



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Mejoramiento de baculovirus como agentes de control biológico mediante la incorporación de proteínas heterólogas en los cuerpos de oclusión y como vectores en salud

Tesista: Ma. Laura Fabre

Director: Víctor Romanowski

Año: 2020

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (Área Ciencias Biológicas) ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM, UNLP-CONICET), del Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Prof. Dr. Víctor Romanowski.

Índice

Abreviaturas	5
Resumen	7
Introducción	13
Biología de los Baculovirus	13
Ciclo infectivo	16
Nucleocápside	19
Virion brotante	20
Cuerpos de oclusión	23
Componentes de los cuerpos de oclusión	25
Regulación temporal de la expresión génica	26
Genes tempranos	27
Replicación	28
Genes tardíos y muy tardíos	30
Manejo integrado de plagas	31
Lepidópteros plagas de interés agronómico	34
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	34
<i>Autographa californica</i>	34
<i>Spodoptera frugiperda</i>	35
Baculovirus recombinantes para la expresión de proteínas heterólogas	35
Vectores virales para la inmunización y terapia génica	36
Bibliografía	39
Objetivos	53
Capítulo 2. Estudio bioinformático de la proteína de envoltura del poliedro, PEP	55
Introducción	57
Objetivos específicos	63
Materiales y métodos	65
Análisis bioinformático	65
Alineamiento múltiple	65
Análisis filogenético	65
Caracterización de los motivos proteicos	66
Análisis de la estructura secundaria	66
Predicción de regiones <i>coiled-coil</i>	67
Predicción de desorden	67
Modelado de la estructura terciaria	68
Resultados	69
Alineamiento múltiple	69
Análisis filogenético	71
Análisis de la estructura secundaria	75
Determinación de los dominios proteicos	77
Dominio Baculo_PEP_N	77
Predicción de desorden	80

Dominio Baculo_PEP_C	82
Modelado de la estructura terciaria (I-TASSER)	85
Discusión	89
Bibliografía	93
Material suplementario	99
Capítulo 3. Generación y caracterización de un sistema de empaquetamiento de OB en células de insecto	103
Introducción	105
Objetivos específicos	109
Materiales y Métodos	111
Células y virus	111
Construcción de los vectores de expresión	111
Generación de líneas celulares de insecto transgénicas que expresan GFP y GFP::PEPAg	112
Purificación de cuerpos de oclusión	113
Análisis de microscopía confocal y SEM	113
SDS-PAGE y Western blot	114
Espectroscopía de masas	115
Análisis de los datos de espectroscopía de masas	116
Resultados	117
Construcción de vectores de expresión	117
Desarrollo de líneas celulares de insecto monoclonales	119
Direccionamiento de GFP::PEPAg en los OB de AgMNPV y AcMNPV	120
Caracterización de GFP::PEPAg en los OB de AgMNPV y AcMNPV	122
Análisis de los cuerpos de oclusión empaquetados por diferentes microscopias	124
Caracterización de los OB por espectrometría de masas	125
Caracterización de la localización subcelular de GFP::PEPAg	127
Discusión	131
Bibliografía	135
Material suplementario	139
Capítulo 4. Estrategias para el mejoramiento de los baculovirus como agentes bioinsecticidas	143
Introducción	145
Objetivos específicos	151
Materiales y métodos	153
Células y virus	153
Biblioteca de oligoDNA como sistema como modulador huésped- patógeno	153
Purificación de DNA viral a pequeña escala	154
Clonado de genes insecticidas candidatos en el vector pGEM-T Easy	154
Construcción de vectores de transferencia para la generación de baculovirus recombinantes	155
Generación de vectores de expresión para la generación de líneas celulares de insecto transgénicas	157

Obtención de los baculovirus recombinantes: Ac-PEPAcHtoxGNAIRESdT y Ac-ENHGP37PEPAg	157
Evaluación de la actividad biológica de los poliedros recombinantes en larvas susceptibles a AcMNPV.	158
Resultados	159
Biblioteca de oligoDNA como estrategia bioinsecticida	159
Biblioteca de vectores de clonado con genes insecticidas candidatos	161
Generación de vectores de transferencia para la producción de baculovirus recombinantes	164
Obtención de los baculovirus recombinantes: Ac-PEPAcHtoxGNAIRESdT y Ac-ENHGP37PEPAg	166
Generación de los vectores de expresión pIB-ENHGP37PEPAg, pIB-ENHPEPAg y pIB-GP37PEPAg	169
Evaluación de la actividad biológica de los poliedros recombinantes en larvas susceptibles a AcMNPV	171
Discusión	173
Bibliografía	177
Capítulo 5. Desarrollo de plataformas para la aplicación de los baculovirus	
en la salud	183
Introducción	185
Objetivos específicos	191
Materiales y métodos	193
Clonado del gen G del virus de la estomatitis vesicular	193
Clonado de la construcción sintética de los shRNA	193
Generación de las líneas celulares transgénicas	194
Evaluación de la expresión e incorporación de la proteína VSV G	195
Ensayos de transducción en células de mamífero	196
Evaluación de la expresión de los shRNA en ensayos de expresión transitoria	196
Evaluación de la expresión de los shRNA en ensayos de expresión constitutiva	197
Resultados	198
Generación de la línea celular monoclonal de insecto Hi5-vsvG	198
Caracterización de la línea monoclonal Hi5-vsvG	200
Eficiencia de transducción en células de mamífero	201
Generación de la línea celular monoclonal de insecto Hi5-shGP64	202
Ensayos de funcionalidad de la construcción silenciadora shGP64	204
Discusión	207
Bibliografía	211
Conclusiones	217
Perspectivas	220
Anexo	223
Materiales y Métodos	223
A.1. Materiales	223

A.1.1. Productos químicos y enzimáticos	223
A.1.2. Soluciones	223
A.1.2.1 Soluciones para la extracción de plásmidos	223
A.1.2.2. Soluciones de antibióticos	224
A.1.2.3. Soluciones para la resolución de ácidos nucleicos mediante electroforesis	224
A.1.2.4. Soluciones para el análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS	224
A.1.2.5. Soluciones utilizadas en reacciones enzimáticas:	224
A.1.3. Cepas bacterianas	224
A.1.4. Medios	225
A.1.4.1. Medios para cultivo de bacterias	225
A.1.4.2. Antibióticos para cultivo de bacterias	225
A.1.4.3. Medios para cultivo de células de insectos	225
A.1.4.4. Antifúngicos y Antibióticos para cultivo de células	225
A.2. Métodos	225
A.2.1. Técnicas que involucran DNA	225
A.2.1.2. Preparación de DNA plasmídico	225
A.2.1.3. Extracción fenólica	226
A.2.1.4. Precipitación de ácidos nucleicos	226
A.2.1.5. Electroforesis en geles de agarosa	226
A.2.1.6. Purificación de fragmentos de DNA por adsorción a polvo de sílice	226
A.2.2. Métodos de transformación y screening	227
A.2.2.1. Preparación de bacterias <i>E. coli</i> electrocompetentes	227
A.2.2.2. Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación	227
A.2.2.3. <i>Colony PCR</i>	227
A.2.2.4. Reacciones de amplificación por PCR	228
A.2.3. Métodos que involucran cultivo celular.	228
A.2.3.1. Mantenimiento de células	228
A.2.3.2. Congelamiento	228
A.2.3.3. Transfecciones	228
A.2.3.4. Generación de líneas celulares transgénicas.	229
A.2.3.5. Métodos que involucran manipulación de baculovirus en cultivo celular	229
A.2.4. Métodos que involucran proteínas.	229
A.2.4.1. Reducción, alquilación y precipitación con TCA de muestras en solución (Servicio del CEQUIBIEM).	229
A.2.5. Análisis estadístico	229
A.3. Lista de primers utilizados	230
A.4. Bibliografía	232
Material Suplementario (vectores plasmídicos)	233

Abreviaturas

°C: grados centígrados (Celsius)
aa: aminoácido/s AcMNPV: *Autographa californica* multiple nucleopoliedrovirus
BV: viriones brotantes o brotados (del inglés *budded virus*)
ddH₂O: agua bidestilada
DNA: ácido desoxirribonucleico (ADN)
BEVS: sistema de expresión por baculovirus
BmMNPV: *Bombyx mori* MNPV (ver abajo)
BV: virion brotante
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
d p.i.: días post infección
emPAI: índice de abundancia proteica exponencialmente modificado (del inglés, exponentially modified Protein Abundance Index)
ESI: ionización por electrospray (del inglés, electrospray ionization)
d p.t.: días post transfección
GFP: del inglés *green fluorescent protein*, proteína verde fluorescente
GV: granulovirus
h: horas
Hi5: células de insecto High Five™
h p.i.: horas post infección
h p.t.: horas post transfección
IRES: Sitio Interno de Entrada al Ribosoma, (del inglés, *Internal Ribosome Entry Site*)
kDa: kilodaltons
kpb: kilopares de bases
min: minuto
mL: mililitro
MNPV: Multicapsid Nuclear Polyhedrosis Virus (virus de la poliderovirus nuclear con múltiples cápsides por virión)
MOI: multiplicidad de infección (multiplicity of infection)
MOT: multiplicidad de transducción (multiplicity of transfection)
NC: nucleocápside
nm: nanómetros
NPV: nucleopoliedrovirus
OB: cuerpo de oclusión (del inglés *occlusion body*)
ODV: viriones derivados de oclusión (del inglés *occlusion-derived virus*)
ON: toda la noche (del inglés *overnight*) usado para tiempos de 12-16 hs
ORF: marco abierto de lectura, (del inglés *open reading frame*)
pb: pares de bases
PBS: buffer fosfato salino (del inglés *phosphate buffer saline*)
PBST: PBS con Tween 0,1% (v/v)
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*)
PEP: proteína de envoltura del poliedro
POLH: poliedrina
rBV: baculovirus recombinante
RIPA: del inglés, *radioimmunoprecipitation assay buffer*
RNA: ácido ribonucleico (ARN)
RNAi: RNA de interferencia
rpm: revoluciones por minuto
s: segundo
SFB: suero fetal bovino
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante.
shRNA: del inglés *short hairpin RNA*
SNPV: simple nucleopoliedrovirus
UFLAg: células de insecto UFLAg-286
Tween 20: polisorbato 20
µl: microlitro
UV: ultravioleta

VLP: del inglés *virus like particle*, partículas semejantes a virus

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

WB: western blot

wt: del inglés *wild type*, tipo salvaje

µm: micrómetros

µM: micromolar

Resumen

En el contexto de este trabajo, los baculovirus son una herramienta de ingeniería genética accesible en los laboratorios de biología molecular para el estudio y desarrollo de un sistema de expresión de proteínas heterólogas recombinantes en células de insecto (BEVS: *baculovirus expression vector system*). Durante más de cuatro décadas, el estudio se ha concentrado en generar sistemas de recombinación más eficientes, en su gran mayoría se han enfocado en una de las dos partes esenciales de este sistema BEVS: el baculovirus. Sin embargo, en este trabajo nos propusimos investigar y desarrollar la parte complementaria del sistema: las células de insecto.

En el primer capítulo se desarrolla la introducción general exponiéndose los objetivos de este trabajo donde se propone desarrollar herramientas aplicadas al mejoramiento de los baculovirus como plataforma biotecnológica para el cuidado del ambiente y la salud humana. Se busca obtener líneas celulares de insecto monoclonales que expresen proteínas recombinantes para su incorporación final en los dos morfotipos baculovirales: en los cuerpos de oclusión para el desarrollo de bioinsecticidas y en los viriones brotantes para desarrollos en salud humana.

En el segundo capítulo, se realiza un análisis bioinformático de la estructura primaria, secundaria y terciaria de la proteína de la envoltura del poliedro (PEP) del baculovirus AgMNPV para evaluar los sitios de inserción de proteínas candidatas insecticidas.

En el tercer capítulo, se describe el desarrollo de la generación de líneas celulares derivadas de lepidópteros que expresan proteínas recombinantes producto de la fusión de PEP o alguno de sus dominios con la proteína indicadora GFP. Este estudio permitió mostrar la expresión y localización de la proteína quimérica en los OB de tipo salvaje de dos baculovirus AgMNPV (rango de huésped estrecho) y AcMNPV (rango de huésped amplio).

En el cuarto capítulo, se describen dos estrategias para mejorar la capacidad insecticida de los baculovirus de AgMNPV y AcMNPV, el avance en el desarrollo de líneas celulares

empaquetadoras de proteínas activas y la generación de virus recombinantes de AcMNPV como prueba de concepto para evaluar la toxicidad de proteínas insecticidas en larvas susceptibles. Adicionalmente, se plantean estrategias para mejorar la formulación de los bioinsecticidas.

En el quinto y último capítulo, se discuten los resultados de líneas celulares derivadas de lepidópteros que expresan proteínas recombinantes para mejorar el uso de los baculovirus como vectores virales para la inmunización y futuras terapias.

Agradecimientos

Al Dr. Víctor Romanowski. Por permitirme realizar el doctorado bajo su dirección. Por ayudarme a cumplir los objetivos, a través de la discusión y de la disposición de todos los recursos que se requirieron. Por permitirme avanzar y desarrollar mi investigación de manera independiente sin dejar nunca de lado el aprendizaje.

Mi reconocimiento a la educación pública, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), y a la Universidad Nacional de La Plata por haber hecho posible la realización del presente trabajo.

Al Laboratorio de Virología Molecular, por ayudarnos a acompañar y cuidar nuestras individualidades: Pau, Mati, Les, Leti, Emy, Agus, Lau, Carito, **Amigos, Compañeros, Familia**, con pasión por el trabajo y la ciencia, los amo. A los más jóvenes Tomi, Abrilita, Pablito, Meli y Santi por renovar, acompañar y actualizar a las viejas generaciones :P.

A los profesionales y técnicos de apoyo del IBBM, sin cuya colaboración el desarrollo de este trabajo sería inimaginable. Un agradecimiento especial a Caty por su fuerza y contención. A Abel, Silvana, Paula, Larissa, Ulises, Juan, Luciana y Claudio.

A los becarios del IBBM, por los lazos de amistad, el compañerismo, los espacios de lucha y de diversión.

A los investigadores del IBBM, que han colaborado a través de los intercambios en reuniones y permitiendo generosamente el uso de los equipamientos necesarios: Antonio Lagares, Ma. Laura García, Eduardo Peña, Carina Reyes, Gabriel Robles, Daniela Hozbor, Julieta Pérez G., Florencia Del Papa. A los investigadores que no aparecen aquí, pero han contribuido igualmente al desarrollo de este trabajo.

A mi familia, por acompañarme en la vida.

A Gaita (mi sapita), Pollito, Mari, Toto, Zo, Juanito, Malala y Bru por abrirme las puertas y dejarme formar parte de esta hermosa aventura.

Al Gomi, por su amor, compañerismo y su enorme confianza en mi.



Capítulo 1. Introducción general

Introducción

Los baculovirus son virus patógenos que infectan invertebrados y se distribuyen ampliamente en el ambiente. El nombre baculovirus se deriva del latín *baculum*, que se refiere a las nucleocápsides (NC) en forma de bastón (aproximadamente 50 × 300 nm) características de estos virus. Los virus más estudiados son los que infectan a insectos del género *Lepidoptera* (polillas y mariposas), y en segundo lugar *Hymenoptera* (moscas de sierra) y *Diptera* (mosquitos). Diversos miembros de la familia *Baculoviridae* son utilizados como agentes de control biológico, ya que se constituyen como excelentes candidatos debido a su alta virulencia, especificidad, factibilidad de producción y compatibilidad con otras medidas de control de plagas (Moscardi, 1999; Haase *et al.*, 2015). El cuerpo de oclusión que los caracteriza los hace estables durante largos períodos y facilita su aplicación mediante pulverizaciones convencionales. Además, su estrecho espectro de huéspedes y la ausencia de otros posibles efectos perjudiciales al ambiente, han permitido que la gran mayoría de los bioinsecticidas comercializados a base de virus entomopatógenos contengan como materia activa virus de la familia *Baculoviridae*. Los baculovirus también son bien conocidos en el área de la biotecnología, ya que se los ha utilizado ampliamente como sistema de expresión con aplicaciones que van desde la expresión rutinaria de proteínas en laboratorios de investigación básica hasta la producción de vacunas y la terapia génica en la industria (Fabre *et al.*, 2019; Felberbaum, 2015; López *et al.*, 2018).

Biología de los Baculovirus

Los baculovirus tienen un genoma de DNA de doble cadena circular que varía entre los 80 a 180 kpb. Recientemente, sobre la base del conocimiento de secuencias de genomas completos baculovirales y sus relaciones filogenéticas, se ha aceptado la división de esta familia en cuatro géneros: *Alphabaculovirus* (Nucleopoliedrovirus NPV de lepidópteros),

Betabaculovirus (Granulovirus GV de lepidópteros), *Gammabaculovirus* (Nucleopoliedrovirus NPV de himenópteros) y *Deltabaculovirus* (Nucleopoliedrovirus NPV de dípteros) (Herniou *et al.*, 2011). Estas subdivisiones reflejan diferencias en (a) la filogenia, según el análisis de los 38 genes *core* o centrales; (b) especies hospedadoras permisivas; y (c) la manera en que los viriones se encuentran ocluidos o incrustados dentro de sus cuerpos de oclusión (Chateigner *et al.*, 2015; Harrison *et al.*, 2018; Jehle *et al.*, 2006). A su vez, otros virus a DNA de doble cadena que infectan invertebrados (miembros de *Nudiviridae*, *Hytrosaviridae*, *Nimaviridae* y el género de *Bracovirus* de la familia *Polydnviridae*) comparten un subconjunto de estos 38 genes *core* o centrales de los baculovirus, lo que sugiere un ancestro común con los baculovirus o un intercambio de ciertos genes funcionales entre los mismos (Drezen *et al.*, 2017; Herniou & Jehle, 2007; Theze *et al.*, 2011). Se ha sugerido que existe una coevolución de los baculovirus y los huéspedes que infectan. A medida que se secuencian más genomas completos, este proceso se ha demostrado de manera más convincente (Herniou *et al.*, 2004; Rohrmann *et al.*, 1981) y se refleja claramente en Figura 1.1 donde los linajes principales se agrupan en clados en función del insecto huésped que infectan (Bideshi *et al.*, 2000). En la filogenia, también se ha observado una división importante en el linaje de los NPV de los lepidópteros resultando en dos grupos principales, I y II (Zanotto *et al.*, 1993). Estos dos grupos difieren significativamente en el contenido génico, sobre todo los NPV del Grupo I los cuales utilizan la glicoproteína GP64 como proteína de fusión en los viriones brotantes (BV), mientras que los NPV del Grupo II carecen del gen *gp64* y utilizan la proteína denominada F (Pearson & Rohrmann, 2002). Adicionalmente, los NPV del Grupo I difieren en otros 11 genes (Miele *et al.*, 2011). Se ha sugerido que el linaje del Grupo I se originó cuando una variante de NPV incorporó el gen *gp64* lo que estimuló su evolución como un linaje distinto (Herniou *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2009). Si bien la amplia variedad de secuencias obtenidas en los últimos años ha permitido ampliar el conocimiento de los virus que infectan lepidópteros, se necesita más información sobre virus de otras órdenes de insectos para completar nuestra comprensión de la evolución del baculovirus.

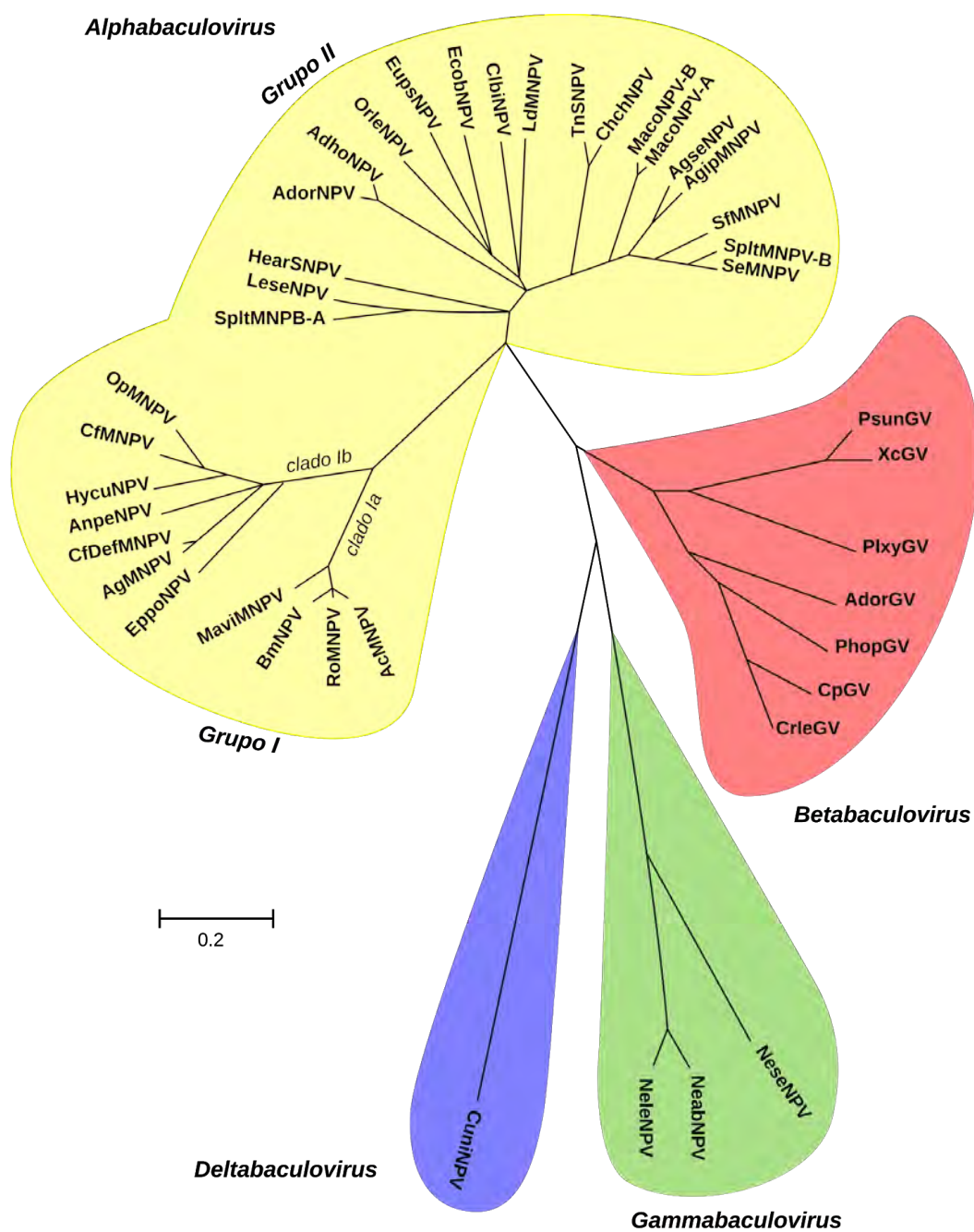


Figura 1.1. Filogenia de 29 genes core de baculovirus de las secuencias de los genoma de baculovirus actualmente reconocidos como especies por el *International Committee on Taxonomy of Viruses*. El árbol filogenético se infirió a partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos concatenadas de estos genes core. Los cuatro géneros de Baculoviridae se distinguen por diferentes colores, y las subdivisiones dentro de los *Alphabaculovirus* (grupos I y II, clados Ia y Ib) están indicadas. Las especies que se incluyen son: *Autographa californica* (AcMNPV), *Rachiplusia nu* MNPV (RoMNPV), *Bombyx mori* NPV (BmNPV), *Maruca vitrata* MNPV (MaviMNPV), *Epiphyas postvittana* NPV (EppoNPV), *Anticarsia gemmatalis* MNPV (AgMNPV), *Choristoneura fumiferana* DEF NPV (CfDEFNPV), *Antheraea pernyi* NPV (AnpeNPV), *Hyphantria cunea* NPV (HycuNPV), *Choristoneura fumiferana* MNPV (CfMNPV), *Spodoptera litura* MNPV-A and -B (SpltMNPV-A and -B), *Leucania separata* NPV (LeseNPV), *Helicoverpa armigera* SNPV (HearSNPV), *Adoxophyes orana* NPV (AdorNPV), *Adoxophyes honmai* NPV (AdhoNPV), *Orgyia leucostigma* NPV (OrleNPV), *Euproctis pseudoconsersa* NPV (EupsNPV), *Clanis bilineata* NPV (ClbiNPV), *Lymantria dispar* MNPV (LdMNPV), *Trichoplusia ni* SNPV (TnSNPV), *Chrysodeixis chalcites* NPV (ChchNPV), *Mamestra configurata* NPV-A and -B (MacoNPV-A and -B), *Agrotis segetum* NPV (AgseNPV), *Agrotis ipsilon* MNPV (AgipMNPV), *Spodoptera frugiperda* MNPV (SfMNPV), *Spodoptera exigua* MNPV (SeMNPV), *Pseudaletia unipuncta* GV (PsunGV), *Xestia c-nigrum* GV (XecnGV), *Plutella xylostella* GV (PlxyGV), *Adoxophyes orana* GV (AdorGV), *Phthorimaea operculella* GV (PhopGV), *Cydia pomonella* GV (CpGV), *Cryptophlebia leucotreta* GV (CrleGV), *Neodiprion sertifer* NPV (NeseNPV), *Neodiprion abietis* NPV (NeabNPV), *Neodiprion lecontei* NPV (NeleNPV), y *Culex nigripalpus* NPV (CuniNPV). Versión modificada de Blissard & Hoover 2018.

Ciclo infectivo

Una característica adaptativa de los baculovirus es su ciclo infectivo bifásico que resulta en la producción de dos tipos de viriones físicamente diferentes, generando dos progenies virales muy distintas (Figura 1.2a). Ambos viriones poseen un genoma idéntico, y difieren de manera notable en varios aspectos: se producen en compartimentos diferentes en la célula infectada, sus envolturas están compuestas por diferentes membranas y proteínas de membrana, y cada una cumple una función diferencial y esencial en el ciclo de infección en la naturaleza. Las progenies virales se conocen como: los cuerpos de oclusión (del inglés *occlusion bodies*, OB) encargados de la infección primaria y los viriones brotantes (del inglés, *Budded Virus BV*) encargados de la infección secundaria; los nombres se refieren al mecanismo de formación de la partícula viral. Dado que en este trabajo de tesis vamos a trabajar con baculovirus del género *Alphabaculovirus*, desarrollaremos la introducción analizando el ciclo infectivo para los nucleopoliedrovirus, más específicamente nos referiremos a los estudios sobre el virus modelo de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* AcMNPV (Rohrmann, 2019; Van Oers *et al.*, 2015).

El ciclo de infección comienza cuando una larva susceptible ingiere material foliar contaminado con los OB. Cabe remarcar que los baculovirus se replican exclusivamente en insectos en etapa larvaria. La transmisión ocurre por vía oral, y los OB son los encargados de la transmisión horizontal del virus de insecto a insecto susceptible (Jehle *et al.*, 2006). Los OB y las partículas de alimento se transportan a través del intestino próximo y una vez que se alcanza al intestino medio (Figura 1.2 a), y debido a su pH alcalino los OB se desintegran para liberar a los ODV (del inglés, *Occlusion Derived Virus ODV*). Consecuentemente, los ODV llevan a cabo la infección inicial de las células columnares del epitelio intestinal de la larva luego de atravesar la membrana peritrófica, una matriz de quitina y proteínas, que se dispone a lo largo del intestino medio cuya alcalinidad (pH 10-11) predispone la disolución de los OB y la liberación de los ODV dentro del lumen (Slack & Arif, 2007) (Figura 1.2a). Los baculovirus han desarrollado estrategias para debilitar la

membrana peritrófica. Una de ellas consiste en la liberación de proteínas denominadas *enhancins* previamente empaquetadas dentro de los cuerpos de oclusión (Beck, 1997; Gallo *et al.*, 1991; Hashimoto *et al.*, 1991; Hoover *et al.*, 2010; Hotchkin, 1981; Lepore *et al.*, 1996) o presentes en la superficie de los ODV (Slavicek, 2005). Se trata de metaloproteasas que pueden llevar a cabo el clivaje de las proteínas MLP (del inglés, *mucin-like proteins*) que unen las unidades de quitina de la membrana peritrófica. Existen además otros factores virales que debilitan la membrana peritrófica (Derksen, 1988; Levy *et al.*, 2007).

Una vez avanzada la infección mediada por los ODV en estas células epiteliales, las nucleocápsides ingresan al citoplasma y se traslocan al núcleo donde se transcribe y replica el DNA viral (Figura 1.2b). El DNA genómico sintetizado se ensambla con proteínas virales específicas para formar las NC en el núcleo. Los nucleocápsides se dirigen a la membrana citoplasmática donde se produce la brotación y los virus brotantes, responsables de la infección sistémica en las larvas (Figura 1.2 b). Dependiendo de la especie de baculovirus, la mayoría de los tejidos dentro del hemocele (epitelio traqueal, hemocitos, epidermis, músculo, cuerpo adiposo, etc.) se infectan y producen BV adicionales, extendiendo aún más la infección a través de la larva infectada (Engelhard *et al.*, 1994; Kirkpatrick *et al.*, 1994; Washburn *et al.*, 1995). Los viriones brotantes se producen en cantidades sustanciales a partir de las 12-18 h p.i. (horas post infección) en cultivo celular (Milks *et al.*, 2003). Más adelante en la infección, muchas nucleocápsides son retenidas dentro del núcleo y, posteriormente, son envueltas por una membrana derivada de la envoltura nuclear para generar los ODV (Braunagel & Summers, 2007). Estos viriones ODV recién envueltos en el núcleo se encierran en una matriz proteica que cristaliza para formar el OB. Finalmente, cuando el hospedador infectado muere los cuerpos de oclusión son liberados al medio ambiente (los cuales son capaces de persistir en la naturaleza), principalmente en el suelo y hojarasca, durante largos períodos de tiempo. Esta permanencia en el ambiente constituye una fuente de inóculo para generaciones subsiguientes de la plaga y un medio de control de la densidad poblacional del insecto (Kalmakoff *et al.*, 1982).

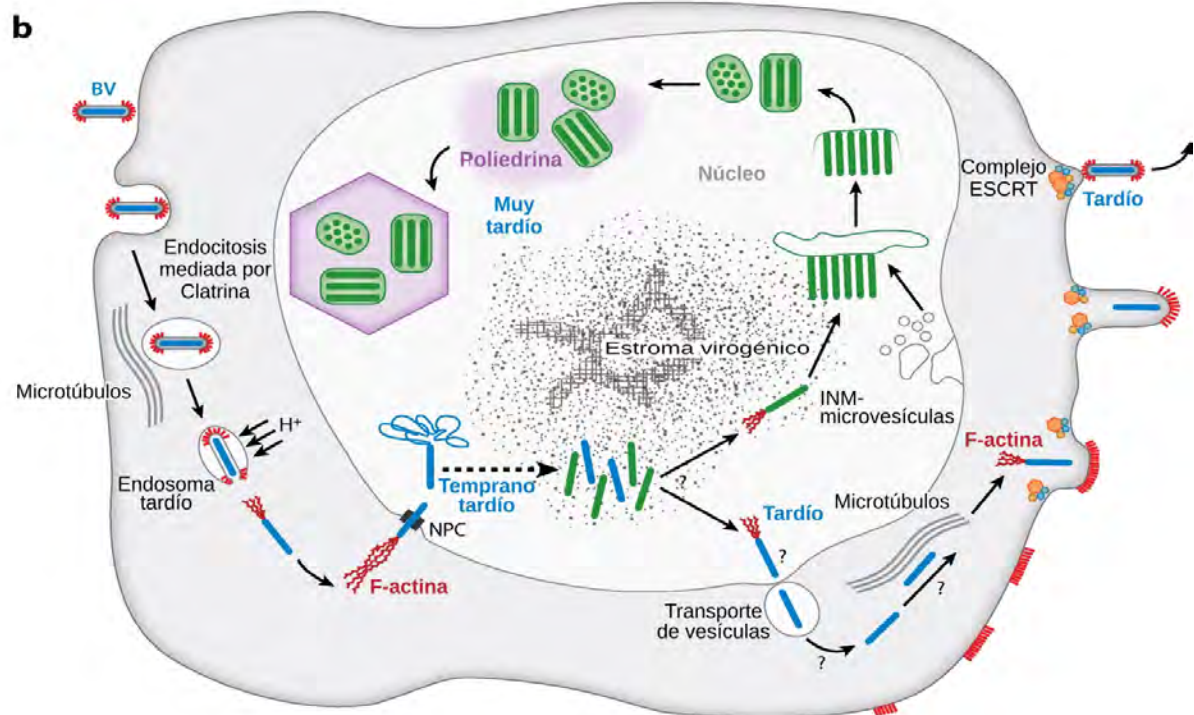
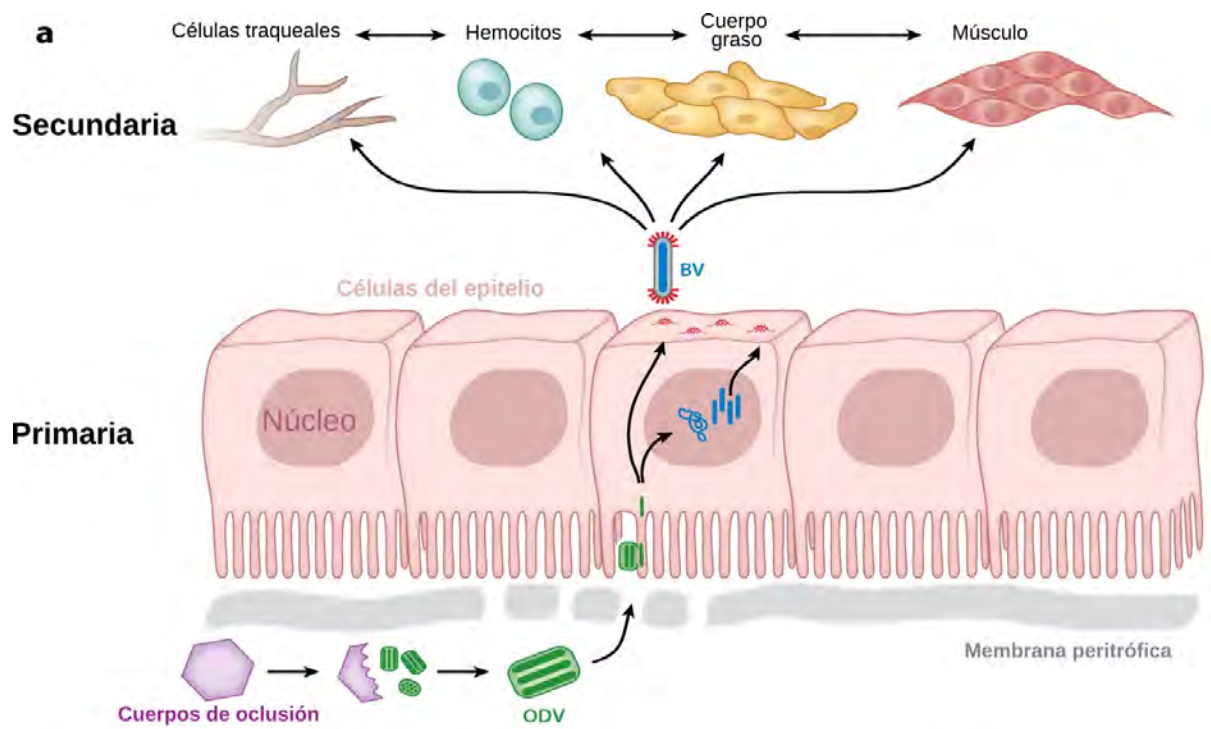


Figura 1.2. (a) Representación de la infección de los baculovirus en los tejidos del huésped. En el esquema se ilustra la etapa primaria y secundaria de la infección. La etapa primaria ocurre cuando el cuerpo de oclusión (OB) presente en el ambiente es ingerido por la larva comenzando un nuevo ciclo de infección. Cuando el OB alcanza el intestino medio se disuelve en el medio alcalino, liberando los ODV. La membrana peritrófica, que protege a las células epiteliales del contacto directo con el contenido intestinal, es degradada por la acción de proteínas codificadas por el virus y la célula hospedadora presentes en el OB, permitiendo el ingreso de los ODV en las células polarizadas del epitelio del intestino medio, liberando nucleocápsides al citoplasma. Después de la replicación viral y el ensamblaje de la nucleocápside en el núcleo (o el paso directo), las nucleocápsides se transportan y emergen de la membrana citoplasmática basolateral en forma de viriones brotantes. Los viriones BV pueden infectar algunas células directamente (células traqueales y hemocitos) o pueden circular en la hemolinfa, infectando otros tejidos como el cuerpo graso y el músculo. Los ODV y OB se producen en todos los tipos de células y posteriormente se liberan cuando las células se lisan y la larva se disuelve o licua. (b) Representación del ciclo de vida de un baculovirus del género *Alphabaculovirus* en células huésped no intestinales. Después de la fusión y entrada de BV por endocitosis mediada por clatrina, es probable que los endosomas se transporten a lo largo de los microtúbulos. Luego de la acidificación del endosoma, se liberan nucleocápsides en el citoplasma (azul). El reclutamiento del complejo Arp2/3 por P78/83 da como resultado el inicio de la polimerización de actina que genera la fuerza propulsora para transportar las nucleocápsides por el citoplasma y atravesar el poro nuclear. Las NC que ingresan en el núcleo se desensamblan liberando el genoma viral que da como resultado la expresión génica viral, la replicación del DNA y el ensamblaje de nuevas nucleocápsides (azul y verde) en el estroma virogénico. De las nuevas nucleocápsides, algunas están marcadas para salir del núcleo (azul) y otras para la producción de ODV (verde). Las nucleocápsides que salen del núcleo se observan en vesículas citoplasmáticas (vesículas de transporte). El transporte de nucleocápsides a la membrana plasmática podría estar mediada por microtúbulos, polimerización de actina o ambos. Las proteínas del complejo ESCRT podrían estar involucradas en la salida del núcleo, en brotación por la membrana plasmática, o en ambas. Las nucleocápsides destinadas a convertirse en el fenotipo viral ODV interactúan con las membranas derivadas de la membrana nuclear interna (INM) para formar los ODV, que posteriormente son ocluidos por la proteína del OB (poliedrina) para generar los cuerpos de oclusión. (Adaptado de: Blissard & Theilmann, 2018).

