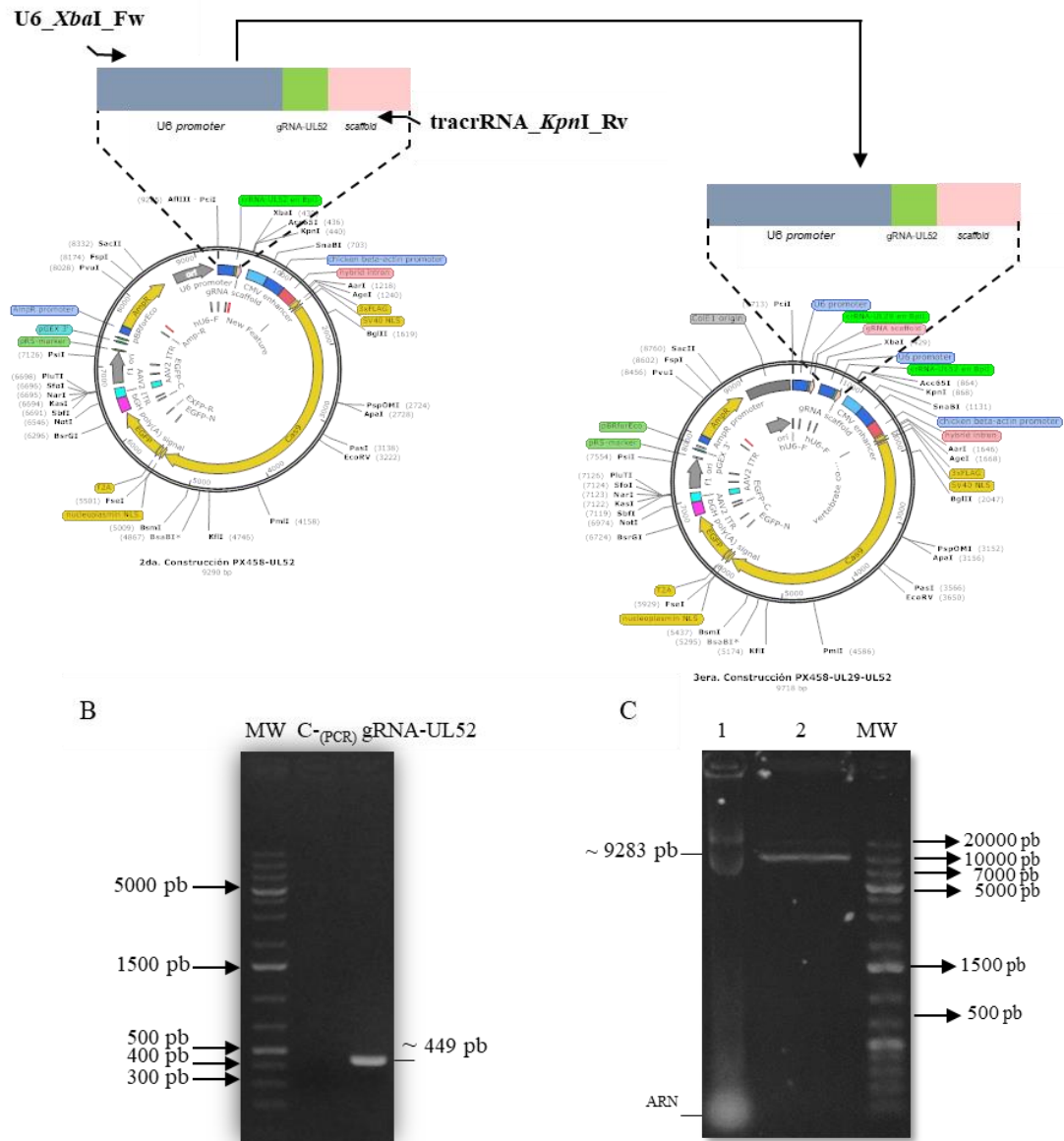


Figura 18. Construcción del vector PX458-UL29/UL52. A. Esquema representativo de la clonación del *cassette* de expresión del gRNA-UL52 en el plásmido PX458-UL29. El plásmido resultante fue denominado PX458-UL29/UL52 y contiene un tamaño final de 9718 pb. B. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, en el carril gRNA-UL52 se observa la presencia de la banda esperada de aproximadamente 449 pb, la cual fue comparada con el marcador de peso molecular de 1 Kb. No se evidenció amplificación en el control negativo de PCR (Carril C- PCR). C. El plásmido PX458-UL29 fue digerido con las enzimas de restricción *XbaI* y *KpnI*, generando una banda de aproximadamente 9283 pb tal como se observa en el carril 2. En el carril 1, se observa dos conformaciones espaciales del plásmido PX458-UL29 no tratado con las enzimas de restricción, las conformaciones observadas fueron superenrollada y circular. Además, se observa probablemente un pequeño remanente de ARN.

A fin de obtener el vector, se extrajo y se purificó el plásmido PX458-UL29 del clon bacteriano 1 para su posterior digestión con las enzimas de restricción *Xba*I y *Kpn*I. Tal como se observa en la **Figura 18C** se obtuvo la banda de 9283 pb correspondiente al plásmido linearizado. Además, se observó que hubo una digestión parcial del plásmido PX458-UL29, ya que se observa un pequeño remanente del mismo a una altura de 20000 pb en el carril 2.

Sólo la banda de 9283 pb se purificó a partir del gel y se cuantificó por espectrofotometría, obteniéndose una concentración de 23,46 ng/μL de ácido nucleico, mientras que, las relaciones de absorbancia $Abs_{260/280}$ fue de 1,842 y la $Abs_{260/230}$ de 2,120.

La ligación del inserto en el vector PX458-UL29 fue realizada con razón molar inserto:vector 4:1. La totalidad del producto de ligación se utilizó para transformar bacterias calcio-competentes *Escherichia coli* ER2738. Se obtuvo 22 colonias en la placa de ensayo (V+I). Mientras que, en la placa control (V) se observó 5 colonias resistentes a ampicilina, probablemente debido al arrastre de plásmidos no digeridos eficientemente (**Figura 18C**).

La inserción del *cassette* de expresión del gRNA-UL52, fue verificado mediante PCR de colonias, utilizando el cebador *forward* UL29_gRNA_Fw y el cebador *reverse* UL52_gRNA_Rv (**Tabla 1**). Se seleccionaron 10 clones de la placa de ensayo (V+I) y 1 clon de la placa control (V), para verificar la ligación del inserto. La banda esperada de 462 pb fue observada en los clones bacterianos 1, 6 y 9, no se observó amplificación en el control negativo de PCR (ddH₂O) ni en el control que contenía sólo el vector (**Figura 19**).

Por tanto, la presencia del amplicón en los clones 1, 6 y 9 indican que el vector contiene tanto la secuencia de gRNA-UL29 como la secuencia del gRNA-UL52.

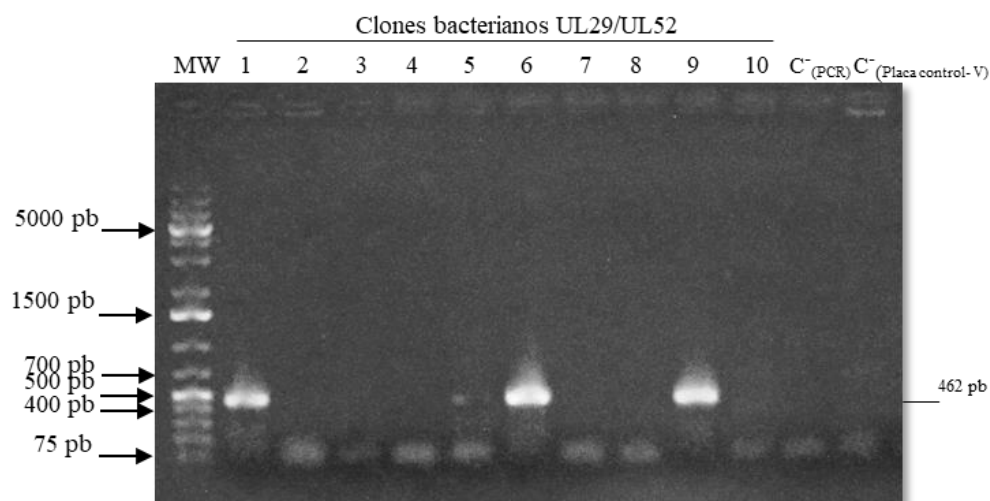


Figura 19. Tamizaje de clones bacterianos UL29/UL52 por PCR de colonias. Los amplicones obtenidos fueron corridos en electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los carriles enumerados 1 al 10 representan los 10 clones seleccionados de la placa de ensayo. El carril C⁻ (Placa control-V) corresponde a un clon bacteriano que fue resistente a ampicilina en la placa control negativo, mientras que, el carril C⁻(PCR) corresponde al control negativo de PCR (ddH₂O). La banda esperada de 462 pb fue comparada con el marcador de peso molecular de 1 Kb. El tamaño de la banda esperada se observó en los clones 1, 6 y 9. No se observó amplificación en el control negativo de PCR, así como en el clon bacteriano que creció en la placa control (V).

4.1.5. Evaluación de los plásmidos producidos para inhibir la infección por HSV-1.

En un proceso previo a la producción de bacteriófagos filamentosos recombinantes se verificó la funcionalidad del sistema CRISPR-Cas9 producido. Para ello, se transfectaron las células HEK293T con los diferentes fagómidos construidos. Tal como se observan en la **Figura 20** todas las construcciones expresaron la proteína GFP, sin embargo, no se observaron altas tasas de transfección. Los clones de plásmidos utilizados fueron: clon 1 de PX458, clon 5 de PX458-UL29, clon 5 de PX458-UL52 y clon 9 de PX458-UL29/UL52.

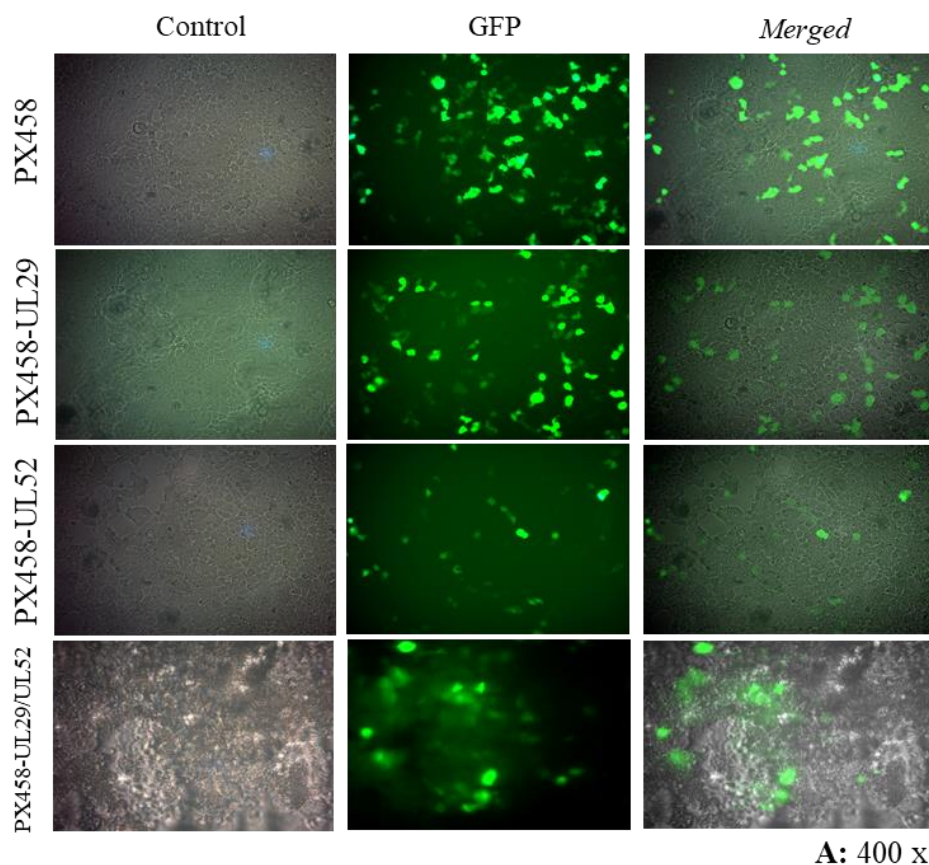


Figura 20. Transfección de células HEK293T con los diferentes fagómitos. Se tomaron imágenes con el microscopio invertido de fluorescencia a A: 400X. En la primera columna se observan las células en campo claro, en la segunda columna las células que expresan la GFP, mientras que, en la tercera columna se realizó un solapamiento de ambas imágenes para indicar individualmente las células que fueron transfectadas. Aproximadamente, un 30% de las células fueron transfectadas.

Considerando que no fue posible conseguir altas tasas de transfección, se decidió realizar un ensayo de inmunofluorescencia para determinar el efecto inhibitorio del sistema CRISPR-Cas9 sobre el HSV-1. Para ello, se procedió a transfectar células y luego de 72 horas infectarlas con HSV-1. Las células infectadas fueron visualizadas con un anticuerpo anti-gD marcado con Alexa 555, mientras que las células que expresaban el sistema CRISPR-Cas9 se observaron mediante la expresión de GFP.

Como se observa en la **Figura 21A**, las células que expresan la Cas9-GFP (grupo PX458) fueron infectadas con HSV-1 (fila 1). Mientras que, en los grupos de células que expresan todos los componentes del sistema CRISPR-Cas9 contra HSV-1

(PX458-UL29, PX458-UL52, PX458-UL29/UL52), no se detectó presencia de la glicoproteína gD viral o la señal de inmunofluorescencia fue sustancialmente menor.