Nucleocápside

Las nucleocápsides de los ODV y BV son muy similares debido a que ambas contienen genomas virales completos y comparten las proteínas estructurales mayoritarias. La nucleocápside (NC) está conformada por DNA superenrollado íntimamente asociado a la proteína P6.9 (Singh *et al.*, 2014). Esta proteína con capacidad de unión a DNA participa en alto grado de la compactación que presenta el material genético viral. Por otra parte, la proteína VLF-1 (Ac77) (del inglés, *very late factor* VLF), está ubicada en la región terminal de la NC y tiene funciones estructurales tanto en los ODV como en los BV (Wang *et al.*, 2010) (Figura 1.3). Las nucleocápsides son polares: poseen una base en un extremo y una estructura apical tipo capuchón en el otro. Además de la proteína estructural mayoritaria de

la nucleocápside que posee homólogos en todos los genomas baculovirales, denominada VP39, existen varias proteínas minoritarias que son esenciales (Katsuma & Kokusho, 2017; Zhang *et al.*, 2018). El ensamblaje de la nucleocápside en los virus generalmente se divide en dos pasos: producción de proteínas de la cápside y empaquetamiento genómico. El mecanismo de ensamblaje presupuesto para las nucleocápsides en los baculovirus es el de un sistema dependiente de energía. En este sistema, primero se ensamblan las cápsides vacías, y luego el genoma es reconocido e incorporado a estas cápsides preformadas por bombas impulsadas por ATP (Zhao *et al.*, 2019). Dado que el ensamblaje de la nucleocápside se realiza en el estroma virogénico (del inglés, *virogenic stroma* VS) en el núcleo de la célula huésped, todas las proteínas estructurales de las nucleocápsides deben transportarse al mismo y luego agregarse para formar las NC. El mecanismo exacto del transporte de las proteínas para las nucleocápsides no se ha dilucidado aún. Se sugiere que la proteína VP1054 es responsable de la correcta localización y de administración de las proteínas de la cápside (incluidas VP39, P78/83 y BV/ODV-C42) en el sitio de ensamblaje (Guan *et al.*, 2016). Además, se presume que BV/ODV-C42 interactúa con P78/83, una proteína asociada con la base de las nucleocápsides (Braunagel *et al.*, 2001), para formar un complejo y facilitar el transporte desde el citoplasma al núcleo en las células de insectos (Wang *et al.*, 2008). Entre otras proteínas de importancia que están presentes en los viriones se pueden citar a GP41 (Ac80), que se encuentra localizada entre la envoltura del virión y la cápside, constituyendo una estructura denominada tegumento (Whitford & Faulkner, 1992) que es requerida para el egreso de la nucleocápside del núcleo (Li *et al.*, 2018).

Virion brotante

Los viriones brotantes contienen una única nucleocápside y estructuralmente poseen en su envoltura una proteína con actividad fusogénica y mayoritaria: GP64 o GP67 (Whitford *et al.*, 1989) y/o la proteína de fusión EFP o F (Lung *et al.*, 2002; Pearson & Rohrmann, 2002;

Westenberg *et al.*, 2004). Estas proteínas se encuentran implicadas en la brotación y en el reconocimiento y la entrada de los BV en las células del hospedador (Hefferon *et al.*, 1999; Oomens & Blissard, 1999). Como mencionamos anteriormente, la proteína GP64 se encuentra presente únicamente en los NPV del grupo I, mientras que en este grupo la proteína F, aunque presente, ha perdido aparentemente las funciones asociadas a la envoltura del virión (Whitford *et al.*, 1989). En cambio, en los NPV del grupo II (y posiblemente en los GV) la proteína F desempeña las funciones descritas para GP64 (Bulach *et al.*, 1999; Slack *et al.*, 2004; Wormleaton *et al.*, 2003; Zanotto *et al.*, 1993). A diferencia de los ODV, la envoltura de los BV se adquiere a partir de la membrana plasmática de la célula durante el proceso de brotación y contiene un número menor de proteínas virales (Figura 1.3). La envoltura del BV de AcMNPV además de la proteína mayoritaria contiene al menos seis proteínas de membrana adicionales codificadas por el virus en menores proporciones. Entre ellas: la proteína tipo F (Ac23), v-Ubi (Ac35), GP37 (Ac64), ODV-E25 (Ac94), ODV-E18 (Ac143) y BV/ODV-E26 (Ac16) (Deng *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010). Se ha reportado que GP64 es esencial para la entrada de viriones en la célula hospedadora, y que ODV-E25 y ODV-E18 son esenciales para la generación de la partícula viral infectiva (McCarthy & Theilmann, 2008; Rohrmann, 2019; Volkman *et al.*, 1984). Si bien las restantes proteínas de envoltura (Ac23, v-Ubi, GP37 y BV/ODV-E26) pueden afectar los niveles de producción de BV, no son esenciales para la producción o la infectividad de BV.

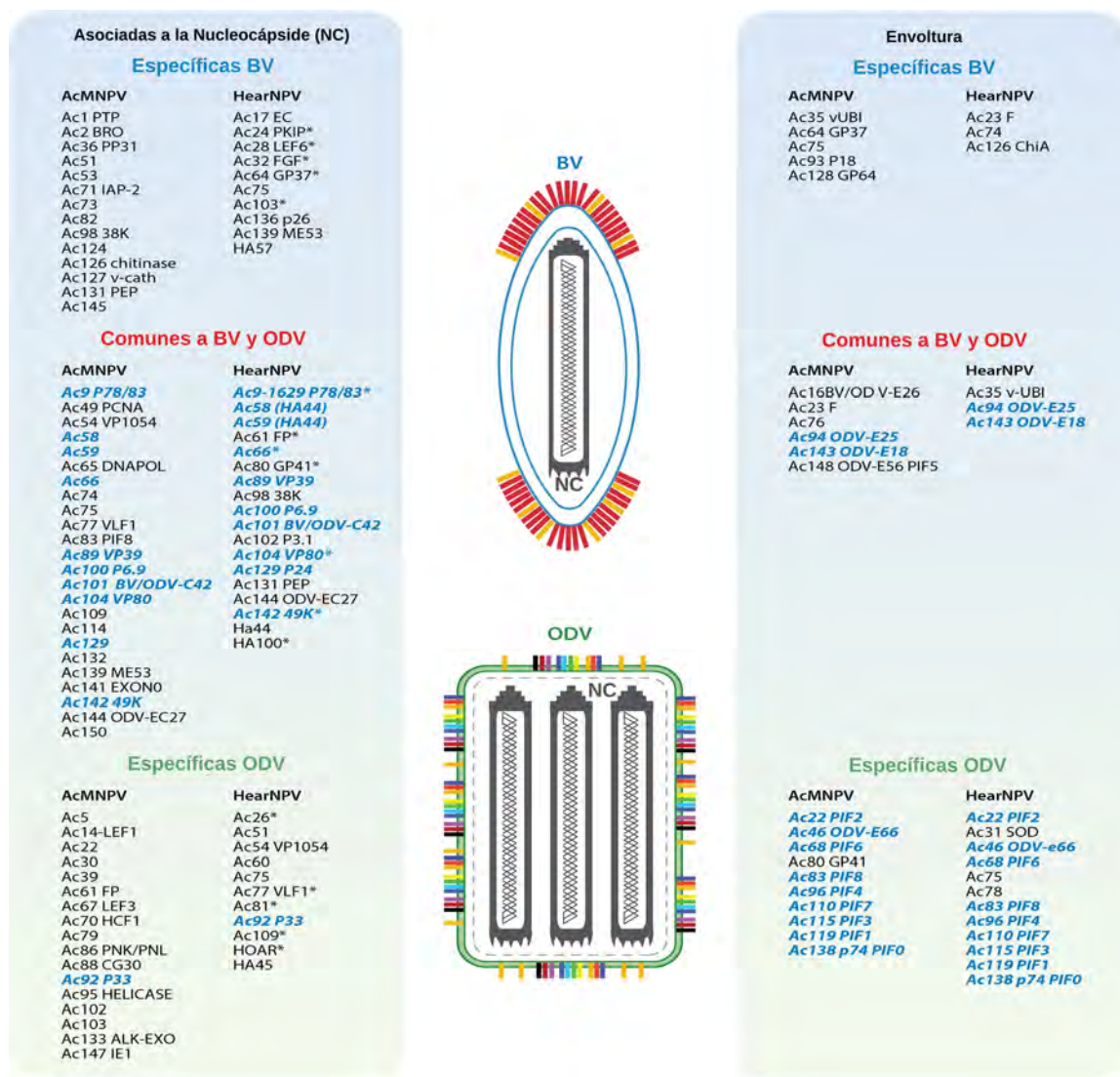


Figura 1.3. Comparación de la composición proteica de los fenotipos: virión brotante (BV) y virus derivado de oclusión (ODV) entre el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) y el virus de la poliedrosis nuclear de *Helicoverpa armigera* (HearNPV). Las proteínas se anotan principalmente a partir de los análisis proteómicos (Deng *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010), entre otros. Las proteínas se enumeran junto a las representaciones de viriones BV y ODV. Las proteínas de la envoltura o asociadas con nucleocápsides se subdividen en grupos que son específicos del fenotipo (ODV o BV) o comunes a ambos. Las proteínas en común a AcMNPV y HearNPV se muestran en azul. El análisis detallado de las proteínas HearNPV (Hou *et al.*, 2013) mostró que algunas proteínas se encuentran en la envoltura y la nucleocápside (indicadas con asteriscos), lo que sugiere que pueden ser proteínas de tegumento. Se utilizó la nomenclatura de AcMNPV para todas las proteínas de la figura (columna de AcMNPV o HearNPV) a menos que la proteína sea específica de HearNPV, en cuyo caso se usa el nombre de la proteína HearNPV. (Adaptado de: Blissard & Theilmann, 2018).

Cuerpos de oclusión

Una consecuencia importante de la naturaleza cíclica de las poblaciones de insectos es que sus patógenos pierden el acceso a su hospedador natural, ya sea estacionalmente o por períodos de tiempo mucho más largos. Los virus, en general, han desarrollado varias estrategias para asegurar su supervivencia hasta que reaparezcan sus anfitriones. Por ejemplo, pueden quedar presentes en los huevos o en las pupas de los insectos durante el invierno, o pueden persistir en huéspedes alternativos, o permanecer de manera estable fuera del huésped en el ambiente. Aunque existe evidencia de la persistencia baculoviral dentro de los insectos hospedadores (Rohrmann, 2019), la estabilidad fuera de la larva hospedante debido a la encapsulación del virión por una matriz proteica parece ser la estrategia común de todos los baculovirus. Los miembros de la familia *Baculoviridae* se caracterizan por su presencia en cuerpos de oclusión llamados poliedros para NPV y gránulos o cápsulas para GV. Los poliedros tienen aproximadamente 0.6–2 μm de diámetro, mientras que los gránulos tienen forma ovalada con diámetros de aproximadamente 0.2–0.4 μm (Ackermann & Smirnov, 1983). Los cuerpos de oclusión (OB) son altamente estables y pueden resistir la mayoría de las condiciones ambientales normales, lo que permite que los viriones mantengan su capacidad infectiva por un tiempo prolongado. Incluso, la evidencia sugiere que pueden sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal de las aves, lo que puede facilitar su dispersión (Entwistle *et al.*, 1978; Hostetter & Bell, 1985). El cuerpo de oclusión consiste en una matriz cristalina compuesta de una proteína llamada polihedrina en NPV y granulina en GV. Aunque tienen nombres diferentes, estas dos proteínas están estrechamente relacionadas.

Unas 20 horas después de iniciado el ciclo infeccioso el estroma virogénico sufre una retracción y tiene lugar la producción de ODV. El anillo nuclear se expande y el espacio es ocupado por nuevas nucleocápsides que luego, en el mismo núcleo, adquieren una envoltura lipídica para convertirse en ODV. Es comprensible, por lo tanto, que la estructura de la bicapa perteneciente a los ODV guarde cierta relación con la membrana nuclear

interna en cuanto a su composición lipídica (Braunagel & Summers, 1994). La membrana de los ODV, al igual que la de los BV, contiene varias proteínas virales integrales y asociadas (Figura 1.3).

Una característica destacada de los ODV dentro de los poliedros es su organización en agregados simples o múltiples de nucleocápsides dentro de la envoltura (Figura 1.3 y 1.4). Por ejemplo, en algunos NPV puede haber entre 1 y 15 nucleocápsides por envoltura, distinguiéndose así como simples (SNPV) y múltiples (MNPV) (Ackermann & Smirnov, 1983; Hughes & Addison, 1970). En contraste, los granulovirus GV contienen una única nucleocápside por envoltura, aunque en algunas excepciones se ha observado más de una (Falcon & Hess, 1985).

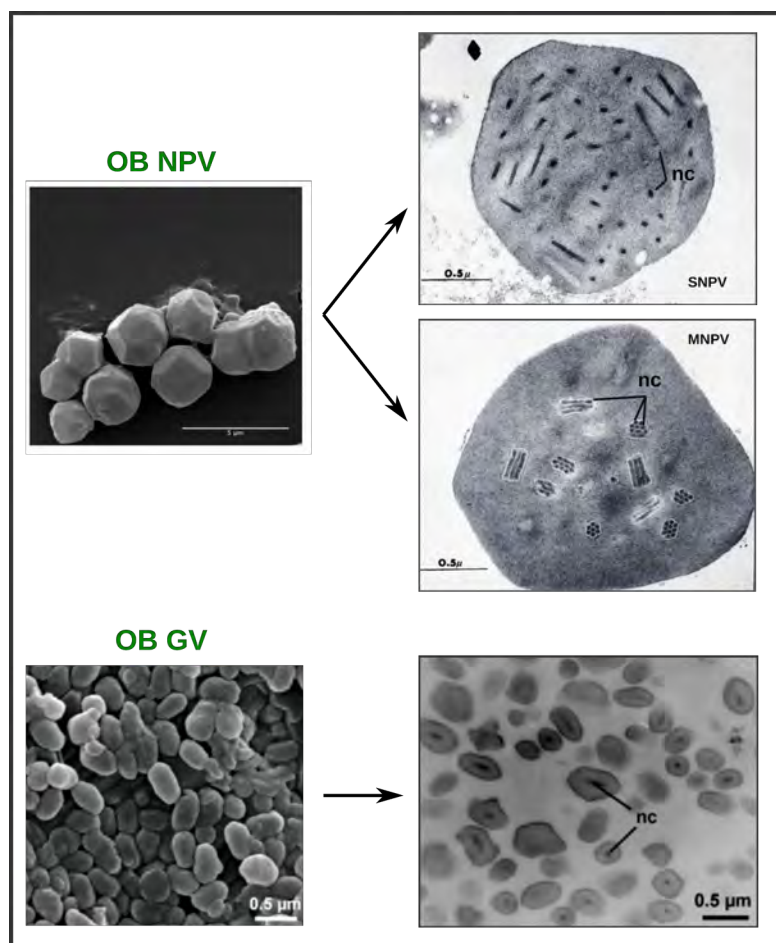


Figura 1.4. Micrografías electrónicas de barrido de cuerpos de occlusión de NPV y GV (Panel izquierdo). Panel derecho: Micrografías electrónicas de cortes ultrafinos de cuerpos de occlusión (nc: nucleocápside). Adaptado de Rohrmann, 2019.

Componentes de los cuerpos de oclusión

Poliedrina/Granulina: La polihedrina y la granulina están estrechamente relacionadas y son los principales componentes estructurales de los cuerpos de oclusión (poliedrina en NPV y granulina en GV). La caracterización del marco de lectura abierto (ORF) de la poliedrina en diferentes especies virales mostraron un tamaño aproximado de 250 aminoácidos (~30 kDa) siendo una de las proteínas virales más conservadas. Las mismas forman una red cristalina cúbica que encierra o rodea a los viriones (ODV) (Figura 1.4). Los genes ortólogos de poliedrina/granulina se encuentran presentes en los géneros *Alpha-*, *Beta-* y *Gammabaculovirus* pero no en los *Deltabaculovirus* (CuniNPV). Sorprendentemente, CuniNPV tiene una proteína del cuerpo de oclusión tres veces más grande que la poliedrina y no presenta homología de secuencia con la poliedrina de otros baculovirus (Afonso *et al.*, 2001; Perera *et al.*, 2006).

Proteína de envoltura del poliedro: El OB está rodeado por una cubierta externa llamada envoltura del poliedro (del inglés, *polyhedron envelope* PE) formada principalmente por carbohidratos asociados a una fosfoproteína de 34 kDa (Ac131). La función de esta proteína denominada proteína de envoltura del poliedro (del inglés, *polyhedron envelope protein* PEP) parece ser la de sellar la superficie de los poliedros y mejorar su estabilidad, ya que la delección en esta proteína genera OB con una superficie rugosa o interrumpida y la envoltura del poliedro parece estar fragmentada o no existir (Rohrmann, 2019). En el capítulo 2 se desarrollan con más detalle las características de esta proteína.

Entre los factores asociados a los OB se puede citar a la proteína Ac68, que pareciera estar involucrada con la morfogénesis del poliedro ya que la delección de su homólogo en el baculovirus BmMNPV genera OB carentes de viriones (Xu *et al.*, 2008). La proteína P10 (Ac137) es requerida para la correcta formación de los poliedros y cuando es fosforilada se la encuentra asociada a microtúbulos (Carpentier *et al.*, 2008; Raza *et al.*, 2017). La

deleción de P10 en el genoma viral ocasiona la malformación de poliedros y la formación de una envoltura del poliedro incompleta (Gross *et al.*, 1994). Las proteínas VEF (del inglés, *Viral Enhancing Factors o enhancins*) pueden aparecer asociadas a los OB en ciertos baculovirus; son metaloproteasas que en el caso de TnGV llegan a representar el 5% de la masa del OB (Hashimoto *et al.*, 1991). Estas proteasas facilitan la infección viral por disrupción de la membrana peritrófica (MP) del hospedador (Hoover *et al.*, 2010; Jiang & Xia, 2014; Lepore *et al.*, 1996; Ohba & Tanada, 1983).

Regulación temporal de la expresión génica

La regulación temporal de la expresión de los genes virales ha sido estudiada principalmente en el baculovirus modelo AcMNPV. En este virus la expresión tiene lugar en forma de cascada, en la cual la expresión de los genes en una determinada etapa requiere la presencia de los productos génicos de la etapa anterior. La expresión genética del baculovirus puede ser dividida en tres fases temporales: fase temprana, tardía y muy tardía (Tabla 1.1) (Rohrmann, 2019; Romanowski & Ghiringhelli, 2001).


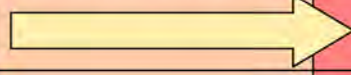

		tiempo (horas)						
		0-8 h	8-24 h	24-76 h				
		fase temprana (early)	fase tardía (late)	fase muy tardía (very late)				
Transcripción mediada por:	RNA polimerasa II celular	RNA polimerasa viral						
Promotores utilizados	TATA	(A/G/T)TAAG						
Secuencia de inicio de la transcripción	CA(C/G/T)T	Primera A de la secuencia TAAG						
Motivos de unión a proteínas involucradas en la transcripción	(T/A)GATA(A/G)CACGTG							
Replicación del ADN								
Genes transcritos	<i>ie-0, ie-1, pe38, me53, dna-pol, dna-hel, etl, p47, lef-1, lef-3, lef-5, lef-6, lef-7, lef-8, iap-1, iap-2, p35, gp64, egt, etc.</i>	<i>ie-0, ie-1, eap-1, iap-2, me53, dna-pol, dna-hel, lef-10, lef-1, lef-2, lef-3, lef-4, lef-8, lef-9, p47, vlf-1, p6.9, vp39, gp64, 39K, p74, ubi, pp78/83, etc.</i>			<i>p10, polh, vp39, chiA, ubi, p74, gp41, odv-e66, odv-ec27, odv-e56, etc.</i>			
Producción de BV								
Producción de OB								

Tabla 1.1. Etapas en la infección con NPV. La expresión de los genes de los baculovirus ocurre en forma de cascada (factores codificados en una etapa son necesarios para el desarrollo en las etapas posteriores) y se divide en tres etapas: temprana, tardía y muy tardía. La transcripción de genes tempranos depende de la RNA polimerasa celular aunque, con la excepción de los genes inmediatos, requiere de factores adicionales codificados por el virus. La replicación del DNA es un requisito para la expresión de genes tardíos y muy tardíos, los cuales se transcriben utilizando la RNA polimerasa viral. (Adaptado de: Romanowski & Ghiringhelli, 2001).

Genes tempranos

Los genes tempranos pueden subdividirse en dos categorías: tempranos inmediatos y tempranos retrasados (genes α y β). Ambos son transcritos por la RNA polimerasa II de la célula huésped. Los genes α y β difieren en sus promotores y en las secuencias activadoras a distancia (del inglés, *enhancers*). Los genes tempranos inmediatos son expresados dentro de los 30 min post infección una vez que el DNA viral ha alcanzado el núcleo (Chisholm &

Henner, 1988). Los genes tempranos retrasados requieren de la unión de transactivadores virales (sintetizados previamente) a los *enhancers* para alcanzar niveles máximos de expresión. Los promotores de estos genes se asemejan a los promotores de los genes del huésped: tienen un motivo TATA *box* típico y un sitio de inicio de la transcripción CAGT que se ubica 25-31 pb *downstream* del motivo TATA *box* y son reconocidos por extractos nucleares de células no infectadas (Hoopes & Rohrmann, 1991). La secuencia CAGT está involucrada en la eficiencia del inicio de transcripción, probablemente influyendo sobre la afinidad por el factor de transcripción TFIID (Pullen & Friesen, 1995). En la fase temprana inmediata la transcripción es llevada a cabo por la RNA polimerasa II del hospedador. Los principales genes de fase temprana inmediata incluyen *ie-1*, *ie-0* e *ie-2* y subunidades de la polimerasa propia del baculovirus.

Replicación

La replicación del DNA se produce en el núcleo de la célula infectada, el virus expresa sus propios genes para este proceso durante la etapa temprana. Los elementos que actúan *in cis* requeridos para la replicación (origen de replicación u *ori*) han sido identificados por el análisis de genomas defectivos obtenidos luego de varios pasajes virales en cultivo de células de insecto (Kool *et al.*, 1994; Lee & Krell, 1994) y por ensayos de replicación transitorios (Leisy & Rohrmann, 1993; Pearson *et al.*, 1993). La actividad del *ori* fue encontrada en los baculovirus por estar asociada con las regiones homólogas (del inglés, *homologous region*, *hr*) (Lu & Miller, 1995). Las *hr* contienen secuencias palindrómicas interesparadas con repeticiones directas cortas capaces de formar estructuras secundarias y se encuentran dispersas a lo largo del genoma del baculovirus. Estas secuencias también pueden actuar como *enhancers* transcripcionales (Friesen, 1997). La presencia de las *hr* es una característica común de los baculovirus, sin embargo, no todo está aclarado acerca de ellos (Berretta & Romanowski, 2008). Además de los *ori* tipo *hr*, se identificaron secuencias *no-hr* con actividad *ori* mediante ensayos de replicación transitoria en los genomas del nucleopoliedrovirus de *Orgia pseudotsugata* (Pearson *et al.*, 1993), de *Autographa*

californica (M. Kool *et al.*, 1994), de *Spodoptera exigua* (Heldens *et al.*, 1997) y de *Spodoptera litura* (Huang & Levin, 1999). Estos *ori*, llamados de tipo *no-hr*, carecen de las secuencias palindrómicas o repeticiones encontradas en los *ori* tipo *hr*. Los *ori no-hr* de diferentes baculovirus no tienen homología estructural entre ellos ni semejanza con los *ori* tipo *hr* en el mismo genoma. Sin embargo, poseen elementos básicos que se encuentran en el consenso de los *ori* eucariotas tales como múltiples repeticiones invertidas y directas, palíndromes y secuencias ricas en AT (DePamphilis, 1993). A diferencia de los *ori* tipo *hr*, la presencia y distribución de motivos de estructura secundaria dentro de las secuencias *ori no-hr* es probablemente más importante para la actividad que la secuencia primaria en sí misma. Los elementos que actúan en *trans* requeridos para la replicación del DNA baculoviral incluyen, entre otros, la DNA polimerasa viral (*dnapol*), *p143* (helicasa), *lef-1* (DNA primasa) y *lef-2*, cuatro genes que han sido encontrados en todos los baculovirus secuenciados hasta el momento (Herniou *et al.*, 2003). Se han identificado cinco genes esenciales (*p143*, *ie-1*, *lef-1*, *lef-2*, y *lef-3*) y cinco genes estimulantes de la replicación del DNA (*dnapol*, *p35*, *ie-2*, *lef-7*, y *pe38*) en AcMNPV (Crouch & Passarelli, 2002). En ensayos de replicación transitoria, los plásmidos con *hr* replican a una alta tasa (Leisy & Rohrmann, 1993). En otros estudios, un plásmido basado en el pUC, sin ninguna secuencia viral *ori*, replica en células de insectos infectadas formando concatémeros y/o integrándose en el genoma viral (Wu *et al.*, 1999). Estas observaciones sugieren un mecanismo de replicación de DNA tipo círculo rodante, mientras que Kool *et al.*, (1995) sugieren una posible combinación de los mecanismos de círculo rodante y tipo *theta*. Oppenheimer & Volkmann (1997) fueron capaces de detectar múltiples fragmentos de genoma de una unidad de longitud en proceso de replicación, sugiriendo que AcMNPV replica en una manera cabeza-cola vía un mecanismo de círculo rodante.

Genes tardíos y muy tardíos

Entre las 8 y las 24 h p.i. ocurre la transcripción y expresión de genes tardíos (o genes γ), la producción de proteínas estructurales y la formación de BV. Estos genes, así como también los genes muy tardíos (o genes δ), tienen un sitio de inicio de la transcripción invariante y universal (A/G/T)TAAG y son transcritos por la RNA polimerasa codificada por el propio virus, la cual es insensible a la α -amanitina, a diferencia de su homóloga en la célula huésped. Además, en estudios de expresión transitoria se demostró que dieciocho genes de AcMNPV son esenciales para lograr niveles de expresión óptimos de un gen indicador bajo el control de promotores tardíos y muy tardíos (*vp39*, *p6.9*, *polh*, *p10*) (Lu & Miller, 1995). En la fase tardía se expresan, entre otros, aquellos genes que codifican proteínas estructurales dando comienzo a la etapa de ensamblaje de nucleocápsides (NC) en el núcleo de la célula infectada (Fraser, 1986). La expresión génica muy tardía comienza alrededor de las 18-24 h p.i. y se caracteriza por un dramático incremento de la transcripción y expresión de genes muy tardíos, y la reducción de la transcripción de genes tardíos. En los promotores muy tardíos, a diferencia de los tardíos, el nivel de expresión no depende del contexto inmediato en el que se encuentra la secuencia TAAG sino de una secuencia denominada *burst sequence* que se localiza entre el sitio de inicio de la transcripción y el codón de inicio de la traducción. En los promotores muy tardíos esta secuencia es rica en AT e influye en la actividad del promotor. Esta región interactúa con proteínas celulares, las cuales son imprescindibles para asegurar altos niveles de transcripción de genes tales como poliedrina (*polh*) o granulina (*gra*), *p10* y otros que codifican proteínas necesarias para formar los cuerpos de oclusión (Braunagel *et al.*, 1997). El producto del gen *p10* está asociado con la formación de extensas estructuras fibrilares en el núcleo y citoplasma de células infectadas (Quant-Russell *et al.*, 1987; Van Der Wilk *et al.*, 1987). Dado que *polh* y *p10* no son necesarias para la transmisión de baculovirus en cultivo celular y que se expresan en altos niveles durante la infección, sus promotores han sido utilizados para el desarrollo de vectores de expresión.

Manejo integrado de plagas

El control de insectos plaga en el mundo agrícola ha sido históricamente integral, hasta que se generalizó el uso de los insecticidas sintéticos. En ese momento, la mayoría de los entomólogos creyó que el problema de las plagas se iba a resolver de una manera definitiva. Sin embargo, luego de los primeros años posteriores a la síntesis y el uso masivo de los insecticidas químicos, comenzaron a surgir varios problemas entre los que se destacan la resistencia de los insectos a los insecticidas, el surgimiento de plagas secundarias (que antes de la aplicación del insecticida no ocasionaban daños importantes) y el abatimiento de poblaciones de aves y mamíferos que forman parte de las cadenas tróficas. Junto con estos impactos negativos para la estabilidad ecológica se empezaron a detectar perjuicios a la salud humana. De esta forma, con el tiempo comenzó a formarse una conciencia ecológica colectiva y se inició una discusión que dio como resultado la primera conceptualización del manejo integrado de plagas (MIP). El MIP tiene como objetivo proteger al máximo las cosechas, al menor costo y con el mínimo riesgo al hombre, los ecosistemas y la biósfera.

Como sistemas de biocontrol el MIP puede incluir el:

- Control del fitoparásito (control químico, físico, mecánico y legal).
- Manejo de los niveles tróficos (control biológico).
- Manejo del hospedante (control genético, cultural y legal).

El control biológico de plaga puede definirse como la regulación de una especie que ha adquirido la categoría de plaga por otro organismo vivo que es introducido al ambiente de manera exógena. Los insectos, aparte de sus predadores naturales, tienen como enemigos muchos patógenos naturales que incluyen bacterias, hongos, nematodos y virus. Estos microorganismos, cuando son administrados artificialmente, pueden controlar de manera

efectiva la población de la plaga, incluso de manera permanente, si es que la especie patógena logra establecerse de forma estable. El control biológico, además, reduce la exposición de los trabajadores del campo a agroquímicos peligrosos y disminuye la contaminación ambiental y de los alimentos elaborados con estos productos. La utilización de insecticidas microbianos es probablemente el método de control biológico más difundido y económico.

A pesar de que se conocen unas 15 familias diferentes de virus capaces de infectar insectos, los pertenecientes a la familia de los baculovirus han sido los más utilizados como bioinsecticidas (Haase *et al.*, 2015). Estos virus son altamente específicos, con frecuencia limitados a una única especie hospedadora, lo que supone ventajas en relación al nivel de bioseguridad y alteración del nicho ecológico. En un comienzo, los tiempos de acción relativamente lentos, que condujeron a los usuarios (acostumbrados a los insecticidas químicos de rápida acción) a catalogarlos de inefectivos y las dificultades técnicas y económicas limitaron la expansión comercial y la aplicación a gran escala de los baculovirus. Sin embargo, la actitud de desconfianza fue revirtiendo y la aplicación de baculovirus comenzó a ser una alternativa atractiva para la protección de cultivos a largo plazo. Hasta la fecha, el proyecto más exitoso ha sido el implementado en Brasil, con la administración del baculovirus AgMNPV a más de dos millones de hectáreas de cultivos de soja (Moscardi, 1989, 1999). Este proyecto ha revitalizado el interés en los baculovirus como bioinsecticidas y gradualmente muchos países de América Latina han incrementado sus líneas de investigación en el tema (Tabla 1.2) (Cherry & Williams, 2001; Haase *et al.*, 2015; Saxena, 2008).

En nuestro país, durante la campaña 2003 se realizó en el Valle Inferior del Río Negro (Prov. de Río Negro), la primera experiencia de control de la plaga de manzanos y perales “carpocapsa” (*Cydia pomonella*) mediante el uso del granulovirus homónimo (CpGV). El producto utilizado fue Carpovirus Plus, registrado en la Argentina por el INTA (Resolución ex-SAGPyA N°1.269). Durante más de 7 años, se desarrolló un trabajo intensivo y

sostenido de evaluación de la eficacia de control en las distintas regiones productoras de nuestro país. Dados los resultados positivos de su aplicación, su uso sigue en aumento.

Tabla 1.2. Algunos ejemplos de bioinsecticidas basados en baculovirus aplicados en Latinoamérica.