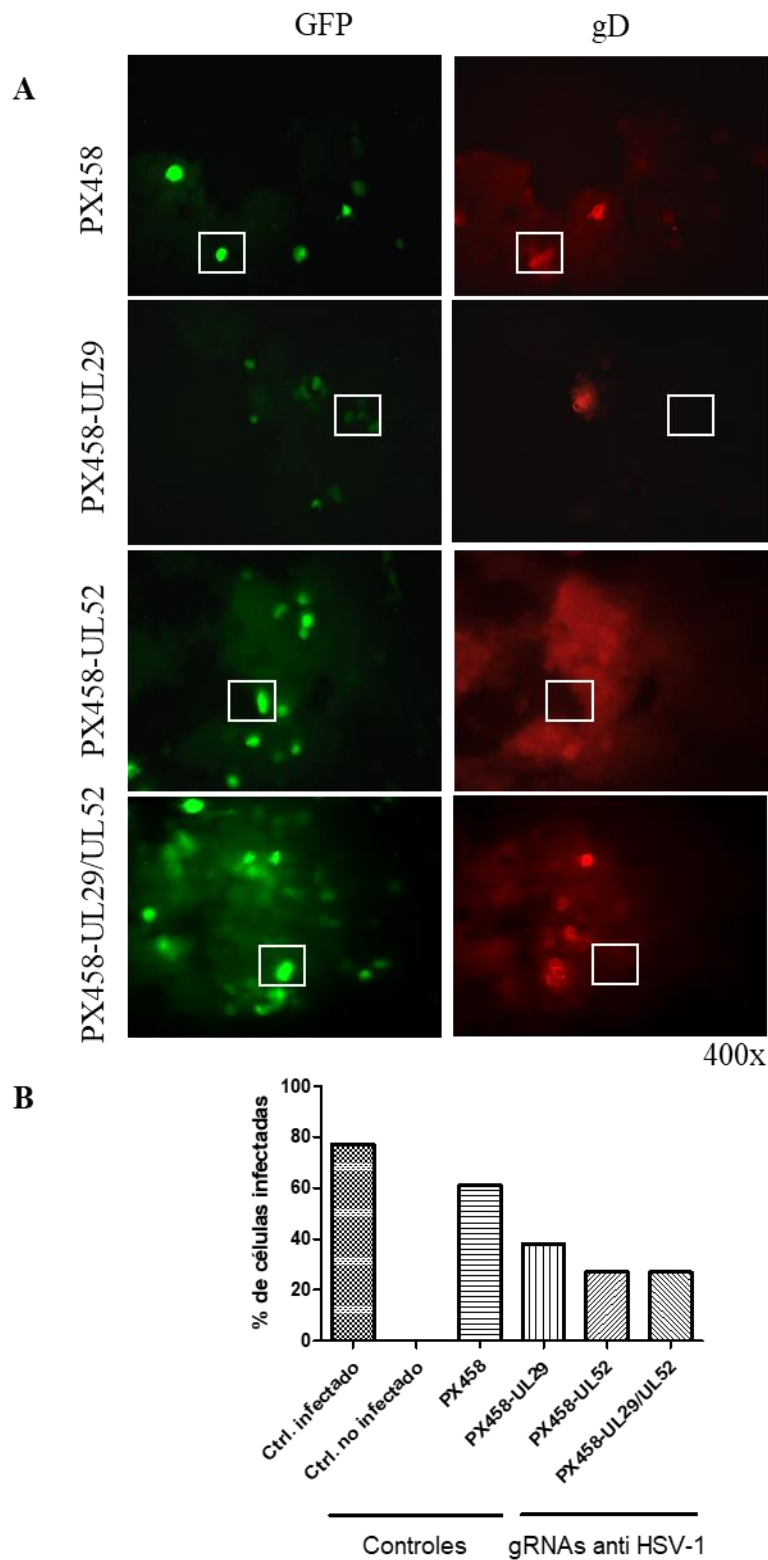


Figura 21. Imágenes de microscopía de fluorescencia y resultados expresados en gráficos de barras. A) La detección de la gD del HSV-1 fue realizado mediante el ensayo de inmunofluorescencia indirecta. En el grupo PX458 se observaron células que co-expresan la GFP y la gD como era de esperarse (cuadros blancos), mientras que, al utilizar gRNAs

dirigidos a los genes UL29 y/o UL52 no se observaron células infectadas o la intensidad de fluorescencia era sustancialmente menor. **B)** Los recuentos fueron expresados en gráficos de barras y se observó que hubo una disminución en la expresión de la gD en los grupos con gRNAs, comparando con el control infectado y PX458.

Como se observa en la **Figura 21B**, se logró observar una disminución en el porcentaje de células infectadas tras la expresión del sistema CRISPR-Cas9. Además, no se observó mayor efectividad del plásmido que contiene el doble gRNA en comparación con los grupos con un único gRNA.

Mediante estos ensayos, se verificó que el sistema CRISPR-Cas9 utilizado, puede ejercer un efecto inhibitorio de la infección, por lo que se continuó con producir los bacteriófagos filamentosos y analizar la capacidad de los fagos recombinantes como transportadores del sistema CRISPR-Cas9, de inhibir el ciclo viral del HSV-1.

4.2. Los fagómidos transportadores del sistema CRISPR-Cas9 son empaquetados en bacteriófagos filamentosos recombinantes.

Para la producción de bacteriófagos filamentosos M13 recombinantes se utilizó *Escherichia coli* ER2738, ya que expresa el receptor primario *pilus* F, necesario para la infección bacteriana por los bacteriófagos filamentosos M13KO7, *fd* y *fl*.

Bacterias *Escherichia coli* ER2738 que poseen los fagómidos PX458, PX458-UL29, PX458-UL52 y PX458-UL29/UL52, fueron transformadas con el fago *helper* M13KO7. El fago *helper* permite brindar todas las proteínas estructurales y no estructurales para la formación de nuevas partículas virales recombinantes. Además, éste presenta una mutación en su origen de replicación que vuelve ineficaz el empaquetamiento de su genoma. Por lo tanto, se favorece el empaquetamiento del fagómido en la partícula viral en detrimento del genoma del fago M13KO7.

Usualmente se realiza la cuantificación de virus mediante qPCR dirigido contra el ORI M13 (Méndez-Scolari *et al.*, 2019). Sin embargo, ya que el fago *helper* posee un origen de replicación truncado activo, pero menos eficiente y considerando que los tamaños de los fagómidos son muy grandes, se decidió analizar el grado de empaquetamiento de los fagómidos mediante una qPCR dirigido contra el gen GFP presente exclusivamente en los fagómidos de interés. Para ello, se realizó una curva de

calibración contra el gen GFP utilizando 6 puntos que van de 3.0×10^7 de copias del amplicón GFP hasta 300 copias del mismo. En todos los casos se observó señal de amplificación (**Figura 22A**), a excepción del control negativo de PCR. Para todos los amplicones se obtuvo la T_m esperada, tal como se observa en la **Figura 22B**.

En la **Figura 22C**, se observa el gráfico de la curva de calibración para la cuantificación de número de copias de ADN correspondiente a GFP, que está dada por el *Log* de número de copias de ADN agregado al tubo de reacción en función a los promedios de *C_q* de cada dilución, respectivamente. Se obtuvo un comportamiento lineal de la curva, con un coeficiente $R^2 = 0,9955$ y cuya correspondiente ecuación de la recta está dada por $y = -0,2487x + 10,283$. Adicionalmente, se calculó la eficiencia de la qPCR, y se obtuvo un valor del 0,77 (cercano al 1), lo cual indica una buena eficiencia de la qPCR.

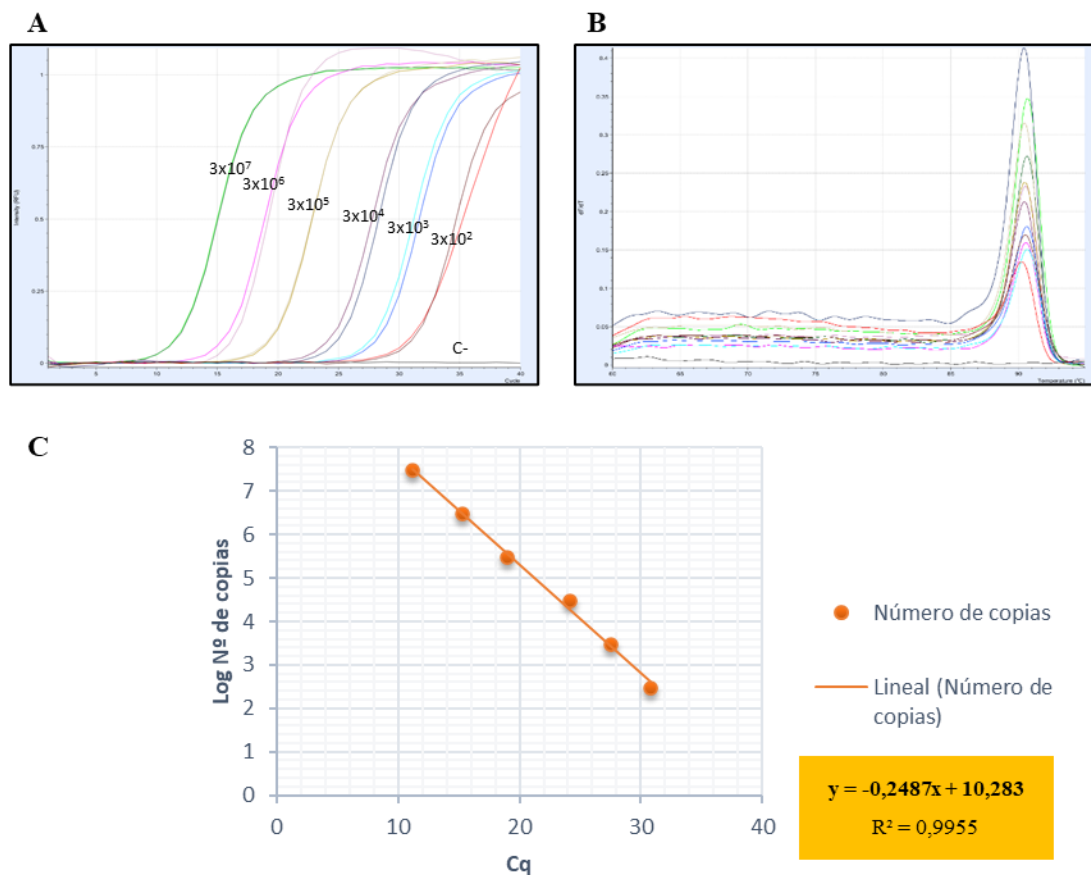


Figura 22. Curva de calibración de GFP para la cuantificación de fagos filamentosos que poseen el fagómido de interés. **A.** Gráfico de intensidad de fluorescencia en función al número de ciclos de la qPCR, cada dilución fue realizada por duplicado. **B.** Curva de *melting* obtenida a partir de los amplicones generados para cada número de copias. **C.** Curva de logaritmo de número de copias de ADN en función al *Cq*. Se puede observar la relación entre el *Log* y los promedios de *Cq*. Además, se detalla la ecuación de la recta y el índice de correlación.

Los diferentes fagos fueron cuantificados utilizando las curvas de calibración mencionadas anteriormente. En las **Figura 23** se observan las curvas de amplificación de ORI M13 en bacteriófagos filamentosos *phPX458*, *phPX458-UL29*, *phPX458-UL52* y *phPX458UL29/UL52*. Los *Cq* obtenidos para cada bacteriófago en el orden indicando anteriormente, fueron: 17,24; 9,4; 14,95 y 6,98, respectivamente. No se detectó señal de amplificación en los controles negativos de las reacciones de qPCR.

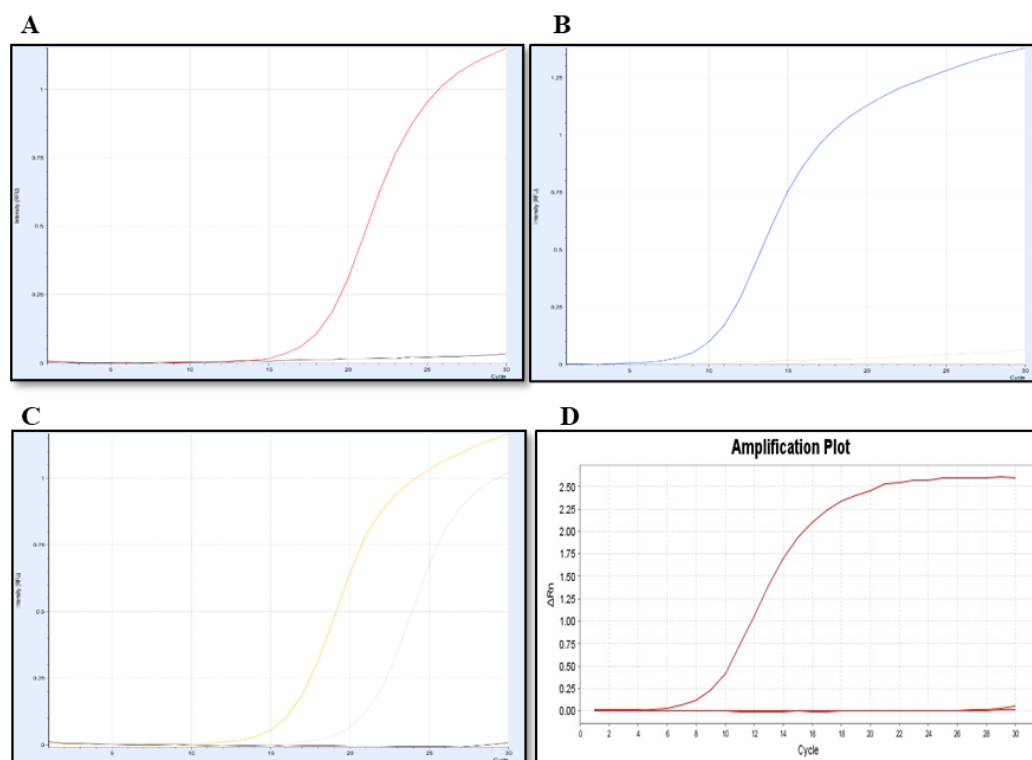


Figura 23. Curvas de amplificación de ORI M13. Los 4 gráficos representan la intensidad de fluorescencia en función al número de ciclos de la qPCR de los productos generados **A.** Cuantificación de fagos *phPX458* **B.** Cuantificación de fagos *phPX458-UL29*. **C.** Cuantificación de fagos *phPX458-UL52*. **D.** Cuantificación de fagos *phPX458-UL29/UL52*. En los cuatro casos no se detectó señal de amplificación en los controles negativos (líneas negras).

A fin de identificar la presencia de amplificaciones inespecíficas o la formación de dímeros de cebadores, se determinó la T_m de los productos de amplificación. Los gráficos de las **Figura 24**, representan las curvas de *melting* para cada amplicón en el orden anteriormente descrito. El eje de las ordenadas corresponde a la derivada de la intensidad de la fluorescencia en función a la temperatura, mientras que el eje de las abscisas pertenece a la temperatura en aumento. Se detectó la misma T_m en todos los casos, correspondiente al producto esperado.

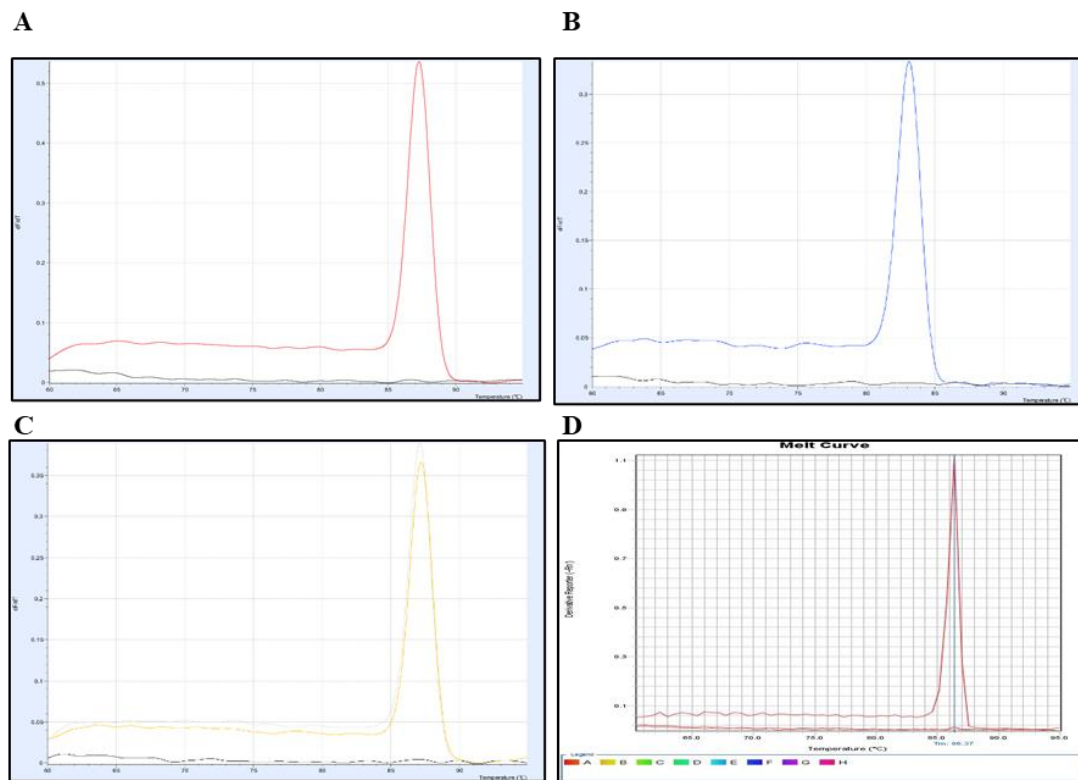


Figura 24. Curva de *melting* para ORI M13. Para cada amplicón generado, se realizó el análisis de *melting* **A.** *phPX458* **B.** *phPX458-UL29*. **C.** *phPX458-UL52*. **D.** *phPX458-UL29/UL52*. No se detectó señal del amplicón correspondiente a ORI M13 en los controles negativos (líneas negras).

En las **Figura 25**, se observan las curvas de amplificación de GFP en bacteriófagos filamentosos *phPX458*, *phPX458-UL29*, *phPX458-UL52* y *phPX458-UL29/UL52*, respectivamente. En todos los casos se obtuvieron curvas sigmoideas típicas para el sistema, donde el eje de las ordenadas indica la intensidad de fluorescencia (RFU) en función al número de ciclos (*C_q*). Los *C_q* obtenidos para cada bacteriófago en el orden indicando anteriormente, fueron de: 17,916; 10,278, 15,245 y 22,482 respectivamente. Únicamente se detectó señal de amplificación en el control negativo de la qPCR del *phPX458-UL29* en el ciclo 25,129 (**Figura 25B**).

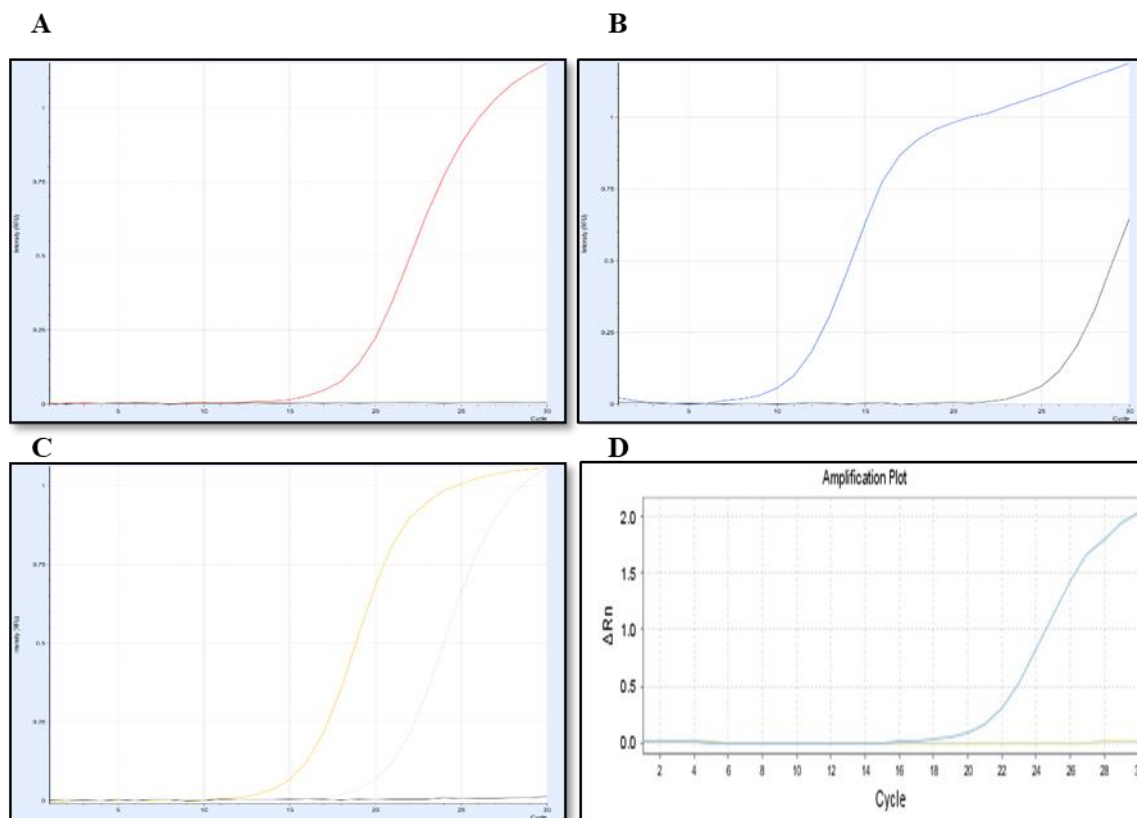


Figura 25. Curvas de amplificación de GFP. Los 4 gráficos representan la intensidad de fluorescencia en función al número de ciclos de la qPCR de los productos generados **A.** Cuantificación de fagos *phPX458* **B.** Cuantificación de fagos *phPX458-UL29*. **C.** Cuantificación de fagos *phPX458-UL52*. **D.** Cuantificación de fagos *phPX458-UL29/UL52*. Se detectó señal de amplificación en el control negativo de la qPCR correspondiente al *phPX458-UL29*.

Los gráficos de las **Figura 26** representan las curvas de *melting* para cada amplicón obtenido. Se detectó la misma T_m en todos los casos, correspondiente al producto esperado. La señal de amplificación del control negativo observada en la **Figura 25B** fue confirmada mediante el análisis de *melting*, resultando tener la misma T_m que el amplicón GFP, por lo que, este resultado se tuvo en cuenta en el momento de realizar el cálculo de cuantificación del bacteriófago en cuestión.

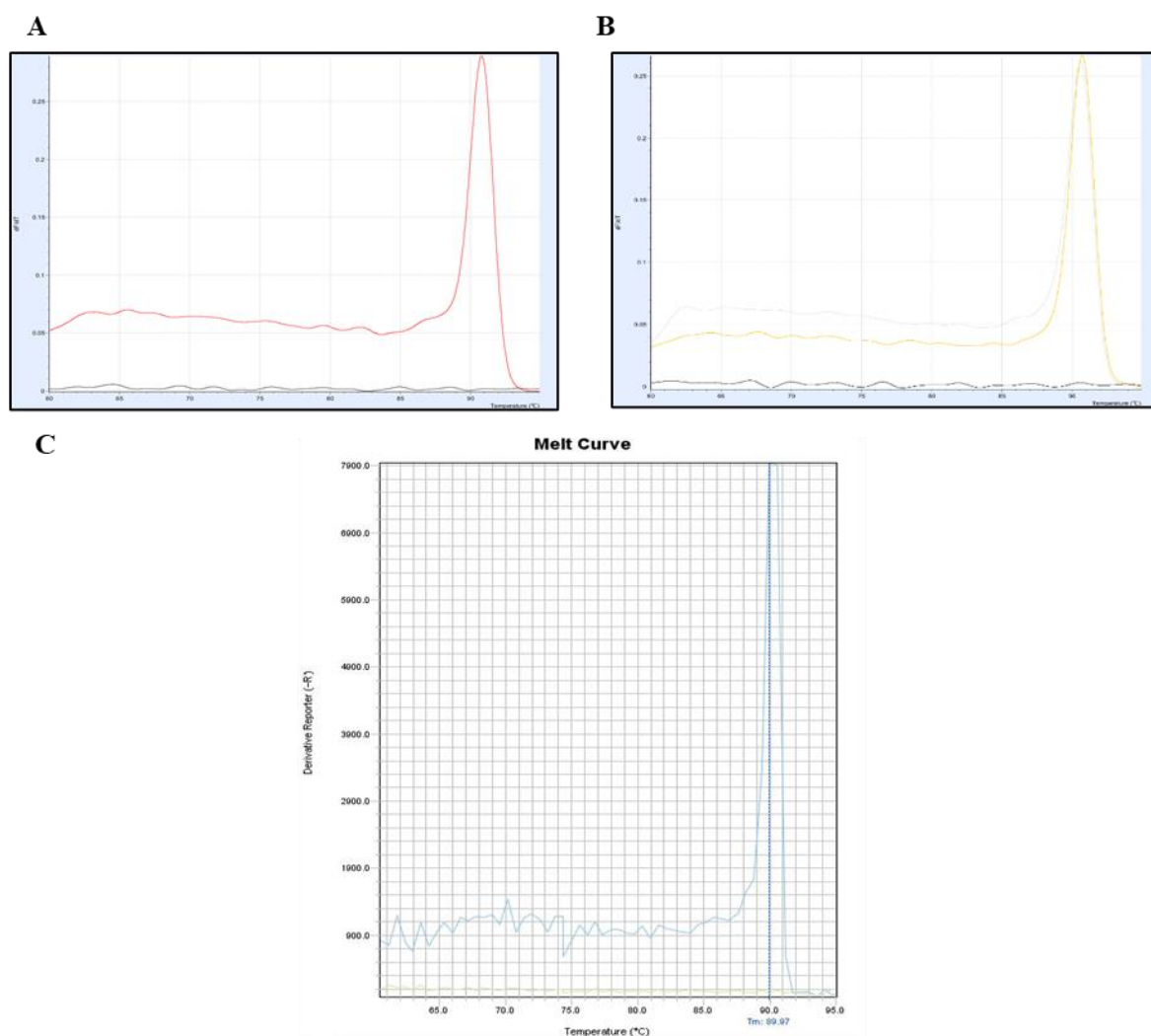


Figura 26. Curva de *melting* para GFP. Para cada amplicón generado, se realizó el análisis de *melting*. **A.** *phPX458* **B.** *phPX458-UL52*. **C.** *phPX458-UL29/UL52*.

La cuantificación del número de copias de genoma viral utilizando la curva de calibración de ORI M13 como la de GFP, permitió calcular una razón entre el número de copias de genoma presente en los fagos recombinantes respecto a las totales representadas por las copias del ORI M13. De esta manera, fue posible expresar en porcentaje los fagos recombinantes que transportan el sistema CRISPR-Cas9 contra el HSV-1.

Los valores de cuantificación fueron expresados en VGC/mL (copias de genoma viral/mililitros). Se calcularon la razón y el porcentaje de empaquetamiento de los fagos filamentosos recombinantes teniendo en cuenta la cuantificación obtenida por la

curva GFP sobre la obtenida por la curva ORI M13 (**Tabla 4**). Se obtuvieron altos valores de cuantificación de los fagos filamentosos mediante las dos curvas de calibración, tal como se detalla en la **Tabla 5**. Los valores de cuantificación van del orden 10^{11} a 10^{14} VGC/mL. Cabe destacar que, hay una correspondencia entre las cuantificaciones obtenidas tanto por GFP como por ORI en los fagos *phPX458* y *phPX458-UL52*. Mientras que, en el caso de *phPX458-UL29* se observa que un 52,5% de los fagos poseen el gen GFP, lo que nos indica que es probable que a medida que se replican los fagómidos de interés, también se replica el genoma del fago *helper* M13KO7, tal como se muestra en la **Figura 27**.

Mientras que, en el caso del bacteriófago *phPX458-UL29/UL52*, se obtuvo un bajo rendimiento en el empaquetamiento (0,01%). Considerando estos resultados y para determinar que realmente es un problema de empaquetamiento, se volvió a producir los fagos *phPX458-UL29/UL52*, pero utilizando otro clon bacteriano (clon 1). Como se observa en la **Tabla 5**, se obtuvieron resultados similares a la cuantificación anterior (segunda producción). Esto denota que no es un problema del clon específico, sino que existe un problema de empaquetamiento del fagómido en el fago M13.

Tabla 5. Valores de cuantificación de fagos filamentosos utilizando dos curvas de calibración.

Bacteriófagos	GFP (VGC/mL)	ORI (VGC/mL)	Razón GFP/ORI M13	%
<i>phPX458</i>	$3,359 \times 10^{11}$	$3,503 \times 10^{11}$	0,95	95
<i>phPX458-UL29</i>	$2,65 \times 10^{13}$	$5,04 \times 10^{13}$	0,525	52,5
<i>phPX458-UL52</i>	$1,55 \times 10^{12}$	$1,55 \times 10^{12}$	1,04	104
* <i>phPX458-UL29/UL52</i>	$2,458 \times 10^{10}$	$2,32 \times 10^{14}$	$1,05 \times 10^{-4}$	0,01
** <i>phPX458-UL29/UL52</i>	$2,46 \times 10^{10}$	$3,72 \times 10^{13}$	$6,6 \times 10^{-4}$	0,07

* Primera producción

** Segunda producción

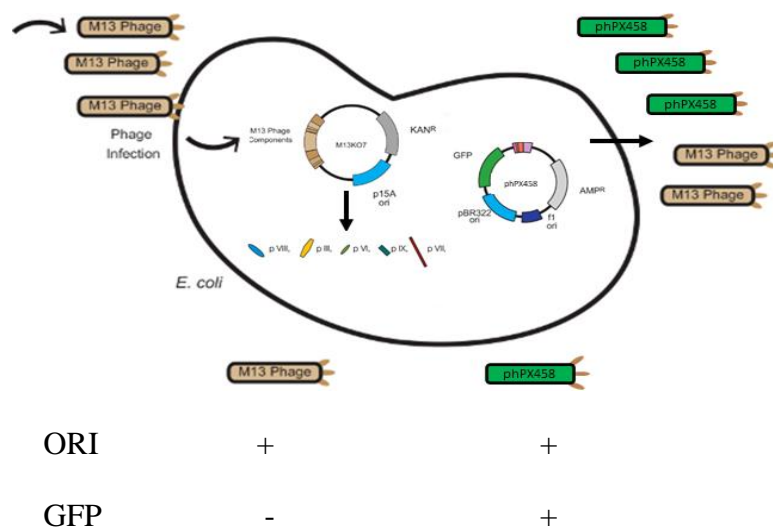
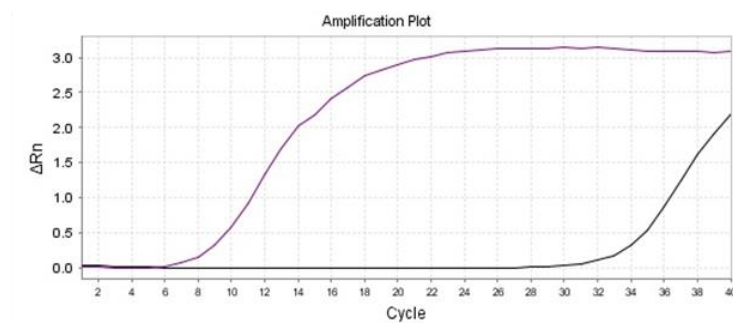


Figura 27. Esquema representativo del empaquetamiento de fagómidos tras la infección de bacterias transformadas con el fago helper M13KO7. Es probable que a medida que se generan los fagos recombinantes, también se empaquetan los fagos M13KO7, debido a que ellas poseen el ORI M13. La eficiencia del empaquetamiento de los fagos recombinantes, fue calculado teniendo en cuenta el valor de VGC/mL de los fagos que poseen el gen GFP sobre el valor total de VGC/mL obtenida por la curva de ORI M13.

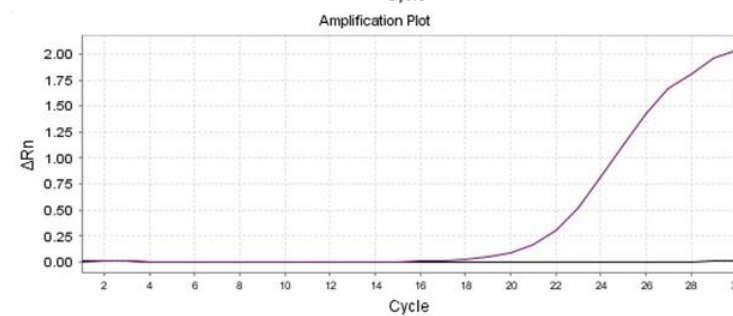
En la **Figura 28A** y **Figura 28B**, se observan las curvas de amplificación de ORI M13 y GFP en los bacteriófagos filamentosos *phPX458-UL29/UL52* respectivamente, tras una segunda producción. Se obtuvo la curva sigmoidea típica para el sistema en ambos casos. Los C_q obtenidos en el orden indicando anteriormente, fueron de: 9,876 y 22,482. Se detectó señal de amplificación en el control negativo de la qPCR de ORI M13 en el ciclo 34,929 de 40 ciclos.