Virus	Hospedador	Cultivo	Producto	País	Empresa productora
<i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Soja	Baculo-soja ¹ , Baculovirus Nitral ² , Coopervirus SC ³ , protégé ⁴ , Multigen ⁵	Brazil	Nova Era Biotecnología Agrícola ¹ , Nitral Urbana ² , COODETEC ³ , Milenia ⁴ , EMBRAPA ⁵
<i>Autographa californica</i> MNPV + <i>Spodoptera albula</i> NPV	<i>Autographa californica</i> <i>Trichoplusia ni</i> <i>Pseudoplusia includens</i> <i>Heliothis virescens</i> <i>Spodoptera exigua</i> <i>Estigmene acrea</i> <i>Plutella xylostella</i>	Alfalfa Cultivo Hortícola	VPN-ULTRA	Guatemala	Agricola El Sol
<i>Spodoptera sunia</i> NPV	<i>Spodoptera</i> spp.	Hortícola	VPN 82	Guatemala	Agricola El Sol
<i>Cydia pomonella</i> GV	<i>Cydia pomonella</i> , <i>C. pomonella</i> , <i>Grapholita molesta</i>	Manzana, Pera, Nogal, Durazno	Carpovirus Plus ⁶ Madex ⁷ Carpovirusine ⁶ Madex Twin ⁷	Argentina ⁶ Argentina ⁷ Chile ⁶ Uruguay ⁷	NPP-Arysta Life Science ⁶ Andermatt Biocontrol ⁷
<i>Erinnyis ello</i> GV	<i>Erinnyis ello</i>	Mandioca ⁸ Caucho ⁹	Baculovirus erinnyis ^{8,9,10}	Brazil ⁸ Colombia ⁹ Colombia ¹⁰	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. ⁸ BioCaribe SA ⁹ CORPOICA ¹⁰
<i>Helicoverpa zea</i> SNPV	<i>Heliothis and</i> <i>Helicoverpa</i> spp.	Maiz, Tomate, Algodón, Tabaco	Gemstar ¹¹ HzNPV CCAB ¹²	Mexico ¹¹ Brazil ¹²	Certis USA ¹¹ AgBiTech Australia ¹²
<i>Helicoverpa armigera</i> NPV	<i>Heliothis and</i> <i>Helicoverpa</i> spp.	Maiz, Tomate, Algodón, Tabaco Hortícola	Diplomata ¹³ Helicovex ¹⁴	Brazil ^{13,14}	Koppert ¹³ Andermatt Biocontrol ¹⁴
<i>Phthorimaea operculella</i> GV	<i>Phthorimaea operculella</i> <i>Tecia solanivora</i>	Papa	Baculovirus Corpoica ¹⁵ PTM baculovirus ^{16,17}	Colombia ¹⁵ Peru ¹⁶ Costa Rica ¹⁷	CORPOICA ¹⁵ SENASA Peru ¹⁶ INTA Costa Rica ¹⁷
<i>Phthorimaea operculella</i> GV + <i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Phthorimaea operculella</i> <i>Tecia solanivora</i> <i>Symmetrischema tangolias</i>	Papa	Matapol Plus ¹⁸ Bacu-Turin ¹⁹	Bolivia ¹⁸ Ecuador ¹⁹	PROINPA Foundation ¹⁸ INIAP, Ecuador ¹⁹
<i>Spodoptera exigua</i> NPV	<i>Spodoptera exigua</i>	Tomate, Pimiento, Berenjena	SPOD-X LC	Mexico	Certis USA SUMMIT AGRO Mexico
<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Maíz, Sorgo	-	Brazil	EMBRAPA (en desarrollo)

(Adaptado de Haase et al., 2015)

Lepidópteros plagas de interés agronómico

Anticarsia gemmatalis

La "oruga de leguminosas", *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), es un lepidóptero noctuido nativo de América. En nuestro país, se encuentra en el Norte, la Mesopotamia y la región Pampeana. Las mayores infestaciones se producen en las provincias de Córdoba y Santa Fé (Iannone, 2007). Esta observación resulta coincidente con la mayor área sembrada de soja, su planta predilecta. Además, puede encontrarse en maní, alfalfa, poroto y otras plantas diferentes a leguminosas que incluyen algodón, trigo, lino y algunas hortalizas. Esta plaga es infectada por un nucleopoliedrovirus (AgMNPV), el cual es ampliamente utilizado como bioinsecticida en Brasil y Paraguay, habiéndose realizado aplicaciones experimentales en Argentina, Bolivia y Uruguay (Levy *et al.*, 2007; Moscardi, 1999; Oliveira *et al.*, 2006).

Autographa californica

El "gusano gris de alfalfa", *Autographa californica* (Lepidoptera: Noctuidae), es un lepidóptero noctuido ampliamente distribuido en Estados Unidos y el norte de México. Las larvas se alimentan de hojas de más de 50 géneros de plantas herbáceas y arbustos leñosos; las legumbres como la alfalfa y el trébol son huéspedes comunes (Pogue, 2005). El virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) posee un amplio espectro de infección. Este virus ha sido aislado del gusano gris de la alfalfa en la década del 70 y se han registrado 31 especies del orden *Lepidoptera* susceptibles al mismo (Granados & Federici, 1986; Vail *et al.*, 1971). A su vez, la gran mayoría de los estudios detallados sobre biología del baculovirus se han centrado en este baculovirus deviniendo como virus modelo y como vector de expresión. Esto ha sido estimulado por su capacidad de replicar en células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (Vaughn *et al.*, 1977) y

Trichoplusia ni (Hink, 1970). Posteriormente, el desarrollo del sistema bÁcrido, que permitiÓ la producci3n de baculovirus recombinantes mediante la transposici3n de plÁsmidos recombinantes en el genoma de AcMNPV incorporado en un cromosoma bacteriano artificial, habilit3 la manipulaci3n del genoma de AcMNPV en bacterias (Luckow *et al.*, 1993). La adaptaci3n de esta tecnologÍa para realizar deleciones y mutaciones dirigidas a genes esenciales de los baculovirus proporcion3 un m3todo para el estudio de la biologÍa de AcMNPV (Je *et al.*, 2001).

Spodoptera frugiperda

La "oruga cogollera", *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), es una especie polifit3faga nativa del tr3pico, con amplia distribuci3n geogrÁfica, desde Argentina y Chile, hasta el sur de Estados Unidos. En maÍz, prefiere hojas y brotes tiernos, especialmente los cogollos. Entre los cultivos frecuentemente atacados se destacan el algod3n, el sorgo, la soja, el girasol y el maÍz (PolanÍa *et al.*, 2007). Es la plaga principal del noroeste y noreste argentino (Willink *et al.*, 1994). Los maÍces de siembra tardÍa son los mÁs afectados y se requieren hasta 3 aplicaciones de insecticidas para controlar la plaga (Sosa, 2002). Las larvas son activas de noche y de dÍa, atacan a la planta de maÍz actuando como cortadoras, defoliadoras y cogolleras segÚn el momento de su desarrollo, produciendo daÑos directos cuando se alimentan de los granos de la espiga (Willink *et al.*, 1994).

Baculovirus recombinantes para la expresi3n de proteÍnas heter3logas

Dado que los genes *polh* y *p10* no son necesarios para la transmisi3n de baculovirus en cultivo celular y que poseen altos niveles de expresi3n durante etapas tardÍas de la infecci3n, sus promotores han sido ampliamente utilizados para el desarrollo de vectores de expresi3n. La regi3n codificante de estos genes puede ser reemplazada por genes ex3genos o heter3logos que resultan en altos niveles de producci3n de la proteÍna de

interés (Van Oers *et al.*, 2015; Vlak *et al.*, 1990). Se ha desarrollado una variedad de mejoras tecnológicas que simplificaron los procedimientos tediosos para generar y aislar los virus recombinantes y convirtieron al sistema de expresión basado en baculovirus en un método seguro y de fácil manipulación (Fabre *et al.*, 2019; Haase *et al.*, 2015; Kost *et al.*, 2005). Además, los baculovirus han sido utilizados para el desarrollo de estrategias basadas en la exposición de péptidos y proteínas de interés en la superficie viral, así como para la transducción de células de mamífero utilizando diferentes construcciones génicas. Estos tópicos serán desarrollados más adelante.

Vectores virales para la inmunización y terapia génica

De manera paralela al control biológico, se ha estudiado el segundo fenotipo en los baculovirus: los viriones brotantes. La capacidad de los mismos de replicar en cultivo celular de insectos (Goodwin *et al.*, 1970), convirtió a los baculovirus en una herramienta eficaz de ingeniería genética para el estudio y desarrollo de un sistema de expresión de proteínas recombinantes (del inglés, *baculovirus expression vector system* BEVS) (Smith *et al.*, 1983). En la década de 1990 se demostró que el genoma baculoviral es capaz de transducir células de mamífero y expresar de forma transitoria las proteínas recombinantes que se encuentran bajo la influencia de un promotor fuerte y activo en estas células, como, por ejemplo, el promotor del gen temprano *ie1* del citomegalovirus humano (CMV-IE), entre otros. El genoma viral en la célula de mamífero es degradado en los días sucesivos y es incapaz de integrarse en el genoma celular exceptuando la condición en la que se aplica externamente una presión de selección (Boyce & Bucher, 1996; Carbonell *et al.*, 1985). Actualmente se reconoce la capacidad de los baculovirus de transducir líneas celulares de vertebrados tanto *in vivo* como *in vitro* existiendo una lista de células permisivas muy extensa (Kost & Condreay, 2002), incluyendo células madres (Airenne *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2010). El virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) es el más utilizado en el ámbito de la terapia génica, con un genoma de 134 kpb,

con una nucleocápside de un tamaño de 15-40 x 200-300 nm y con capacidad de transducir un amplio espectro de células de mamífero (Makkonen *et al.*, 2015; Makkonen *et al.*, 2013). Es importante señalar que el mecanismo exacto de transducción en estas células se continúa investigando. Sin embargo, para ciertos tipos celulares la eficiencia de transducción es baja comparada con otros vectores virales, es por ello, que se han diseñado estrategias para mejorar esta capacidad en los baculovirus. Una de ellas, plantea el uso del virus de la estomatitis vesicular (VSV) un rhabdovirus oncolítico cuya glicoproteína G (VSV G) ha sido ampliamente utilizada para pseudotipar virus terapéuticos (Kolangath *et al.*, 2014). En los próximos capítulos se ahondará en este tema.

En cuanto a la bioseguridad de los baculovirus como bioinsecticidas y vectores virales en seres humanos se realizaron estudios en los cuales se incorporan cuerpos de oclusión (OB) en la dieta alimenticia de personas voluntarias y se demostró que no existe una respuesta inflamatoria, o alergia o efectos secundarios luego de 5 días post ingestión (Heimpel *et al.*, 1973). Estos estudios se han extendido a diferentes modelos animales para evaluar la citotoxicidad, irritación de la piel, entre otros, y en todos los casos no se observaron respuestas adversas (Jin *et al.*, 2008; Kost & Condreay, 1999). Esta evidencia, sumada al hecho de que hasta la fecha no se ha reportado la infección en algún organismo fuera del filo *Arthropoda* es que se los clasifica como un producto bioseguro para su aplicación en el desarrollo de bioinsecticidas, vacunas de DNA, inmunoterapia (Provenge®), y terapia génica (Fabre *et al.*, 2019; Haase *et al.*, 2015). Actualmente este sistema es considerado una de las herramientas más eficientes para el desarrollo de ciencia básica y para las grandes empresas farmacéuticas en el área de vacunología y terapia génica. A la fecha, existen nueve productos comercializados internacionalmente desarrollados con la tecnología BEVS y muchos más se encuentran en la fase de desarrollo y/o ensayos clínicos (Cox, 2012; Fabre *et al.*, 2019).

El presente trabajo doctoral plantea generar estrategias y avances para el diseño y aplicación del sistema BEVS. Nos centraremos en mejorar la plataforma de células de insecto mediante modificaciones genéticas que permitan complementar en *trans* a los baculovirus salvajes con proteínas recombinantes y, de esta manera, obtener virus decorados en su superficie. A su vez, también generar células de insecto que permitan mejorar el proceso de purificación para favorecer el estudio y producción de proteínas recombinantes, más específicamente para el desarrollo de vacunas VLP (del inglés, *Virus Like Particles*). Los resultados de este trabajo podrían además tener implicancia en otros campos relacionados con la producción de proteínas en cristales para su estabilización o para su acción con fines terapéuticos, permitiendo la liberación sostenida de la proteína fusionada durante largos períodos de tiempo dentro de un organismo.

Bibliografía

- Ackermann, H.-W., & Smirnov, W. A. (1983). A morphological investigation of 23 baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41(3), 269–280.
[https://doi.org/10.1016/0022-2011\(83\)90244-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90244-6)
- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Balinsky, C. A., Moser, B. A., Becnel, J. J., Rock, D. L., & Kutish, G. F. (2001). Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. *Journal of Virology*, 75(22), 11157–11165. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.11157-11165.2001>
- Airenne, K. J., Makkonen, K.-E., Mähönen, A. J., & Ylä-Herttuala, S. (2010). In vivo application and tracking of baculovirus. *Current Gene Therapy*, 10(3), 187–194.
<https://doi.org/10.2174/156652310791321206>
- Beck, S. D. (1997). An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. 94(June), 6977–6982.
- Bideshi, D. K., Bigot, Y., & Federici, B. A. (2000). Molecular characterization and phylogenetic analysis of the *Harrisina brillians* granulovirus granulin gene. *Archives of Virology*, 145(9), 1933–1945. <https://doi.org/10.1007/s007050070067>
- Blissard, G. W., & Theilmann, D. A. (2018). Baculovirus Entry and Egress from Insect Cells. *Annual Review of Virology*, 5(1), 113–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043356>
- Boyce, F. M., & Bucher, N. L. (1996). Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6), 2348–2352. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2348>
- Braunagel, S. C., Hong, T., Summers, M. D., Russell, D. H., & Summers, M. D. (1997). N-terminal sequences from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope, intranuclear microvesicles and the envelope of occlusion derived virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(8), 4050–4055. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.4050>
- Braunagel, S. C., & Summers, M. D. (1994). *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: Structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. *Virology*, 202(1), 315–328. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1348>
- Braunagel, Sharon C, Guidry, P.A., Rosas-Acosta, G., Engelking, L., & Summers, M. D. (2001).

- Identification of BV/ODV-C42, an *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus orf101-Encoded Structural Protein Detected in Infected-Cell Complexes with ODV-EC27 and p78/83. *Journal of Virology*, 75(24), 12331–12338. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.12331>
- Braunagel, Sharon C., & Summers, M. D. (2007). Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope. *Current Drug Targets*, 8(10), 1084–1095. <https://doi.org/10.2174/138945007782151315>
- Bulach C.A.; Zaia, A.; L., B.; Tribe, D. E., D. M.; Kumar. (1999). Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. *J. Invertebr. Pathol.*, 73(1), 59–73.
- Carbonell, L. F., Klowden, M. J., & Miller, L. K. (1985). Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *Journal of Virology*, 56(1), 153–160.
- Carpentier, D. C. J., Griffiths, C. M., & King, L. A. (2008). The baculovirus P10 protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus forms two distinct cytoskeletal-like structures and associates with polyhedral occlusion bodies during infection. *Virology*, 371(2), 278–291. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.09.043>
- Chateigner, A., Bézier, A., Labrousse, C., Jiolle, D., Barbe, V., & Herniou, E. A. (2015). Ultra deep sequencing of a baculovirus population reveals widespread genomic variations. *Viruses*, 7(7). <https://doi.org/10.3390/v7072788>
- Cherry, A., & Williams, T. (2001). *Control de insectos plaga mediante los baculovirus*. En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas*. P. Caballero, M. López Ferber y T. Williams (eds.), pp. 389-450. *Phytoma, España*.
- Chisholm, D. J., & Henner, G. E. (1988). Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. *J. Virol.*, 62(9), 3193–3200.
- Cox, M. M. J. (2012). Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*, 30(10), 1759–1766. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.016>
- Crouch, E. A., & Passarelli, A. L. (2002). Genetic Requirements for Homologous Recombination in *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 76(18), 9323–9334. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.18.9323-9334.2002>
- Deng, F., Wang, R., Fang, M., Jiang, Y., Xu, X., Wang, H., Chen, X., Arif, B. M., Guo, L., Wang, H., & Hu, Z. (2007). Proteomics analysis of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleo-

- polyhedrovirus identified two new occlusion-derived virus-associated proteins, HA44 and HA100. *Journal of Virology*, 81(17), 9377–9385. <https://doi.org/10.1128/JVI.00632-07>
- DePamphilis, M. L. (1993). Origins of DNA replication that function in eukaryotic cells. *Curr. Opin. Cell Biol*, 5, 434–441.
- Derksen, R.R., A. C. G. y G. (1988). Alteration of a Lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology*, 167, 242–250.
- Drezen, J.-M., Gauthier, J., Josse, T., Bézier, A., Herniou, E., & Huguet, E. (2017). Foreign DNA acquisition by invertebrate genomes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 147, 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.09.004>
- Engelhard, L.N.W.; Washburn, J. O.; V., L. E. ,. E. K. ;. Kam-Morgan. (1994). The insect tracheal system: A conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *PNAS USA*, 91(8), 3224–3227.
- Entwistle, P. F., Adams, P. H. W., & Evans, H. F. (1978). Epizootiology of a nuclear polyhedrosis virus in European spruce sawfly (*Gilpinia hercyniae*): The rate of passage of infective virus through the gut of birds during cage tests. *Journal of Invertebrate Pathology*, 31(3), 307–312. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(78\)90221-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(78)90221-5)
- Fabre, M. L., Arrias, P. N., Masson, T., Ferrelli, M. L., & Romanowski, V. (2019). *Emerging and reemerging viral pathogens* (M. Ennaji, Ed.; Vol. 2). Elsevier.
- Falcon, L. A., & Hess, R. T. (1985). Electron microscope observations of multiple occluded virions in the granulosis virus of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 45(3), 356–359. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(85\)90115-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(85)90115-6)
- Felberbaum, R. S. (2015). The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnology Journal*, 10(5), 702–714. <https://doi.org/10.1002/biot.201400438>
- Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., & Rubinstein, M. (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(18), 7306–7311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214441110>
- Fraser, M. J. (1986). Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *J. Ultrastruct. Mol. Struct.*

- Res. 95, 189–195.
- Friesen, P. D. (1997). Regulation of baculovirus early gene expression. In *The Baculoviruses*. Ed. L. K. Miller. Plenum Press. New York, 141–170.
- Gallo, L. G., Corsaro, B. G., Hughes, P. R., & Granados, R. R. (1991). In vivo enhancement of baculovirus infection by the viral enhancing factor of a granulosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 58(2), 203–210.
[https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90064-W](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90064-W)
- Goodwin, R. H., Vaughn, J. L., Adams, J. R., & Louloudes, S. J. (1970). Replication of a nuclear polyhedrosis virus in an established insect cell line. *Journal of Invertebrate Pathology*, 16(2), 284–288.
- Granados, R. R., & Federici, B. A. (eds). (1986). *The biology of baculoviruses. Volume 1. Biological Properties and Molecular Biology*, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Gross, C. H., Russell, R. L., & Rohrmann, G. F. (1994). *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: Analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure. *J Gen Virol*, 75 (Pt 5), 1115–1123.
- Guan, Z., Zhong, L., Li, C., Wu, W., Yuan, M., & Yang, K. (2016). The *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus ac54 Gene Is Crucial for Localization of the Major Capsid Protein VP39 at the Site of Nucleocapsid Assembly. *Journal of Virology*, 90 (8), 4115–4126.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02885-15>
- Haase, S., McCarthy, C. B., Ferrelli, M. L., Pidre, M. L., Sciocco-Cap, A., & Romanowski, V. (2015). Development of a recombination system for the generation of occlusion positive genetically modified *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Viruses*, 7(4), 1599–1612.
<https://doi.org/10.3390/v7041599>
- Haase, S., Sciocco-Cap, A., & Romanowski, V. (2015). Baculovirus insecticides in Latin America: Historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*, 7(5), 2230–2267.
<https://doi.org/10.3390/v7052230>
- Harrison, R. L., Herniou, E. A., Jehle, J. A., Theilmann, D. A., Burand, J. P., Becnel, J. J., Krell, P. J., van Oers, M. M., Mowery, J. D., Bauchan, G. R., & Consortium, I. R. (2018). ICTV virus taxonomy profile: Baculoviridae. *Journal of General Virology*, 99(10), 1185–1186.
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.001107>

- Hashimoto, Y., Corsaro, B. G., & Granados, R. R. (1991). Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis virus. *Journal of General Virology*, 72(11), 2645–2651. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-11-2645>
- Hefferon, K. L., Oomens, A. G. P., Monsma, S. A., Finnerty, C. M., & Blissard, G. W. (1999). Host Cell Receptor Binding by Baculovirus GP64 and Kinetics of Virion Entry. *Virology*, 258(2), 455–468. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9758>
- Heimpel, A. M., Thomas, E. D., Adams, J. R., & Smith, L. J. (1973). The Presence of Nuclear Polyhedrosis Viruses of *Trichoplusia ni* on Cabbage from the Market Shelf. *Environmental Entomology*, 2(1), 72–75. <https://doi.org/10.1093/ee/2.1.72>
- Heldens, J. G., Broer, R., Zuidema, D., Goldbach, R. W., & Vlak, J. M. (1997). Identification and functional analysis of a non-hr origin of DNA replication in the genome of *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *The Journal of General Virology*, 78 (Pt 6), 1497–1506. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-6-1497>
- Herniou, E. a, & Jehle, J. a. (2007). Baculovirus phylogeny and evolution. *Current Drug Targets*, 8(10), 1043–1050. <https://doi.org/10.2174/138945007782151306>
- Herniou, B. M., Becnel, J. J., G.W., Blissard, Bonning, B., Harrison, R., J.A., J., Theilmann, D. A., Vlak, J. M., & Arif, E. A. (2011). Baculoviridae. In *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. Eds. San Diego: Elsevier Academic Press., 163–173.
- Herniou, E A, Luque, T., Chen, X., Vlak, J. M., Winstanley, D., Cory, J. S., & O'Reilly, D. R. (2001). Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. *Journal of Virology*, 75 (17), 8117–8126. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.17.8117>
- Herniou, Elisabeth A., Olszewski, J. A., Cory, J. S., & O'Reilly, D. R. (2003). The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annual Review of Entomology*, 48, 211–234. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112756>
- Herniou, Elisabeth A., Olszewski, J. A., O'Reilly, D. R., & Cory, J. S. (2004). Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *Journal of Virology*, 78(7), 3244–3251. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.7.3244-3251.2004>
- Hink, W. F. (1970). Established Insect Cell Line from the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni*. *Nature*,

- 226(5244), 466–467. <https://doi.org/10.1038/226466b0>
- Ho, Y.C., Chung, Y.C., Hwang, S.M., Wang, K.C., & Hu, Y.C. (2005). Transgene expression and differentiation of baculovirus-transduced human mesenchymal stem cells. *The Journal of Gene Medicine*, 7(7), 860–868. <https://doi.org/10.1002/jgm.729>
- Hoopes, R.R. & Rohrmann, G. F.(1991). In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *PNAS USA*, 88, 4513–4517.
- Hoover, K., Humphries, M. A., Gendron, A. R., & Slavicek, J. M. (2010). Impact of viral enhancin genes on potency of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus in *L. dispar* following disruption of the peritrophic matrix. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(2), 150–152. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.02.008>
- Hostetter, D. L., & Bell, M. R. (1985). *Natural dispersal of baculoviruses in the environment*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8609050>.
- Hotchkin, P. G. (1981). Comparison of Virion Proteins and Granulin From a Granulosis Virus Produced in Two Host Species. *J. Invertebr. Pathol.*, 38(2), 303–304.
- Hou, D., Zhang, L., Deng, F., Fang, W., Wang, R., Liu, X., Guo, L., Rayner, S., Chen, X., Wang, H., & Hu, Z. (2013). Comparative Proteomics Reveal Fundamental Structural and Functional Differences between the Two Progeny Phenotypes of a Baculovirus. *Journal of Virology*, 87(2), 829–839. <https://doi.org/10.1128/JVI.02329-12>
- Huang, J., & Levin, J. (1999). Identification and functional analysis of a putative non-hr origin of DNA replication from the *Spodoptera littoralis* type B multiple nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.*, 80, 2263–2274.
- Hughes, K. M., & Addison, R. B. (1970). Two nuclear polyhedrosis viruses of the Douglas-fir tussock moth. *Journal of Invertebrate Pathology*, 16(2), 196–204. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(70\)90060-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(70)90060-1)
- Iannone, N. (2007). ALERTA! Plagas de Soja. Editado por C. s. d. Alerta: INTA Pergamino.
- Je, Y. H., Chang, J. H., Choi, J. Y., Roh, J. H., Jin, B. R., O'Reilly, D. R., & Kang, S. K. (2001). A defective viral genome maintained in *Escherichia coli* for the generation of baculovirus expression vectors. *Biotechnology Letters*, 23(8), 575–582.
- Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann,

- D. A., Thiem, S. M., & Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of Baculoviruses : A proposal for revision. *Arch Virol*, *151*(7), 1257–1266.
[\]https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6](https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6)
- Jiang, L., & Xia, Q. (2014). The progress and future of enhancing antiviral capacity by transgenic technology in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *48*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.02.003>
- Jiang, Y., Deng, F., Rayner, S., Wang, H., & Hu, Z. (2009). Evidence of a major role of GP64 in group I alphabaculovirus evolution. *Virus Research*, *142*(1–2), 85–91.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.01.015>
- Jin, R., Lv, Z., Chen, Q., Quan, Y., Zhang, H., Li, S., Chen, G., Zheng, Q., Jin, L., Wu, X., Chen, J., & Zhang, Y. (2008). Safety and Immunogenicity of H5N1 influenza vaccine based on baculovirus surface display system of *bombyx mori*. *PLoS ONE*, *3*(12), 1–7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003933>
- Kalmakoff, J., & Crawford, A. M. (1982). *Enzootic virus control of *Wiseana* spp. In the pasture environment.* (Edouard Kurstak).
- Katsuma, S., & Kokusho, R. (2017). A Conserved Glycine Residue Is Required for Proper Functioning of a Baculovirus VP39 Protein. *Journal of Virology*, *91*(6).
<https://doi.org/10.1128/JVI.02253-16>
- Kirkpatrick, B. A., Washburn, J. O., Engelhard, E. K., & Volkman, L. E. (1994). Primary infection of insect tracheae by *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, *203*(1), 184–186. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1472>
- Kolangath, S. M., Basagoudanavar, S. H., Hosamani, M., Saravanan, P., & Tamil Selvan, R. P. (2014). Baculovirus mediated transduction: Analysis of vesicular stomatitis virus glycoprotein pseudotyping. *VirusDisease*, *25*(4), 441–446. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0229-5>
- Kool, M., Ahrens, C. H., Goldbach, R. W., Rohrmann, G. F., & Vlak, J. M. (1994). Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(23), 11212–11216.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.23.11212>
- Kool, Marcel, Ahrens, C. H., Vlak, J. M., & Rohrmann, G. F. (1995). Replication of baculovirus DNA. *Journal of General Virology*, *76*(9), 2103–2118. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-9-2103>

- Kost, T A, & Condreay, J. P. (1999). Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 428–433.
- Kost, T A, Condreay, J. P., & Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 23(5), 567–575.
<https://doi.org/10.1038/nbt1095>
- Kost, Thomas A., & Condreay, J. P. (2002). Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends in Biotechnology*, 20(4), 173–180.
[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01911-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01911-4)
- Lee, P. J., & Krell, H. Y. (1994). Reiterated DNA fragments in defective genomes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus are competent for AcMNPV-dependent DNA replication. *Virology*, 202, 418–429.
- Leisy, D. J., & Rohrmann, G. F. (1993). Characterization of the replication of plasmids containing hr sequences in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Virology*, 196, 722–730.
- Lepore, L. S., Roelvink, P. R., & Granados, R. R. (1996). Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J Invertebr Pathol*, 68(2), 131–140. <https://doi.org/10.1006/jipa.1996.0070>
- Levy, S. M., Falleiros, Â. M. F., Moscardi, F., & Gregório, E. A. (2007). Susceptibility/resistance of *Anticarsia gemmatalis* larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV): Structural study of the peritrophic membrane. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(2), 183–186.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.04.007>
- Li, Y., Shen, S., Hu, L., Deng, F., Vlak, J. M., Hu, Z., Wang, H., & Wang, M. (2018). The Functional Oligomeric State of Tegument Protein GP41 Is Essential for Baculovirus Budded Virion and Occlusion-Derived Virion Assembly. *Journal of Virology*, 92(12).
<https://doi.org/10.1128/JVI.02083-17>
- Lin, C.Y., Lu, C.H., Luo, W.Y., Chang, Y.H., Sung, L.Y., Chiu, H.Y., & Hu, Y.C. (2010). Baculovirus as a gene delivery vector for cartilage and bone tissue engineering. *Current Gene Therapy*, 10(3), 242–254.
- López, M. G., Diez, M., Alfonso, V., & Taboga, O. (2018). Biotechnological applications of occlusion bodies of Baculoviruses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 10–10.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9130-2>

- Lu, A., & Miller, L. K. (1995). Differential requirements for baculovirus late expression factor genes in two cell lines. *Journal of Virology*, 69(10), 6265–6272.
- Lu, L. K., & Miller, A. (1995). The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication. *J. Virol.*, 69, 975–982.
- Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F., & Olins, P. O. (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 67(8), 4566–4579.
- Lung, M., Vlak, J. M., Blissard, G. W., Westenberg O. (2002). Pseudotyping *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV): F proteins from group II NPVs are functionally analogous to AcMNPV GP64. *J. Gen. Virol.*, 76, 5729–5736.
- Makkonen, Kaisa-Emilia, Airene, K., & Ylä-Herttulala, S. (2015). Baculovirus-mediated Gene Delivery and RNAi Applications. *Viruses*, 7(4), 2099–2125. <https://doi.org/10.3390/v7042099>
- Makkonen, K.-E., Turkki, P., Laakkonen, J. P., Ylä-Herttulala, S., Marjomaki, V., & Airene, K. J. (2013). 6-O- and N-Sulfated Syndecan-1 Promotes Baculovirus Binding and Entry into Mammalian Cells. *Journal of Virology*, 87(20), 11148–11159. <https://doi.org/10.1128/JVI.01919-13>
- Mangor, J. T., Monsma, S. A., Johnson, M. C., & Blissard, G. W. (2001). A GP64-Null Baculovirus Pseudotyped with Vesicular Stomatitis Virus G Protein. *Journal of Virology*, 75(6), 2544–2556 <https://doi.org/10.1128/jvi.75.6.2544-2556.2001>
- McCarthy, C. B., & Theilmann, D. A. (2008). AcMNPV ac143 (odv-e18) is essential for mediating budded virus production and is the 30th baculovirus core gene. *Virology*, 375(1), 277–291. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.01.039>
- Miele, S. A. B., Garavaglia, M. J., Belaich, M. N., & Ghiringhelli, P. D. (2011). Baculovirus: Molecular insights on their diversity and conservation. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2011, 379424. <https://doi.org/10.4061/2011/379424>
- Milks, M. L., Washburn, J. O., Willis, L. G., Volkman, L. E., & Theilmann, D. A. (2003). Deletion of pe38 attenuates AcMNPV genome replication, budded virus production, and virulence in *Heliothis virescens*. *Virology*, 310(2), 224–234. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00143-0](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00143-0)

- Moscardi, F. (1989). Use of viruses for pest control in Brazil: The case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz.*, 84, 51–56.
- Moscardi, F. (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.*, 44, 257–289.
- Nikolic, J., Belot, L., Raux, H., Legrand, P., Gaudin, Y., & A. Albertini, A. (2018). Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein. *Nature Communications*, 9(1), 1029. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03432-4>
- Ohba, y Tanada, Y., M. (1983). A synergistic factor enhances the in vitro infection of an insect baculovirus. *Naturwissenschaften*, 70(12), 613–614.
- Oliveira, J. V., Wolff, J. L., Garcia-Maruniak, A., Ribeiro, B. M., de Castro, M. E., de Souza, M. L., Moscardi, F., Maruniak, J. E., & Zanotto, P. M. (2006). Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol*, 87(Pt 11), 3233–3250. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82161-0>
- Oomens, A. G., & Blissard, G. W. (1999). Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 254(2), 297–314. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9523>
- Oppenheimer, D. I., & Volkman, L. E. (1997). Evidence for rolling circle replication of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus genomic DNA. *Archives of Virology*, 142(10), 2107–2113. <https://doi.org/10.1007/s007050050229>
- Pearson, M., Bjornson, R., Ahres, C., & Rohrmann, G. F. (1993). Identification and characterization of a putative origin of DNA replication in the genome of a baculovirus pathogenic for *Orygia pseudotsugata*. *M.*, 197, 715–725.
- Pearson, M. N., & Rohrmann, G. F. (2002). Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the Baculoviridae, Orthomyxoviridae, and Metaviridae (insect retrovirus) families. *Journal of Virology*, 76(11), 5301–5304. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5301-5304.2002>
- Perera, O. P., Valles, S. M., Green, T. B., White, S., Strong, C. A., & Becnel, J. J. (2006). Molecular analysis of an occlusion body protein from *Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus (CuniNPV). *Journal of Invertebrate Pathology*, 91(1), 35–42.

- <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.10.009>
- Pogue, M. G. (2005). The Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae) of Great Smoky Mountains National Park. *Zootaxa*, 1032(1), 1–28. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1032.1.1>
- Polanía, I. Z. de, Arévalo, H. A., & Mejía, R. (2007). El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 1(1), 103–113. <https://doi.org/10.17584/rcch.2007v1i1.1149>
- Pullen, P. D., & Friesen, S. S. (1995). The CAGT motif functions as an initiator element during early transcription of the baculovirus transregulator ie-1. *J. Virol.*, 69, 3575–3583.
- Quant-Russell, R. L., Pearson, M. N., Rohrmann, G. F., & Beaudreau, G. S. (1987). Characterization of baculovirus p10 synthesis using monoclonal antibodies. *Virology*, 160(1), 9–19. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90038-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90038-9)
- Raza, F., McGouran, J. F., Kessler, B. M., Possee, R. D., & King, L. A. (2017). Phosphorylation Induces Structural Changes in the *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus P10 Protein. *Journal of Virology*, 91(13). <https://doi.org/10.1128/JVI.00002-17>
- Rohrmann, G. F. (2019). *Baculovirus Molecular Biology*, 4th Edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK543458/>.
- Rohrmann, G. F., Pearson, M. N., Bailey, T. J., Becker, R. R., & Beaudreau, G. S. (1981). N-Terminal polyhedrin sequences and occluded Baculovirus evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 17(6), 329–333. <https://doi.org/10.1007/BF01734354>
- Romanowski, V., & Ghiringhelli, P. D. (2001). Biología molecular de baculovirus: Replicación y regulación de la expresión génica. *Universidad Pública de Navarra, Pamplona, España* (pp. 119–142).
- Saxena, H. (2008). Microbial Management of Crop – Pest. *Journal of Biopesticides*, 1, 32–37.
- Singh, C. P., Singh, J., & Nagaraju, J. (2014). Bmnpv-miR-3 facilitates BmNPV infection by modulating the expression of viral P6.9 and other late genes in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 49, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.008>
- Slack, B.M., Lobo de Souza, M., J. M., Ribeiro. (2004). The gp64 locus of the *Anticarsia gemmatalis* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus contains a three prime repair exonuclease homologue and lacks v-cath and ChiA genes. *J. Gen. Virol.*, 85, 211–219.