Por otro lado, en los gráficos de las **Figura 28C** y **Figura 28D** se observan las curvas de *melting* para cada amplicón en el orden anteriormente descrito. Se detectó la misma T_m en todos los casos, correspondiente al producto esperado. La señal de amplificación del control negativo observada en la **Figura 28A** fue confirmada mediante el análisis de *melting*, resultando tener la misma T_m que el amplicón ORI M13, por lo que este resultado se tuvo en cuenta en el momento de realizar el cálculo de VGC del bacteriófago en cuestión.

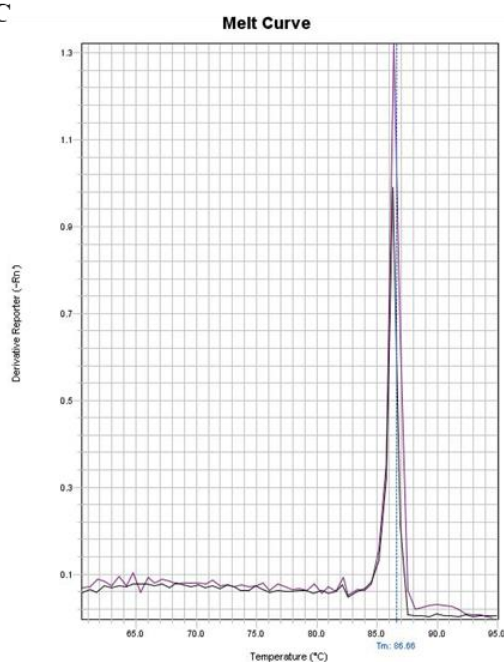
A



B



C



D

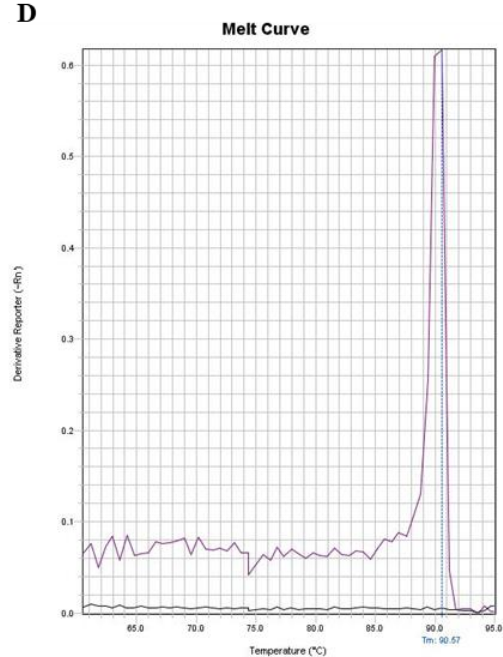


Figura 28. Curvas de amplificación de ORI M13 y GFP detectados en una segunda producción de los bacteriófagos *phPX458-UL29/UL52*. Los gráficos A y B, representan la intensidad de fluorescencia en función al número de ciclos de la qPCR de los productos generados **A.** Curva de amplificación de ORI M13 (curva en color violeta). Se detectó señal de amplificación en el control negativo de la qPCR-ORI M13 (curva color negro). **B.** Curva de amplificación de GFP (curva en color violeta). **C y D.** Curvas de *melting* de ORI M13 y GFP, respectivamente.

4.3. Transducción de células HEK293T con los diferentes constructos

Se transdujeron las células HEK293T por la permisividad que poseen ante la infección por el HSV-1 (Lin *et al.*, 2016).

Pese a diferentes intentos y cambiando diferentes parámetros tales como el uso de células Vero y células fagocíticas THP1, porcentajes de confluencia celular, tiempo de exposición de las células a los bacteriófagos, el uso de diferentes cantidades de fagos, la combinación de los bacteriófagos con fosfato de calcio, método de transducción utilizando medio de cultivo con SFB, método de *spin infection* y nuevas producciones de bacteriófagos, no se observaron altas tasas de transducción. En las mejores condiciones se observó solo un número limitado de células transducidas. El vector que presentó una mejor tasa de transducción durante los ensayos realizados fue el *phPX458-UL29*. Sin embargo, pese a las numerosas estrategias evaluadas, los resultados no fueron reproducibles, con los fagos *phPX458*.

En la **Figura 29**, se observan las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de células transducidas con el vector *phPX458-UL29*. Se observan células verdes que expresan GFP que no fueron infectadas ya que no se detectó la glicoproteína gD del HSV-1. Por otro lado, el control de células infectadas, muestra una alta tasa de infección en las condiciones de estudio, por lo que sugiere que la no infección de células donde se expresa GFP se debe a la presencia del sistema CRISPR-Cas9.

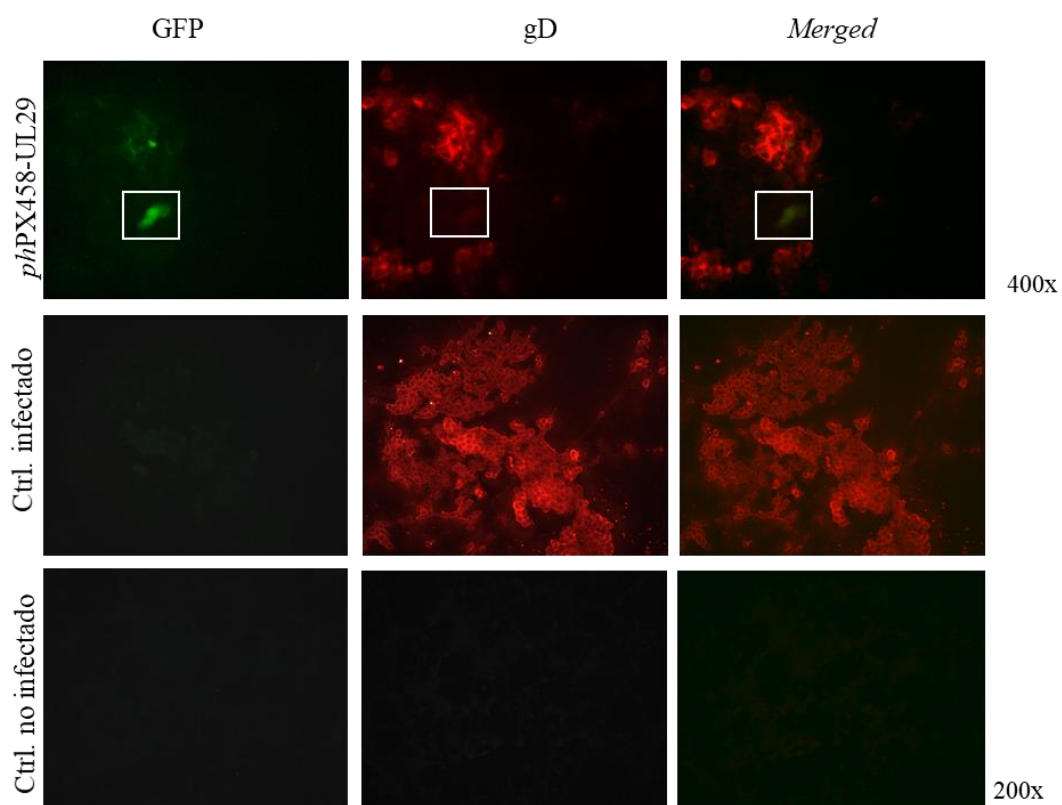


Figura 29. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de células HEK293T transducidas con los bacteriófagos *p/hPX458-UL29* e infectadas con HSV-1 MOI: 30. Las células transducidas expresan fluorescencia debida a GFP, cuyo gen se encuentra exclusivamente en los bacteriófagos recombinantes producidos. No se detecta la glicoproteína gD del HSV-1 en dichas células transducidas, indicando que el sistema CRISPR-Cas9 tuvo un impacto negativo sobre la producción de nuevas partículas de HSV-1 (cuadro blanco).

5. DISCUSIÓN

El tratamiento de las infecciones causadas por el virus del *Herpes simplex* tipo 1, sigue siendo un desafío importante a nivel mundial, debido a que: 1) el virus es capaz de establecer infecciones latentes en células neuronales, 2) el HSV-1 expresa pocos productos génicos durante la latencia, lo que le permite persistir en su huésped sin ser eliminados eficazmente por el sistema inmune, y 3) además generan resistencia frente a las drogas antivirales de primera elección, los cuales se limitan a inhibir la replicación viral en el ciclo lítico de infección y no a reducir ni eliminar virus latentes que impulsan la reactivación. Estas problemáticas, plantean la necesidad de desarrollar nuevos compuestos o estrategias novedosas, directas y potentes que permitan afectar la producción de HSV-1 infectivos y la eliminación de genomas latentes en modelos *in vitro* e *in vivo*. Un enfoque novedoso actualmente estudiado es el uso de la terapia génica basado en el sistema CRISPR-Cas9.

Si bien, se han obtenido resultados prometedores, un desafío importante en el éxito del sistema CRISPR-Cas9 anti-HSV-1 que sigue siendo abordado, es la selección adecuada del vector para transducir las células de manera segura, eficaz, eficiente y de bajo costo. Aunque numerosos estudios se han enfocado en utilizar vectores virales eucariotas, como los lentivirus y AAV, su uso masivo se ve obstaculizado por el potencial inmunogénico, riesgo oncológico, producción costosa y limitada capacidad de carga por cápside (Aubert *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2020; Oh *et al.*, 2019; Roehm *et al.*, 2016; van Diemen *et al.*, 2016).

Considerando estos antecedentes, en este proyecto se desarrollaron los primeros pasos para la construcción de vectores basados en bacteriófagos filamentosos. En esta idea, se diseñaron tres plásmidos de expresión que codifican todos los componentes del sistema CRISPR-Cas9 con gRNAs individuales o dobles, dirigidos a dos genes esenciales del HSV-1.

La funcionalidad del sistema CRISPR-Cas9 y gRNAs, fue verificada mediante un ensayo de transfección de células HEK293T, infección con el HSV-1 y detección de la gD mediante IFI. En un primer paso, se observó que la longitud de los vectores dificultó notoriamente la eficiencia de transfección celular (**Figura 20**). Se ha observado que la eficiencia de transfección puede ser afectada por el tamaño del ADN, pues, a diferencia de los vectores más grandes (de 9-15 kb), los vectores pequeños (hasta 3,9 kb) pueden atravesar rápidamente las membranas celulares y nucleares (Hornstein *et al.*, 2016; Sondergaard *et al.*, 2020).

Seguidamente, se observó que las células HEK293T fueron susceptibles a la infección por el HSV-1 a una multiplicidad de infección (MOI) alta, y con un valor cercano al 80% de infectividad celular (**Figura 21B**). Es importante destacar que, la susceptibilidad de las líneas celulares, así como la viabilidad de las partículas virales, cumplen un rol importante en la infectividad del HSV-1. Se ha observado que la variabilidad en el perfil de expresión de los receptores celulares utilizados por el virus, tendría particularmente relevancia en la MOI a utilizar, pues MOI bajas podrían ser suficientes para mediar la infección en otros modelos celulares (Fu *et al.*, 2018; Gruenheid *et al.*, 1993; Kalamvoki & Roizman, 2014; Kramer *et al.*, 1988; Wyler *et al.*, 2019; Zheng & Su, 2017).

Al analizar el efecto de sistema CRISPR-Cas9 en células transfectadas e infectadas se observó un patrón de reducción parcial en la expresión de la glicoproteína D del HSV-1 al utilizar gRNAs individuales dirigidos a los genes UL29 y UL52, pero no con una alta eficacia a las 30 h post-infección (**Figura 21A, B**). En trabajos anteriores, se observó que a las 24 h post-infección, los mismos gRNAs individuales dirigidos a los genes esenciales UL29 y UL52, fueron parcialmente eficientes para alterar la replicación del HSV-1 en células Vero y MRC5 (Karpov *et al.*, 2019; van Diemen *et al.*, 2016).

Por otro lado, se analizó la posibilidad de aumentar la eficiencia del sistema mediante la actividad aditiva de los gRNAs dirigidos a los genes UL29 y UL52 codificados a partir de un mismo plásmido. A las 30 h post-infección, el direccionamiento simultáneo de múltiples genes no resultó en una mayor efectividad en la disminución

de la replicación viral respecto al uso de gRNAs individuales (**Figura 21B**). Estos resultados están en concordancia con observaciones anteriores en células Vero, donde a las 24 h post-infección, no se observó diferencias significativas en la disminución de la replicación viral entre los grupos de células tratadas con gRNAs individuales y dobles (van Diemen *et al.*, 2016). Mientras que, en células MRC5 se observó que el direccionamiento simultáneo de múltiples genes afectó completamente la replicación viral a las 24 y 72 h post-infección (van Diemen *et al.*, 2016). Por otro lado, en células HEK293T infectadas con HSV-1 a MOI: 10 por 36 h, se observó un 41% de inserciones/delecciones y probablemente la eficiencia de escisión mediada por CRISPR-Cas9 está relacionada a las cantidades del HSV-1 (Lin *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren que además de los tiempos evaluados, el uso de doble gRNA, y la susceptibilidad de las líneas celulares a la infección, podrían tener una implicancia para lograr el efecto de edición génica deseado (Lin *et al.*, 2016; van Diemen *et al.*, 2016).

Una vez verificada la funcionalidad del sistema en las condiciones del laboratorio, se abordó el impacto que tendría el tamaño del plásmido PX458 y sus derivados, sobre el empaquetamiento de los bacteriófagos filamentosos recombinantes. Los resultados indicaron que se logró empaquetar eficientemente los bacteriófagos filamentosos con tamaño de genoma hasta 9290 pb, entre los que se incluyen *phPX458* y *phPX458-UL52*. Curiosamente, el empaquetamiento de los *phPX458-UL29* presentó una menor eficiencia en el empaquetamiento respecto al *phPX458-UL52*, con quien comparte alta similitud y longitud genómica. Respecto a esta observación en los *phPX458-UL29*, no se descarta el mal plegamiento de la señal de empaquetamiento durante la producción de los fagos, lo cual reduciría significativamente el número de bacteriófagos filamentosos recombinantes (Chasteen *et al.*, 2006; Dotto & Zinder, 1983; Russel & Model, 1989).

Por otro lado, se puede proponer que el tamaño del plásmido afectó completamente el empaquetamiento de los *phPX458-UL29/UL52*, cuya longitud del genoma es de 9718 pb (**Tabla 5**). Este resultado fue diferente a lo observado recientemente por (Zhou *et al.*, 2020), tras reportar obtener altos títulos de bacteriófagos filamentosos recombinantes que poseen como genoma ADN de 10 kb de longitud, sugiriendo que

es necesario realizar más estudios para explicar los factores que pudieron influir en el empaquetamiento de los bacteriófagos filamentosos diseñados en este trabajo. Además, nuevamente no se puede descartar un efecto sobre el plegamiento de la señal de empaquetamiento de los bacteriófagos.