- Slack, J., & Arif, B. M. (2007). The baculoviruses occlusion-derived virus: Virion structure and function. *Adv Virus Res*, 69, 99–165. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(06\)69003-9](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(06)69003-9).
- Slavicek, J. M. (2005). Lymantria dispar. *Cell*, 79(16), 10578–10588. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10578>
- Smith, G. E., Summers, M. D., & Fraser, M. J. (1983). *Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector*.
- Sosa, M. A. (2002). *Estimación de daño de Spodoptera frugiperda Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz con infestación natural en tres fechas de siembra en el noreste santafesino. INTA. EEA Reconquista*.
- Sun, X., Yau, V. K., Briggs, B. J., & Whittaker, G. R. (2005). Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology*, 338(1), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.05.006>
- Theze, J., Bezier, a., Periquet, G., Drezen, J.-M., & Herniou, E. a. (2011). Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 15931-15935. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105580108>
- Vail, P. V., Sutter, G., Jay, D. L., & Gough, D. (1971). Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis viruses of the cabbage looper and alfalfa looper. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17(3), 383–388. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(71\)90013-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(71)90013-9)
- Van Der Wilk, F., Van Lent, J. W. M., & Vlak, J. M. (1987). Immunogold Detection of Polyhedrin, p10 and Virion Antigens in Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus-infected Spodoptera frugiperda Cells. *Journal of General Virology*, 68(10), 2615–2623. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-10-2615>
- Van Oers, M M, Flipsen, J. T., Reusken, C. B., & Vlak, J. M. (1994). Specificity of baculovirus p10 functions. *Virology*, 200(2), 513–523. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1214>
- Van Oers, Monique M., Pijlman, G. P., & Vlak, J. M. (2015). Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: From dark horse to mainstream technology. *Journal of General Virology*, 96 (1), 6–23. <https://doi.org/10.1099/vir.0.067108-0>
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., & McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect spodoptera frugiperda (lepidoptera; noctuidae). *In Vitro*, 13(4), 213–217. <https://doi.org/10.1007/BF02615077>

- Vlak, J. M., Schouten, A., Usmany, M., Belsham, G. J., Klinge-Roode, E. C., Maule, A. J., Van Lent, J. W. M., & Zuidema, D. (1990). Expression of cauliflower mosaic virus gene I using a baculovirus vector based upon the p10 gene and a novel selection method. *Virology*, *179*(1), 312–320. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90299-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90299-7)
- Volkman, L. E., Goldsmith, P. A., Hess, R. T., & Faulkner, P. (1984). Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody: Identification of the target antigen. *Virology*, *133*(2), 354–362. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90401-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90401-X)
- Wang, R. R., Deng, F., Hou, D. H., Zhao, Y., Guo, L., Wang, H. L., & Hu, Z. H. (2010). Proteomics of the *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus Budded Virions. *Journal of Virology*, *84*(14), 7233–7242. <https://doi.org/10.1128/jvi.00040-10>
- Wang, Y., Wang, Q., Liang, C., Song, J., Li, N., Shi, H., & Chen, X. (2008). *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus Nucleocapsid Protein BV/ODV-C42 Mediates the Nuclear Entry of P78/83. *Journal of Virology*, *82*(9), 4554–4561. <https://doi.org/10.1128/JVI.02510-07>
- Washburn, J. O., Kirkpatrick, B. A., & Volkman, L. E. (1995). Comparative pathogenesis of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus in larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*. *Virology*, *209*(2), 561–568. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1288>
- Westenberg, F.; Roode, E. C.; Vlak, J. M.; Zuidema, D.; Veenman. (2004). Functional analysis of the putative fusion domain of the baculovirus envelope fusion protein F. *J. Virol.*, *78*, 6946–6954.
- Whitford M, Stewart S, Kuzio J, Faulkner P. Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol.* 1989;*63*(3):1393-1399. doi:10.1128/JVI.63.3.1393-1399.1989
- Whitford, M., & Faulkner, P. (1992). A structural polypeptide of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus contains O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of Virology*, *66*(6), 3324–3329.
- Willink, E., Osorio, V. M., & Costilla, A. (1994). *Ataque de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) en diferentes fechas de siembra del maíz en Tucumán.* *71*, 69–72.
- Wormleaton J.; Winstanley, D., S.; Kuzio. (2003). The complete sequence of the *Adoxophyes orana* granulovirus genome. *Virology*, *311*(2), 350–365.
- Wu, Y., Liu, G., & Carstens, E. B. (1999). Replication, Integration, and Packaging of Plasmid DNA

- following Cotransfection with Baculovirus Viral DNA. *Journal of Virology*, 73(7), 5473–5480.
- Xu, H.J., Yang, Z.N., Zhao, J.F., Tian, C.H., Ge, J.Q., Tang, X.D., Bao, Y.Y., & Zhang, C.X. (2008). Bombyx mori nucleopolyhedrovirus ORF56 encodes an occlusion-derived virus protein and is not essential for budded virus production. *The Journal of General Virology*, 89(Pt 5), 1212–1219. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83633-0>
- Zanotto B. D.; Maruniak, J. E., P. M. ;. Kessing. (1993). Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: Evolutionary rates and host associations. *J. Invertebr. Pathol.*, 62(2), 147–164.
- Zhang, J., Feng, M., Fan, Y., Xu, W., Zheng, Q., & Wu, X. (2018). Networks of protein-protein interactions among structural proteins of budded virus of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 518, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.02.015>
- Zhao, S., He, G., Yang, Y., & Liang, C. (2019). Nucleocapsid Assembly of Baculoviruses. *Viruses*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/v11070595>

Objetivos

Objetivo general

Desarrollo de herramientas aplicadas al mejoramiento de los baculovirus como plataforma biotecnológica para el cuidado del ambiente y la salud humana. Se planea obtener líneas celulares de insecto monoclonales que expresen proteínas recombinantes para su final incorporación en los dos morfotipos baculovirales: en los cuerpos de oclusión para el desarrollo de bioinsecticidas y en los viriones brotantes para el desarrollo de terapias génicas.

Objetivos específicos

Análisis bioinformático predictivos para evaluar el efecto de la inserción de polipéptidos en la proteína estructural del cuerpo de oclusión PEP (proteína de la envoltura poliédrica) del baculovirus AgMNPV.

Desarrollo de líneas celulares que expresen proteínas quiméricas producto de la fusión de una proteína estructural del cuerpo de oclusión (PEP) de AgMNPV con proteínas candidatas para su uso como bioinsecticida.

Producción de cuerpos de oclusión del baculovirus y evaluación de los parámetros bioinsecticidas de los cuerpos de oclusión que contienen proteínas quiméricas en su estructura.

Desarrollo de líneas celulares que permitan mejorar el sistema de expresión Baculovirus-células de insecto para el desarrollo de vacunas y terapias génicas.

Evaluación de la eficiencia en la transducción de los viriones brotantes mejorados en células tumorales de mamíferos.



Capítulo 2. Estudio bioinformático de la proteína de envoltura del poliedro, PEP

Introducción

Como se ha mencionado en la introducción general, los baculovirus se dividieron en dos grandes grupos según la morfología de sus cuerpos de oclusión (OB): los nucleopoliedrovirus (NPV) y los granulovirus (GV). Actualmente la familia viral es dividida en cuatro géneros: *Alphabaculovirus*, comprendiendo a los NPVs que infectan lepidópteros; *Betabaculovirus*, agrupando a los GV que infectan lepidópteros; *Gammabaculovirus*, con los NPV que infectan himenópteros (avispas); y finalmente, *Deltabaculovirus*, que comprende temporalmente a un único NPV que infecta dípteros (mosquitos). Los OB de los NPV se denominan “poliedros” ya que esta es la forma que adoptan los cristales, mientras que los cristales ovoides de los GV se denominan “gránulos”. Siguiendo con esta nomenclatura, la proteína mayoritaria de los poliedros se conoce como “poliedrina” (POLH) y la de los gránulos como “granulina”, ambas con un peso molecular aproximado de 30 kDa. Una diferencia importante es que los poliedros ocluyen varios virus/viriones derivados de oclusión (ODV), mientras que los gránulos ocluyen un único virión (Jehle *et al.*, 2006; Slack & Arif, 2007). Los baculovirus son especialmente atractivos como agentes de control biológico debido a su estrecho rango de huéspedes y a la larga persistencia en el ambiente. En el suelo y follaje, los baculovirus se encuentran como OB recubiertos por una envoltura denominada envoltura del poliedro (del inglés, *polyhedron envelope* PE). La misma está compuesta de carbohidratos y, principalmente, de la proteína de envoltura de poliedro (PEP) también conocida como PP34, una fosfoproteína de 34 kDa que forma múltiples láminas alrededor de los OB representando aproximadamente un tercio de su volumen (Sajjan & Hinchigeri, 2016). Se observó que la delección del gen que codifica para la proteína PEP (*pep*) genera cuerpos de oclusión con una apariencia porosa, sin la envoltura completa y poco resistentes (Gross *et al.*, 1994; Sajjan & Hinchigeri, 2016) (Figura 2.1). Es importante destacar que las características de la proteína de la envoltura (Chiu *et al.*, 2012) y las razones que subyacen a su papel en la estabilidad de los OB en el ambiente siguen siendo aún desconocidas.

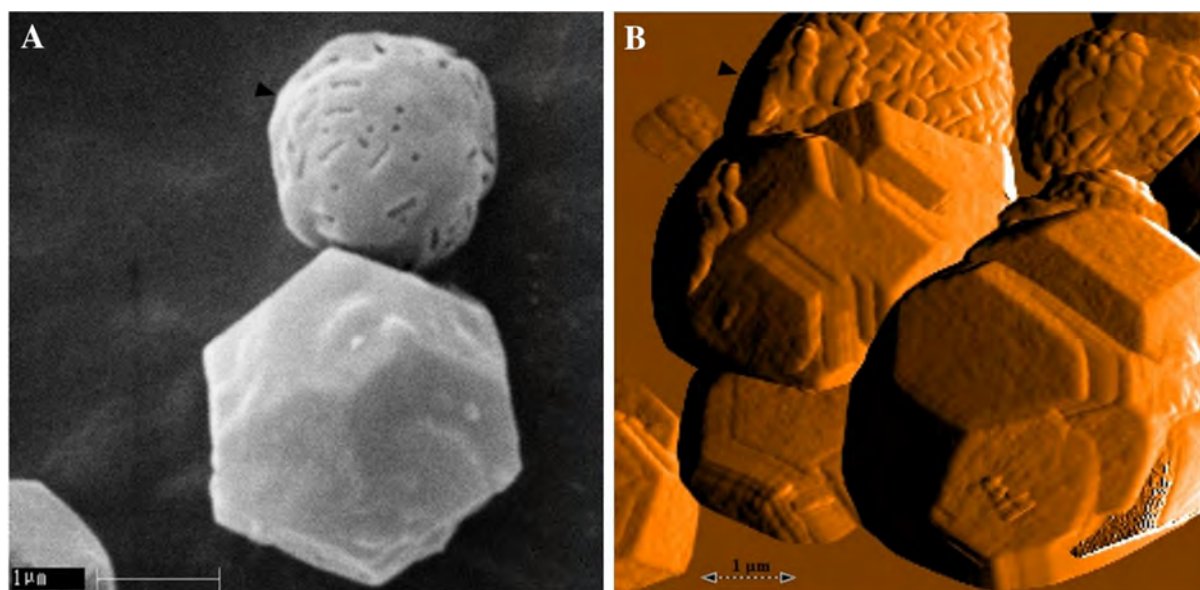


Figura 2.1. Comparación de la estructura de los cuerpos de oclusión con y sin la proteína PEP (flechas negras). Micrografía generada mediante microscopía electrónica de barrido SEM (A) y microscopía de fuerza atómica AFM (B) de los OB de BmMNPV. Adaptada de Sajjan & Hinchigeri, 2016.

Los primeros estudios realizados por Minion y col. (1979), permitieron separar la envoltura poliédrica de las proteínas de la matriz y nucleocápsides. Los análisis espectrofotométricos y la tinción histoquímica demostraron que la envoltura estaba compuesta de carbohidratos; contenía 60,9% (p/p) de hexosa, 29,1% (p/p) de pentosa y cantidades significativas de ácido urónico 8,4% (p/p) y hexosamina 1,6% (p/p), con nulo contenido proteico. Whitt & Manning (1988), fueron los primeros en determinar la existencia de una fosfoproteína en la envoltura del poliedro, la cual podría estar asociada a la poliedrina por enlaces disulfuro que involucran a los residuos cisteína al demostrar que PEP es sensible al tratamiento con el compuesto dodecilsulfato sódico (SDS) y un agente reductor. Además, evaluaron la localización subcelular de esta proteína en el transcurso de la infección, observando que comenzaba a acumularse a las 15 h p.i. y que se localizaba en el núcleo celular. En contraste, Gombart y col. (1989), establecieron por inmunofluorescencia que la proteína PEP se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo (entre las 24 y 60 h p.i.) con un incremento progresivo en el citoplasma durante el ciclo infectivo. El aumento de la marca fluorescente lo asocian a varios factores. Por un lado, a la producción continua de PEP con

una baja tasa en el transporte hacia el núcleo ó por el contrario, al aumento del volumen del núcleo a expensas de una disminución del volumen del citoplasma (concentrando así su contenido) o a una combinación de ambos. Por su parte, Zuidema y col. (1989), demostraron una colocación entre la proteína PEP y los espaciadores electrón-densos (del inglés, *electron-dense spacers*) hipotetizando que estas estructuras podrían ser el nacimiento de la envoltura (MacKinnon *et al.*, 1974). A su vez, dado que estos espaciadores electrón-densos a menudo se encuentran asociados con estructuras fibrilares y estas estructuras contienen a la proteína viral P10, se comenzó a estudiar la relación entre PEP, P10 y la formación de la envoltura del poliedro (Van der Wilk & Vlak, 1987). La proteína viral P10 es un componente abundante en las estructuras fibrilares que se encuentran tanto en el núcleo como en el citoplasma y la cual se expresa en etapas muy tardías de la infección. Lee y col. (1996), analizaron tejidos de larvas infectados y determinaron que existe una continuidad progresiva entre las estructuras fibrilares nucleares, los espaciadores electrón-densos y la envoltura del poliedro en desarrollo. Además, P10 y PEP colocan con estas estructuras lo que sugiere que ambas son requeridas en el ensamblaje de la envoltura. Sin embargo, existe controversia en este punto, ya que se asociaba la colocación a una reactividad cruzada entre el anticuerpo anti-PEP y las estructuras fibrilares y, por consiguiente, sería incorrecto establecer que PEP coloca con estas estructuras (van Lent *et al.*, 1990). Independientemente de la interpretación, en los estudios posteriores en los se utilizaron los anticuerpos anti-P10 y los mismos anticuerpos anti-PEP se confirmó que tanto los espaciadores electrón-densos como las envolturas de poliedro en las larvas de OpMNPV contienen ambas proteínas (Gross *et al.*, 1994). Esas observaciones sugieren que las estructuras fibrilares, donde normalmente se forman los espaciadores electrón-densos, están asociados al ensamblaje de la envoltura del poliedro. Los mutantes en el gen de la poliedrina muestran una desregulación de la síntesis o ensamblaje de proteínas normalmente involucradas en la formación de la envoltura. Sin embargo, la expresión de P10 y PEP no se vio afectada, lo que indica que los eventos de desregulación ocurren solo en la etapa de ensamblaje. Es decir, los espaciadores electrón-densos y las estructuras

fibrilares continúan formándose pero, debido a la falta de poliedros, estas estructuras terminan ensamblandose sobre sí mismas (Lee *et al.*, 1996).

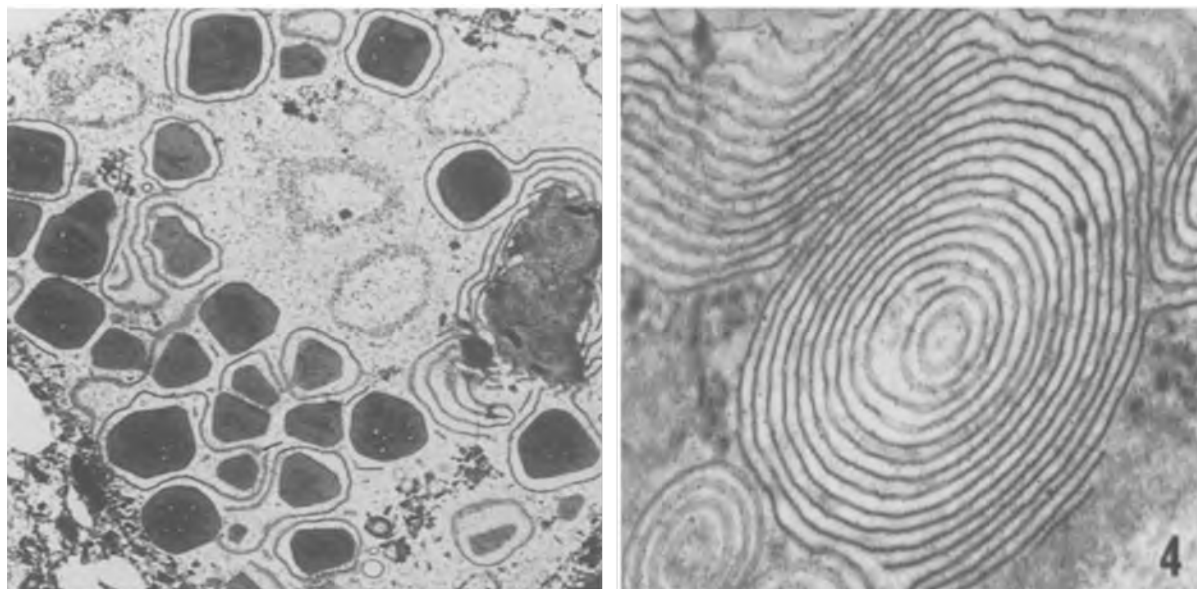


Figura 2.2. Inmunomarcación con partículas de oro coloidal utilizando un microscopio electrónico de transmisión (TEM) en tejidos de la larva de *S. frugiperda* infectadas con AcMNPV salvaje (panel izquierdo) y con el virus AcMNPV(PH⁻) deficiente en la proteína POLH (panel derecho). Adaptado de Lee *et al.*, 1996.

Por otro lado, los estudios respecto a la capacidad insecticida mejorada de poliedros deficientes en la envoltura del poliedro también han generado discordancia. Ignoffo y col. (1995), mostraron que la interrupción del marco de lectura abierto (del inglés, *open reading frame* ORF) del gen *pep* con la incorporación del gen *lacZ* produce virus mutantes con mayor capacidad insecticida en larvas de *Trichoplusia ni*. Este aumento en la infectividad lo explican proponiendo que la presencia de una envoltura porosa, no completamente cerrada, permitiría una rápida liberación de los cuerpos derivados de oclusión (ODV) en el intestino medio de larva, y como consecuencia, el inicio de la infección se vería acelerado en comparación con el virus salvaje. En cambio, Bianchi *et al.*, 2000, no observó diferencias en la velocidad de infección con el virus deficiente en PEP en larvas de *Spodoptera exigua*. Este estudio, sugirió que la eficiencia de la liberación de ODV en el intestino medio larval no

sería un factor limitante en el tiempo de infección. Finalmente, Lua y col. (2003), estudiando la sensibilidad de los OB al tratamiento con SDS determinaron que la integridad de la envoltura del poliedro es vital para la actividad biológica de los mismos, ya que asegura la retención de viriones, que de otra forma serían expulsados y perdidos previo al inicio de la infección. Lo interesante de este trabajo, fue que demostraron que los poliedros producidos *in vitro* son muy sensibles al tratamiento con SDS, con un 80% de los poliedros dañados incluso con exposición al detergente por tiempos cortos (5 minutos). Por el contrario, solo el 20% de los poliedros producidos *in vivo* mostraron evidencia de daño al SDS. Esta diferencia entre fenotipos, no la asocian a posibles mutaciones en el gen de *pep* debido a que el fenotipo se observa en el segundo pasaje en cultivo celular y logra revertirse con un único pasaje en larvas susceptibles. Se requiere mayor investigación para establecer si el cambio se debe a una diferencia en el perfil de expresión de genes virales clave o debido a un entorno intracelular inadecuado, como, por ejemplo, la disponibilidad de azúcares clave para la formación de la envoltura del poliedro.

En la década que siguió, el estudio de la proteína de envoltura pareció estancarse y los esfuerzos fueron direccionados al estudio de la proteína P10 (Carpentier *et al.*, 2008; Graves *et al.*, 2019). Más recientemente se publicaron dos trabajos sobre PEP. Li y col. (2015), quienes determinaron que el extremo N-terminal de PEP es suficiente para la formación de la envoltura del poliedro, y que no es posible complementar un virus deficiente en PEP con proteínas homólogas. Por otro lado, Sajjan & Hinchigeri (2016), analizaron en profundidad la estructura del poliedro por microscopía de fuerza atómica y establecieron que la envoltura ocupa el 30% del OB y que se organiza en múltiples láminas de PEP a las cuales relacionaron directamente con el rol de protección en el ambiente.

Un estudio tridimensional de PEP es esencial para comprender en detalle su función a nivel molecular y proporcionar la información necesaria para el desarrollo de las estrategias experimentales de aplicación encaradas en este trabajo de tesis. La aplicación de técnicas bioinformáticas para este fin es de gran utilidad siendo las técnicas ampliamente

reconocidas en el ámbito científico. En este primer capítulo se analiza a la proteína de envoltura del poliedro PEP del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) perteneciente al género más amplio de la familia *Baculoviridae*, los *Alphabaculovirus*. En este capítulo se busca actualizar la caracterización de la proteína PEP realizando un análisis bioinformático descriptivo que permitirá obtener información de su estructura primaria, secundaria y terciaria con herramientas de libre acceso desarrolladas en los últimos años.

Objetivos específicos

- Análisis de las regiones conservadas por alineamiento múltiple de la proteína de envoltura del poliedro PEP de los *Alphabaculovirus*.
- Análisis filogenético de la proteína de envoltura del poliedro PEP para los géneros *Alpha-* y *Betabaculovirus*.
- Análisis de la estructura primaria y secundaria de PEP de AgMNPV: secuencias de localización transmembrana, la presencia de dominios conservados y secuencias blanco de modificaciones postraduccionales.
- Modelado de la estructura 3D de la proteína de envoltura del poliedro de AgMNPV.

Materiales y métodos

Análisis bioinformático

Alineamiento múltiple

Para la obtención de las secuencias homólogas a la proteína de envoltura del poliedro de AgMNPV se analizaron 47 genomas baculovirales. Se seleccionaron 75 genes, 42 de ellos agrupan las proteínas PEP1, PEP2 y PEP/P10 correspondientes al género de *Betabaculovirus* y 33 a los genes *pep* del género de *Alphabaculovirus* (Tabla S1). Una vez obtenido el conjunto de secuencias homólogas, el alineamiento se construyó con el software ClustalO (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de>, Larkin *et al.*, 2007) con los siguientes parámetros: *multiple alignments; gap opening 10, gap extension 0±05*, matriz de sustitución: BLOSUM62. A continuación, el alineamiento múltiple se curó manualmente usando un editor de secuencias Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009). Por otro lado, los resultados del alineamiento de a pares de las secuencias homólogas de PEP se grafican con un análisis de componentes principales (del inglés, *principal component analysis* PCA) que permite visualizar grupos de proteínas según su similitud de secuencia. Los componentes son generados por una descomposición de vectores propios de la matriz formada a partir de puntuaciones de similitud por pares entre cada par de secuencias. La matriz de sustitución utilizada para el cálculo fue la BLOSUM62 y los cálculos se realizaron en Jalview (<http://www.jalview.org>) y python3.

Análisis filogenético

Se realizó un análisis filogenético de las proteínas PEP. El método estadístico utilizado para la construcción del árbol filogenético es el de máxima verosimilitud (del inglés, *Maximum Likelihood* ML) (Fisher, 1922). Este último selecciona aquel árbol que presenta el mínimo camino con cambios evolutivos (“pasos” evolutivos) que se requieren para explicar una

determinada matriz de caracteres (Farris, 1970). La matriz de sustitución utilizada es la JTT (Jones *et al.*, 1992) y la robustez del árbol se estima por el método no paramétrico *bootstrap* (500 replicas). El programa utilizado para el análisis filogenético fue el MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

Caracterización de los motivos proteicos

Los motivos proteicos son secuencias cortas y conservadas (10-20 aminoácidos) que a su vez forman los dominios proteicos. En la base de datos PROSITE, estos motivos se definen como expresiones regulares o patrones, reglas o perfiles dependiendo del método de predicción utilizado (<https://prosite.expasy.org/>, Sigrist *et al.*, 2013). La base de datos ELM: *Eukaryotic Linear Motif*, fue utilizada para predecir motivos lineales para los sitios de unión a proteínas (<http://elm.eu.org/>, Gouw *et al.*, 2018). Para la localización celular se utilizaron los siguientes predictores: PSORT II (<https://www.psort.org/>), que busca posibles señales de retención de ER o localización nuclear. SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), que predice posibles sitios de escisión de péptidos en la secuencia N-terminal, posibles péptidos señal de la vía secretoria, señales de localización celular, entre otras. La interfaz InterProScan proporciona una búsqueda amigable para la obtención de motivos proteicos, familias de dominios y sitios funcionales ya que integran todas las bases de datos mencionadas anteriormente (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>, Jones *et al.*, 2014) Para visualizar la conservación de cada posición en la secuencia aminoacídica se utiliza el servidor web ConSurf (<https://consurf.tau.ac.il/>). La visualización gráfica permite explorar regiones funcional o estructuralmente importantes, utilizando como entrada un alineamiento múltiple curado y un árbol filogenético.

Análisis de la estructura secundaria

Para la predicción de la estructura secundaria se utilizó PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) que trabaja con los perfiles calculados por PSI-BLAST para predecir la estructura secundaria con una precisión promedio del 76%. Cada predictor

divide la estructura secundaria en tres clases: α -hélice (H), cadena beta o extendido (E) y *coil* (C) (Buchan & Jones, 2019).

Predicción de regiones *coiled-coil*

Los motivos *coiled-coil* poseen un patrón repetido de 7 residuos de aminoácidos hidrofóbicos y polares formando α -hélices anfipáticas exponiendo los aminoácidos hidrofílicos al exterior de la estructura. El patrón se designa *abcdefg*, estando *a* y *d* ocupadas por aminoácidos hidrofóbicos, mientras que *e* y *g* son aminoácidos hidrofílicos (Lupas *et al.*, 1991). Los métodos predictivos para estos motivos se basan en una matriz de peso de posición específica (del inglés, *Position Specific Scoring Matrix* PSSM) con una longitud fija o ventana (28, 21 y 14 residuos); o en un Modelo oculto de Markov (del inglés, *Hidden Markov Model* HMM), sin ventana. Se utilizó el predictor PCOILS con una matriz PSSM, y el predictor Marcoil con una matriz HMM (Lupas, 1997). Todos los programas utilizados se encuentran en la web y son de libre acceso. (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/>).

Predicción de desorden

Las regiones intrínsecamente desordenadas (IDR, del inglés *intrinsically disordered region*) pueden predecirse ya sea utilizando redes neuronales o máquinas de soporte vectorial (del inglés, *support vector machines* SVM). El método SVM es utilizado en el servidor web CSPRITZ (<http://protein.bio.unipd.it/cspritz/>, Walsh *et al.*, 2011), el cual combina la búsqueda por homología de secuencia y la información de la estructura cristalina, aquellas regiones que no se encuentran cristalizadas y analizadas por la técnica de difracción de rayos X.

Modelado de la estructura terciaria

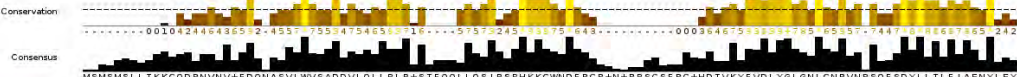
Los predictores de estructura terciaria (3D) de una proteína se basan en el modelado por homología. El programa que se utilizó fue I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), el cual se desarrolla en 4 etapas: identificación del molde, ensamblaje de fragmentos estructurales, refinamiento atómico a nivel estructural e interpretación funcional basado en la estructura. La estimación de la exactitud del modelo se computa como *C-score*. Los valores de *C-score* varían entre -5 y 2; para un plegamiento correcto se espera un *C-score* > -1,5 y un *TM-score* > 0,5 (*TM-score* es una medida de la similitud entre dos estructuras terciarias diferentes) (Roy *et al.*, 2010; Yang & Zhang, 2015).

Resultados

Alineamiento múltiple

La inferencia filogenética a partir de secuencias homólogas es un método eficiente para obtener información sobre la identidad y función de una proteína (Koonin, 2005). La premisa general considera que las secuencias con alta similitud evolucionaron de un antepasado común y, por lo tanto, comparten la misma función. Es importante remarcar que la similitud a veces puede referirse a la secuencia completa o a una parte de la misma; lo último generalmente corresponde a un dominio específico de la proteína. En este trabajo, para el análisis de alineamiento múltiple de secuencias homólogas a la proteína PEP de AgMNPV se seleccionaron homólogos de 33 *Alphabaculovirus* (Figura 2.3). A partir de este análisis, se observó que la secuencia de aminoácidos presenta una gran divergencia, con porcentajes de identidad que varían entre 28 - 98%. Asimismo, se destacan dos regiones con posiciones de aminoácidos conservadas en más del 50% de las secuencias (coloreadas en escala de rojos) y otras muy diversas (sin colorear). En estas últimas regiones donde el alineamiento múltiple es variable se observa una zona en el centro de la secuencia donde la composición de aminoácidos es rica en residuos prolina (P), serina (S) y arginina (R) y cuya longitud de secuencia varía entre los 12 y 50 aminoácidos y otra zona hacia el extremo C-Terminal rica en residuos glicina (G) o alanina (A) con longitudes entre 4 y 10 aminoácidos.

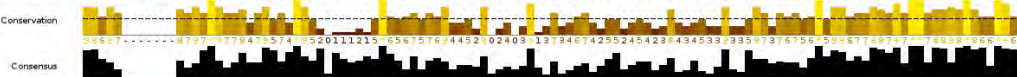
ID	Protein ID	Accession	Sequence	Accession	Sequence
ID_YP_003521.1/2-288	1	1	...MTNPNVNFVFD-ASVNHVDFYFQMSKHLRTFOOLLF	50	...PSKPKKINIGN---PPSCFPSPNINIVYVWDVIAAVVIMSP
ID_NP_932735.1/2-293	1	1	...MTSCMTNNVNFVFD-ASVNHVDFYFQMSKHLRTFOOLLF	50	...PSKPKKINIGN---PPSCFPSPNINIVYVWDVIAAVVIMSP
ID_NP_046285.1/2-297	1	1	...MTNPNVNFVFD-ASVNHVDFYFQMSKHLRTFOOLLF	50	...PSKPKKINIGN---PPSCFPSPNINIVYVWDVIAAVVIMSP
ID_NP_203285.1/2-296	1	1	...MTSCMTNNVNFVFD-ASVNHVDFYFQMSKHLRTFOOLLF	50	...PSKPKKINIGN---PPSCFPSPNINIVYVWDVIAAVVIMSP
ID_AB012255.1/2-289	1	1	...MTSCMTNNVNFVFD-ASVNHVDFYFQMSKHLRTFOOLLF	50	...PSKPKKINIGT---SCFPSPNINIVYVWDVIAAVVIMSP
ID_YP_610997.1/2-289	1	1	...MTSCMVPNNVNFVFD-ASVNHVDFYFQMSKHLRTFOOLLF	50	...SCFPSPNINIVYVWDVIAAVVIMSP
ID_NP_848435.1/2-289	1	1	...MTSCMVPNNVNFVFD-ASVNHVDFYFQMSKHLRTFOOLLF	50	...SCFPSPNINIVYVWDVIAAVVIMSP
ID_NP_047528.1/2-315	1	1	...MKPTNVNFVFD-ASVNLVDIYVYQLKMLLAFQOLLF	50	...PSKPKKINIGG---SC---HNTVYVWDVIAAVVIMSP
ID_YP_00288435.1/2-315	1	1	...MKPTNVNFVFD-ASVNLVDIYVYQLKMLLAFQOLLF	50	...PSKPKKINIGG---SC---HNTVYVWDVIAAVVIMSP
ID_YP_758595.1/2-312	1	1	...MKPTNVNFVFD-ASVNLVDIYVYQLKMLLAFQOLLF	50	...PSKPKKINIGG---SC---HNTVYVWDVIAAVVIMSP
ID_NP_703118.1/2-321	1	1	...MKPTNVNFVFD-ASVNLVDIYVYQLKMLLAFQOLLF	50	...PSKPKKINIGG---SC---HNTVYVWDVIAAVVIMSP
ID_YP_00351786.1/2-310	1	1	1MSAPHNVLTKKIHVGLHLHLAAYVLSADIEVQLLRFAH---	110	1INHGHRKXKWNVRRGGG---GGGSRVDTAFMDLQVYCNHT
ID_NP_047773.1/2-313	1	1	1MSAPHNVLTKKIHVGLHLHLAAYVLSADIEVQLLRFAH---	110	1INHGHRKXKWNVRRGGG---GGGSRVDTAFMDLQVYCNHT
ID_NP_810751.1/2-308	1	1	1MSLTLTKKVDVPIPVYVPTNTYVAGSAGELNLLRFAH---	110	1AIOGFLRHKKWLRRHFVNFNSGCSGRWGGGLIDLGLN
ID_YP_00230661.1/2-309	1	1	1MSLTLTKKVDVPIPVYVPTNTYVAGSAGELNLLRFAH---	110	1AIOGFLRHKKWLRRHFVNFNSGCSGRWGGGLIDLGLN
ID_AA01079.1/2-321	1	1	1MSLTLTKKVDVPIPVYVPTNTYVAGSAGELNLLRFAH---	110	1AIOGFLRHKKWLRRHFVNFNSGCSGRWGGGLIDLGLN
ID_NP_613143.1/2-321	1	1	1MSLTLTKKVDVPIPVYVPTNTYVAGSAGELNLLRFAH---	110	1AIOGFLRHKKWLRRHFVNFNSGCSGRWGGGLIDLGLN
ID_YP_002332745.1/2-333	1	1	1MSLTKKQDINLVVFDQFCVHVSADLHLHLRFAH---	110	1TIOHAPRKKWVDRCPN---HCSHGDIIVLIDLGLN
ID_NP_001651019.1/2-331	1	1	1MSLTKKQDINLVVFDQFCVHVSADLHLHLRFAH---	110	1TIOHAPRKKWVDRCPN---HCSHGDIIVLIDLGLN
ID_YP_249725.1/2-331	1	1	1MSLTKKQDINLVVFDQFCVHVSADLHLHLRFAH---	110	1TIOHAPRKKWVDRCPN---HCSHGDIIVLIDLGLN
ID_YP_001036337.1/2-332	1	1	1MSLTKKQDINLVVFDQFCVHVSADLHLHLRFAH---	110	1TIOHAPRKKWVDRCPN---HCSHGDIIVLIDLGLN
ID_YP_002332589.1/2-325	1	1	1MSLTKKQDINLVVFDQFCVHVSADLHLHLRFAH---	110	1TIOHAPRKKWVDRCPN---HCSHGDIIVLIDLGLN
ID_NP_689236.1/2-335	1	1	1MSLTKKQDINLVVFDQFCVHVSADLHLHLRFAH---	110	1TIOHAPRKKWVDRCPN---HCSHGDIIVLIDLGLN
ID_NP_037806.1/2-335	1	1	1MSLTKKQDINLVVFDQFCVHVSADLHLHLRFAH---	110	1TIOHAPRKKWVDRCPN---HCSHGDIIVLIDLGLN
ID_YP_309002.1/2-331	1	1	1MSLTKKQDINLVVFDQFCVHVSADLHLHLRFAH---	110	1TIOHAPRKKWVDRCPN---HCSHGDIIVLIDLGLN
ID_YP_529719.1/2-341	1	1	1MSLTKKQDINLVVFDQFCVHVSADLHLHLRFAH---	110	1TIOHAPRKKWVDRCPN---HCSHGDIIVLIDLGLN
ID_YP_717652.1/2-338	1	1	1MSLTKKQDINLVVFDQFCVHVSADLHLHLRFAH---	110	1TIOHAPRKKWVDRCPN---HCSHGDIIVLIDLGLN
ID_NP_542747.1/2-340	1	1	1MTFNIVKIKIDVNVVFP-SWTVSVLSEAHLLRFAH---	110	1TADLAPRKKWVDRCPN---HCSHGDIIVLIDLGLN
ID_YP_002274050.1/2-338	1	1	1MTFNIVKIKIDVNVVFP-SWTVSVLSEAHLLRFAH---	110	1TADLAPRKKWVDRCPN---HCSHGDIIVLIDLGLN
ID_YP_002854716.1/2-326	1	1	1MSLTLVSKKFOQPTTAFALR-CWVYSYACEDVQLLRFAH---	110	1VOTPLRKKWVDRCPN---HCSHGDIIVLIDLGLN
ID_YP_758455.1/2-338	1	1	1MSFRVLTKKQOETTVAAP-CWVYSYACEDVQLLRFAH---	110	1VOTPLRKKWVDRCPN---HCSHGDIIVLIDLGLN



ID	Protein ID	Accession	Sequence	Accession	Sequence
ID_YP_003521.1/2-288	103	103	...CNRQRCPPCP...PPCOPOT	170	...DCVQKIVDAENH
ID_NP_932735.1/2-293	108	108	...CNRQRCPPCP...PPCOPOT	170	...DCVQKIVDAENH
ID_NP_046285.1/2-297	107	107	...CNRQRCPPCP...PPCOPOT	170	...DCVQKIVDAENH
ID_NP_203285.1/2-296	107	107	...CNRQRCPPCP...PPCOPOT	170	...DCVQKIVDAENH
ID_AB012255.1/2-289	105	105	...CNRQRCPPCP...PPCOPOT	170	...DCVQKIVDAENH
ID_YP_610997.1/2-289	105	105	...CNRQRCPPCP...PPCOPOT	170	...DCVQKIVDAENH
ID_NP_848435.1/2-289	105	105	...CNRQRCPPCP...PPCOPOT	170	...DCVQKIVDAENH
ID_NP_047528.1/2-315	96	96	...FYRRRSRSPSR...RSRPHGRPSRSPSR	170	...RGRGRIIDAE
ID_YP_00288435.1/2-315	96	96	...FYRRRSRSPSR...RSRPHGRPSRSPSR	170	...RGRGRIIDAE
ID_YP_758595.1/2-312	96	96	...FYRRRSRSPSR...RSRPHGRPSRSPSR	170	...RGRGRIIDAE
ID_NP_703118.1/2-321	96	96	...FYRRRSRSPSR...RSRPHGRPSRSPSR	170	...RGRGRIIDAE
ID_YP_00351786.1/2-310	109	109	...CCPPPP...APPDYNAP	170	...DSELV
ID_NP_047773.1/2-313	109	109	...CCPPPP...APPDYNAP	170	...DSELV
ID_NP_810751.1/2-308	114	114	...YSECS...PQ	170	...TPDCRPPPLP
ID_YP_00230661.1/2-309	106	106	...CIGSIS...GCVV	170	...NVD
ID_AA01079.1/2-321	103	103	...YREC-RRSPRR...RRSPRR	170	...HH-HNONHEL
ID_NP_613143.1/2-321	103	103	...YREC-RRSPRR...RRSPRR	170	...HH-HNONHEL
ID_YP_002332745.1/2-333	103	103	...YREC-RRSPRR...RRSPRR	170	...HH-HNONHEL
ID_NP_001651019.1/2-331	109	109	...CAOSS...GHN	170	...HTEL
ID_YP_249725.1/2-331	103	103	...YREC-RRSPRR...RRSPRR	170	...HH-HNONHEL
ID_YP_002332589.1/2-325	103	103	...YREC-RRSPRR...RRSPRR	170	...HH-HNONHEL
ID_NP_689236.1/2-335	103	103	...YREC-RRSPRR...RRSPRR	170	...HH-HNONHEL
ID_NP_037806.1/2-335	103	103	...YREC-RRSPRR...RRSPRR	170	...HH-HNONHEL
ID_YP_309002.1/2-331	103	103	...YREC-RRSPRR...RRSPRR	170	...HH-HNONHEL
ID_YP_529719.1/2-341	103	103	...YREC-RRSPRR...RRSPRR	170	...HH-HNONHEL
ID_YP_717652.1/2-338	107	107	...CODERR...ARR	170	...HHHGH
ID_NP_542747.1/2-340	107	107	...CODERR...ARR	170	...HHHGH
ID_YP_002274050.1/2-338	107	107	...CODERR...ARR	170	...HHHGH
ID_YP_002854716.1/2-326	107	107	...CODERR...ARR	170	...HHHGH
ID_YP_758455.1/2-338	107	107	...CODERR...ARR	170	...HHHGH



ID	Protein ID	Accession	Sequence	Accession	Sequence
ID_YP_003521.1/2-288	130	130	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_932735.1/2-293	143	143	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_046285.1/2-297	141	141	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_203285.1/2-296	140	140	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_AB012255.1/2-289	137	137	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_610997.1/2-289	137	137	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_848435.1/2-289	137	137	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_047528.1/2-315	137	137	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_00288435.1/2-315	135	135	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_758595.1/2-312	154	154	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_703118.1/2-321	154	154	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_00351786.1/2-310	154	154	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_047773.1/2-313	154	154	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_810751.1/2-308	159	159	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_00230661.1/2-309	158	158	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_AA01079.1/2-321	161	161	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_613143.1/2-321	161	161	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_002332745.1/2-333	180	180	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_001651019.1/2-331	177	177	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_249725.1/2-331	177	177	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_002332589.1/2-325	162	162	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_689236.1/2-335	182	182	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_037806.1/2-335	182	182	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_309002.1/2-331	182	182	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_529719.1/2-341	182	182	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_717652.1/2-338	187	187	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_542747.1/2-340	187	187	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_002274050.1/2-338	185	185	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_002854716.1/2-326	159	159	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_758455.1/2-338	177	177	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	290	...KALPDQSAQOELDKLEA



ID	Protein ID	Accession	Sequence	Accession	Sequence
ID_YP_003521.1/2-288	245	245	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_932735.1/2-293	249	249	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_046285.1/2-297	254	254	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_203285.1/2-296	253	253	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_AB012255.1/2-289	250	250	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_610997.1/2-289	250	250	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_848435.1/2-289	250	250	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_047528.1/2-315	263	263	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_00288435.1/2-315	263	263	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_758595.1/2-312	267	267	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_703118.1/2-321	274	274	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_00351786.1/2-310	262	262	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_047773.1/2-313	265	265	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_810751.1/2-308	272	272	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_00230661.1/2-309	282	282	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_AA01079.1/2-321	274	274	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_613143.1/2-321	274	274	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_002332745.1/2-333	292	292	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_001651019.1/2-331	270	270	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_249725.1/2-331	290	290	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_001036337.1/2-332	290	290	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_002332589.1/2-325	275	275	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_689236.1/2-335	291	291	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_037806.1/2-335	295	295	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_309002.1/2-331	300	300	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_529719.1/2-341	294	294	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_YP_717652.1/2-338	300	300	...HLLT...HVNQVSLHSHOGLER	420	...KALPDQSAQOELDKLEA
ID_NP_542747.1/2-340	300	3			

Figura 2.3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de PEP de 33 baculovirus del género *Alphabaculovirus* (Tabla S1) usando ClustalO (<https://www.ebi.ac.uk/>) con los parámetros estándar y la edición con el programa JalView, los residuos de aminoácidos con un 50-100 % de conservación se resaltan en escala de rojos. La proteína PEP de AgMNPV se marca en rojo y la secuencia consenso se detalla en el panel inferior.

Análisis filogenético

Las proteínas PEP son altamente conservadas en la familia *Baculoviridae*; sin embargo, la evolución las afecta de manera diferente y, por ello, nos propusimos realizar un análisis filogenético ya que es muy escaso lo que se ha estudiado de esta familia de proteínas. A continuación, se incorporaron secuencias homólogas a PEP del género *Betabaculovirus* al alineamiento múltiple de la sección anterior. Se analizaron en total 47 genomas baculovirales y se seleccionaron 75 genes: a las 33 secuencias de PEP del género *Alphabaculovirus* se le adicionan 42 proteínas homólogas obtenidas de los 14 genomas seleccionados de los *Betabaculovirus* (Tabla S1.1). A partir de este análisis, se observó que los géneros *Alpha-* y *Betabaculovirus* expresan un número diferente de genes *pep*. Mientras que los primeros expresan un único gen, los segundos expresan tres genes homólogos: *pep-1*, *pep-2* y *pep/p10*. El alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos entre la proteína de PEP de AgMNPV y otras 74 secuencias homólogas se utilizó para construir el árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud (Figura 2.4). A partir del análisis filogenético, se observa que las proteínas se agrupan en *clusters* en concordancia con la filogenia de la familia *Baculoviridae* siguiendo la subdivisión evolutiva en género; esto sugiere un origen monofilético para la proteína PEP.

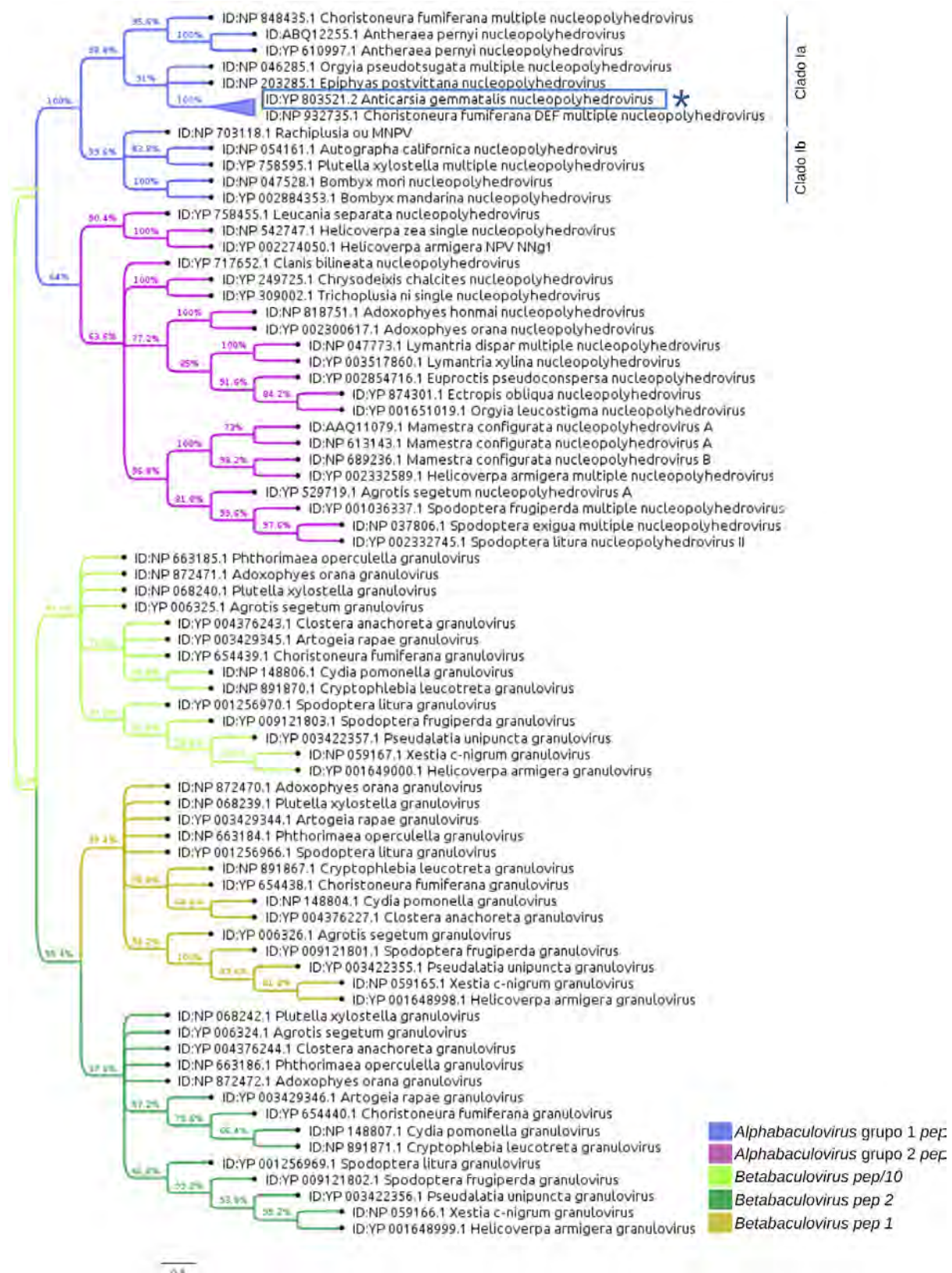


Figura 2.4. El árbol filogenético fue inferido usando el método de Máximo Likelihood y la matriz modelo JTT. Se muestra el árbol con el mayor likelihood log (500 *bootstrap*). El porcentaje de árboles en el cual se asocian los grupos de taxones se muestran sobre las ramas. El árbol inicial para la búsqueda heurística fue obtenido automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancia de a pares estimada usando el modelo JTT, y luego su topología se determinó con el valor superior de likelihood log. Para este análisis se utilizaron 75 secuencias de aminoácidos con un total de 488 posiciones. El análisis evolutivo se realizó con el programa MEGA X. Con un recuadro azul y (*) se ubica al genoma de AgMNPV.

Dada la complejidad que presenta un alineamiento múltiple de 75 secuencias divergentes, se decidió graficar un alineamiento de a pares de las secuencias homólogas de PEP en un análisis de componentes principales (PCA), ya que puede revelar relaciones entre grupos de secuencias que no se pueden observar en un árbol binario (Figura 2.5).

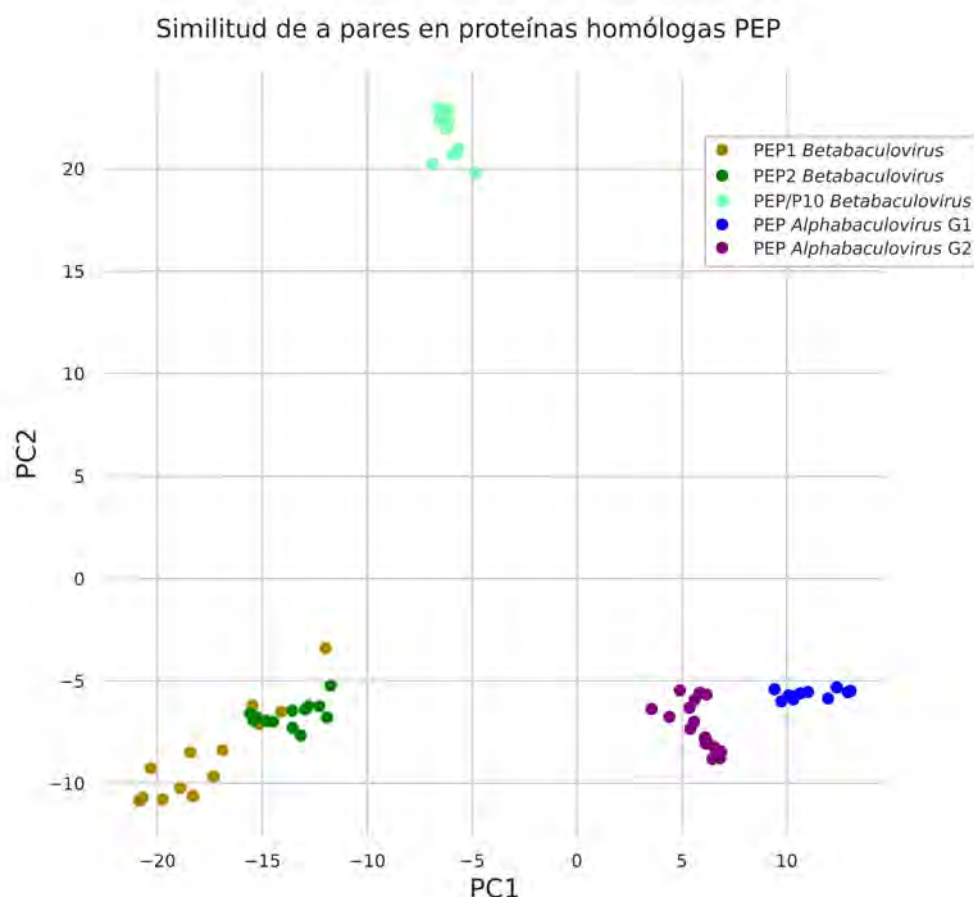


Figura 2.5. Análisis de componentes principales (del inglés, *principal component* PC: PC1 y PC2) de los alineamientos de a pares de las 75 secuencias de PEP homólogas. El alineamiento y la matriz del PCA se realizó con el programa Jalview (<http://www.jalview.org>) y el gráfico en python 3.

En este gráfico se puede observar el "espacio de similitud" entre las secuencias homólogas de PEP, donde la mayor cercanía entre los puntos representa una mayor similitud de secuencia aminoacídica y una mayor distancia una mayor disimilitud. En concordancia con el árbol filogenético presentado anteriormente, se puede observar que las proteínas PEP se agrupan de acuerdo al género de la familia *Baculoviridae*. Como se mencionó

anteriormente, el género *Betabaculovirus* expresa 3 proteínas PEP homólogas denominadas: PEP1, PEP2 y PEP/P10. Es interesante destacar cómo estas proteínas PEP poseen una gran dispersión en el espacio (Figura 2.5). La alta similitud de secuencia entre las proteínas PEP1 y PEP2 pero no así con PEP/P10 podría suponer la duplicación del gen *pep* producto de un evento de recombinación intragénica que resultara los genes *pep1* y *pep2*. En concordancia, la separación marcada en el árbol filogenético entre estas tres PEP sugiere que posiblemente *pep1* y *pep2* sean genes parálogos y que *pep/p10* haya sido adquirido en un evento evolutivo independiente. Por otra parte, en el gráfico PCA se destaca que el grupo de genes *pep1* presenta una gran dispersión en el "espacio de similitud" en comparación con el resto de los genes *pep* analizados lo cual muestra una mayor disimilitud entre las secuencias (Figura 2.5). Es importante remarcar que si se piensa en un posible evento de duplicación para *pep1* y *pep2* la presión evolutiva sobre las dos copias podría no ser la misma, permitiéndole a una de ellas, posiblemente *pep1*, acumular mutaciones sin que el virus pierda la función. También podría ser que la mayor disimilitud entre las secuencias *pep1* sea una consecuencia de la especificidad de la función y su adaptación dependiendo del huésped y de las condiciones ambientales.

Siguiendo con esta hipótesis, la duplicación de genes permitiría generar proteínas nuevas con funciones similares que actúen en asociación en los procesos biológicos. Es por ello que se quiso evaluar si los tres genes *pep* en los betabaculovirus se traducen y sus productos forman parte de los cuerpos de oclusión o si, por el contrario, alguno presenta la característica de pseudogen. Para ello, se analizaron los datos proteómicos de los cuerpos de oclusión de *Spodoptera frugiperda* GV y *Epinotia aporema* GV obtenidos en nuestro laboratorio (Masson *et al.*, 2019) y se observó que PEP1, PEP2 y PEP/P10 están presentes en ambos virus, lo que demuestra que los tres genes se expresan y que serían funcionales en la biología de los betabaculovirus.

Análisis de la estructura secundaria

PSIPRED es el método más popular y vanguardista para la predicción de estructura secundaria en las proteínas y es por ello que se decidió utilizar su flujo de trabajo para el análisis de PEP de AgMNPV. En la Figura 2.6a. se muestra la composición de aminoácidos donde se observa que la mayoría del tipo aromático y las cisteínas se concentran en la región N-terminal. Se ha establecido que este tipo de aminoácidos poseen una función importante en cuanto al arreglo estructural de las proteínas (Anjana *et al.*, 2012; Makwana & Mahalakshmi, 2015). Es por ello que una composición mayoritaria de estos residuos en la región N-terminal sugiere la presencia de un dominio globular y sitios putativos para formar enlaces disulfuro. Por otro lado, la región C-terminal presenta una composición de aminoácidos uniformemente distribuida del tipo polar, pequeños no polares e hidrofóbicos. A su vez, se observan repeticiones continuas y discontinuas de heptámeros compuestos por aminoácidos hidrofóbicos lo que sugeriría una estructura tipo *coiled-coil*; en la próxima sección se desarrolla con más detalle. En la Figura 2.6b, se muestra la predicción de la estructura secundaria de la proteína, donde se observa una mayoría de estructuras de tipo α -hélice (H, 69,28%), con solo dos segmentos del motivo cadena beta o β -strand (E, 1,37%) y un 29,35% de estructuras *coil* (C). Continuando con el flujo de trabajo, se utilizó el servidor DomPred que predice la unión putativa entre dos dominios. La predicción de un único pico en el gráfico refiere a una única discontinuidad en la secuencia lo que indicaría la existencia de dos dominios en ambos extremos del polipéptido ("Material suplementario", Figura S1.1). Finalizando con el flujo de trabajo propuesto en PSIPRED, se caracterizó esta región entre los dominios putativos con el programa DISOPRED3 ("Material suplementario", Figura S1.1) la cual sugiere una estructura desordenada, rica en aminoácidos arginina y prolina, la cual se analiza en las próximas secciones. Este análisis de la estructura secundaria sugiere la presencia de dos dominios proteicos, lo cual se condice con la diferencia en la composición de aminoácidos y con la presencia de una región desordenada que podría funcionar como un *linker* entre ambos.

Determinación de los dominios proteicos

La búsqueda en la base de datos InterPro resultó en la identificación de dos dominios denominados: Baculo_PEP_N (InterPro: IPR07600) y Baculo_PEP_C (InterPro: IPR07601) como se muestra en la Figura 2.7. Los miembros del género *Alphabaculovirus* poseen ambos dominios en un único marco de lectura abierto, y esa misma condición se cumple en el gen *pep/p10* de los *Betabaculovirus*. En cambio, en los genes *pep1* y *pep2* del género *Betabaculovirus*, solo existe el dominio Baculo_PEP_N (datos no mostrados). Seguidamente, se realizó una búsqueda *in silico* de motivos lineales en los dominios N-terminal y C-terminal utilizando predictores de secuencia y no se encontraron resultados para: sitios catalíticos de enzimas, sitios de unión a grupos prostéticos, residuos que puedan coordinar iones metálicos o cisteínas involucradas en enlaces disulfuro. Sin embargo, se predicen sitios de fosforilación y de N-glicosilación como se muestra en "Material suplementario" (Figura S1.1).

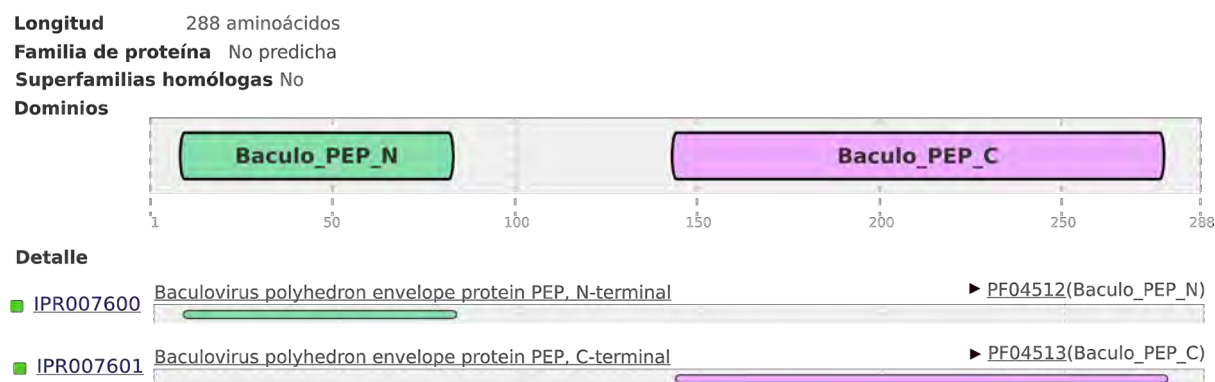


Figura 2.7. Análisis de los dominios de la proteína de envoltura PEP de AgMNPV utilizando la base de datos: InterPro, la cual proporciona una descripción funcional de las proteínas en familias e informando los dominios y sitios característicos (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Dominio Baculo_PEP_N

La información en la base de datos Pfam sobre este dominio (PF04512) es muy sintética, se informa que el mismo se encuentra presente solamente en la familia *Baculoviridae* y no posee ninguna característica funcional más allá de la estructural en el global de la proteína.

Es por ello que se propuso rever las características distintivas de este dominio utilizando predictores bioinformáticos. Para la predicción de la función, se realizó una búsqueda de homólogos muy lejanos y se obtuvo un porcentaje de similitud del 20 % con el dominio BRO-N (Prosite: PS51750) presente en los multigenes *bro* (del inglés, *Baculovirus repeated ORF BRO*) de los baculovirus, y no se obtuvo ningún resultado por fuera de la familia *Baculoviridae*, no pudiendo recabar más información sobre alguna posible función conocida. A su vez, el dominio proteico BRO-N posee una función desconocida pero tiene predicho un motivo de unión a DNA cuya secuencia consenso es: K/R X₂₋₅ K/R X₄₋₁₂ F/Y X₂₋₁₄ F/Y X₆₋₁₃ F/Y X₁₋₁₉ K/R X₃₋₂₆ F/Y/W X₆₋₁₂ K/R (Mikhailov *et al.*, 1998; Zemskov *et al.*, 2000). Analizando en detalle la secuencia del dominio Baculo_PEP_N en el alineamiento múltiple de los *Alphabaculovirus* en busca de este motivo de unión a DNA, encontramos que el patrón se encuentra presente en la proteína PEP de AgMNPV: K₄₃ X₍₂₎ K₄₆ X₍₁₂₎ F₅₉ X₍₈₎ Y₆₈ X₍₄₎ Y₇₃ X₍₇₎ R₈₁ X₍₁₂₎ F₉₄ X₍₁₀₎ R₁₀₅, y en 28 de las 33 secuencias del alineamiento (Figura 2.8). Las proteínas de los *Alphabaculovirus* pertenecientes al grupo I **clado Ia** que no tienen un aminoácido básico K/R en la 4^{ta} posición no presentan la secuencia motivo completa.

Otro motivo de secuencia característica que se observa en este dominio, es un *cluster* muy conservado de residuos cargados positivamente: **R/KHR/IKK** seguido de un motivo rico en residuos prolina o glicina dependiendo de la especie (Figura 2.8). Estos dos motivos también se encuentran presentes en la proteína P10. En algunos trabajos al motivo básico se lo considera una señal putativa de localización nuclear (del inglés, *nuclear localization signal NLS*) pero debido a que P10 y PEP tienen tamaños que varían entre los 7-10 y 32-35 kDa respectivamente, pueden ingresar al núcleo por simple difusión (Wang & Brattain, 2007) y por ello, no se ha esclarecido su función como secuencia de localización nuclear. Más importante y, en concordancia con el hecho de que tanto PEP como P10 son proteínas fosforiladas, se realizó una búsqueda de motivos lineales de secuencia utilizando el servidor ELM en búsqueda de motivos para la fosforilación. Nosotros hipotetizamos que este motivo básico flanqueado por prolinas podría actuar como un sitio de fosforilación posiblemente

modificado por quinasas dirigidas por prolina (MOD_ProDKin_1, MOD_CK1_1, código de acceso: ELME000063).

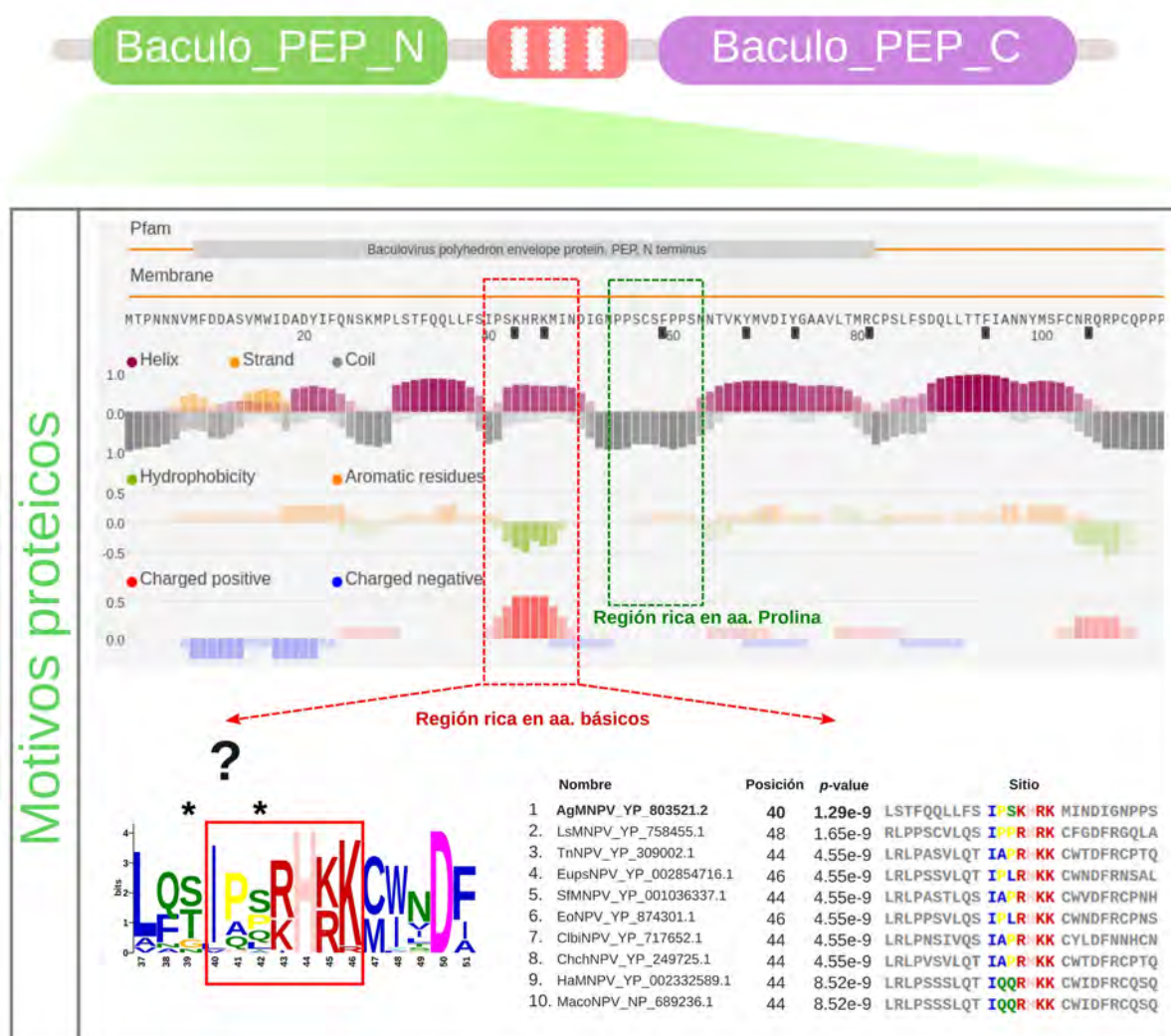


Figura 2.8. Esquema del dominio N-terminal de la proteína PEP de AgMNPV utilizando el servidor FIELDS (<http://protein.bio.unipd.it/fields>) que estima la estructura local y representa la estructura secundaria y desorden en un único gráfico (panel superior). En se muestran las posiciones del sitio putativo de unión a DNA predicho sobre la base de homología con el motivo BRO-N. El recuadro en rojo muestra el motivo conservado de residuos básicos y, se amplía esta región donde se muestra el alineamiento con 10 secuencias de PEP homólogas y en * los residuos Ser/Thr fosforilables. El recuadro verde el motivo rico en residuos prolina (panel inferior).

Predicción de desorden

Las regiones intrínsecamente desordenadas (del inglés, *intrinsically disordered region* IDR) pueden distinguirse de las ordenadas en función de la composición de aminoácidos ya que las IDR muestran una baja hidrofobicidad y una alta carga neta (Jorda *et al.*, 2010). Como

se observa en la Figura 2.9, la zona intermedia que conecta los dos dominios de PEP AgMNPV posee una región rica en aminoácidos arginina (R) y prolina (P) y se predice intrínsecamente desordenada según la predicción con el servidor CSpritz. Esa región presenta una menor proporción de aminoácidos denominados "promotores del orden", incluyendo los residuos hidrofóbicos (isoleucina (I), leucina (L), y valina (V)) y aromáticos (triptófano (W), tirosina (Y), y fenilalanina (F)) que normalmente forman el núcleo hidrofóbico en el plegamiento de una proteína globular. En contraste, las IDR se encuentran enriquecidas en los residuos denominados "promotores del desorden" como Pro, Arg, Gln y Cys. A partir del alineamiento múltiple con las proteínas PEP homólogas se pudo determinar que esta región desordenada entre los dominios N- y C-terminal es conservada en cuanto a la composición de aminoácidos promotores del desorden Pro, Arg, Gln y Cys variando su longitud según la especie viral (Figura 2.3). Continuando con la predicción realizada con el servidor ELM, la PEP de AgMNPV presenta dos motivos ricos en prolina en la región entre dominios: **PCQPQTP** (acceso: ELME000155) y **QPQTPP** (acceso: ELME000136). El primero es un motivo putativo de interacción proteína-proteína y el segundo un motivo de fosforilación. Si analizamos esta región desordenada en el alineamiento múltiple de PEP para los NPV podemos ver que la misma se va ampliando incorporando secuencias repetidas de Pro(P)/Arg(R)/Ser(S) a medida que nos movemos filogenéticamente del grupo I (AgMNPV) al grupo II. Es interesante destacar que la proteína PEP1, pero no PEP2 o PEP/P10 en los *Betabaculovirus* presenta una secuencia similar de aminoácidos repetidos prolina(P)/arginina(R)/serina(S), pudiendo ser este un motivo funcional de PEP (datos no mostrados). En este trabajo se propone que esta región desordenada podría cumplir la función de *linker* flexible entre los dominios, y que, a su vez, posea algún motivo de fosforilación que regule y/o modifique la estructura terciaria y su función durante el ciclo infectivo. Para responder estas incógnitas se requieren estudios mutacionales y estructurales.

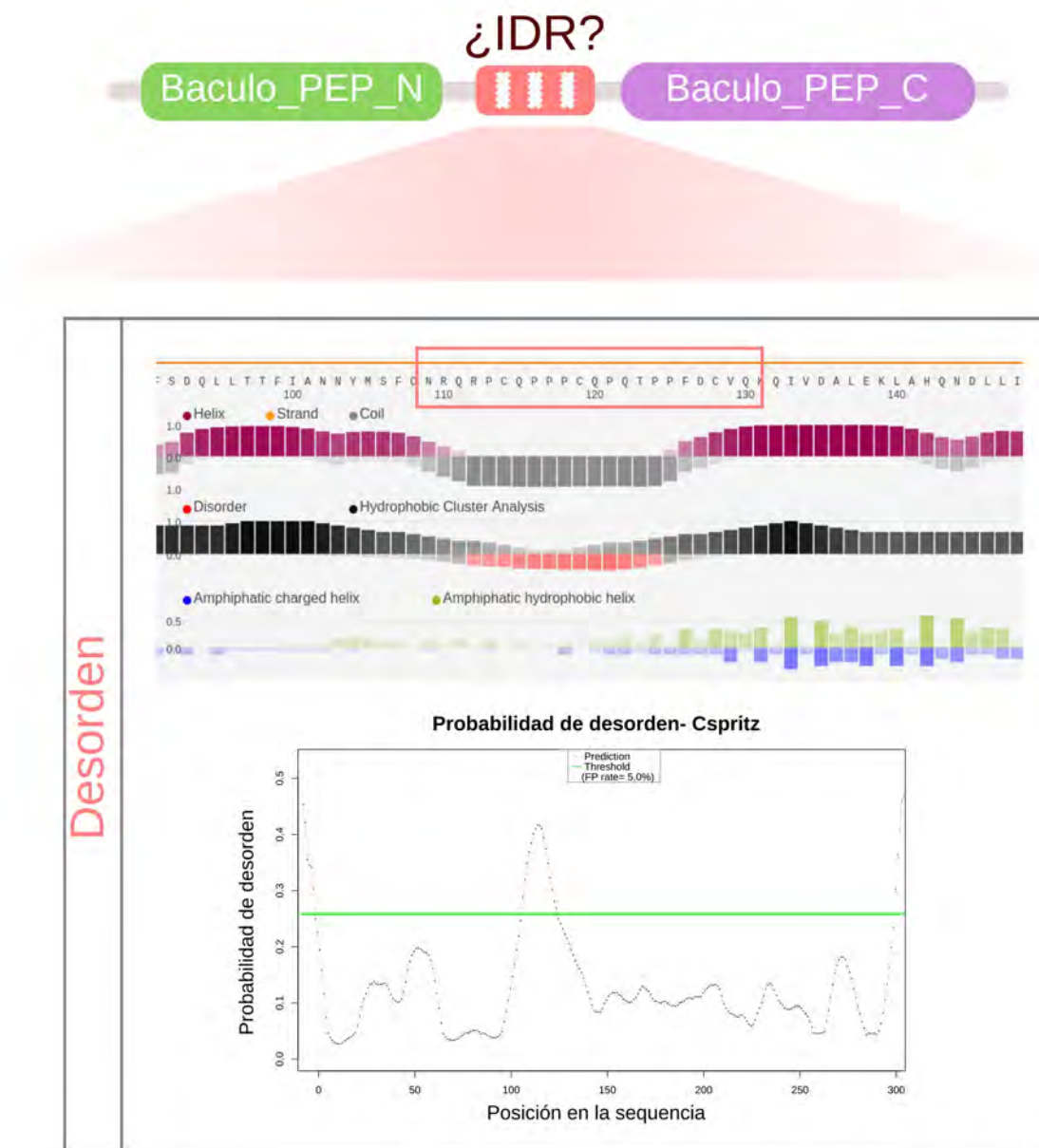


Figura 2.9. Esquema de la región intermedia entre los dominios de la proteína PEP de AgMNPV (recuadro rosa) utilizando el servidor FIELDS (<http://protein.bio.unipd.it/fells>, panel superior) que estima la estructura local latente y representa la probabilidad de la estructura secundaria (del inglés, *Helix*, *Strand* y *Coil*) y desorden (barras rojas) en un único gráfico. En el recuadro inferior se muestra la secuencia proteica con predicción de desorden, como así también el resultado de la predicción de desorden utilizando el servidor CSpritz.