Posteriormente, se analizó la capacidad de los fagos recombinantes de transportar el sistema CRISPR-Cas9 e inhibir el ciclo viral del *Herpes simplex* tipo 1. Se logró transducir las células con el bacteriófago filamentoso recombinante *phPX458-UL29*, pero no con alta eficiencia. Mientras que los resultados no fueron reproducibles para *phPX458*. Esta baja eficiencia de transducción celular pudo deberse a que las partículas de fagos no poseen tropismo intrínseco hacia células de mamíferos (Kassner *et al.*, 1999; Larocca *et al.*, 1998, 1999). Sin embargo, otros autores han observado la unión y la internalización celular por la ruta endolisosomal o transcitosis de los bacteriófagos PK1A2, T4, T5, T7, SP01, SPP1 y P22, lo cual sugiere que los fagos no modificados pueden ser internalizados (Lehti *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2017).

Por otro lado, la evidencia sugiere que la internalización de los bacteriófagos filamentosos puede darse por diferentes vías, dependiendo del tipo celular: endocitosis mediada por clatrina y macropinocitosis en células epiteliales (p. ej.: células HeLA, MCF-7) y endocitosis mediada por caveolas para células endoteliales (p. ej. células HDMEC). Por tanto, en su mayoría esto implica, que los bacteriófagos trafican mediante la ruta endolisosomal. Se sabe que los fagos toleran amplios rangos de pH de los endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas, pero se ha reportado que un mayor porcentaje de fagos no resisten a la degradación por las proteasas lisosomales y las del complejo proteosomal (Branston *et al.*, 2013; Casey *et al.*, 2009; Hajitou *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2012; Lehti *et al.*, 2017; Przystal *et al.*, 2013; Stoneham *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2014). Es claro que las vías de acceso y el tráfico intracelular pueden influir en la estabilidad de los bacteriófagos filamentosos, sin embargo, aún no está bien esclarecido el mecanismo por el cual algunos fagos pueden escapar de la degradación en el lisosoma o proteosoma. (Kim *et al.*, 2012).

Desde una perspectiva de la funcionalidad de los bacteriófagos como transportadores de material genético, la entrada del ADN al núcleo sería el siguiente paso decisivo.

Hasta la actualidad no existen mayores antecedentes de los mecanismos de transporte nuclear de los bacteriófagos filamentosos ni la liberación de la carga genética, pero, se sabe que el ingreso al núcleo celular es un proceso afinado, que requiere de la exposición de un péptido señal de localización nuclear (NLS) típico de los eucariotas (Gorlich & Mattaj, 1996; Ludtke *et al.*, 1999). Curiosamente, esto ha sido identificado en las proteínas terminales (TP) de los bacteriófagos Φ 29, Nf, PRD1, Bam35 y Cp-1, los cuales han sido localizados en el núcleo celular (Redrejo-Rodríguez *et al.*, 2012). Aunque las proteínas de los bacteriófagos filamentosos de tipo silvestre no poseen NLS, no se descarta que el ADN del fago pueda ingresar al núcleo durante la desintegración de la membrana nuclear en la división celular, probablemente sea un evento raro, pero posible, que requiere de mayores estudios a nivel proteómico y funcional para dilucidar este fenómeno (Grosse *et al.*, 2006; Lehti *et al.*, 2017; Ludtke *et al.*, 2002).

En conjunto, los resultados obtenidos en este proyecto y las evidencias hasta la actualidad, sugieren que la baja eficiencia de transducción celular observada en este estudio, podría ser explicada por: 1) el reconocimiento e internalización celular 2) secuestro de los fagos internalizados en vesículas endocíticas con la eventual degradación lisosomal y proteosomal y 3) el transporte y liberación de la carga genética al núcleo celular. Estas observaciones fueron reportadas y abordadas mediante el uso de la tecnología *Phage display* (Hajitou *et al.*, 2006; Kassner *et al.*, 1999; Larocca *et al.*, 1998; Pasqualini & Ruoslahti, 1996; Poul & Marks, 1999).

La tecnología *Phage display* consiste en incorporar por medio de ingeniería genética, péptidos y/o proteínas pequeñas en las proteínas estructurales de los fagos filamentosos (proteínas de fusión) (Smith, 1985). Las proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX pueden ser modificadas, en función a la longitud del péptido o proteína que quiere ser expuesta (Barbas *et al.*, 1991; Gao *et al.*, 1999; Iannolo *et al.*, 1995). En particular, la proteína pVIII puede acomodar establemente péptidos cortos de 6-8 aminoácidos de longitud, mientras que la proteína pIII puede exponer péptidos de longitud más largos (Barbas *et al.*, 1991; Iannolo *et al.*, 1995).

Mediante el uso de la tecnología *Phage display*, se han realizado adaptaciones a los fagos con el fin de promover la unión ligando-receptor que conduce a la internalización de los fagos filamentosos mediante endocitosis mediada por receptor (Hart *et al.*, 1994). Utilizando este enfoque, para permitir la internalización celular *in vivo* e *in vitro*, se han diseñado proteínas quiméricas de pIII acopladas: 1) al Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) de interacción con su receptor específico (FGFR) (Larocca *et al.*, 1999) al Factor de crecimiento epidérmico (EGF) de interacción con su receptor específico (EGFR) (Kassner *et al.*, 1999) 2) anticuerpos scFv anti-ErbB2 de interacción con el receptor de crecimiento ErbB2 (Poul & Marks, 1999), nanocuerpos específicos del receptor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2) (Ranjibar *et al.*, 2018), así como con 3) péptidos con el motivo RGD de unión a integrinas $\alpha\beta_3$, en sus diversas variantes (Choi *et al.*, 2014; A. Donnelly *et al.*, 2015; Hajitou *et al.*, 2006, 2007; Hart *et al.*, 1994; Ivanenkov *et al.*, 1999; Kia *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012; Justyna M. Przystal *et al.*, 2013; Trepel *et al.*, 2009). Si bien, es de notar, que el motivo RDG4C facilita la entrada en diversos modelos celulares, además, se especula que este proceso podría ocurrir en las células neuronales debido a que también expresan las integrinas $\alpha\beta_3$ (Campbell *et al.*, 2018; Hajitou *et al.*, 2007; Kia *et al.*, 2012; Przystal *et al.*, 2019; Staquicini *et al.*, 2019; Wu & Reddy, 2012).

Paralelamente, a las modificaciones de la pIII, (Suwan *et al.*, 2019) sugieren modificar la pVIII (WT) para disminuir la carga negativa total de pVIII, y evitar la unión inespecífica a moléculas cargadas positivamente. Para resolver este obstáculo, han introducido propiedades zwitteriónicas en el extremo N-terminal de una rpVIII, mediante la incorporación de un péptido neutralizante de carga corta con la secuencia de aminoácidos Ala – Lys – Ala – Ser (AKAS) (Suwan *et al.*, 2019).

Seguidamente, como se ha visto, la vía de degradación endosomal-lisosomal y proteosomal cumplen un factor crítico para mejorar la entrega de genes mediados por bacteriófagos, tal como se ha observado en tumores y células cancerígenas mantenidas *in vitro* (Justyna M. Przystal *et al.*, 2013; Stoneham *et al.*, 2012). Un estudio sugiere que la inhibición de las proteínas lisosomales y las del complejo proteosomal permitiría la estabilización de la partícula y favorecería el escape del fago al citoplasma (Przystal *et al.*, 2013; Volcy & Dewhurst, 2009). Por otro lado, esta barrera de post-

internalización puede ser superada mediante la exposición de un péptido fusogénico en rpVIII, como por ejemplo: el péptido H5WYG (23 mer) (Midoux *et al.*, 1998), INF7 (23 mer) (Plank *et al.*, 1994), C1(12 mer) (Hirosue & Weber, 2006), ya que se ha visto que estos péptidos podrían promover el escape endosomal y evitar la degradación en el proteosoma (Hajitou *et al.*, 2007; Suwan *et al.*, 2019).

El escape del fago al citoplasma, permitiría la disponibilidad del mismo para entregar la carga genética al núcleo. Esta idea ha sido abordada en el diseño del bacteriófago AAVP, que expone en la rpVIII el péptido señal de localización nuclear del virus SV40 (PKKKRKV), observándose una mayor efectividad en el transporte del bacteriófago al núcleo celular (Hajitou *et al.*, 2007; Suwan *et al.*, 2019).

Es importante destacar que, recientemente se ha publicado una idea similar a la propuesta en este trabajo, donde se ha evaluado el uso del bacteriófago AAVP como transportador del sistema CRISPR-Cas9 en células de adenocarcinoma de pulmón humano (A549), dirigido a eliminar la expresión de la proteína p53, obteniéndose resultados satisfactorios (Zhou *et al.*, 2020). En base a este antecedente recientemente publicado y a lo observado en este trabajo, se sugiere evaluar a futuro algunas estrategias, para mejorar la eficiencia de transducción celular: **1)** el fagómido, idealmente debe poseer un tamaño menor o igual a 9290 pb, **2)** eliminar la necesidad de añadir fagos auxiliares, y en su reemplazo, utilizar una línea celular de empaquetamiento bacteriano sin *ori fl, fd* o M13, que proporcione las mismas funciones que el fago auxiliar y que favorezca el empaquetamiento de bacteriófagos recombinantes en detrimento de los fagos auxiliares (Chasteen *et al.*, 2006), **3)** co-transformar *E. coli* con vectores plasmídicos bicistrónicos sin *ori fl, fd* o M13 que permitan la expresión en *trans* de proteínas recombinantes pIII y pVIII u otros del fago M13 (Rangel *et al.*, 2013; Suwan *et al.*, 2019; Yero *et al.*, 2006). **4)** evaluar el uso de *phage display* en la proteína pIII y pVIII. Finalmente, se sugiere evaluar el bacteriófago resultante en células neuronales.

Respecto al *phage display* en pIII, es de particular interés direccionar los bacteriófagos filamentosos hacia las células epiteliales y neuronales donde el HSV-1 establece un ciclo lítico y latente de infección. En base a los antecedentes, se podrían evaluar; el

péptido RGD4C de unión a la integrina $\alpha\beta 3$ (Hajitou *et al.*, 2006, 2007; Wu & Reddy, 2012), el péptido Tet1 (12 mer) que posee una alta afinidad y especificidad de unión al trisialogangliósido (G_{T1b}) presente en las membranas neuronales, aunque también se encuentra en células epiteliales (Federici *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2004, 2005), la penetratina-1 (16 mer), el cual ingresa a las células por un mecanismo independiente del receptor y es capaz de evadir la acción degradativa de la vía endocítica en diversos tipos de células, entre ellas, las células neuronales (Derossi *et al.*, 1996; Rangel *et al.*, 2012, 2013). Las secuencias nucleotídicas codificantes de estos péptidos o pequeñas proteínas, pueden ser clonadas en marco de lectura entre el gen III y la secuencia señal N-terminal (Nemudraya *et al.*, 2016).

Por otro lado, el *phage display* en pVIII debería ser multifuncional, por un lado, la exposición del péptido fusogénico H5WYG en rpVIII, para promover el escape de la vía de degradación endolisosómica (Midoux *et al.*, 1998; Suwan *et al.*, 2019), así como la exposición de un péptido señal de localización nuclear no canónicas o la derivada del virus SV40 (PKKKRKV) en la rpVIII (Kalderon *et al.*, 1984; Kosugi *et al.*, 2009).

Finalmente, este estudio proporciona una plataforma para el desarrollo de herramientas innovadoras para su uso amplio en biomedicina. Tras evaluar nuevas alternativas se podría mejorar la eficiencia global de la transducción celular, superando la endocitosis por direccionamiento receptor-ligando, el escape endosomal y la localización nuclear.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró desarrollar los vectores tipo fagómido para la expresión de Cas9 y gRNAs dirigidos contra el genoma del HSV-1. Pese a la dificultad de ensamblaje del bacteriófago *phPX458-UL29/UL52*, los demás fagómidos fueron empaquetados en un porcentaje mayor al 50%. Además, se logró establecer un sistema de PCR en tiempo real para la cuantificación de fagos recombinantes que poseen en su genoma la secuencia codificante de GFP.

Se analizó la capacidad de los fagos recombinantes de transportar el sistema CRISPR-Cas9 e inhibir el ciclo viral del HSV-1, se ha observado que las células HEK293T fueron transducidas con los fagos *phPX458-UL29*, pero en una baja eficiencia, pese a las estrategias alternativas evaluadas. Sin embargo, las construcciones podrán ser utilizadas para generar bacteriófagos filamentosos recombinante con atributos que permitan mejorar la eficiencia de transducción celular utilizando el *Phage Display*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackermann, M., Braun, D. K., Pereira, L., & Roizman, B. (1984). Characterization of Herpes simplex virus 1 alpha proteins 0, 4, and 27 with monoclonal antibodies. *Journal of Virology*, 52(1), 108–118. <https://doi.org/10.1128/jvi.52.1.108-118.1984>
- Adelman, K., Salmon, B., & Baines, J. D. (2001). Herpes simplex virus DNA packaging sequences adopt novel structures that are specifically recognized by a component of the cleavage and packaging machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), 3086–3091. <https://doi.org/10.1073/pnas.061555698>
- Alwine, J. C., Steinhart, W. L., & Hill, C. W. (1974). Transcription of Herpes simplex type 1 DNA in nuclei isolated from infected HEp-2 and KB cells. *Virology*, 60(1), 302–307. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(74\)90390-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(74)90390-0)
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2015). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519), 569–573. <https://doi.org/10.1038/nature13579>.Structural
- Applied Biosystems. (2003). Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR. In *ReVision* (pp. 1–8).
- Arduino, P. G., & Porter, S. R. (2008). Herpes simplex Virus Type 1 infection: Overview on relevant clinico-pathological features. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 37(2), 107–121. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00586.x>
- Aslani, A., Olsson, M., & Elias, P. (2002). ATP-dependent unwinding of a minimal origin of DNA replication by the origin-binding protein and the single-strand DNA-binding protein ICP8 from Herpes simplex virus type I. *The Journal of*

Biological Chemistry, 277(43), 41204–41212.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M208270200>

Atanasiu, D., Saw, W. T., Cohen, G. H., & Eisenberg, R. J. (2010). Cascade of Events Governing Cell-Cell Fusion Induced by Herpes simplex Virus Glycoproteins gD, gH/gL, and gB. *Journal of Virology*, 84(23), 12292–12299.
<https://doi.org/10.1128/jvi.01700-10>

Aubert, M., Madden, E. A., Loprieno, M., Felixge, H. S. D., Stensland, L., Huang, M.-L., Greninger, A. L., Roychoudhury, P., Niyonzima, N., Nguyen, T., Magaret, A., Galletto, R., Stone, D., & Jerome, K. R. (2016). In vivo disruption of latent HSV by designer endonuclease therapy. *JCI Insight*, 1(14), 1–17.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.88468>

Aubert, M., Strongin, D. E., Roychoudhury, P., Loprieno, M. A., Haick, A. K., Klouser, L. M., Stensland, L., Huang, M. L., Makhsous, N., Tait, A., De Silva Felixge, H. S., Galletto, R., Duchateau, P., Greninger, A. L., Stone, D., & Jerome, K. R. (2020). Gene editing and elimination of latent Herpes simplex virus in vivo. *Nature Communications*, 11(4148), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17936-5>

Baird, A. (2011). Gene Transfer into mammalian cells using targeted filamentous bacteriophage. *Cold Spring Harb Protoc.*, 8(12), 950–957.
<https://doi.org/doi:10.1101/pdb.prot5653>

Barbas, C. F., Kang, A. S., Lerner, R. A., & Benkovict, S. J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(September), 7978–7982.

Barrow, P A, Soothill, J. S. (1997). Prophylaxis: Rediscovery and Renewed Assessment of Potential. *Trends in Microbiology*, 5, 268–271.