Dominio Baculo_PEP_C

Finalmente, para el dominio C-terminal de la proteína PEP se repitió el método de búsqueda de homólogos muy lejanos con el fin de determinar la función y/o caracterizar elementos altamente conservados en su secuencia. Como resultado de esta búsqueda, se encontraron

proteínas con funciones muy diversas y con un porcentaje de identidad que varía entre el 15 y 20% (datos no mostrados). Independientemente del bajo porcentaje de identidad, estas proteínas homólogas presentan un motivo estructural común denominado *coiled-coil* (del inglés, *coiled-coil motif* CCM). En consecuencia, se analizó la secuencia primaria de PEP de AgMNPV con los predictores de *coiled-coil*. Los mismos predicen dos α -hélices con alta probabilidad de formar *coiled-coil* en el dominio C-terminal las cuales fueron denominadas CCM1 y CCM2 como se detalla en la Tabla 2.1. Estos dominios son considerados muy versátiles, admiten una amplia variedad de funciones biológicas, entre las que se encuentran la interacción proteína-proteína y la oligomerización, entre otras, y están conformados por dos o más α -hélices anfipáticas enrolladas entre sí para formar una estructura de superenrollamiento (Truebestein & Leonard, 2016). En la familia *Baculoviridae*, las estructuras *coiled-coil* son requeridas para la infectividad de los BV y para el ensamblaje de los ODV, entre otras funciones (Braunagel *et al.*, 2004; Garretson *et al.*, 2016; Kingsley *et al.*, 1999; Yimeng Li *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2009). Este motivo está formado por heptapéptidos repetidos designados como **(abcdefg)_n** separados por *stammers* (delección 4 residuos) o *stutters* (delección 3 residuos), donde "a y d" son aminoácidos hidrofóbicos comúnmente Leu e Ile, y "e y g" son residuos cargados como Glu, Asp, Arg y Lys. Los residuos anteriores (a y d) pueden generar "interacciones hidrofóbicas", mientras que los últimos (e y g) pueden generar "interacciones electrostáticas", formando finalmente una estructura proteica dimérica o oligomérica altamente estable (Apostolovic *et al.*, 2010, Truebestein & Leonard, 2016).

Programa	Probabilidad de <i>coiled-coil</i> en PEP		
	CCM 1 (150-200)	CCM 2 (200-250)	CCM 3 (250-288)
PCOILS	+++	+++++	+
MARCOIL	+++	+++++	+
DeepCOIL	+++++	+++++	+++
MULTICOIL	+	+++	-
COILS	+++	+++++	-
COILS 2(NPS)	+++	+++++	-

Tabla 2.1. Predicción del motivo *coiled-coil* (CCM) en la secuencia aminoacídica de la proteína PEP de AgMNPV con diversos programas ("Materiales y métodos"). Los valores de probabilidad se informan con el siguiente orden: +++++ probabilidad alta, +++ probabilidad moderada, + probabilidad débil, - probabilidad nula.

En la Figura 2.10 se muestra la correspondencia en la predicción de una región *coiled-coil* realizada con los programas PCOILS y MARCOIL cuyos algoritmos de búsqueda son diferentes ("Materiales y Métodos"). A su vez, el dominio *coiled-coil* se representó en 2D (proyección bidimensional de la rueda helicoidal), donde se observa claramente la α -hélice anfipática con una cara hidrofóbica de un lado y la cara opuesta hidrofílica. El alineamiento múltiple de las regiones CCM1 y CCM2 de las PEP en los NPV se encuentra representado por logos (Figura 2.10). Realizando un análisis *in silico*, observamos que CCM1 y CCM2 presentan una α -hélice que contiene no solo residuos hidrofóbicos ricos en Leu/Ile/Val formando la cara hidrofóbica, sino que también en la cara opuesta hidrofílica presentan una cantidad importante de aminoácidos cargados negativa y positivamente (Glu, Asp, Lys y Arg) (Figura 2.10). Esta característica permite hipotetizar que el dominio podría facilitar no solo la formación de homodímero/oligómero, sino que también podría jugar un papel en la interacción proteína-proteína estableciendo heterodímeros/oligómeros con proteínas virales o del huésped que también contienen dominios *coiled-coil*. Li y col. (2015), han mostrado que los baculovirus deficientes en la proteína PEP y complementados con una proteína PEP homóloga no restituyen su función y que los cuerpos de oclusión no poseen la envoltura poliédrica. Una hipótesis, podría ser que las numerosas interrupciones cortas que presentan CCM1 y CCM2 en la secuencia repetida *abcdefg* generen una mayor plasticidad

conformacional y, por ende, esta propiedad podría ser la base de la especificidad de PEP para interactuar con otras proteínas o con otras moléculas de PEP y formar la envoltura.

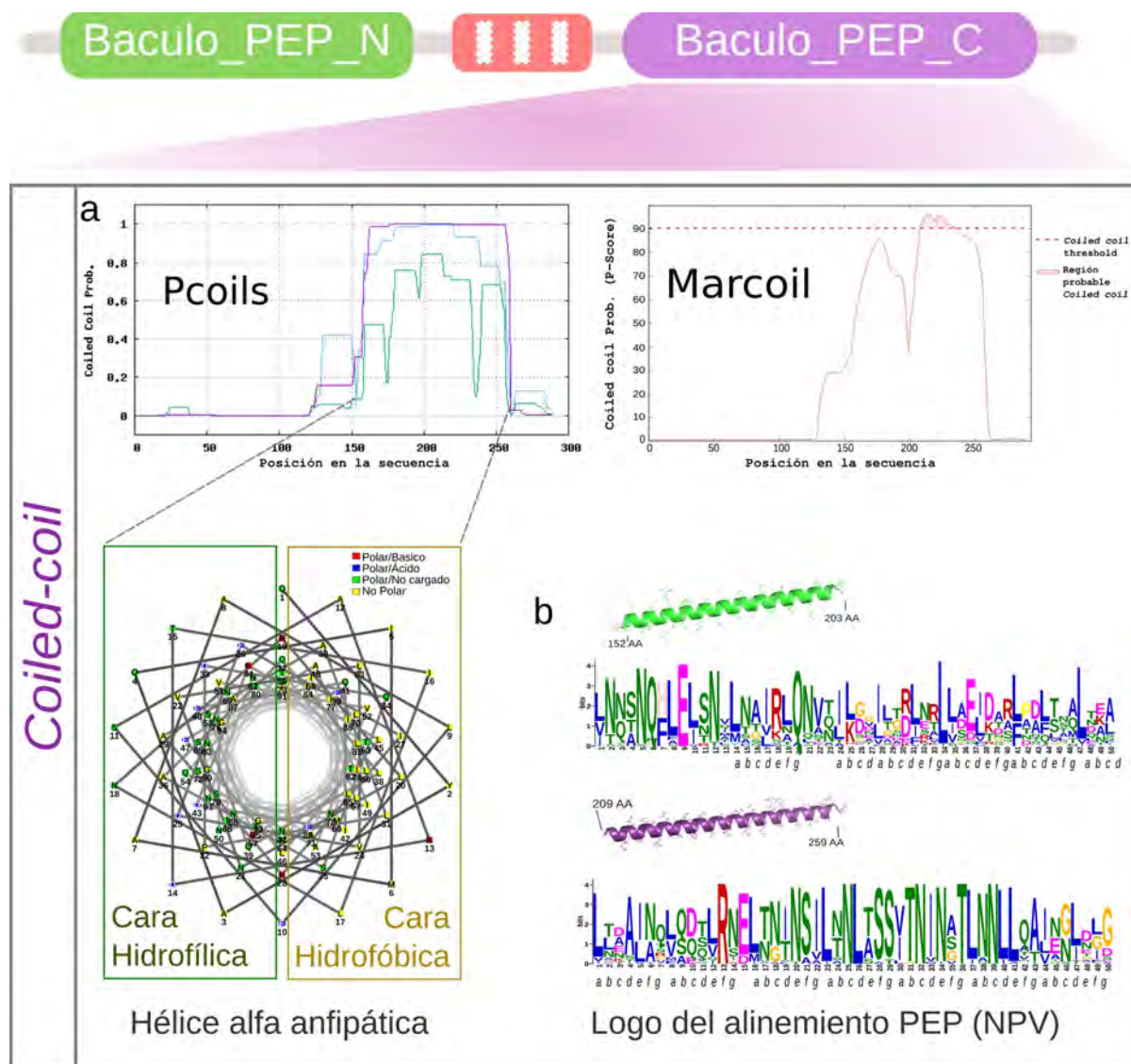


Figura 2.10. Esquema del dominio C-terminal de la proteína PEP (panel superior). a. Predictores de la secuencia *coiled-coil*: Pcoils y Marcoil utilizando el servidor MPI bioinformatics toolkit (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de>) y proyección bidimensional de la rueda helicoidal. b. MEME logo de alineamiento de las regiones CCM1 y CCM2 de las PEP homólogas del género *Alphabaculovirus*, predicción de la secuencia repetida (*abcdefg*).

Modelado de la estructura terciaria (I-TASSER)

Los avances en programas computacionales, aunado con el aumento de las estructuras reportadas en las bases de datos del PDB (www.rcsb.org) permiten obtener modelos de estructura tridimensional cada vez más confiables partiendo únicamente de su estructura primaria. En este caso, se partió de la secuencia de aminoácidos de PEP de AgMNPV para su modelado 3D utilizando el programa I-TASSER. Para ello, se modeló de manera independiente cada uno de los dominios (N-terminal y C-terminal) con el fin de obtener más información sobre la función y características de los mismos. Previamente y para ambos dominios se realizó una búsqueda en UniProt, Pfam y PDB de experimentos de cristalización en la proteína PEP de la familia *Baculoviridae*. Se encontró una única estructura correspondiente al dominio N-terminal de la proteína PEP/P10 del virus de la granulosis de *Cydia pomonella* (PDB: 4ye7, NC_002816: *orf22* CpGV), sin que exista ningún análisis descriptivo o publicado en revistas científicas. A continuación, se utilizó esta estructura tridimensional para el modelado del dominio N-terminal de PEP de AgMNPV. Finalmente, realizando un alineamiento estructural se comparó con la de PEP/P10 de CpGV nuestra estructura modelada utilizando el programa FATCAT (<http://fatcat.godziklab.org/>). Este análisis, mostró una similitud de estructura significativa con un P-value igual a $5,17 \times 10^{-3}$ y el alineamiento se muestra en la Figura 2.11.

moléculas y que posiblemente cumpla un rol esencial para determinar el plegamiento y función de esta proteína.

DALI Z-score	Proteína	PDB
6.3	DACHSHUND	1L8RA
5.1	SKI ONCOGENE	1SBXA
3.8	TRANSCRIPTION FACTOR MBP1	1L3GA

Tabla 2.2. Resultado de la búsqueda de a pares utilizando como molde el PDB de PEP/P10 CpGV contra la base de datos PDB. *Z-score* asignados por el servidor DALI (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi>).

Para el análisis del extremo C-terminal de PEP de AgMNPV no se encontraron dominios Baculo_PEP_C cristalizados, por lo tanto, se generó un modelado *de novo* con el servidor I-TASSER. Para identificar el molde a partir del cual predecir la estructura 3D este servidor utiliza otros 10 programas que realizan el alineamiento estructural contra la base de datos de PDB (LOMETS (Wu & Zhang, 2007)). Es importante remarcar que, en estos programas, se utiliza el *Z-score* normalizado para evaluar la similitud estructural. Al finalizar la búsqueda todas las proteínas putativas con una alta similitud estructural presentaron motivos *coiled-coil* (Figura 2.12, panel izquierdo). Este resultado refuerza la hipótesis de que en la región C-terminal de PEP de los NPV presentan un dominio *coiled-coil* en concordancia con la predicción a partir de estructura primaria y secundaria. Finalmente, el modelo con el mayor *C-score* y mejor *TM-score* se muestra en la Figura 2.12 (panel derecho).

PEP AgMNPV C-terminal

PDB moldes para la predicción de la estructura terciaria

PDB + Chain	Cobertura	Norm. Z-score
5XG2A	0.96	1.53
1EQ1A	0.3	1.17
6GAPA	0.8	1.02
4UOSA	0.96	1.13
4K1PA	1	1.32
5OENA	0.89	1.51
4TQ1A	1	1.1
6EZVX	0.99	1.28
4IGGA	0.97	1.49
2NRJA	1	1.1

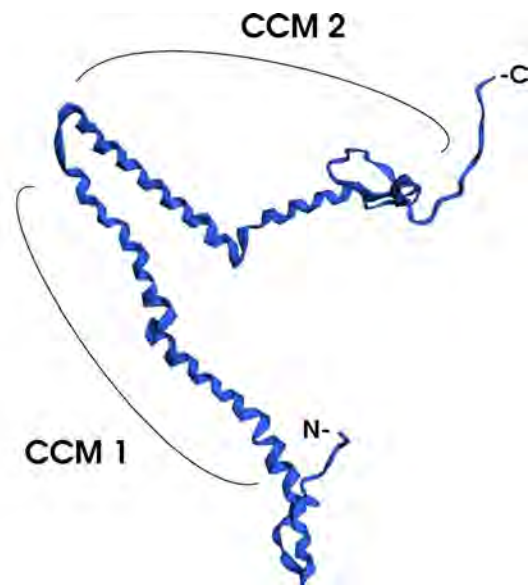


Figura 2.12. Izq.; Tabla con el listado de los PDB seleccionados por el programa para el modelado, un Z-score normalizado >1 , refiere a una buena similitud estructural. Der.; Modelado de la estructura terciaria del dominio C-terminal de la proteína PEP de AgMNPV con el programa I-TASSER, se marcan las regiones de los motivos *coiled-coil* predichos en la sección anterior (CCM1 y CCM2).

Discusión

En la introducción de este capítulo se revisó la mayoría de los estudios relacionados con la función del producto del gen *pep*, aunque estas investigaciones sobre la morfogénesis de la envoltura del poliedro sugieren que es una estructura importante del baculovirus, su papel preciso en el ciclo de vida del virus y las razones que subyacen a su papel en la estabilidad de los OB en el ambiente siguen siendo desconocidas. En el análisis desarrollado en este capítulo, se avanzó en la caracterización de un modelo estructural de PEP de AgMNPV a partir de la secuencia de aminoácidos tomada de la base de datos de secuencias de genomas completos de baculovirus. Este análisis se aprovechará en estudios bioinformáticos futuros para el efecto de la inserción de polipéptidos heterólogos en sitios seleccionados de la secuencia de PEP.

En general, se acepta que la expresión de la proteína PEP no es esencial para la infección, replicación y propagación del baculovirus y que la interrupción del marco de lectura abierto de *pep* no tiene un efecto perjudicial sobre la infección en el cultivo celular o en la larva. Por otro lado, se ha establecido que la proteína PEP se encuentra presente en los miembros de los géneros *Alpha-*, *Beta-* y *Gammabaculovirus*, y que, a su vez, es virus-específica (particular de cada especie de baculovirus) no pudiendo ser su función reemplazada por una PEP homóloga (Li *et al.*, 2015).

A partir del análisis global de las secuencias homólogas de PEP de AgMNPV en los alpha- y betabaculovirus se realizó un análisis filogenético mediante el cual se pudo determinar un origen monofilético para esta proteína, donde se agrupan de acuerdo al género en concordancia con la historia evolutiva de los baculovirus. El análisis en las secuencias PEP de los alphabaculovirus muestra que poseen una longitud que varía entre los 280 y 340 aminoácidos. Los extremos N-terminal y C-terminal presentan patrones de secuencias conservados e incluyen los dominios descritos anteriormente como Baculo_N_PEP y Baculo_C_PEP, respectivamente. A su vez, en la región entre dominios se observa un alineamiento sumamente variable en cuanto a secuencia y longitud y, con una composición

de aminoácidos rica en prolina (P), arginina (R) y serina (S). En cuanto a las secuencias asociadas a la señalización de tránsito subcelular, no se encontró ninguna señal con alta probabilidad por lo que se hipotetiza que su presencia en el núcleo celular se debe a un mecanismo de simple difusión, ya que el tamaño de 34 kDa es menor que el límite de exclusión por difusión.

El dominio N-terminal está caracterizado por un motivo básico **R/KHR/KK** muy conservado e inmediatamente seguido de una región rica en aminoácidos desestabilizantes de la α -hélice como prolina o glicina dependiendo de la especie viral, lo que pareciera indicar la existencia de un giro (*turn*) o bucle (*loop*) para luego continuar con una estructura secundaria de α -hélice (Lodish *et al.*, 2000). Dadas estas características, este motivo representaría una zona expuesta en la proteína que le permitiría interactuar con otras moléculas. Utilizando predictores de estructura primaria y terciaria con la proteína PEP de AgMNPV se han encontrado sitios putativos de unión a DNA, de interacción proteína-proteína y de fosforilación. Existe evidencia que PEP es una fosfoproteína aunque ni la funcionalidad de la fosforilación ni los residuos de aminoácidos involucrados se han definido con precisión (Whitt & Manning, 1988).

La región N-terminal altamente conservada en residuos básicos seguido de un motivo rico en prolina podría ser un sitio potencial para esta modificación post-traduccional. Existen trabajos empíricos que apoyan esta predicción como el estudio de proteómica del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Helicoverpa armigera* en el que se detecta un péptido fosforilado en esta región, más específicamente en Ser 55 adyacente al motivo **R/KHR/KK**; igualmente se necesita una mayor investigación que valide este y otros sitios (Hou *et al.*, 2013). Asimismo, los baculovirus expresan varias quinasas, incluyendo las serina/treonina proteína quinasas: PK-1 and PK-2, que se expresan en la etapa muy tardía y tardía del ciclo infectivo, respectivamente (Li & Miller, 1995; Reilly & Guarino, 1994). Por lo tanto, es probable que la PEP sea fosforilada por alguna de estas enzimas virales. Ensayos de coimmunoprecipitación nos permitirían evaluar estas quinasas y otras del huésped, así como determinar aquellos interactores en la generación de la envoltura del poliedro.

Para la región entre los dos dominios, se predijo una zona desordenada rica en aminoácidos promotores de desorden que podría cumplir una función de *linker* flexible entre los dominios. El alineamiento de secuencia en esta región es muy variable sin posiciones conservadas que presentan, en todos los casos, o motivos ricos en prolina o motivos ricos en serina/arginina. Se necesitan estudios mutacionales para evaluar si esta región cumple una función que regule y/o modifique la estructura terciaria de PEP y su función o localización durante el ciclo infeccioso.

Finalmente, por diversos métodos *in silico* se determinó que el dominio C-terminal está caracterizado por un dominio putativo *coiled-coil*, el cual representa casi la totalidad de la extensión del mismo. Es de interés determinar qué aminoácidos son cruciales para la formación de la interacción hidrofóbica del motivo *coiled-coil*. Para profundizar en el interactoma de PEP, son necesarios estudios de co-inmunoprecipitación que hemos comenzado a realizar en nuestro laboratorio, para determinar si la proteína PEP interactúa con otras copias de PEP, formando oligómeros, fibras o tramas multiméricas y/o con otras proteínas y, a continuación, llevar a cabo estudios mutacionales para determinar interactores y caracterizar su función. Recientemente, se publicó un trabajo en el que se mostró que el dominio N-terminal y la región intermedia que nosotros caracterizamos como desordenada de la proteína PEP de AcMNPV son necesarias para la generación de la envoltura del poliedro, siendo el dominio C-terminal prescindible (Li *et al.*, 2015). Sin embargo, no se ahondó en la caracterización de la envoltura y cómo podría haber afectado la delección a la estabilidad de los cuerpos de oclusión. Por otra parte, Li y col. (2015), utilizaron la secuencia de PEP de AcMNPV que se encontraba mal anotada en la base de datos, a la cual le faltan 80 aminoácidos del extremo C-terminal. Por esta razón resulta importante revisar este análisis.

Una de las hipótesis sobre la naturaleza de los dominios de PEP es que el dominio putativo *coiled-coil* pueda formar una estructura extendida o plegada dependiente del grado de fosforilación, que a su vez pueda estar involucrada en la organización de homopolímeros de orden superior (por ejemplo, filamentos) como lo son las estructuras fibrilares nucleares o

los espaciadores electrón-densos descritos para la proteína PEP (Figura 2.2). Además, dado que los *coiled-coil* pueden funcionar como separadores y reguladores de una estructura supramacromolecular me lleva a pensar que este dominio puede cumplir una función importante al momento de regular la formación de las múltiples capas de envoltura que caracterizan a los OB. Por el contrario, el dominio N-terminal podría interactuar con factores heterólogos y determinar la localización subcelular en diferentes etapas del ciclo infectivo y estas interacciones determinar y discriminar la presencia de la proteína en el cuerpo de oclusión o en los viriones brotantes. Finalizada la caracterización descriptiva de la proteína PEP surgen muchas incógnitas las cuales no podrán ser abarcadas en este trabajo de tesis.

Bibliografía

- Anjana, R., Vaishnavi, M. K., Sherlin, D., Kumar, S. P., Naveen, K., Kanth, P. S., & Sekar, K. (2012). Aromatic-aromatic interactions in structures of proteins and protein-DNA complexes: A study based on orientation and distance. *Biomedical Informatics*, 5.
- Bianchi, F. J., Snoeiijing, I., van der Werf, W., Mans, R. M., Smits, P. H., & Vlak, J. M. (2000). Biological activity of SeMNPV, AcMNPV, and three AcMNPV deletion mutants against *Spodoptera exigua* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 75(1), 28–35. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4907>
- Braunagel, S. C., Williamson, S. T., Saksena, S., Zhong, Z., Russell, W. K., Russell, D. H., & Summers, M. D. (2004). Trafficking of ODV-E66 is mediated via a sorting motif and other viral proteins: Facilitated trafficking to the inner nuclear membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(22), 8372–8377. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402727101>
- Buchan, D. W. A., & Jones, D. T. (2019). The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W402–W407. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz297>
- Carpentier, D. C. J., Griffiths, C. M., & King, L. A. (2008). The baculovirus P10 protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus forms two distinct cytoskeletal-like structures and associates with polyhedral occlusion bodies during infection. *Virology*, 371(2), 278–291. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.09.043>
- Chiu, E., Coulibaly, F., & Metcalf, P. (2012). Insect virus polyhedra, infectious protein crystals that contain virus particles. *Current Opinion in Structural Biology*, 22(2), 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.02.003>
- Farris, J. S. (1970). On the Relationship Between Variation and Conservatism. *Evolution*, 24(4), 825–827. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1970.tb01819.x>
- Fisher, R. A. (1922). *018: On the Mathematical Foundations of Theoretical Statistics*. <https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/handle/2440/15172>
- Garretson, T. A., McCoy, J. C., & Cheng, X.W. (2016). Baculovirus FP25K Localization: Role of the coiled-coil Domain. *Journal of Virology*, 90(21), 9582–9597. <https://doi.org/10.1128/JVI.01241-16>

- Gombart, A. F., Pearson, M. N., Rohrmann, G. F., & Beaudreau, G. S. (1989). A baculovirus polyhedral envelope-associated protein: Genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization. *Virology*, *169*(1), 182–193.
[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90054-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90054-8)
- Gouw, M., Michael, S., Sámano-Sánchez, H., Kumar, M., Zeke, A., Lang, B., Bely, B., Chemes, L. B., Davey, N. E., Deng, Z., Diella, F., Gürth, C.-M., Huber, A.-K., Kleinsorg, S., Schlegel, L. S., Palopoli, N., Roey, K. V., Altenberg, B., Reményi, A., Gibson, T. J. (2018). The eukaryotic linear motif resource – 2018 update. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D428–D434.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1077>
- Graves, L. P., Hughes, L. C., Irons, S. L., Possee, R. D., & King, L. A. (2019). In cultured cells the baculovirus P10 protein forms two independent intracellular structures that play separate roles in occlusion body maturation and their release by nuclear disintegration. *PLoS Pathogens*, *15*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007827>
- Gross, C. H., Russell, R. L., & Rohrmann, G. F. (1994). *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: Analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure. *J Gen Virol*, *75* (Pt 5), 1115–1123.
- Holm, L., & Rosenström, P. (2010). Dali server: Conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Research*, *38*(Web Server issue), W545–W549. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq366>
- Hou, D., Zhang, L., Deng, F., Fang, W., Wang, R., Liu, X., Guo, L., Rayner, S., Chen, X., Wang, H., & Hu, Z. (2013). Comparative Proteomics Reveal Fundamental Structural and Functional Differences between the Two Progeny Phenotypes of a Baculovirus. *Journal of Virology*, *87*(2), 829–839. <https://doi.org/10.1128/JVI.02329-12>
- Ignoffo, C. M., Garcia, C., Zuidema, D., & Vlak, J. M. (1995). Relative in vivo activity and simulated sunlight-uv stability of inclusion bodies of a wild-type and an engineered polyhedral envelope-negative isolate of the nucleopolyhedrosis virus of *Autographa californica*. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Jehle, J. A., Lange, M., Wang, H., Hu, Z., Wang, Y., & Hauschild, R. (2006). Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology*, *346*(1), 180–193.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.10.032>
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices

- from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS*, 8(3), 275–282.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S.-Y., Lopez, R., & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(9), 1236–1240.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- Jorda, J., Xue, B., Uversky, V. N., & Kajava, A. V. (2010). Protein tandem repeats-The more perfect, the less structured. *FEBS Journal*, 277(12), 2673–2682.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07684.x>
- Kingsley, D. H., Behbahani, A., Rashtian, A., Blissard, G. W., & Zimmerberg, J. (1999). A Discrete Stage of Baculovirus GP64-mediated Membrane Fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 10(12), 4191–4200. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.12.4191>
- Koonin, E. V. (2005). Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics. *Annual Review of Genetics*, 39(1), 309–338. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.114725>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Lee, S.-Y., Poloumienko, A., Belfry, S., Qu, X., Chen, W., MacAfee, N., Morin, B., Lucarotti, C., & Krause, M. (1996). A common pathway for p10 and calyx proteins in progressive stages of polyhedron envelope assembly in AcMNPV-infected *Spodoptera frugiperda* larvae. *Archives of Virology*, 2057–2076.
- Li, J., Zhou, Y., Lei, C., Fang, W., & Sun, X. (2015). Improvement in the UV resistance of baculoviruses by displaying nano-zinc oxide-binding peptides on the surfaces of their occlusion bodies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1–13.
- Li, Y., & Miller, L. K. (1995). Expression and functional analysis of a baculovirus gene encoding a

- truncated protein kinase homolog. *Virology*, 206(1), 314–323.
[https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(95\)80047-6](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(95)80047-6)
- Li, Yimeng, Shen, S., Hu, L., Deng, F., Vlak, J. M., Hu, Z., Wang, H., & Wang, M. (2018). The Functional Oligomeric State of Tegument Protein GP41 Is Essential for Baculovirus Budded Virion and Occlusion-Derived Virion Assembly. *Journal of Virology*, 92(12).
<https://doi.org/10.1128/JVI.02083-17>
- Liu, C. Y.-Y., Wang, C.-H., Hsiao, W.-K., Lo, H.-R., Wu, C. P., & Chao, Y. C. (2009). RING and *coiled-coil* Domains of Baculovirus IE2 Are Critical in Strong Activation of the Cytomegalovirus Major Immediate-Early Promoter in Mammalian Cells. *Journal of Virology*, 83 (8), 3604–3616.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01778-08>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Hierarchical Structure of Proteins. *Molecular Cell Biology*. 4th Edition.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21581/>
- Lua, L. H. L., Nielsen, L. K., & Reid, S. (2003). Sensitivity of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus polyhedra to sodium dodecyl sulfate. *Biological Control*.
[https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00116-0](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00116-0)
- Lupas, A. (1997). Predicting *coiled-coil* regions in proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(3), 388–393. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(97\)80056-5](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(97)80056-5)
- Lupas, A., Dyke, M. V., & Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, 252(5009), 1162–1164. <https://doi.org/10.1126/science.252.5009.1162>
- Mackinnon, E. A., Henderson, J. F., Stoltz, D. B., & Faulkner, P. (1974). Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage in vitro. *Journal of Ultrastructure Research*, 49(3), 419–435. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(74\)90055-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(74)90055-0)
- Makwana, K. M., & Mahalakshmi, R. (2015). Implications of aromatic-aromatic interactions: From protein structures to peptide models: Aromatic Interactions in Protein Structures. *Protein Science*, 24(12), 1920–1933. <https://doi.org/10.1002/pro.2814>
- Masson, T., Fabre, M. L., Ferrelli, M. L., Pidre, M. L., & Romanowski, V. (2019). Protein composition of the occlusion bodies of *Epipotia aporema* granulovirus. *PLoS ONE*, 14(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207735>
- Mikhailov, V. S., Mikhailova, A. L., Iwanaga, M., Gomi, S., & Maeda, S. (1998). *Bombyx mori* Nucleo-

- polyhedrovirus Encodes a DNA-Binding Protein Capable of Destabilizing Duplex DNA. *Journal of Virology*, 72(4), 3107–3116.
- Minion, F. C., Coons, L. B., & Broome, J. R. (1979). Characterization of the Polyhedral Envelope of the Nuclear Polyhedrosis Virus of *Heliothis virescens*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 34, 303–307.
- Reilly, L. M., & Guarino, L. A. (1994). The pk-1 gene of *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus encodes a protein kinase. *The Journal of General Virology*, 75 (11) 2999–3006. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-11-2999>
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Sajjan, D. B., & Hinchigeri, S. B. (2016). Structural Organization of Baculovirus Occlusion Bodies and Protective Role of Multilayered Polyhedron Envelope Protein. *Food and Environmental Virology*. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9227-7>
- Sigrist, C. J. A., de Castro, E., Cerutti, L., Cuche, B. A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., & Xenarios, I. (2013). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D344-347. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067>
- Slack, J., & Arif, B. M. (2007). The baculoviruses occlusion-derived virus: Virion structure and function. *Adv Virus Res*, 69, 99–165. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(06\)69003-9](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(06)69003-9)
- Truebestein, L., & Leonard, T. A. (2016). Coiled-coils: The long and short of it. *Bioessays*, 38(9), 903–916. <https://doi.org/10.1002/bies.201600062>
- Van der Wilk J.W.M.; Vlak, J. M., F. ;. van Lent. (1987). Immunogold detection of polyhedrin, p10 and virion antigens in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Gen. Virol.*, 68, 2615–2623.
- van Lent, J. W. M., Groenen, J. T. M., Klinge-Roode, E. C., Rohrmann, G. F., Zuidema, D., & Vlak, J. M. (1990). Localization of the 34 kDa polyhedron envelope protein in *Spodoptera frugiperda* cells infected with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Archives of Virology*, 111(1–2), 103–114. <https://doi.org/10.1007/BF01310508>
- Wang, R., & Brattain, M. G. (2007). The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS Letters*, 581(17), 3164–3170.

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.082>

- Walsh, I., Martin, A. J. M., Di Domenico, T., Vullo, A., Pollastri, G., & Tosatto, S. C. E. (2011). CSpritz: Accurate prediction of protein disorder segments with annotation for homology, secondary structure and linear motifs. *Nucleic Acids Research*, 39(Web Server issue), W190–W196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr411>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Whitt and Manning, J. S., M. A. (1988). A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body. *Virology*, 163(1), 33–42.
- Wu, S., & Zhang, Y. (2007). LOMETS: A local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 35(10), 3375–3382. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm251>
- Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W174–W181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>
- Zemskov, E. A., Kang, W., & Maeda, S. (2000). Evidence for Nucleic Acid Binding Ability and Nucleosome Association of Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus BRO Proteins. *Journal of Virology*, 74(15), 6784–6789.

Material suplementario

Tabla S1.1.