- Boehmer, P. E., Craigie, M. C., Stow, N. D., & Lehman, I. R. (1994). Association of origin binding protein and single strand DNA-binding protein, ICP8, during Herpes simplex virus type 1 DNA replication in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(46), 29329–29334.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Dusko Ehrlich, S. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, *151*(8), 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
- Booy, F. P., Newcomb, W. W., Trus, B. L., Brown, J. C., Baker, T. S., & Steven, A. C. (1991). Liquid-crystalline, phage-like packing of encapsidated DNA in herpes simplex virus. *Cell*, *64*(5), 1007–1015. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90324-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90324-R)
- Boyd, M. R., Bacon, T. H., Sutton, D., & Cole, M. (1987). Antiherpesvirus activity of 9-(4-Hydroxy-3-Hydroxymethylbut-1-yl)Guanine (BRL 39123) in Cell culture. Antimic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *31*(8), 1238–1242. <https://doi.org/10.1128/AAC.31.8.1238>
- Branston, S. D., Stanley, E. C., Ward, J. M., & Keshavarz. Moore, E. (2013). Determination of the survival of bacteriophage M13 from chemical and physical challenges to assist in its sustainable bioprocessing. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *18*(3), 560–566. <https://doi.org/10.1007/s12257-012-0776-9>
- Brigati, J. R., & Petrenko, V. A. (2005). Thermostability of landscape phage probes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *382*, 1346–1350. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3289-y>
- Cai, W., & Schaffer, P. A. (1992). Herpes simplex virus type 1 ICP0 regulates

- expression of immediate-early, early, and late genes in productively infected cells. *Journal of Virology*, *66*(5), 2904–2915. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.5.2904-2915.1992>
- Cai, Weizhong, Gu, B., & Person, S. (1988). Role of Glycoprotein B of Herpes Simplex Virus Type 1 in Viral Entry and Cell Fusion. *Journal of Virology*, *62*(8), 2596–2604. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.01.064>
- Campbell, S., Suwan, K., Waramit, S., Aboagye, E. O., & Hajitou, A. (2018). Selective Inhibition of Histone Deacetylation in Melanoma Increases Targeted Gene Delivery by a Bacteriophage Viral Vector. *Cancers*, *10*(125), 1–13. <https://doi.org/10.3390/cancers10040125>
- Carrera, M. R. A., Kaufmann, G. F., Mee, J. M., Meijler, M. M., Koob, G. F., & Janda, K. D. (2004). Treating cocaine addiction with viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(28), 10416–10421.
- Carrozza, M. J., & DeLuca, N. A. (1996). Interaction of the viral activator protein ICP4 with TFIID through TAF250. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(6), 3085–3093. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.6.3085>
- Casey, J. R., Grinstein, S., & Orlowski, J. (2009). Sensors and regulators of intracellular pH. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 1, pp. 50–61). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm2820>
- Chasteen, L., Ayriss, J., Pavlik, P., & Bradbury, A. R. M. (2006). Eliminating helper phage from phage display. *Nucleic Acids Research*, *34*(21), 1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl772>
- Chen, X.-P., Li, J., Mata, M., Goss, J., Wolfe, D., Glorioso, J. C., & Fink, D. J. (2000). Herpes Simplex Virus Type 1 ICP0 Protein Does Not Accumulate in the Nucleus of Primary Neurons in Culture. *Journal of Virology*, *74*(21), 10132–10141.

<https://doi.org/10.1128/jvi.74.21.10132-10141.2000>

- Chen, Y., Zhi, S., Liang, P., Zheng, Q., Liu, M., Zhao, Q., Ren, J., Cui, J., Huang, J., Liu, Y., & Songyang, Z. (2020). Single AAV-Mediated CRISPR-SaCas9 Inhibits HSV-1 Replication by Editing ICP4 in Trigeminal Ganglion Neurons. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 18(September), 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.05.011>
- Choi, D. S., Jin, H., Yoo, S. Y., & Lee, S. (2014). Cyclic RGD Peptide Incorporation on Phage Major Coat Proteins for Improved Internalization by HeLa Cells. *Bioconjugate Chemistry*, 25, 216–233.
- Christophers, J., Clayton, J., Craske, J., Ward, R., Collins, P., Trowbridge, M., & Darby, G. (1998). Survey of Resistance of Herpes Simplex Virus to Acyclovir in Northwest England. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42(4), 868–872. <https://doi.org/10.1056/NEJM199904223401608>
- Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E., & Koonin, V. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 42(10), 6091–6105. <https://doi.org/10.1093/nar/gku241>
- Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., & Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, 352, 624–628. <https://doi.org/10.1038/352624a0>
- Colgrove, R. C., Liu, X., Griffiths, A., Raja, P., Deluca, N. A., Newman, R. M., Coen, D. M., & Knipe, D. M. (2016). History and genomic sequence analysis of the herpes simplex virus 1 KOS and KOS1.1 sub-strains. *Virology*, 487, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.09.026>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L., & Zang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using

- CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121), 819–823.
<https://doi.org/10.1126/science.1231143.Multiplex>
- Copeland, A. M., Newcomb, W. W., & Brown, J. C. (2009). Herpes simplex Virus Replication: Roles of Viral Proteins and Nucleoporins in Capsid-Nucleus Attachment. *Journal of Virology*, 83(4), 1660–1668.
<https://doi.org/10.1128/jvi.01139-08>
- Dasgupta, A., & Wilson, D. W. (1999). ATP depletion blocks herpes simplex virus DNA packaging and capsid maturation. *Journal of Virology*, 73(3), 2006–2015.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9971781>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC104443>
- Davison, A. J. (2010). Herpesvirus systematics. *Veterinary Microbiology*, 143(1), 52–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.014>
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., & Prochiantz, A. (1996). Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(30), 18188–18193.
- Deshmane, S. L., & Fraser, N. W. (1989). During Latency, Herpes simplex virus Type 1 DNA is associated with nucleosomes in a Chromatin Structure. *Journal of Virology*, 63(2), 943–947.
- Dohner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Valle, R., & Sodeik, B. (2002). Function of Dynein and Dynactin in Herpes simplex virus capsid transport. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 2795–2809.
<https://doi.org/10.1091/mbc.01>
- Donnelly, A., Yata, T., Bentayebi, K., Suwan, K., & Hajitou, A. (2015). Bacteriophage mediates efficient gene transfer in combination with conventional transfection

reagents. *Viruses*, 7(12), 6476–6489. <https://doi.org/10.3390/v7122951>

Donnelly, M. L. L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L. E., Gani, D., & Ryan, M. D. (2001). Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein “cleavage” mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: A putative ribosomal “skip.” *Journal of General Virology*, 82(5), 1013–1025. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-5-1013>

Dotto, G. P., Enea, V., & Zinder, N. D. (1981). Functional Analysis of Bacteriophage ϕ 1 Intergenic Region. *Virology*, 114, 463–473.

Dotto, G. P., & Zinder, N. D. (1983). The Morphogenetic Signal of Bacteriophage ϕ 1. *Virology*, 130, 252–256.

Douglas, M. W., Diefenbach, R. J., Homa, F. L., Miranda-Saksena, M., Rixon, F. J., Vittone, V., Byth, K., & Cunningham, A. L. (2004). Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 28522–28530. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311671200>

Dracheva, S., Koonin, E. V., & Crute, J. J. (1995). Identification of the primase active site of the Herpes simplex virus type 1 helicase-primase. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 270, Issue 23, pp. 14148–14153). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.23.14148>

Duncan, M. (1987). The genome of Herpes simplex virus: structure, replication and evolution. *Journal of Cell Science*, 4(7), 67–94.

Ejercito, P. M., Kieff, E. D., & Roizman, B. (1968). Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *The Journal of General Virology*, 2(3), 357–364. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-2-3-357>

- Elion, G. B., Furman, P. A., Fyfe, J. A., de Miranda, P., Beauchamp, L., & Schaeffer, H. J. (1977). Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5716–5720. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5716>
- Everett, R. D., & Maui, G. G. (1994). HSV-1 IE protein Vmw110 redistribution of PML. *EMBO Journal*, 13(21), 5062–5069.
- Falkenberg, M., Bushnell, D. A., Elias, P., & Lehman, I. R. (1997). The UL8 subunit of the heterotrimeric Herpes simplex virus type 1 helicase-primase is required for the unwinding of single strand DNA-binding protein (ICP8)-coated DNA substrates. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(36), 22766–22770. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.36.22766>
- Federici, T., Liu, J. K., Teng, Q., Garrity-moses, M., Yang, J. U. N., & Boulis, N. M. (2006). Neuronal affinity of a C7C loop peptide identified through phage display. *Journal of Drug Targeting*, 14(5), 263–271. <https://doi.org/10.1080/10611860600763079>
- Fu, X., Tao, L., Wang, P., Cripe, T. P., & Zhang, X. (2018). Comparison of infectivity and spread between HSV-1 and HSV-2 based oncolytic viruses on tumor cells with different receptor expression profiles. *Oncotarget*, 9(30), 21348–21358.
- Fyfe, J. A., Keller, P. M., Furman, P. A., Miller, R. L., & Elion, G. B. (1978). Thymidine Kinase from Herpes Simplex Virus Phosphorylates the New Antiviral Compound, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(24), 8721–8727.
- Gao, C., Mao, S., Lo, C.-H. L., Wirsching, P., Lerner, R. A., & Janda, K. D. (1999). Making artificial antibodies: A format for phage display of combinatorial

heterodimeric arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 6025–6030.

Gaudin, R., & Kirchhausen, T. (2015). Superinfection exclusion is absent during acute Junin virus infection of Vero and A549 cells. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep15990>

Gaudreau, A., Hill, E., Balfour, H. H., Erice, A., & Boivin, G. (1998). Phenotypic and Genotypic Characterization of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Viruses from Immunocompromised Patients. *The Journal of Infectious Diseases*, 178, 297–303.

Geraghty, R. J., Krurnmenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., & Spear, P. G. (1998). Entry of Alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science*, 280(5), 1618–1620.

Gill, M. J., Ariette, J., & Buchan, K. A. (1988). Herpes simplex virus infection of the hand. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 84(1), 89–93. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(90\)70018-D](https://doi.org/10.1016/0190-9622(90)70018-D)

González-Mora, A., Hernández-Pérez, J., Iqbal, H. M. N., Rito-Palomares, M., & Benavides, J. (2020). Bacteriophage-Based Vaccines : A Potent Approach for Antigen Delivery. *Vaccines*, 8(504), 1–24.

Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., & Blinov, V. M. (1988). A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Letters*, 235(1–2), 16–24. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)81226-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81226-2)

Gorlich, D., & Mattaj, I. W. (1996). Nucleocytoplasmic Transport. In *Science* (Vol. 271, pp. 1513–1519).

- Gottlieb, J., & Challberg, M. D. (1994). Interaction of Herpes simplex virus Type 1 DNA polymerase and the UL42 accessory protein with a model primer template. *Journal of Virology*, 68(8), 4937–4945.
- Gottlieb, J., Marcy, A. I., Coen, D. M., & Challberg, M. D. (1990). The Herpes simplex virus type 1 UL42 gene product: a subunit of DNA polymerase that functions to increase processivity. *Journal of Virology*, 64(12), 5976–5987. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.12.5976-5987.1990>
- Grinde, B. (2013). Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. *Journal of Oral Microbiology*, 1(5), 1–9. <https://doi.org/10.3402/jom.v5i0.22766>
- Grosse, S., Thévenot, G., Monsigny, M., & Fajac, I. (2006). Which mechanism for nuclear import of plasmid DNA complexed with polyethylenimine derivatives? *The Journal of Gene Medicine*, 8, 845–851. <https://doi.org/10.1002/jgm>
- Gruenheid, S., Gatzke, L., Meadows, H., & Tufaro, F. (1993). Herpes Simplex Virus Infection and Propagation in a Mouse L Cell Mutant Lacking Heparan Sulfate Proteoglycans. *Journal of Virology*, 67(1), 93–100.
- Guay, G., & Lippe, R. (2006). Reconstitution of Herpes Simplex Virus Type 1 Nuclear Capsid Egress In Vitro. *Journal of Virology*, 80(19), 9741–9753. <https://doi.org/10.1128/JVI.00061-06>
- Haddow, L. J., Dave, B., Mindel, A., McPhie, K. A., Chung, C., Marks, C., & Dwyer, D. E. (2006). Increase in rates of Herpes simplex virus type 1 as a cause of anogenital herpes in western Sydney, Australia, between 1979 and 2003. *Sexually Transmitted Infections*, 82(3), 255–259. <https://doi.org/10.1136/sti.2005.018176>
- Hajitou, A., Rangel, R., Trepel, M., Soghomonyan, S., Gelovani, J. G., Alauddin, M. M., Pasqualini, R., & Arap, W. (2007). Design and construction of targeted

- AAVP vectors for mammalian cell transduction. *Nature Protocols*, 2(3), 523–531. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.51>
- Hajitou, A., Trepel, M., Lilley, C. E., Soghomonyan, S., Alauddin, M. M., Frank C. Marini, I., Restel, B. H., Ozawa, M. G., Moya, C. A., Rangel, R., Sun, Y., Zaoui, K., Schmidt, M., Kalle, C. von, Weitzman, M. D., Gelovani, J. G., Pasqualini, R., & Arap, W. (2006). A Hybrid Vector for Ligand-Directed Tumor Targeting and Molecular Imaging. *Cell*, 125(3), 385–398. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.042>
- Hamatake, R. K., Bifano, M., Hurlburt, W. W., & Tenney, D. J. (1997). A functional interaction of ICP8, the Herpes simplex virus single-stranded DNA-binding protein, and the helicase-primase complex that is dependent on the presence of the UL8 subunit. *Journal of General Virology*, 78(4), 857–865. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-4-857>
- Hart, S. L., Knight, A. M., Harbottle, R. P., Mistry, A., Hunger, H. D., Cutler, D. F., Williamson, R., & Coutelle, C. (1994). Cell binding and internalization by filamentous phage displaying a cyclic Arg-Gly-Asp-containing peptide. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(17), 12468–12474.
- Haurwitz, R. E., Jinek, M., Wiedenheft, B., Zhou, K., & Doudna, J. A. (2010). Sequence and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*, 329(5997), 1355–1358.
- Hay, I. D., & Lithgow, T. (2019). Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. *EMBO Reports*, 20(6), 1–24. <https://doi.org/10.15252/embr.201847427>
- Heming, J. D., Conway, J. F., & Homa, F. L. (2017). Herpesvirus capsid assembly and DNA packaging. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 223, 1–27.

<https://doi.org/10.1007/978-3-319-53168-7>

- Herold, B. C., WuDunn, D., Soltys, N., & Spear, P. G. (1991). Glycoprotein C of Herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *Journal of Virology*, *65*(3), 1090–1098. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.3.1090-1098.1991>
- Higgs, M. R., Preston, V. G., & Stow, N. D. (2008). The UL15 protein of herpes simplex virus type 1 is necessary for the localization of the UL28 and UL33 proteins to viral DNA replication centres. *Journal of General Virology*, *89*(7), 1709–1715. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/000448-0>
- Hirosue, S., & Weber, T. (2006). pH-Dependent Lytic Peptides Discovered by Phage-Display. *Biochemistry*, *45*(20), 6476–6487.
- Hodge, P. D., & Stow, N. D. (2001). Effects of Mutations within the Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Encapsidation Signal on Packaging Efficiency. *Journal of Virology*, *75*(19), 8977–8986. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.19.8977-8986.2001>
- Honess, R. W., & Roizman, B. (1974). Regulation of Herpesvirus Macromolecular Synthesis I. Cascade Regulation of the Synthesis of Three Groups of Viral Proteins 1. *Journal of Virology*, *14*(1), 8–19. <https://doi.org/10.1128/jvi.14.1.8-19.1974>
- Hornstein, B. D., Roman, D., Arévalo-Soliz, L. M., Engevik, M. A., & Zechiedrich, L. (2016). Effects of Circular DNA Length on Transfection Efficiency by Electroporation into HeLa Cells. *PLoS ONE*, *11*(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167537>
- Hulo, C., Castro, E. De, Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., & Mercier, P. Le. (2011). ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 39, pp. 576–582).

<https://doi.org/10.1093/nar/gkq901>

- Iannolo, G., Minenkova, O., Petruzzelli, R., & Cesareni, G. (1995). Modifying Filamentous Phage Capsid: Limits in the Size of the Major Capsid Protein. *Journal of Molecular Biology*, 248, 835–844.
- Ivanenkov, V. V., Felici, F., & Menon, A. G. (1999). Targeted delivery of multivalent phage display vectors into mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1448(3), 463–472. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(98\)00163-3](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(98)00163-3)
- Jackson, S. A., & DeLuca, N. A. (2003). Relationship of Herpes simplex virus genome configuration to productive and persistent infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 7871–7876. <https://doi.org/10.1073/pnas.1230643100>
- Jacobson, A. (1972). Role of F Pili in the Penetration of Bacteriophage f1. *Journal of Virology*, 10(4), 835–843.
- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jiang, W., & Marraffini, L. A. (2015). CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 209–228. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104441>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

- Kalamvoki, M., & Roizman, B. (2014). HSV-1 degrades, stabilizes, requires, or is stung by STING depending on ICP0, the US3 protein kinase, and cell derivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(5), E611–E617. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323414111>
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., & Smith, A. E. (1984). A Short Amino Acid Sequence Able to Specify Nuclear Location. *Cell*, *39*, 499–509.
- Karasneh, G. A., & Shukla, D. (2011). Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: Clues to its success. *Virology Journal*, *8*(481), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-481>
- Karpov, D. S., Karpov, V. L., Klimova, R. R., Demidova, N. A., & Kushch, A. A. (2019). A Plasmid-Expressed CRISPR/ Cas9 System Suppresses Replication of HSV Type I in a Vero Cell Culture. *53*(1), 70–78. <https://doi.org/10.1134/S0026893319010059>
- Kassner, P. D., Burg, M. A., Baird, A., & Larocca, D. (1999). Genetic selection of phage engineered for receptor-mediated gene transfer to mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *264*(3), 921–928. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1603>
- Kelly, B. J., Fraefel, C., Cunningham, A. L., & Diefenbach, R. J. (2009). Functional roles of the tegument proteins of Herpes simplex virus type 1. *Virus Research*, *145*(2), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.07.007>
- Kia, A., Przystal, J. M., Nianiaris, N., Mazarakis, N. D., Mintz, P. J., & Hajitou, A. (2012). Dual Systemic Tumor Targeting with Ligand-Directed Phage and Grp78 Promoter Induces Tumor Regression. *Molecular Cancer Therapeutics*, *11*(12), 2566–2577. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5888>
- Kim, A., Shin, T.-H., Shin, S.-M., Pham, C. D., Choi, D.-K., Kwon, M.-H., & Kim,

- Y.-S. (2012). Cellular Internalization Mechanism and Intracellular Trafficking of Filamentous M13 Phages Displaying a Cell-Penetrating Transbody and TAT Peptide. *PLoS ONE*, 7(12), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051813>
- Kingston, R. E., Chen, C. A., & Rose, J. K. (1996). Calcium Phosphate Transfection. *Current Protocols in Molecular Biology*, 63(1), 9.1.1-9.1.11. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0901s63>
- Klinedinst, D. K., & Challberg, M. D. (1994). Helicase-primase complex of Herpes simplex virus type 1: a mutation in the UL52 subunit abolishes primase activity. *Journal of Virology*, 68(6), 3693–3701. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.6.3693-3701.1994>
- Kodaka, Y., Asakura, Y., & Asakura, A. (2018). Spin infection for efficient gene delivery in muscle stem cells for intramuscular cell transplantation. *Biotechniques*, 63(2), 72–76. <https://doi.org/10.2144/000114576.Spin>
- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-sato, E., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009). Six Classes of Nuclear Localization Signals Specific to Different Binding Grooves of Importin. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 478–485. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807017200>
- Krag, D. N., Shukla, G. S., Shen, G., Pero, S., Ashikaga, T., Fuller, S., Weaver, D. L., Burdette-radoux, S., & Thomas, C. (2006). Selection of Tumor-binding Ligands in Cancer Patients with Phage Display Libraries. *Cancer Research*, 66(15), 7724–8925. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4441>
- Kramer, S. M., Ford, K. M., & York, M. K. (1988). Comparison of HSV-1 and HSV-2 Isolation in Vero , Primary Rabbit Kidney, and MRC-5 Cells. *Laboratory Medicine*, 19(1), 30–31.
- La Boissière, S., Hughes, T., & O'Hare, P. (1999). HCF-dependent nuclear import of

- VP16. *EMBO Journal*, 18(2), 480–489. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.2.480>
- Larocca, D., Kassner, P. D., Witte, A., Ladner, R. C., Pierce, G. F., & Baird, A. (1999). Gene transfer to mammalian cells using genetically targeted filamentous bacteriophage. *The FASEB Journal*, 13, 727–734.
- Larocca, D., Witte, A., Johnson, W., Pierce, G. F., Baird, A., & Al, L. E. T. (1998). Targeting Bacteriophage to Mammalian Cell Surface Receptors for Gene Delivery. *Human Gene Therapy*, 9, 2393–2399.
- Ledford, H., & Callaway, E. (2020). Pioneers of revolutionary CRISPR gene editing win chemistry Nobel. In *Nature* (Vol. 586, Issue 7829, pp. 346–347). <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02765-9>
- Lehti, T. A., Pajunen, M. I., Skog, M. S., & Finne, J. (2017). Internalization of a polysialic acid-binding Escherichia coli bacteriophage into eukaryotic neuroblastoma cells. *Nature Communications*, 8(1915), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02057-3>
- Li, Z., Bi, Y., Xiao, H., Sun, L., Ren, Y., Li, Y., Chen, C., & Cun, W. (2018). CRISPR-Cas9 System-driven Site-specific Selection Pressure on Herpes Simplex Virus Genomes. *Virus Research*, 244, 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.03.010>
- Lin, C., Li, H., Hao, M., Xiong, D., Luo, Y., Huang, C., Yuan, Q., Zhang, J., & Xia, N. (2016). Increasing the Efficiency of CRISPR/Cas9-mediated Precise Genome Editing of HSV-1 Virus in Human Cells. *Scientific Reports*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep34531>
- Lin, S., Staahl, B. T., Alla, R. K., & Doudna, J. A. (2014). Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR / Cas9 delivery. *ELife*, 3(e04766), 1–13. <https://doi.org/10.7554/eLife.04766>

- Liu, J. K., Teng, Q., Garrity-moses, M., Federici, T., Tanase, D., Imperiale, M. J., & Boulis, N. M. (2005). A novel peptide defined through phage display for therapeutic protein and vector neuronal targeting. *Neurobiology of Disease*, *19*, 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.01.022>
- Liu, J. K., Teng, Q., Tanase, D., Moses, M., Krishnaney, A., & Boulis, N. M. . (2004). Neuronal Membrane Specific Binding Peptides Isolated Via Phage Display Biopanning Against Trisialogangliosides. *The American Society of Gene Therapy*, *9*(1), 167–168. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.06.417>
- Looker, Katharine J., Magaret, A. S., May, M., & Turner, K. (2015). Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS ONE*, *10*(e0140765), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140765>
- Looker, Katherine J., Margaret, A. S., Turner, K. M. E., Vickerman, P., Gottlieb, S. L., & Newman, L. M. (2015). Global Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 2 Infections in 2012. *PLoS ONE*, *10*(e114989), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140765>
- Ludtke, J J, Zhang, G., Sebestyen, M. G., & Wolff, J. A. (1999). A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA. *Journal of Cell Science*, *112*, 2033–2041. <https://doi.org/10.1177/089124397011003003>
- Ludtke, James J, Sebestyén, M. G., & Wolff, J. A. (2002). The Effect of Cell Division on the Cellular Dynamics of Microinjected DNA and Dextran. *Molecular Therapy*, *5*(5), 579–588. <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0581>
- Lundstrom, K. (2003). Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends in Biotechnology*, *21*(3), 117–122. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)00042-2)

- Macdonald, S. J., Mostafa, H. H., Morrison, L. A., & Davido, D. J. (2012). Genome Sequence of Herpes simplex Virus 1 Strain KOS. *Journal of Virology*, *86*(11), 6371–6372. <https://doi.org/10.1128/jvi.00646-12>
- Mangold, C. A., & Szpara, M. L. (2019). Persistent Infection with Herpes Simplex Virus 1 and Alzheimer's Disease- A Call to Study How Variability in Both Virus and Host may Impact Disease. In *Viruses* (Vol. 11, Issue 10, pp. 1–22). <https://doi.org/10.3390/v11100966>
- Martin, D. W., Deb, S. P., Klauer, J. S., & Deb, S. (1991). Analysis of the Herpes simplex virus type 1 OriS sequence: mapping of functional domains. *Journal of Virology*, *65*(8), 4359–4369. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.8.4359-4369.1991>
- McGeoch, D. J., Rixon, F. J., & Davison, A. J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research*, *117*(1), 90–104. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.002>
- McGeoch, Dalrymple, M., Davison, A., Dolan, A., Frame, M., McNab, D., Perry, L., Scott, J., & Taylor, P. (1988). The complete DNA sequence of the Long Unique Region in the Genome of Herpes simplex virus type 1. *Journal of General Virology*, *69*(7), 1531–1574. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-7-1531>
- Mcginn, J., & Marraffini, L. A. (2019). Molecular mechanisms of CRISPR-Cas spacer acquisition. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(1), 7–12. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0071-7>
- Méndez-Scolari, J. E., Florentín-Pavía, M. M., Mujica, M. P., Rojas, N., & Sotelo, P. H. (2019). A qPCR Targeted Against the Viral Replication Origin Designed to Quantify Total Amount of Filamentous Phages and Phagemids. *Indian Journal of Microbiology*, *59*(3), 365–369. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00798-x>
- Messing, J. (2016). Phage M13 for the treatment of Alzheimer and Parkinson disease.

In *Gene*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.02.005>

- Midoux, P., Kichler, A., Maurizot, J., & Monsigny, M. (1998). Membrane Permeabilization and Efficient Gene Transfer by a Peptide Containing Several Histidines. *Bioconjugate Chemistry*, 9(2), 260–267.
- Miller, W. H., & Miller, R. L. (1980). Phosphorylation of Acyclovir (Acycloguanosine) Monophosphate by GMP Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(15), 7204–7207.
- Moghimian, P., Srot, V., Pichon, B. P., Facey, S. J., & Aken, P. A. Van. (2016). Stability of M13 Phage in Organic Solvents. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 7, 72–77. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2016.72009>
- Moiani A, Paleari, Y, et al. (2012). Lentiviral vector integration in the human genome induces alterantive splicing and generates aberrant transcripts. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(5), 1653–1666. <https://doi.org/10.1172/JCI61852DS1>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 36(1), 244–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
- Montgomery, R. I., Warner, M. S., Lum, B. J., & Spear, P. G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell*, 87(3), 427–436. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81363-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81363-X)
- Moon, J., Choi, E. J., Jeong, N., Sohn, J., Han, D., & Oh, J.-W. (2019). Research

- Progress of M13. Bacteriophage-Based Biosensors. *Nanomaterials*, 9(1448), 1–18.
- Nambiar, T. S., Billon, P., Diedenhofen, G., Hayward, S. B., Taglialatela, A., Cai, K., Huang, J., Leuzzi, G., Cuella-martin, R., Palacios, A., Gupta, A., Egli, D., & Ciccia, A. (2019). Stimulation of CRISPR-mediated homology-directed repair by an engineered RAD18 variant. *Nature Communications*, 10(3395), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11105-z>
- Nemudraya, A. A., Richter, V. A., & Kuligina, E. V. (2016). Phage Peptide Libraries As a Source of Targeted Ligands. *Acta Naturae*, 8(28), 48–57.
- Newcomb, W. W., Juhas, R. M., Thomsen, D. R., Homa, F. L., Burch, A. D., Weller, S. K., & Brown, J. C. (2001). The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the Herpes simplex virus capsid. *Journal of Virology*, 75(22), 10923–10932. [https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.10923–10932.2001](https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.10923-10932.2001)
- Newcomb, W. W., Thomsen, D. R., Homa, F. L., Brown, J. C., Newcomb, W. W., Thomsen, D. R., Homa, F. L., & Brown, J. C. (2003). Assembly of the Herpes Simplex Virus Capsid : Identification of Soluble Scaffold-Portal Complexes and Their Role in Formation of Portal-Containing Capsids Assembly of the Herpes Simplex Virus Capsid : Identification of Soluble Scaffold-Portal Complexes an. *Journal of Virology*, 77(18), 9862–9871. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.18.9862>
- Nguyen, S., Baker, K., Padman, B. S., Patwa, R., Dunstan, R. A., Weston, T. A., Schlosser, K., Bailey, B., Lithgow, T., Lazarou, M., Luque, A., Rohwer, F., Blumberg, R. S., & Barr, J. J. (2017). Bacteriophage Transcytosis Provides a Mechanism To Cross Epithelial Cell Layers. *MBio*, 8(6), 1–15.
- Nicholson, P., Addison, C., Cross, A. M., Kennard, J., Preston, V. G., & Rixon, F. J. (1994). Localization of the herpes simplex virus type 1 major capsid protein VP5

to the cell nucleus requires the abundant scaffolding protein VP22a. *Journal of General Virology*, 75(5), 1091–1099. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-5-1091>

Nicoll, M. P., Proença, J. T., & Efstathiou, S. (2012). The molecular basis of Herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3), 684–705. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00320.x>

O'Donnell, M. E., Elias, P., Funnell, B. E., & Lehman, I. R. (1987). Interaction between the DNA polymerase and single-stranded DNA-binding protein (infected cell protein 8) of Herpes simplex virus 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(9), 4260–4266.

O'Hare, P. (1993). The virion transactivator of Herpes simplex virus. *Seminars in Virology*, 4, 145–155.

Oh, H. S., Neuhausser, W. M., Eggan, P., Angelova, M., Kirchner, R., Eggan, K. C., & Knipe, D. M. (2019). Herpesviral lytic gene functions render the viral genome susceptible to novel editing by CRISPR/Cas9. *ELife*, 8(e51662.), 1–30.

Owen, D. J., Crump, C. M., & Graham, S. C. (2015). Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. *Viruses*, 7(9), 5084–5114. <https://doi.org/10.3390/v7092861>

Pasdeloup, D., Blondel, D., Isidro, A. L., & Rixon, F. J. (2009). Herpesvirus Capsid Association with the Nuclear Pore Complex and Viral DNA Release Involve the Nucleoporin CAN/Nup214 and the Capsid Protein pUL25. *Journal of Virology*, 83(13), 6610–6623. <https://doi.org/10.1128/jvi.02655-08>

Pasqualini, R., & Ruoslahti, E. (1996). Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature*, 380, 364–366.