Proteínas PEP homólogas en los géneros *Beta-* y *Alphabaculovirus*

Virus	Proteína	N° Acceso
<i>Xestia c-nigrum</i> granulovirus	PEP1	NP_059165.1
<i>Plutella xylostella</i> granulovirus	PEP1	NP_068239.1
<i>Cydia pomonella</i> granulovirus	PEP1	NP_148804.1
<i>Phthorimaea operculella</i> granulovirus	PEP1	NP_663184.1
<i>Adoxophyes orana</i> granulovirus	PEP1	NP_872470.1
<i>Cryptophlebia leucotreta</i> granulovirus	PEP1	NP_891867.1
<i>Agrotis segetum</i> granulovirus	PEP1	YP_006326.1
<i>Choristoneura fumiferana</i> granulovirus	PEP1	YP_654438.1
<i>Spodoptera litura</i> granulovirus	PEP1	YP_001256966.1
<i>Helicoverpa armigera</i> granulovirus	PEP1	YP_001648998.1
<i>Pseudaletia unipuncta</i> granulovirus	PEP1	YP_003422355.1
<i>Artogeia rapae</i> granulovirus	PEP1	YP_003429344.1
<i>Clostera anachoreta</i> granulovirus	PEP1	YP_004376227.1
<i>Spodoptera frugiperda</i> granulovirus	PEP1	YP_009121801.1
<i>Xestia c-nigrum</i> granulovirus	PEP2	NP_059166.1
<i>Plutella xylostella</i> granulovirus	PEP2	NP_068242.1
<i>Cydia pomonella</i> granulovirus	PEP2	NP_148807.1
<i>Phthorimaea operculella</i> granulovirus	PEP2	NP_663186.1
<i>Adoxophyes orana</i> granulovirus	PEP2	NP_872472.1
<i>Cryptophlebia leucotreta</i> granulovirus	PEP2	NP_891871.1
<i>Agrotis segetum</i> granulovirus	PEP2	YP_006324.1
<i>Choristoneura fumiferana</i> granulovirus	PEP2	YP_654440.1
<i>Spodoptera litura</i> granulovirus	PEP2	YP_001256969.1
<i>Helicoverpa armigera</i> granulovirus	PEP2	YP_001648999.1
<i>Pseudaletia unipuncta</i> granulovirus	PEP2	YP_003422356.1
<i>Artogeia rapae</i> granulovirus	PEP2	YP_003429346.1
<i>Clostera anachoreta</i> granulovirus	PEP2	YP_004376244.1
<i>Spodoptera frugiperda</i> granulovirus	PEP2	YP_009121802.1
<i>Xestia c-nigrum</i> granulovirus	PEP-p10	NP_059167.1
<i>Plutella xylostella</i> granulovirus	PEP-p10	NP_068240.1
<i>Cydia pomonella</i> granulovirus	PEP-p10	NP_148806.1
<i>Phthorimaea operculella</i> granulovirus	PEP-p10	NP_663185.1
<i>Adoxophyes orana</i> granulovirus	PEP-p10	NP_872471.1
<i>Cryptophlebia leucotreta</i> granulovirus	PEP-p10	NP_891870.1
<i>Agrotis segetum</i> granulovirus	PEP-p10	YP_006325.1
<i>Choristoneura fumiferana</i> granulovirus	PEP-p10	YP_654439.1
<i>Spodoptera litura</i> granulovirus	PEP-p10	YP_001256970.1
<i>Helicoverpa armigera</i> granulovirus	PEP-p10	YP_001649000.1
<i>Pseudaletia unipuncta</i> granulovirus	PEP-p10	YP_003422357.1

<i>Artogeia rapae</i> granulovirus	PEP-p10	YP_003429345.1
<i>Clostera anachoreta</i> granulovirus	PEP-p10	YP_004376243.1
<i>Spodoptera frugiperda</i> granulovirus	PEP-p10	YP_009121803.1
<i>Autographa californica</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	NP 054161.1
<i>Plutella xylostella</i> multiple nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 758595.1
<i>Rachiplusia nu</i> multiple nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	NP 703118.1
<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	NP 047528.1
<i>Bombyx mandarina</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 002884353.1
<i>Antheraea pernyi</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	ABQ12255.1
<i>Antheraea pernyi</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 610997.1
<i>Choristoneura fumiferana</i> multiple nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	NP 848435.1
<i>Anticarsia gemmatalis</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 803521.2
<i>Choristoneura fumiferana</i> DEF multiple nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	NP 932735.1
<i>Orgyia pseudotsugata</i> multiple nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	NP 046285.1
<i>Epiphyas postvittana</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	NP 203285.1
<i>Mamestra configurata</i> nucleopolyhedrovirus A	PEP_npv	AAQ11079.1
<i>Mamestra configurata</i> nucleopolyhedrovirus A	PEP_npv	NP 613143.1
<i>Mamestra configurata</i> nucleopolyhedrovirus B	PEP_npv	NP 689236.1
<i>Helicoverpa armigera</i> multiple nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 002332589.1
<i>Agrotis segetum</i> nucleopolyhedrovirus A	PEP_npv	YP 529719.1
<i>Spodoptera frugiperda</i> multiple nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 001036337.1
<i>Spodoptera exigua</i> multiple nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	NP 037806.1
<i>Spodoptera litura</i> nucleopolyhedrovirus II	PEP_npv	YP 002332745.1
<i>Chrysodeixis chalcites</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 249725.1
<i>Trichoplusia ni</i> single nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 309002.1
<i>Clanis bilineata</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 717652.1
<i>Adoxophyes honmai</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	NP 818751.1
<i>Adoxophyes orana</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 002300617.1
<i>Lymantria dispar</i> multiple nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	NP 047773.1
<i>Lymantria xyliana</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 003517860.1
<i>Euproctis pseudoconspersa</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 002854716.1
<i>Ectropis obliqua</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 874301.1
<i>Orgyia leucostigma</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 001651019.1
<i>Leucania separata</i> nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	YP 758455.1
<i>Helicoverpa zea</i> single nucleopolyhedrovirus	PEP_npv	NP 542747.1
<i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus NNg1	PEP_npv	YP 002274050.1

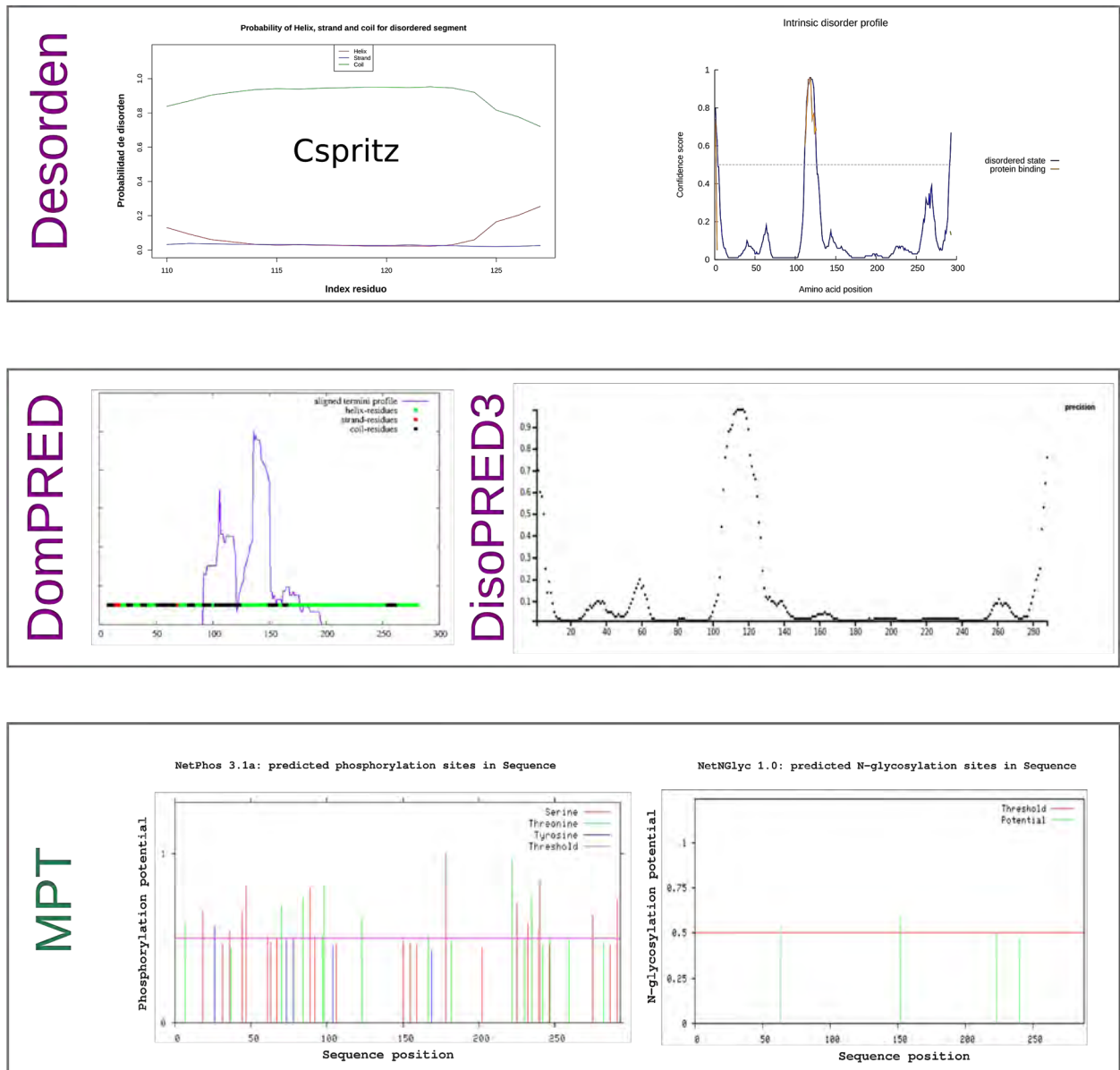


Figura S1.1. Predicción de desorden usando el servidor Cspritz (Panel superior). Predictores utilizando el flujo de trabajo de PSIPRED (panel intermedio). Predicción de modificaciones post traduccionales utilizando NetPhos para fosforilación y NetNGlyc para la N-glicosilación (panel inferior).



Capítulo 3. Generación y caracterización de un sistema de empaquetamiento de OB en células de insecto

Introducción

En vista de su potencial patogénico, los baculovirus han sido estudiados como importantes candidatos insecticidas en el marco del control biológico de plagas (Haase *et al.*, 2015; Kroemer *et al.*, 2015; López *et al.*, 2018). Los baculovirus son especialmente atractivos como agentes de control biológico debido a su rango estrecho de huéspedes, a la viabilidad y a la persistencia en un ambiente hostil. Como se ha mencionado anteriormente, en el ambiente, principalmente en el follaje y en el suelo, los baculovirus se encuentran como cuerpos de oclusión (OB) (Jehle *et al.*, 2006). A su vez, los OB están recubiertos por una envoltura denominada cálix o envoltura del poliedro (PE), compuesta principalmente de la proteína de envoltura de poliedro (PEP), también conocida como PP34, una fosfoproteína de 34.5 kDa que forma múltiples láminas alrededor de los OB representando aproximadamente un tercio de su volumen (Sajjan & Hinchigeri, 2016). El ciclo infeccioso comienza cuando los insectos se alimentan del follaje contaminado ingiriendo los OB. Una vez en el intestino medio, los OB se disuelven, liberando los viriones derivados de la oclusión (ODV) que deben atravesar la primer barrera de defensa: la membrana peritrófica (del inglés, *peritrophic membrane* PM) del intestino medio de la larva, para luego ingresar a las células epiteliales e iniciar un ciclo replicativo (Rohrmann, 2019).

Algunos baculovirus han sido modificados genéticamente para mejorar su infectividad, incorporando proteínas insecticidas en los OB de manera que permitan aumentar la permeabilidad de la PM, modificar la fisiología o afectar al sistema nervioso de larva (Hegedus *et al.*, 2009; Mitsuhashi *et al.*, 2007; Haase *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017). A su vez, una estrategia extensamente explorada consiste en la fusión de proteínas insecticidas candidatas a la poliedrina con la finalidad de ser direccionadas al OB (Ali *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2013; López *et al.*, 2018). En este trabajo y debido a la gran abundancia de PEP, se consideró a esta proteína como potencial candidata para direccionar polipéptidos insecticidas foráneos a la envoltura externa del OB. Esta localización permitiría una

interacción más inmediata y directa con la barrera de la PM durante la infección por vía oral de larvas susceptibles.

Debido a las limitaciones para la liberación y comercialización de organismos genéticamente modificados (OGM) así como restricciones serias para la comercialización de los productos vegetales derivados de cultivos transgénicos los baculovirus genéticamente modificados podrían ser considerados incompatibles en el marco de la agricultura ecológica sostenible (Tiedje *et al.*, 2014). Por estas razones, se propone en este trabajo desarrollar una estrategia que permita obtener baculovirus con capacidades insecticidas potenciadas a través de la incorporación de proteínas heterólogas sin recurrir a modificaciones genéticas. Debido al éxito de su uso como bioinsecticida para controlar las poblaciones de la oruga *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), un importante defoliador de los campos de soja en diferentes países de América del Sur, en este trabajo se decidió mejorar al virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) (Levy *et al.*, 2011; Moscardi, 2007; Haase *et al.*, 2015).

La estrategia general consiste en la producción de OB en líneas celulares transgénicas que expresen genes cuyos productos sean dirigidos a la estructura del OB. De esta manera, se pretende incorporar al OB proteínas heterólogas que puedan incrementar su poder insecticida, quedando el transgén contenido en el genoma de la célula hospedadora (en *trans*). Al purificar los OB para su formulación, el producto insecticida consistiría en virus no modificados en su genoma (*wt*) y quedaría libre del contenido transgénico. Para asegurar el direccionamiento de las proteínas candidatas a la estructura del OB, se producirán proteínas quiméricas que consistan en una fusión al gen de PEP.

En este capítulo se plantea el diseño y el desarrollo de la prueba concepto para evaluar la capacidad de direccionamiento del polipéptido de fusión de GFP en el extremo N-terminal de PEP de AgMNPV en los cuerpos de oclusión mediante el uso de una línea celular de insecto transgénica que expresa constitutivamente esta fusión traduccional (Figura 3.1). Se evaluará la expresión y localización de la proteína quimérica en los OB de tipo salvaje de

dos baculovirus AgMNPV (rango de huésped estrecho) y AcMNPV (rango de huésped amplio).

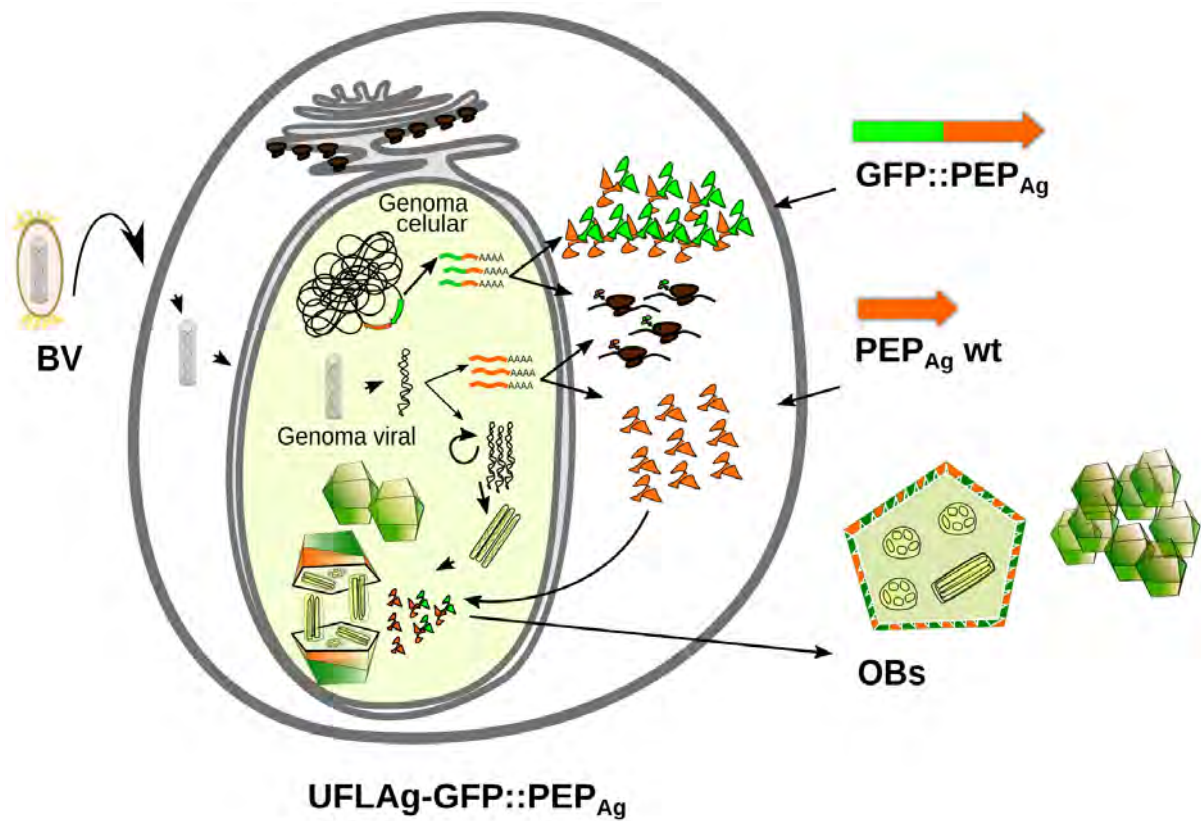


Figura 3.1. Esquema gráfico del objetivo general de este capítulo: cuerpos de ocusión producidos en una línea celular de insecto transgénica que expresa la proteína recombinante GFP::PEP_{Ag}.

Objetivos específicos

- Prueba concepto del empaquetamiento de proteínas recombinantes en *trans*: Generación de una línea celular derivada de lepidóptero que exprese la proteína GFP fusionada en el extremo N-terminal de PEP de AgMNPV.
- Evaluación y caracterización de los cuerpos de oclusión de AgMNPV y AcMNPV empaquetados en esta línea celular de insecto transgénica.
- Análisis de cuantificación relativa de la fusión proteica en los poliedros de AcMNPV y AgMNPV salvajes. A partir de este análisis, se pretende determinar las diferencias en la capacidad de incorporar proteínas quiméricas.
- Ensayos de localización subcelular de la proteína de fusión GFP::PEP_{Ag} en el contexto de infección viral.

Materiales y Métodos

Células y virus

Las células High Five™ (BTI-TN-5B1-4, derivadas de *Trichoplusia ni*) y UFL-Ag-286 (derivada de *Anticarsia gemmatalis*), fueron mantenidas a 28°C en medio de Grace (Invitrogen™) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Internegocios S.A., Mercedes, Argentina). El baculovirus AcMNPV-C6 fue propagado en monocapa de células High Five™ y el baculovirus AgMNPV-2D en las células UFL-Ag-286, y el título viral se calculó mediante ensayo de placas siguiendo el protocolo estándar (O'Reilly *et al.*, 1994; Sieburth & Maruniak, 1988).

Construcción de los vectores de expresión

El vector de expresión pIP-V5/His es una versión modificada del vector comercial pIB-V5/His (Invitrogen™) en el que el gen de resistencia blastidina ha sido reemplazado por el *cassette* de selección puromicina. El gen *pac*, que codifica para el *cassette* de selección de la puromicina, fue amplificado por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con los *primers* Fw puro y Rv puro utilizando como molde un plásmido desarrollado en nuestro laboratorio bajo las condiciones que se detallan en el Anexo. A continuación, se purificó el producto de PCR y se clonó en el vector de clonado pGEM-T Easy™ (Invitrogen™) para generar el pGEMT-Puro. Este plásmido y el vector comercial pIB-V5/His se digirieron con las enzimas de restricción *NcoI* y *BglII*. Finalmente, el ORF de la puromicina se subclonó en el vector pIB-V5/His generando el plásmido pIP-V5/His en el que se intercambió el marcador de selección de la blastidina por el de la puromicina. Además, este vector de expresión contiene el promotor temprano constitutivo pOie2 y la señal de poliadenilación derivada del gen *ie1* de *Orgyia pseudotsugata* MNPV (OpMNPV) flanqueando la región del sitio de clonado múltiple (del inglés, *multiple cloning site* MCS). Para la generación del plásmido pIP-GFP::PEP_{Ag}, el ORF, que codifica para PEP fue amplificado por PCR utilizando como molde el genoma de AgMNPV-2D (Genbank

accession number NC_008520) con los *primers* FpепNter y RpепNter (ver Anexo) incorporando sitios de clivaje de enzimas de restricción junto con una secuencia que codifica para un *linker* flexible (péptido: GGGGS). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 55 °C por 20 s, y 72 °C por 45 s. El producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T Easy™ y, luego, escindido por digestión con las enzimas *SacI* y *XhoI*. Este fragmento fue insertado entre los sitios *SacI-XhoI* del vector de expresión pIP-V5/His para generar el pIP-PEP_{Ag}. El gen indicador *egfp* (del inglés, *enhanced green fluorescent protein* eGFP, desde ahora denominada GFP) fue amplificado utilizando como molde el plásmido pEGFP-N3 (Clontech) por PCR usando los *primers* Fegfp y Regfp s/s (ver Anexo). Las condiciones de la reacción de PCR fueron las mismas que las descritas anteriormente. El fragmento resultante *egfp* fue clonado en el plásmido pGEM-T Easy™ y luego subclonado en el pIP-PEP_{Ag} entre los sitios *SacI* y *BamHI* y también en el vector pIP-V5/His (*SacI-BamHI*) para generar el plásmido pIP-GFP::PEP_{Ag} y pIP-GFP, respectivamente. La secuencia de todos los plásmidos con productos de PCR fueron confirmadas por secuenciamiento de Sanger (Macrogen Corporation, Corea del Sur).

Generación de líneas celulares de insecto transgénicas que expresan GFP y GFP::PEP_{Ag}

Se sembraron las células UFL-Ag-286 en placas de 6-pocillos (2×10^6 células/pocillo) y luego fueron transfectadas con 1 µg de DNA plasmídico usando 3 µl de 1 mg/ml de polyethylenimina (PEI) según lo establecido en Ogay *et al.*, (2006) para la generación de las líneas celulares transgénicas UFLAg-GFP::PEP_{Ag} y UFLAg-GFP (ver Anexo). Luego de 24 h post transfección (h p.t.), el medio de cultivo fue reemplazado con medio fresco con 10 µg/mL de puomicina e incubado por 2–3 semanas con recambio de medio de cultivo ocasional. Los clones resistentes a la puomicina fueron aislados por el método de dilución terminal (ver Anexo, Lynn & Harrison, 2016). Aquellos pocillos con las células transgénicas fueron examinados por microscopía utilizando el filtro de GFP en el microscopio invertido de epifluorescencia Nikon Eclipse Ti. Para todos los experimentos se utilizaron los mismos

clones de las células monoclonales de UFLAg-GFP y UFLAg-GFP::PEP_{Ag} en paralelo con la línea celular de insecto original UFLAg-*wt*.

Purificación de cuerpos de oclusión

Las líneas celulares UFLAg-*wt*, UFLAg-GFP, y UFLAg-GFP::PEP_{Ag} (10⁴ células/pocillo) fueron infectadas con AcMNPV o AgMNPV (MOI: 10 pfu/cel). A las 120 h p.i., los poliedros fueron purificados de acuerdo al protocolo estándar con algunas modificaciones (ver Anexo, O'Reilly *et al.*, 1994). Brevemente, se partió de 15 ml de medio de cultivo infectado, se sedimentaron las células a 3000 x g por 5 min, se resuspendieron en ddH₂O y se procedió a homogeneizar mediante sonicador con dos ciclos de 30 s al 50% de potencia en frío (Sonics Vibra-Cell). Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación (500 x g, 2 min) y, luego, el sobrenadante con OB centrifugado a 15000 x g por 20 min. Los OB fueron lavados dos veces y resuspendidos en PBS. Para finalizar, se repartió el volumen en tubos eppendorf cargados con 500 ml de una solución de sacarosa 50% p/p (colchón) y se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C en una microcentrífuga (Eppendorf). A continuación, se retiró el sobrenadante y se lavó sucesivamente el *pellet* para eliminar la sacarosa. Finalmente, la muestra se resuspendió en 100 ml de agua o PBS y se contaron los OB en cámara de Neubauer al microscopio óptico con contraste de fase y un objetivo 20X. Los OB GFP positivos fueron detectados por microscopía de fluorescencia (objetivo 40X). Tres imágenes con más de 1000 OB fueron tomadas para cada una de las muestras (AgMNPV y AcMNPV) y se procesaron con el programa ImageJ, (<https://imagej.nih.gov/ij/>). El resultado se expresa en un gráfico de barras como: % OB GFP-positivos vs. el número total de OB en las muestras.

Análisis de microscopía confocal y SEM

Las células UFLAg-GFP::PEP_{Ag} y UFLAg-GFP adheridas a los cubreobjetos fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, seguido de lavados con PBS 1X o, en su defecto, con solución

fisiológica. Los núcleos celulares fueron teñidos con verde de metilo por 1 minuto seguido de lavados con PBS 1X o, en su defecto, con solución fisiológica. Finalmente, los preparados fueron montados con *polymount* (Polysciences) y cubreobjetos para ser observados en el microscopio confocal Leica TCS SP5 (zoom óptico de 63X). Asimismo, los OB de AcMNPV y AgMNPV purificados a partir de células UFLAg-GFP y células UFLAg-GFP::PEP_{Ag}, infectadas en experimentos independientes, se visualizaron en el microscopio confocal Leica TCS SP5 (zoom óptico de 63X). En paralelo, se utilizó la microscopía electrónica de barrido (SEM) para examinar la envoltura del poliedro y evaluar la integridad de la superficie de los OB derivados de las células UFLAg-GFP::PEP_{Ag}. Brevemente, las muestras de OB se fijaron durante la noche en la suspensión de fijador (formaldehído al 4% y glutaraldehído al 1% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4) y, posteriormente, se lavaron dos veces con el tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4. Luego, las muestras se deshidrataron parcialmente con etanol al 70%, se secaron, se colocaron sobre soportes de aluminio usando etiquetas de carbono, se recubrieron con oro-paladio y se fotografiaron (aumento, 10000X; 12,5 kV, FEI Quanta 200). Se seleccionaron al azar quince OB por cada virus y se les midió el tamaño para calcular el diámetro promedio.

SDS-PAGE y Western blot

Los *pellet* de las células UFLAg-*wt*, UFLAg-GFP y UFLAg-GFP::PEP_{Ag} infectadas y no infectadas, así como las muestras de control negativo y positivo (células UFL-Ag-286 y proteína GFP purificada, respectivamente) se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón RIPA que contiene 1:100 del inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich). Las proteínas fueron visualizadas mediante SDS-PAGE (10% acrilamida) y mediante tinción de los geles con Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% p/v (ver Anexo). Para la realización de los ensayos de Western Blot, las proteínas de los geles fueron transferidas a una membrana de PVDF (HybondTM-P; Amersham Biosciences, Little Chalfont, GB) durante 30 minutos aplicando una diferencia de potencial de 15 V en el sistema semi-seco del equipo Trans-blot

SD (BioRad, Hercules, CA). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía Tween 20 al 0,01% y se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-GFP (Chromotek, 3#9) durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con TBS-Tween y, luego, se incubaron con el anticuerpo secundario IgG anti-rata conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (Thermo Fisher Scientific, #61-9520) a temperatura ambiente durante 1 h. La membrana se lavó tres veces con TBS-Tween y se reveló incubando con una solución luminol 1.25 mM (Sigma, St. Louis, MO), ácido p-cumárico 200mM (Sigma, St. Louis, MO) y H₂O₂ 2.7 mM en Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5. Las imágenes fueron obtenidas con el adquisidor EC3TM 500 (UVP, Upland, CA).

Espectroscopía de masas

Los análisis se realizaron en el Centro de Proteómica CEQUIBIEM, UBA-CONICET (Universidad de Buenos Aires - Consejo Nacional de Investigación). Brevemente, las muestras de OB de AcMNPV y AgMNPV derivadas de células UFLAG-GFP::PEP_{Ag} se cuantificaron mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976), se redujeron, alquilaron y precipitaron (ver Anexo) y luego se digirieron con tripsina en el laboratorio que presta el servicio. Las muestras digeridas se analizaron por nano-HPLC, acoplado a un espectrómetro de masa modelo Q-Exactive (Thermo Scientific). Se usó un voltaje de 3.5 kV para la ionización por ElectroSpray (Thermo Scientific, EASY-SPRAY). El equipo cuenta con una celda de HCD (HCD del inglés, *higher-energy collisional dissociation*) y un analizador Orbitrap, lo que nos permitió en primer lugar una separación de los péptidos obtenidos por digestión trípica y una posterior identificación de los péptidos en la muestra. De esta manera, se obtuvo el espectro denominado MS¹. A partir del mismo se seleccionaron los cinco péptidos más intensos como precursores para la fragmentación en la trampa iónica. A continuación, se obtiene el espectro MS/MS. El rango de masa escaneada fue de 400-1800 m/z, a una resolución de 70000 a 400 m/z, y los 12 iones más intensos en cada ciclo, se aislaron secuencialmente, y se fragmentaron por disociación de colisión de mayor energía

(HCD). Los péptidos con una carga +1 o con un estado de carga no asignado se excluyeron de la fragmentación.

Análisis de los datos de espectroscopía de masas

Para la identificación de las proteínas, se hicieron búsquedas con los espectros de fragmentación (MS/MS) en MASCOT, empleando el paquete informático *Proteome Discoverer*TM con los parámetros determinados por el prestador de servicios CEQUIBIEM. Brevemente, la búsqueda de las proteínas se realiza contra la base de datos de los proteomas de AgMNPV y AcMNPV (números de acceso: DQ813662.2 y KM667940, National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) digeridos *in silico* con tripsina permitiendo como máximo y, por péptido, un único sitio de clivaje sin detectar. Se analizaron todas las muestras por triplicado. Para el análisis estadístico de la cuantificación relativa sin marcaje se utilizó el mismo software, y la búsqueda la realizó el prestador de servicios CEQUIBIEM. Se estableció una tolerancia de masa precursora de 10 ppm y un 0,05 Da para la tolerancia de iones. Los datos de LC-MS/MS se analizaron con el software *Proteome Discoverer*TM para una cuantificación de proteínas sin marcaje usando los valores de emPAI (del inglés, exponentially modified protein abundance index emPAI). Los valores de emPAI de GFP::PEP_{Ag} se convirtieron en porcentajes molares al normalizarlos con la suma de todos los valores de emPAI (Shinoda *et al.*, 2009).

$$\% \text{ Porcentaje molar (en moles)} = \frac{\text{emPAI}_{\text{GFP::PEP}_{\text{Ag}}}}{\sum(\text{emPAI})} \times 100$$

Resultados

Construcción de vectores de expresión

Habiendo analizado la secuencia de la proteína PEP de AgMNPV *in silico* en el capítulo anterior, se propuso la expresión en células de insecto con el fin de evaluar si la proteína suministrada en *trans* afecta la morfología de estas células (ej. alteraciones del citoesqueleto) y determinar su utilidad como plataforma empaquetadora de proteínas recombinantes. Para ello, se desarrollaron 4 vectores de expresión. El primero es el vector molde o *backbone* pIP-V5His que es una versión modificada del vector comercial pIB-V5His (Invitrogen™). La modificación se refiere al cambio del *cassette* de selección reemplazando el gen de resistencia a la blasticidina (*bsr*) por el de la puromicina acetil transferasa (*pac*). Esta modificación nos permite reducir ampliamente los costos de selección y producción en cultivo celular. Para ello, se amplificó por la técnica de PCR el gen *pac* y, luego de su purificación, se incorporó en el vector de clonado para finalmente ser subclonado en el vector de expresión pIB-V5His como se muestra en la Figura 3.2 (panel superior). A continuación, se construyeron los plásmidos para expresar las dos proteínas recombinantes: pIP-GFP::PEP_{Ag}, que contiene la secuencia completa de PEP AgMNPV, en adelante denominada PEP_{Ag}, fusionada en su extremo N-terminal a la proteína fluorescente GFP, y pIP-GFP, que contiene el ORF de *gfp* para ser utilizado como un plásmido de control. El esquema de clonado se muestra en la Figura 3.2, panel medio e inferior, respectivamente. Los clones positivos de los tres vectores de expresión fueron identificados por *colony PCR* (datos no mostrados) y luego, se corroboró el patrón por digestión enzimática, que resultó en el patrón de bandas con los tamaños esperados para los 3 vectores. En el panel superior, se observan las bandas correspondientes a la puromicina (~700 pb) y al pIP-V5/His (~3700 pb), en el panel medio, se muestran las bandas correspondientes a PEP_{Ag} (~950 pb) y al pIP-V5/His (~3700 pb) y, en el panel inferior, se observan las bandas correspondientes a GFP (~750 pb), GFP::PEP_{Ag} (~1700) y al pIP-V5/His (~3700 pb). La secuencia de estos plásmidos fueron confirmadas por

secuenciamiento de Sanger (Macrogen Corporation, Corea del Sur).

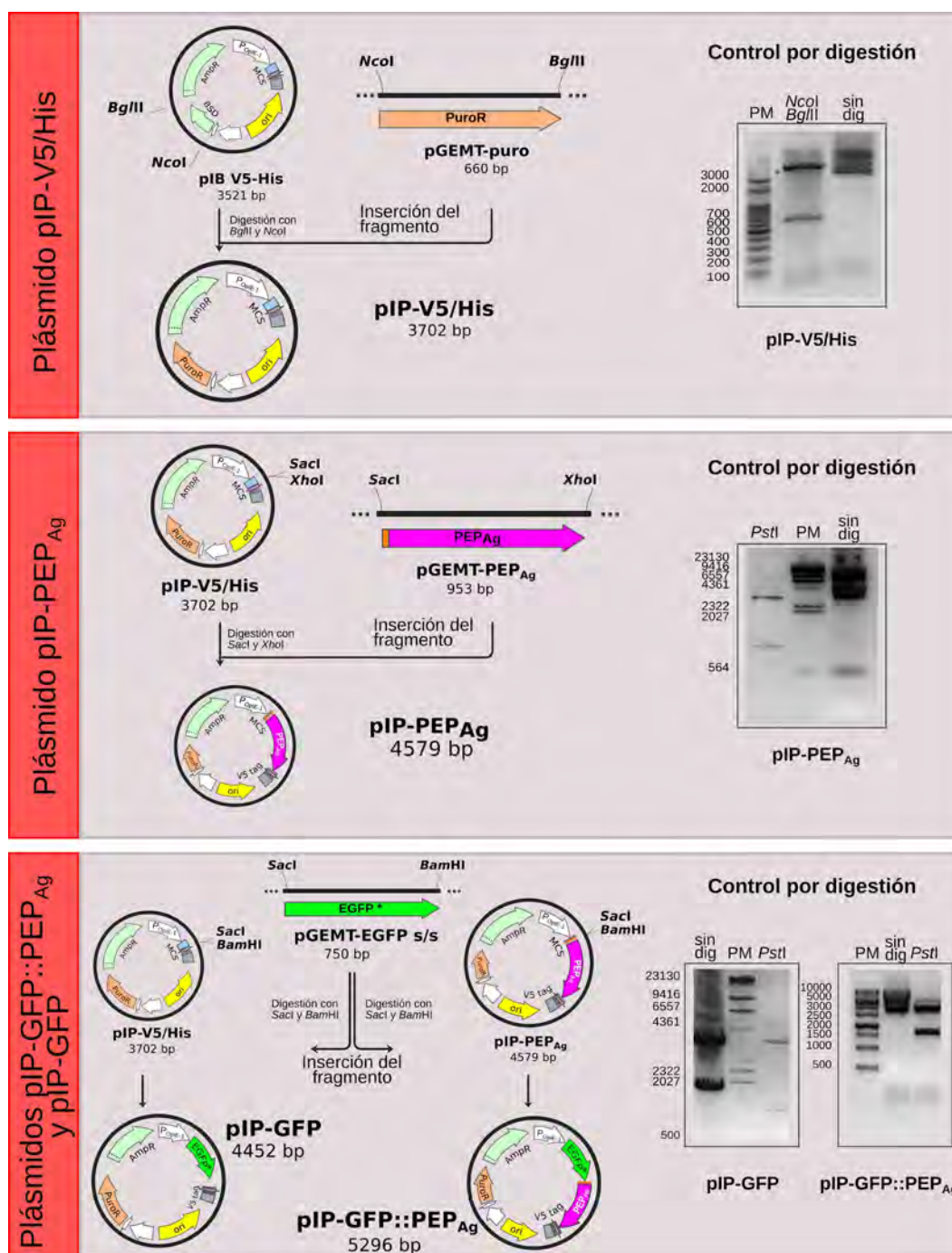


Figura 3.2. Generación de los vectores de expresión. Panel superior: Esquema del clonado donde se intercambia el cassette de selección de la blasticidina por el de la puromicina en el vector pIB-V5/His para dar lugar al pIP-V5/His. A la derecha, el *screening* del clonado del gen *pac* en el vector pIP-V5/His por digestión y liberación del inserto con las enzimas de restricción *Nco*I y *Bgl*II observándose la banda de ~700 pb correspondiente al ORF de puromicina. En el panel intermedio: Esquema del clonado del gen *pep* de AgMNPV en el vector pIP-V5/His. A la derecha, el *screening* del clonado del gen *pep* en el vector pIP-PEP_{Ag} por digestión y liberación del inserto con la enzima de restricción *Pst*I observándose la banda de ~950 pb correspondiente al ORF de PEP. Panel inferior: Esquema del clonado del gen *gfp* en el vector pIP-V5/His y pIP-PEP_{Ag}. A la derecha, el *screening* del clonado del gen *gfp* en el vector pIP-GFP y pIP-GFP::PEP_{Ag} por liberación del inserto con la enzima de restricción *Pst*I observándose la banda de ~750 pb o ~1700 pb correspondiente al ORF de *gfp* o *gfp*::*pep*_{Ag}, respectivamente.

Desarrollo de líneas celulares de insecto monoclonales

Las células UFL-Ag-286 (UFLAg-*wt*) fueron modificadas genéticamente para que expresen el polipéptido de fusión GFP::PEP_{Ag} de manera constitutiva con el fin de evaluar si los OB adquieren la proteína PEP_{Ag} suministrada en *trans* durante la morfogénesis en estas células. Con los vectores de expresión pIP-GFP::PEP_{Ag} y pIP-GFP se generaron dos líneas celulares de insectos transgénicas monoclonales: UFLAg-GFP::PEP_{Ag}, que expresa el polipéptido GFP::PEP_{Ag} y UFLAg-GFP, que expresa la proteína GFP, respectivamente. Esta última línea celular, utilizada como control, permitió analizar si el direccionamiento es dependiente de la fusión a la proteína de envoltura o si, por el contrario, existe una incorporación al azar en los OB. Para generar estas líneas celulares se transfectaron las células UFLAg-*wt* con los plásmidos de expresión correspondientes y luego se incubaron con medio de selección (puromicina) hasta que se obtuvieron varios clones resistentes al antibiótico. La expresión del gen indicador *gfp* en ambas células transgénicas se evaluó mediante microscopía de fluorescencia,. La presencia de ambas proteínas recombinantes, GFP::PEP_{Ag} o GFP, se evidenció por su fluorescencia característica en las líneas celulares seleccionadas (Fig. 3.3a). En el panel de la Figura 3.3b se muestra el resultado del SDS-PAGE donde se comparó la expresión de proteínas entre las células UFLAg-*wt* y las células transgénicas UFLAg-GFP::PEP_{Ag} observándose una nueva banda a los 65 kDa del tamaño esperado para GFP::PEP_{Ag}. Este patrón de expresión se analizó por western blot con anticuerpos anti-GFP y se confirmó que la banda de 65 kDa corresponde a la expresión del producto de fusión GFP::PEP_{Ag} (Fig. 3.3c). Como control negativo se utilizaron células UFLAg-*wt* y como positivo las células UFLAg-GFP. A partir de estos experimentos, se comprobó la expresión y presencia de las proteínas recombinantes en las células de insecto transgénicas y monoclonales UFLAg-GFP y UFLAg-GFP::PEP_{Ag}.