Plank, C., Oberhauser, B., Mechtler, K., Koch, C., & Wagner, E. (1994). The Influence

- of Endosome-disruptive Peptides on Gene Transfer Using Synthetic Virus-like Gene Transfer Systems. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(17), 12918–12924. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99963-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99963-1)
- Poliquin, L., Levine, G., & Shore, G. C. (1985). Involvement of the Golgi Apparatus and a Restructured Nuclear envelope during biogenesis and transport of Herpes simplex virus glycoproteins. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33(9), 875–883.
- Poul, M. A., & Marks, J. D. (1999). Targeted gene delivery to mammalian cells by filamentous bacteriophage. *Journal of Molecular Biology*, 288(2), 203–211. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2678>
- Przystal, Justyna M., Umukoro, E., Stoneham, C. A., Yata, T., O'Neill, K., Syed, N., & Hajitou, A. (2013). Proteasome inhibition in cancer is associated with enhanced tumor targeting by the adeno-associated virus/phage. *Molecular Oncology*, 7(1), 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.08.001>
- Przystal, Justyna Magdalena, Waramit, S., Pranjol, M. Z. I., Yan, W., Chu, G., Chongchai, A., Samarth, G., Olaciregui, N. G., Tabatabai, G., Carcaboso, A. M., Aboagye, E. O., Suwan, K., & Hajitou, A. (2019). Efficacy of systemic temozolomide-activated phage-targeted gene therapy in human glioblastoma. *EMBO Molecular Medicine*, 1–21. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708492>
- Quinn, J. P., & McGeoch, D. J. (1985). DNA sequence of the Region in the genome of Herpes simplex virus type 1 containing the genes for DNA polymerase and the major DNA binding protein. *Nucleic Acids Research*, 13(22), 8143–8163.
- Rader, C., Cheresch, D. A., & Barbas, C. F. (1998). A phage display approach for rapid antibody humanization : Designed combinatorial V gene libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 8910–8915.

- Rakonjac, J., Bennett, N. J., Spagnuolo, J., Gagic, D., & Russel, M. (2011). Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications. In *Current Issues in Molecular Biology* (Vol. 13, Issue 2, pp. 51–76). <https://doi.org/10.21775/cimb.013.051>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Rangel, R., Dobroff, A. S., Guzman-Rojas, L., Salmeron, C., Gelovani, J. G., Sidman, R. L., Pasqualini, R., & Arap, W. (2013). Targeting mammalian organelles with internalizing phage (iPhage) libraries. *Nature Protocols*, 8(10), 1916–1939. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.119.Targeting>
- Rangel, R., Guzman-rojas, L., Roux, L. G., Staquicini, F. I., Hosoya, H., Barbu, E. M., Ozawa, M. G., Nie, J., Jr, K. D., Langley, R. R., Sage, E. H., Koivunen, E., Gelovani, J. G., Lobb, R. R., Sidman, R. L., Pasqualini, R., & Arap, W. (2012). Combinatorial targeting and discovery of ligand- receptors in organelles of mammalian cells. *Nature Communications*, 3(788), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms1773>
- Ranjibar, F., Habibi-Anbouhi, M., Kazemi-Lomedasht, F., Aghae-Bakhtiyari, S. H., Alirahimi, E., & Behdani, M. (2018). Cell-specific targeting by engineered M13 bacteriophage expressing VEGFR2 nanobody. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(9), 884–888. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2018.26191.6432>
- Redrejo-Rodríguez, M., Muñoz-Espín, D., Holguera, I., Mencía, M., & Salas, M. (2012). Functional eukaryotic nuclear localization signals are widespread in terminal proteins of bacteriophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(45), 18482–18487. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216635109/->

/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1216635109

- Retamal-Díaz, A. R., Suazo, P. A., Garrido, I., Kalergis, A. M., & González, P. A. (2015). Evasión de la respuesta inmune por virus Herpes simplex. *Revista Chilena de Infectología*, 32(1), 58–70.
- Richart, S. M., Simpson, S. A., Krummenacher, C., Whitbeck, J. C., Pizer, L. I., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., & Wilcox, C. L. (2003). Entry of Herpes simplex Virus Type 1 into Primary Sensory Neurons In Vitro Is Mediated by Nectin-1/HveC. *Journal of Virology*, 77(5), 3307–3311. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.5.3307-3311.2003>
- Roehm, P. C., Shekarabi, M., Wollebo, H. S., Bellizzi, A., He, L., Salkind, J., & Khalili, K. (2016). Inhibition of HSV-1 Replication by Gene Editing Strategy. *Scientific Reports*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep23146>
- Roehnisch, T., Then, C., Nagel, W., Blumenthal, C., Braciak, T., Donzeau, M., Böhm, T., Flaig, M., Bourquin, C., & Oduncu, F. S. (2014). Phage idio type vaccination : first phase I / II clinical trial in patients with multiple myeloma. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-119>
- Ronzitti, G., Gross, D. A., & Mingozzi, F. (2020). Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11, Issue April, pp. 1–13). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00670>
- Russel, M., & Model, P. (1989). Genetic analysis of the filamentous bacteriophage packaging signal and of the proteins that interact with It. *Journal of Virology*, 63(8), 3284–3295.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2746731>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC250900>
- Sampath, P., & DeLuca, N. A. (2008). Binding of ICP4, TATA-Binding Protein, and

RNA Polymerase II to Herpes simplex Virus Type 1 Immediate-Early, Early, and Late Promoters in Virus-Infected Cells. *Journal of Virology*, 82(5), 2339–2349. <https://doi.org/10.1128/jvi.02459-07>

Schlimgen, R., Howard, J., Wooley, D., Thompson, M., Baden, L. R., Yang, O. O., Christiani, D. C., Mostoslavsky, G., Diamond, D. V., Duane, E. G., Byers, K., Winters, T., Gelfand, J. A., Fujimoto, G., Hudson, T. W., & Vyas, J. M. (2016). Risks associated with lentiviral vector exposures and prevention strategies. In *Journal of Occupational and Environmental Medicine* (Vol. 58, Issue 12, pp. 1159–1166). <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000000879>

Scott, J. K., & Smith, G. P. (1990). Searching for Peptide Ligands Epitope Library with an Epitope Library. *Science*, 249, 386–390.

Semenova, E., Jore, M. M., Datsenko, K. A., Semenova, A., Westra, E. R., Wanner, B., Oost, J. van der, Bronus, S. J. J., & Severinov, K. (2011). Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(25), 10098–10103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104144108>

Sen, J., Xueqiao, L., Roller, R., & Knipe, D. (2013). Herpes simplex virus US 3 tegument protein inhibits Toll-like receptor 2 signaling at or before TRAF6 ubiquitination. *Virology*, 439(2), 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted>

Sheaffer, A. M. Y. K., Newcomb, W. W., Gao, M. I. N., Yu, D., Weller, S. K., Brown, J. A. Y. C., & Tenney, D. J. (2001). Herpes Simplex Virus DNA Cleavage and Packaging Proteins Associate with the Procapsid prior to Its Maturation. *Journal of Virology*, 75(2), 687–698. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.2.687>

Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H.,

- Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D., & Spear, P. G. (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in Herpes simplex virus 1 entry. *Cell*, *99*(1), 13–22. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80058-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80058-6)
- Smith, G. P. (1985). Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors that Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science*, *228*(4705), 1315–1317.
- Smith, S., Reuven, N., Mohni, K. N., Schumacher, A. J., & Weller, S. K. (2014). Structure of the Herpes Simplex Virus 1 Genome: Manipulation of Nicks and Gaps Can Abrogate Infectivity and Alter the Cellular DNA Damage Response. *Journal of Virology*, *88*(17), 10146–10156. <https://doi.org/10.1128/JVI.01723-14>
- Sodeik, B., Ebersold, M. W., & Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming Herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *Journal of Cell Biology*, *136*(5), 1007–1021. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.5.1007>
- Sondergaard, J. N., Geng, K., Sommerauer, C., Atanasoai, I., Yin, X., & Kutter, C. (2020). Successful delivery of large-size CRISPR/Cas9 vectors in hard-to-transfect human cells using small plasmids. *Communications Biology*, *3*(319), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1045-7>
- Spencer, C. A., Dahmus, M. E., & Rice, S. A. (1997). Repression of host RNA polymerase II transcription by herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology*, *71*(3), 2031–2040. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.3.2031-2040.1997>
- Staquicini, F. I., Smith, T. L., Tang, F. H. F., Gelovani, J. G., Giordano, R. J., Libutti, S. K., Sidman, R. L., Cavenee, W. K., Arap, W., & Pasqualini, R. (2019). Targeted AAVP-based therapy in a mouse model of human glioblastoma: a comparison of cytotoxic versus suicide gene delivery strategies. *Cancer Gene Therapy*. <https://doi.org/10.1038/s41417-019-0101-2>
- Stoneham, C. A., Hollinshead, M., & Hajitou, A. (2012). Clathrin-mediated

Endocytosis and Subsequent Endo-Lysosomal Trafficking of Adeno-associated Virus/Phage. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(43), 35849–35859. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.369389>

Strang, B. L., & Stow, N. D. (2005). Circularization of the Herpes simplex Virus Type 1 Genome upon Lytic Infection. *Journal of Virology*, 79(19), 12487–12494. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.19.12487-12494.2005>

Suwan, K., Yata, T., Waramit, S., Przystal, J. M., Stoneham, C. A., Bentayebi, K., Asavarut, P., Chongchai, A., Pothachareon, P., Lee, K. Y., Topanurak, S., Smith, T. L., Gelovani, J. G., Sidman, R. L., Pasqualini, R., Arap, W., & Hajitou, A. (2019). Next-generation of targeted AAVP vectors for systemic transgene delivery against cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(37), 18571–18577. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906653116>

Tian, Y., Wu, M., Liu, X., Liu, Z., Zhou, Q., Niu, Z., & Huang, Y. (2014). Probing the Endocytic Pathways of the Filamentous Bacteriophage in Live Cells Using Ratiometric pH Fluorescent Indicator. *Advanced Healthcare Materials*, 4(3), 1–7. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400508>

Trepel, M., Stoneham, C. A., Eleftherohorinou, H., Nicholas, D., Pasqualini, R., Arap, W., & Hajitou, A. (2009). A Heterotypic Bystander Effect for Tumor Cell Killing after AAVP-mediated Vascular-targeted Suicide Gene Transfer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(8), 2383–2391. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0110.A>

Trus, B. L., Booy, F. P., Newcomb, W. W., Brown, J. C., Homa, F. L., Thomsen, D. R., & Steven, A. C. (1996). The herpes simplex virus procapsid: Structure, conformational changes upon maturation, and roles of the triplex proteins VP19c

- and VP23 in assembly. *Journal of Molecular Biology*, 263(3), 447–462.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(96\)80018-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(96)80018-0)
- Trybala, E., Tufaro, F., Bergstro, T., & Ma, K. (2017). Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C is necessary for efficient infection of chondroitin sulfate-expressing gro2C cells. *Journal of General Virology*, 2002, 291–300.
- Turcotte, S., Letellier, J., & Lippe, R. (2005). Herpes Simplex Virus Type 1 Capsids Transit by the trans-Golgi Network, Where Viral Glycoproteins Accumulate Independently of Capsid Egress. *Journal of Virology*, 79(14), 8847–8860.
<https://doi.org/10.1128/jvi.79.14.8847-8860.2005>
- van Diemen, F. R., Kruse, E. M., Hooykaas, M. J. G., Bruggeling, C. E., Schürch, A. C., van Ham, P. M., Imhof, S. M., Nijhuis, M., Wiertz, E. J. H. J., & Lebbink, R. J. (2016). CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of Herpesviruses Limits Productive and Latent Infections. *PLoS Pathogens*, 12(6), 1–29.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005701>
- Vieira, G. V., Cecílio, N. T., Arruda, L. M., & Sales, K. U. (2016). *Visão geral do mecanismo básico de ação. En: Campos Pereira T, editor. Introdução à técnica de CRISPR.*
- Volcy, K., & Dewhurst, S. (2009). Proteasome Inhibitors Enhance Bacteriophage Lambda Mediated Gene Transfer in Mammalian Cells. *Virology*, 71(11), 77–87.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.019>. Proteasome
- Warner, M. S., Geraghty, R. J., Martinez, W. M., Montgomery, R. I., Whitbeck, J. C., Xu, R., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., & Spear, P. G. (1998). A cell surface protein with Herpesvirus entry activity (Hveb) confers susceptibility to infection by mutants of Herpes simplex virus type 1, Herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology*, 246(1), 179–189.

<https://doi.org/10.1006/viro.1998.9218>

- Weller, S. K., & Coen, D. M. (2012). Herpes Simplex viruses: Mechanisms of DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013011>
- Wezenbeek, P. M. G. F. van, Hulsebos, T. J. M., & Schoenmakers, J. G. G. (1980). Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd. *Gene*, 11(1–2), 129–148. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(80\)90093-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(80)90093-1)
- White, C. A., Stow, N. D., Patel, A. H., Hughes, M., & Preston, V. G. (2003). Herpes Simplex Virus Type 1 Portal Protein UL6 Interacts with the Putative Terminase Subunits UL15 and UL28. *Journal of Virology*, 77(11), 6351–6358. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.11.6351-6358.2003>
- Wu, X., & Reddy, D. S. (2012). Integrins as Receptor Targets for Neurological Disorders. *Pharmacol Ther*, 134(1), 68–81. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.12.008>. Integrins
- Wu, Z., Yang, H., & Colosi, P. (2010). Effect of genome size on AAV vector packaging. *Molecular Therapy*, 18(1), 80–86. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.255>
- Wyler, E., Franke, V., Menegatti, J., Kocks, C., Boltengagen, A., Praktijnjo, S., Walch-rückheim, B., Bosse, J., Rajewsky, N., Grässer, F., Akalin, A., & Landthaler, M. (2019). Single-cell RNA-sequencing of herpes simplex virus 1-infected cells connects NRF2 activation to an antiviral program. *Nature Communications*, 10(4878), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12894-z>
- Xu, X., Fan, S., Zhou, J., Zhang, Y., Che, Y., Cai, H., Wang, L., Guo, L., Liu, L., & Li, Q. (2016). The mutated tegument protein UL7 attenuates the virulence of

- herpes simplex virus 1 by reducing the modulation of α -4 gene transcription. *Virology Journal*, *13*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0600-9>
- Yang, L., Yang, Q., Wang, M., Jia, R., Chen, S., Zhu, D., Liu, M., Wu, Y., Zhao, X., Zhang, S., Liu, Y., Yu, Y., Zhang, L., Chen, X., & Cheng, A. (2019). Terminase Large Subunit Provides a New Drug Target for Herpesvirus Treatment. In *Viruses* (Vol. 11, Issue 3, pp. 1–18). <https://doi.org/10.3390/v11030219>
- Yata, T., Nianiaris, N., Songsivilai, S., & Hajitou, A. (2014). Bacteriophage: From Bacteria to a Successful Targeted Systemic Gene Delivery for Cancer. *Gene Therapy of Cancer*, 479–490. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394295-1.00033-0>
- Yero, D., Pajón, R., Niebla, O., Sardiñas, G., Vivar, I., Perera, Y., García, D., Delgado, M., & Cobas, K. (2006). Bicistronic expression plasmid for the rapid production of recombinant fused proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *44*, 27–34. <https://doi.org/10.1042/BA20050170>
- Yoo, S. Y., Merzlyak, A., & Lee, S. (2014). Synthetic Phage for Tissue Regeneration. *Mediators of Inflammation*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/192790>
- Zheng, C., & Su, C. (2017). Herpes simplex virus 1 infection dampens the immediate early antiviral innate immunity signaling from peroxisomes by tegument protein VP16. *Virology Journal*, *14*(35), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0709-5>
- Zhou, J. Y., Suwan, K., & Hajitou, A. (2020). *Initial Steps for the Development of a Phage-Mediated Gene Replacement Therapy Using CRISPR-Cas9 Technology*. 53.

<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>.

<https://biorender.com/>