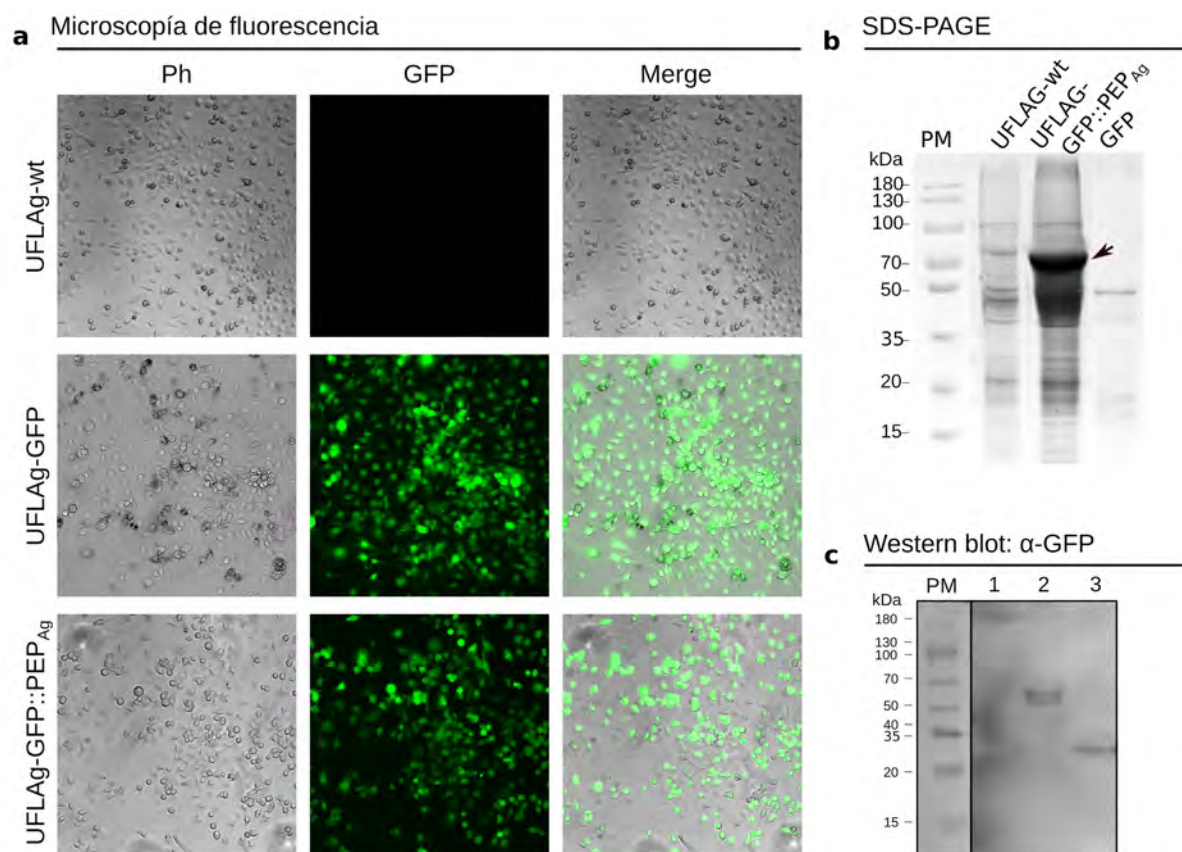


Figura 3.3. a. Microscopía de fluorescencia de las líneas celulares monoclonales. Panel superior: células UFLAG-wt, panel intermedio: UFLAG-GFP y panel inferior: UFLAG-GFP::PEP_{Ag} (200x). Morfología celular en contraste de fase (del inglés, *Phase contrast* Ph), UV fluorescencia (GFP) y superposición de ambas imágenes (del inglés, *Merge*). b. SDS-PAGE: gel de poliacrilamida (10%), de izquierda a derecha: PM: marcador de peso molecular, calle 2: control negativo cél. UFLAG-wt, calle 3: cél. UFLAG-GFP::PEP_{Ag} y calle 4: control positivo, proteína purificada GFP. c. Western blot: el anticuerpo monoclonal anti-GFP fue usado para detectar GFP y la proteína de fusión GFP::PEP_{Ag}: PM: marcador de peso molecular, calle 1: control negativo, célula UFLAG-wt, calle 2: cél. UFLAG-GFP::PEP_{Ag} y calle 3: cél. UFLAG-GFP.

Direccionamiento de GFP::PEP_{Ag} en los OB de AgMNPV y AcMNPV

Para evaluar la localización del polipéptido de fusión GFP::PEP_{Ag} en los OB, las células UFLAG-GFP::PEP_{Ag} fueron infectadas con el baculovirus salvaje AgMNPV. Adicionalmente, se decidió analizar en paralelo la capacidad de PEP_{Ag} de complementar otros baculovirus con los que contamos en el laboratorio dado que nuestra finalidad pretende obtener una línea celular que permita complementar la mayor cantidad de virus posibles y, de esta manera, ampliar el rango de huéspedes plagas. Sieburth & Maruniak (1988), reportaron que las células UFL-Ag-286 también son susceptibles a la infección por AcMNPV; por lo tanto,

se decidió estudiar a este baculovirus como posible candidato. Primero, se analizó la homología de secuencias entre la proteína PEP_{Ag} y la PEP de AcMNPV (Figura 3.4a). El alineamiento se realizó utilizando ClustalO y se obtuvo un alto porcentaje de identidad (66%), donde la menor puntuación en el alineamiento se debe a la región desordenada que une a los dominios N- y C-terminal de PEP. Por lo tanto, se decidió evaluar la capacidad de direccionamiento de GFP::PEP_{Ag} en los OB de AcMNPV y AgMNPV en las células UFLAg-GFP::PEP_{Ag}. El análisis por microscopía de campo claro mostró que la expresión constitutiva de la proteína recombinante en células UFLAg-GFP::PEP_{Ag} no afecta la replicación viral de AgMNPV o AcMNPV y que, en ambos casos, se producen poliedros con las características fenotípicas habituales (Figura 3.4b). Los mismos resultados se obtuvieron con la línea celular monoclonal control UFLAg-GFP, infectada con AgMNPV o AcMNPV (Figura 3.4c).

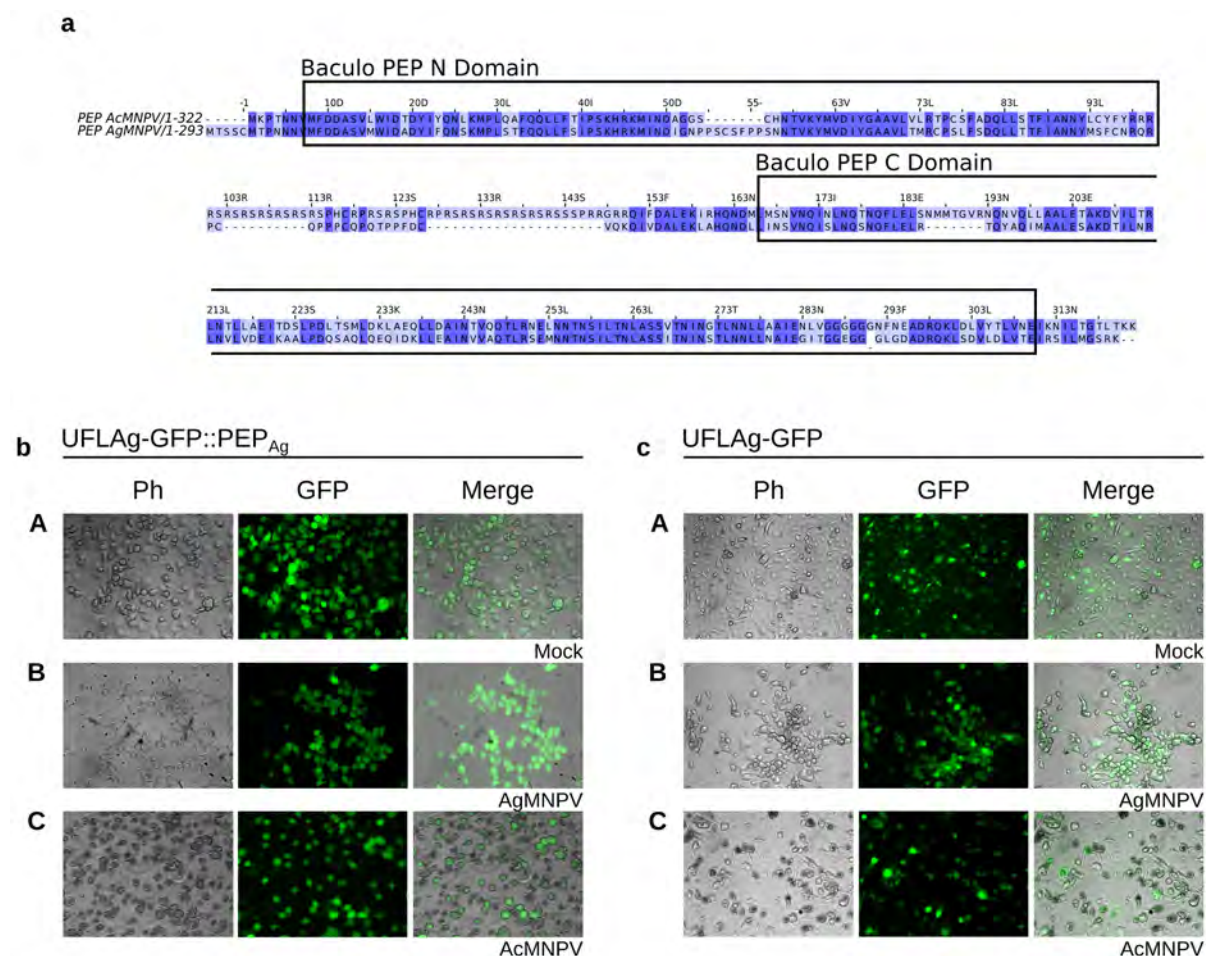


Figura 3.4. a. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de PEP derivada de AgMNPV (ABI13910.2) y AcMNPV (ABF30966.) usando ClustalO (<https://www.ebi.ac.uk/>) con los parámetros estándar y la edición con el programa JalView, los residuos de aminoácidos idénticos se resaltan en azul y los dominios conservados se encuentran encuadrados. b. Microscopía de fluorescencia de células de insecto transgénicas, morfología celular en contraste de fase (Ph), luz UV (GFP) y superposición de ambas imágenes (del inglés, *Merge*): a. Células UFLAg-GFP::PEP_{Ag}. Mock de infección (A, 200x), infectadas con AgMNPV (B, 200x), AcMNPV (C, 200x) a los 3 d p.i. b. Células UFLAg-GFP: Mock de infección (A, 200x), infectadas con AgMNPV (B, 200x), AcMNPV (C, 200x) a los 3 dp.i.

Caracterización de GFP::PEP_{Ag} en los OB de AgMNPV y AcMNPV

En experimentos paralelos se infectaron las células UFLAg-*wt*, UFLAg-GFP y UFLAg-GFP::PEP_{Ag} con los virus AgMNPV o AcMNPV (Figura 3.5a). Los OB producidos en estas células se purificaron y analizaron por western blot con anticuerpos anti-GFP para confirmar la localización de la proteína de fusión y determinar si PEP_{Ag} es la responsable del direccionamiento de GFP en el OB (Figura 3.5b). Los OB derivados de las células UFLAg-GFP::PEP_{Ag} infectadas fueron GFP positivos, mostrando la banda de 65 kDa correspondiente al tamaño del polipéptido de fusión. Por otra parte, no se observó señal de GFP en los OB derivados de las células UFLAg-GFP infectadas confirmando que la proteína GFP por sí sola no se direcciona a los OB. Estos resultados demuestran que la proteína PEP_{Ag} es la responsable de la localización de GFP::PEP_{Ag} en los OB de AgMNPV y AcMNPV. A continuación, se evaluó la eficiencia en la incorporación de GFP::PEP_{Ag} en los OB obtenidos a partir de la infección AgMNPV o AcMNPV en las células UFLAg-GFP::PEP_{Ag} en experimentos paralelos e independientes. Para ello, esta línea celular se infectó con ambos virus (por separado) con la misma multiplicidad de infección (MOI), los OB purificados se contaron por microscopía de fluorescencia por triplicado (Figura 3.5a). Los experimentos se realizaron por duplicado. El porcentaje de OB fluorescentes (GFP-positivos) versus OB no fluorescentes se muestran en el gráfico de barras (Figura 3.5c). El análisis estadístico por el test *t* de Student mostró que no hay diferencias significativas entre los dos morfotipos virales. Es importante remarcar, que el gen *pep* ha sido descrito como un gen especie específico, y que hasta la fecha no ha sido posible su complementación por

otros genes *pep* homólogos. Sin embargo, y como conclusión de estos experimentos, pareciera ser posible incluir una proteína PEP homóloga (AgMNPV) en el OB de AcMNPV cuando existe una co-expresión con la proteína PEP salvaje, en este caso la proteína PEP de AcMNPV. Finalmente, se evaluó por PCR un posible evento de recombinación entre el genoma de la célula y el genoma de los BV de AcMNPV o AgMNPV que diera por resultado la integración de la secuencia de DNA del polipéptido de fusión GFP::PEP_{Ag}. Los resultados muestran que no existió tal evento de recombinación luego del pasaje por las células UFLAg-GFP::PEP_{Ag} (Fig. S3.1).

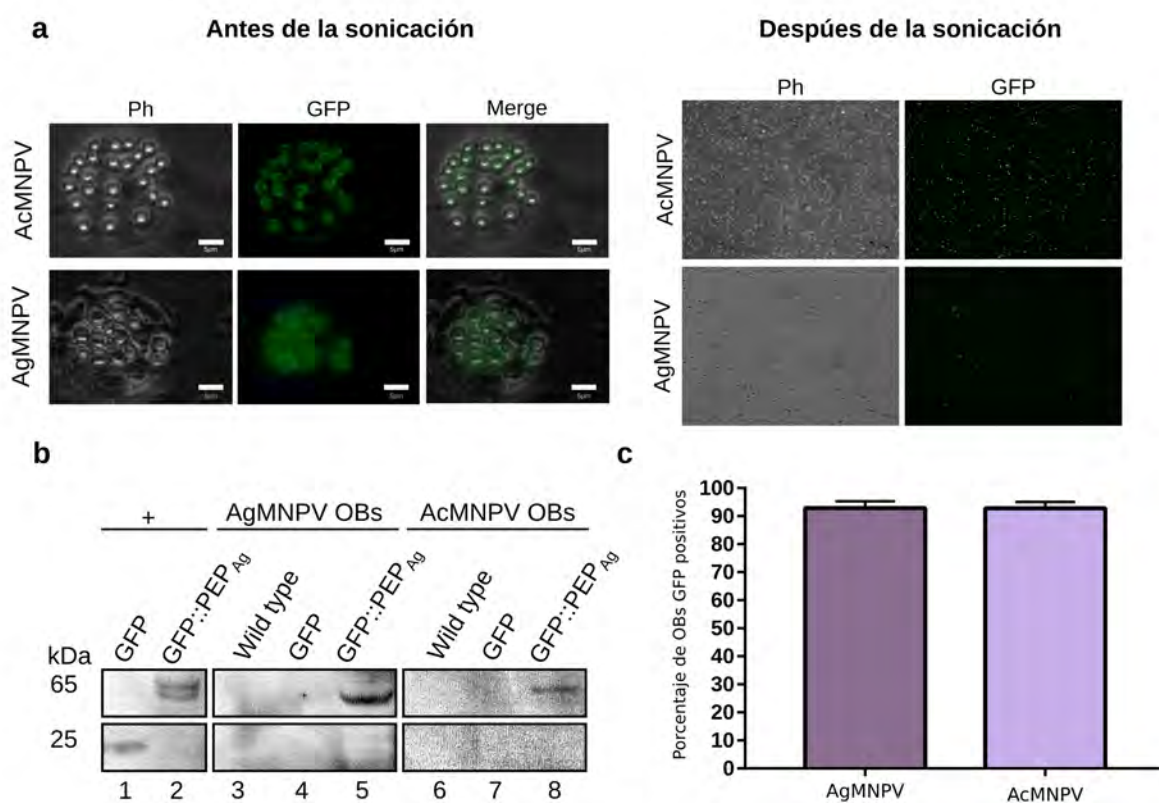


Figura 3.5. a. Imágenes representativas de los OB de AcMNPV o AgMNPV aislados de células UFLAg-GFP::PEP_{Ag}, luz UV (GFP), contraste de fase (Ph), superposición de ambas imágenes (del inglés, *Merge*). En el panel de la izquierda: 72 h p.i. en células UFLAg-GFP::PEP_{Ag} antes de la sonicación. En el panel de la derecha: los OB luego de la purificación por sonicación. b. Western blot (anti-GFP) calle 1: GFP purificada, calle 2: mock UFLAg-GFP::PEP_{Ag}, calles 3-4-5: OB AgMNPV purificados aislados de células UFLAg-wt, UFLAg-GFP y UFLAg-GFP::PEP_{Ag}, respectivamente, calles 6-7-8: OB AcMNPV purificados aislados de células UFLAg-wt, UFLAg-GFP y UFLAg-GFP::PEP_{Ag}, respectivamente. c. Análisis del rendimiento de los OB empaquetados con GFP::PEP_{Ag}, cada barra representa el porcentaje de OB fluorescentes referidos al número total de OB de AgMNPV o AcMNPV en las muestras. Test *t* Student, $p = 0.96$ ($n \geq 1000$ OB/muestra, realizados por triplicado).

Análisis de los cuerpos de oclusión empaquetados por diferentes microscopías

Estudios de microscopía confocal de los OB de AgMNPV y AcMNPV producidos en las células UFLAg-GFP::PEP_{Ag} infectadas confirman la presencia de la proteína recombinante de fusión GFP::PEP_{Ag} (Figura 3.6). A continuación, se buscó evaluar el fenotipo de la envoltura de estos OB y, para ello se realizó una microscopía electrónica de barrido (del inglés, *scanning electron microscopy* SEM). Nuestros resultados muestran una superficie lisa, intacta y homogénea típica de los cuerpos de oclusión salvajes en ambos virus como se muestra en la figura (Fig. 3.6). Las imágenes obtenidas por SEM se utilizaron para estimar las dimensiones de los poliedros; los valores obtenidos fueron 3 μ m y 2,30 μ m para AgMNPV y AcMNPV, respectivamente. Estos valores coinciden con los publicados previamente (Coulibaly *et al.*, 2009; Pombo *et al.*, 1998). En su conjunto, estos resultados indican que nuestra línea celular de insecto transgénica posee un alto rendimiento para suplementar los cuerpos de oclusión de virus salvajes con la proteína recombinante GFP::PEP_{Ag} sin desestabilizar la estructura de la envoltura del OB.

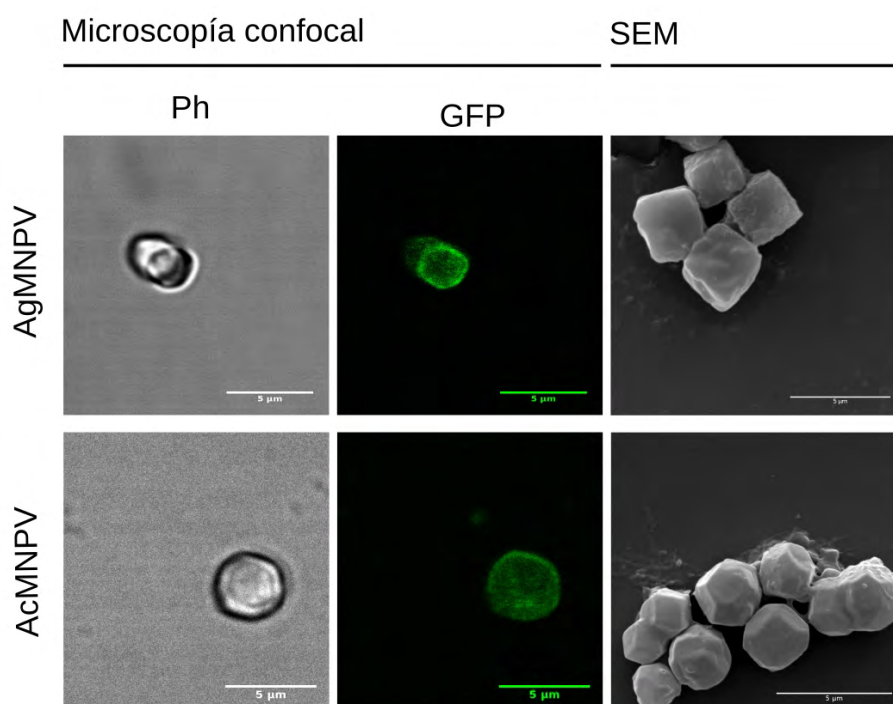


Figura 3.6. En el panel de la izquierda imágenes representativas de la microscopía confocal de OB de AgMNPV y AcMNPV purificados (objetivo 65x), contraste de fase (Ph) y filtro GFP. En el panel de la derecha: imágenes representativas de la microscopía electrónica de barrido (SEM) de los OB de AgMNPV y AcMNPV purificados (10000x).

Caracterización de los OB por espectrometría de masas

Los OB obtenidos por en células UFLAg-GFP::PEP_{Ag} infectadas con AgMNPV o AcMNPV, en experimentos paralelos, fueron analizados por espectrometría de masas en tándem (del inglés, *tandem mass spectrometry*) con el fin de caracterizar la composición proteica de los mismos y confirmar la incorporación de la proteína recombinante GFP::PEP_{Ag}. Los perfiles LC-MS/MS obtenidos fueron similares a los reportados en bibliografía para los OB de los virus salvajes de AcMNPV y AgMNPV (Braconi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2010): un total de 78 y 66 proteínas fueron identificadas para los OB empaquetados de AcMNPV y AgMNPV, respectivamente (Tabla S3.1). A su vez, se identificaron diez y siete péptidos únicos para GFP::PEP_{Ag} en AgMNPV y AcMNPV, respectivamente, confirmando la presencia de la proteína de fusión recombinante en los OB (Figura 3.7a). Quizás el hallazgo más importante fue la identificación de la proteína PEP propia del AcMNPV junto con la PEP_{Ag} recombinante. Esto puede interpretarse como la confirmación de que ambas proteínas no fueron mutuamente excluyentes en la competición durante el ensamblaje de los OB. Además de la identificación de las proteínas, esta técnica nos permitió realizar un análisis de cuantificación relativa libre de marcaje en los OB de las diferentes especies de baculovirus. Nuestro método está basado en el número de espectros asignados para una dada proteína (MS/MS) denominado emPAI (del inglés, *exponentially modified Protein Abundance Index*) (Tabla S3.1) (Ishihama *et al.*, 2005; Shinoda *et al.*, 2009). Un incremento en la abundancia de la proteína normalmente se correlaciona con un aumento en el número de péptidos proteolizados encontradas en el análisis. Un aumento de estos péptidos, conlleva a un aumento de la cobertura en la secuencia de la proteína: en el número de péptidos identificados y en el número de espectros detectados por proteína. Es importante tener en cuenta que, para poder realizar una cuantificación adecuada, es necesario un paso

previo de normalización de cada elución cromatográfica. En este trabajo, se realizó una normalización a nivel de la muestra biológica, que consistió en utilizar como estándar interno una proteína cuya expresión permanece constante en los diferentes grupos y condiciones experimentales del estudio. En este estudio se utilizó la proteína poliedrina (POLH), cuyo valor de emPAI es el más alto, con un valor límite consistente con el hecho de que la misma ocupa el 66% del volumen del OB convirtiéndose en la proteína más abundante (Megger *et al.*, 2013; Sajjan & Hinchigeri, 2016; Zhu *et al.*, 2010). Los valores normalizados de emPAI obtenidos con el programa *Proteome Discoverer*TM permitieron calcular de manera aproximada la cantidad de la proteína de fusión GFP::PEP_{Ag} en los OB de AcMNPV o AgMNPV (Fig. 3.7b). Para las muestras de proteína GFP::PEP_{Ag} en los cuerpos de oclusión de AgMNPV o AcMNPV el porcentaje molar fue de $8,82 \cdot 10^{-02}$ y $1,1 \cdot 10^{-04}$, respectivamente. Esta aproximación refleja que en los OB de AgMNPV la proteína recombinante se incorporó unas ~100 veces más que en los OB de AcMNPV. Es necesario realizar más experimentos para validar estos datos y obtener una cuantificación más precisa de la GFP::PEP_{Ag} incorporada en los OB.



Figura 3.7. a. Secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante GFP::PEP_{Ag}: el segmento de GFP se resalta en verde y el fragmento de PEP_{Ag} en naranja. La secuencia del *linker* en negrita. Los péptidos únicos de GFP::PEP_{Ag} identificados por Orbitrap se encuentran subrayados: péptidos en los OB de AcMNPV en rojo y péptidos en los OB de AgMNPV en azul. b. Cuantificación relativa libre de marcaje con los resultados de LC-MS/MS, en la tabla se resalta en amarillo el porcentaje molar de GFP::PEP_{Ag} en los OB de AcMNPV y AgMNPV aislados de las células UFLAg-GFP::PEP_{Ag}.

Caracterización de la localización subcelular de GFP::PEP_{Ag}

A partir de los experimentos anteriormente mencionados, en los que las células UFLAg-GFP::PEP_{Ag} expresan la proteína recombinante de manera constitutiva se observó un cambio en el patrón de localización de esta proteína en el contexto de la infección viral. En consecuencia, se propuso evaluar la localización subcelular de GFP::PEP_{Ag} antes y después de la infección por el baculovirus AgMNPV. Para ello, las células UFLAg-GFP::PEP_{Ag} se observaron al microscopio confocal luego de 24 h p.i.; como control de la localización mediada únicamente por GFP se utilizaron las células UFLAg-GFP. En la Figura 3.8, la señal fluorescente en las células UFLAg-GFP se encuentra distribuida en todo el citoplasma y, particularmente, en el núcleo. En cambio, en las células UFLAg-GFP::PEP_{Ag}

se observa una disminución de GFP en el núcleo celular, una amplia distribución en el citoplasma y una alta concentración formando un anillo alrededor del núcleo. A las 24 h p.i., en las células UFLAg-GFP::PEP_{Ag} se observa un cambio en la localización subcelular de la proteína recombinante concentrándose principalmente en el interior del núcleo.

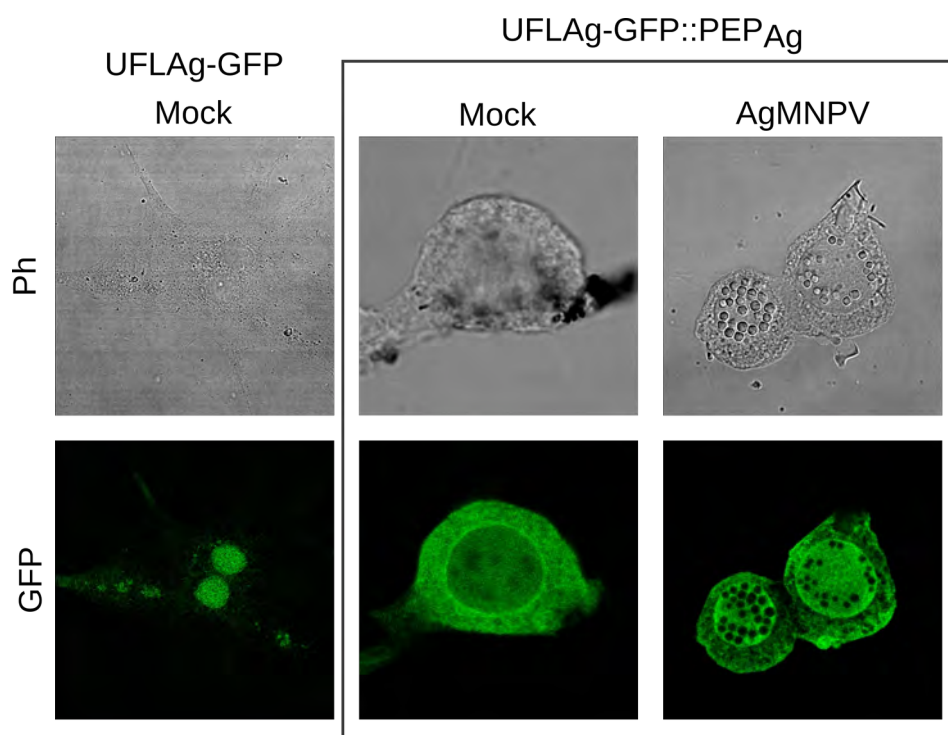


Figura 3.8. Microscopía de fluorescencia confocal de las líneas celulares monoclonales. Panel izquierdo: mock células UFLAg-GFP, panel intermedio: mock células UFLAg-GFP::PEP_{Ag} y panel derecho: células UFLAg-GFP::PEP_{Ag} infectadas con AgMNPV. Morfología celular en contraste de fase (Ph) y UV fluorescencia (GFP), (65X).

En concordancia con estos resultados, se analizó por microscopía confocal las células UFLAg-GFP::PEP_{Ag} a diferentes tiempos de post infección con el virus AgMNPV. En la Figura 3.9, se observa la progresión de la infección luego de las 3, 6, 12 y 24 h p.i., la expresión de GFP::PEP_{Ag} y su localización del núcleo en los compartimientos citoplásmico y nuclear. A medida que avanza la infección viral, la localización de GFP::PEP_{Ag} se va

concentrando en el núcleo. El punto de inflexión donde se produce la mayor translocación de la proteína recombinante desde el citoplasma al núcleo, se ubica entre las 12 y 24 h p.i., en concordancia con la etapa tardía de la infección. En esta etapa, se inhibe la producción de BV y la salida de las nucleocápsides del núcleo celular, y comienza la expresión de las proteínas virales P10 y POLH para la formación de los cuerpos de oclusión maduros. Más importante aún, coincide con el comienzo de la expresión de PEP en el genoma baculoviral (Martínez-Solís *et al.*, 2016; Miller, 2013).

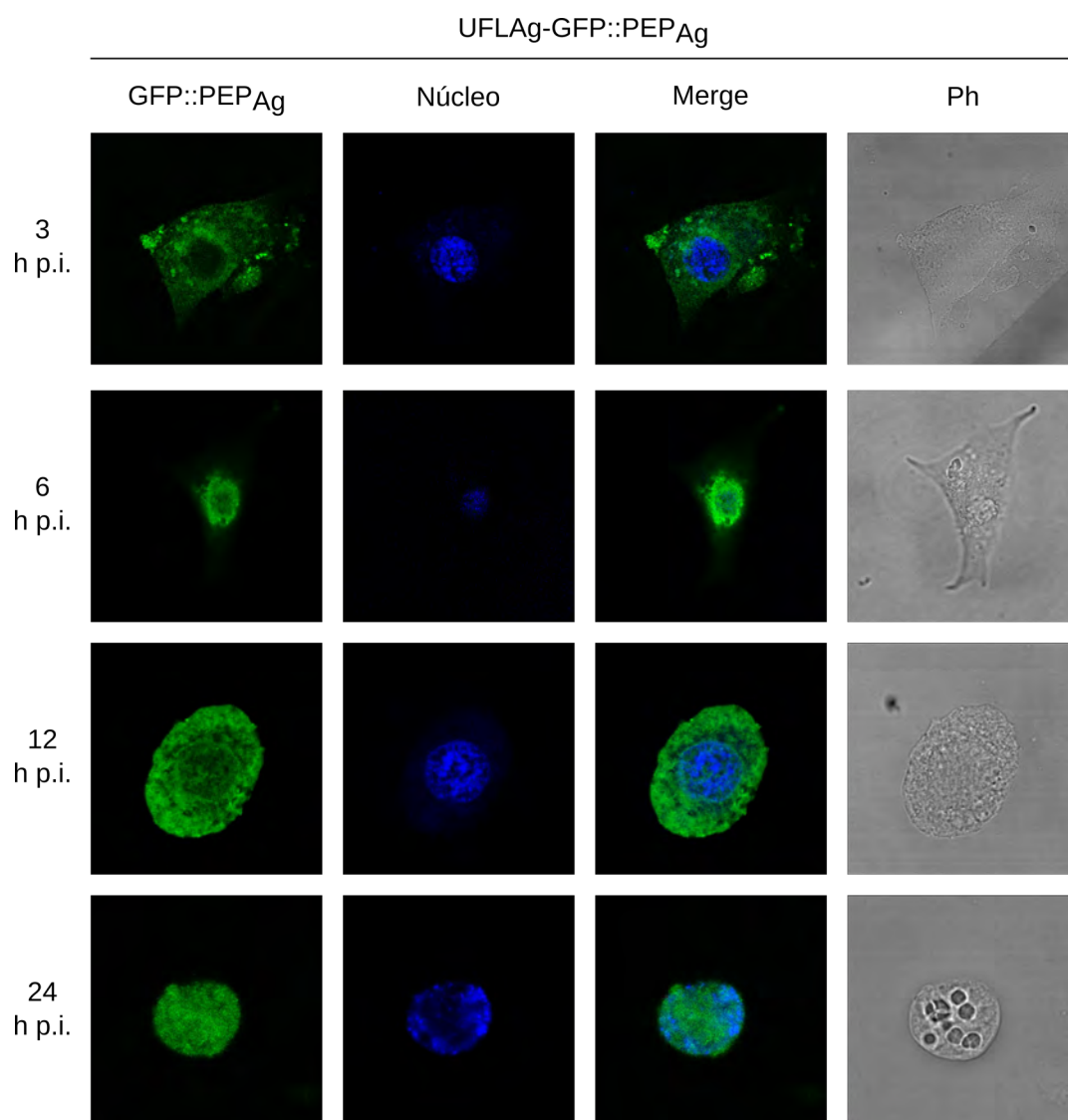


Figura 3.9. Microscopía confocal de células UFLAg-GFP::PEP_{Ag}, infectadas con el baculovirus AgMNPV a las 3, 6, 12 y 24 h p.i.. De izquierda a derecha: UV fluorescencia (GFP), fluorescencia azul de la tinción del núcleo, superposición de ambas imágenes (del inglés, *Merge*) y morfología celular en contraste de fase.

Discusión

La formulación de biopesticidas a base de baculovirus salvajes o *wild type* ha sido ampliamente evaluada y aprobada para su aplicación en el ambiente por las autoridades regulatorias de varios países. Si bien el uso de baculovirus recombinantes ha resultado en una disminución en el tiempo letal medio o un aumento en la velocidad de acción en insectos plagas (Kroemer *et al.*, 2015; López *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2017), se requieren grandes esfuerzos para determinar su impacto en el ambiente. Las normas (o reglamentaciones) que dificultan la liberación al ambiente de organismos genéticamente modificados en gran escala animó que en este trabajo se desarrolle una prueba de concepto para evaluar si una línea celular de insecto transgénica, UFLAg-GFP::PEP_{Ag}, era capaz de expresar y direccionar un polipéptido de fusión GFP::PEP_{Ag} a diferentes cuerpos de occlusión de virus no modificados genéticamente. En este estudio se utilizaron dos alphabaculovirus del grupo I con rango de huésped limitado y amplio respectivamente: AgMNPV y AcMNPV, respectivamente. La morfología de los OB de ambos virus decorados con la proteína recombinante GFP::PEP_{Ag} mostraron la forma y tamaño normal de los OB salvajes, en concordancia con lo publicado previamente (Sajjan & Hinchigeri, 2016; Wang *et al.*, 2010). Si bien la PEP es una proteína viral especie específica, la línea celular monoclonal UFLAg-GFP::PEP_{Ag} que expresa la PEP homóloga (AgMNPV) fue capaz de localizarse en el OB de AcMNPV. La hipótesis es que las interacciones proteína-proteína entre las diferentes PEP baculovirales dependen en gran medida de la similitud de secuencia y la distancia evolutiva entre las mismas. Esta observación se basa en la deficiencia de la complementación entre las PEP de AcMNPV y sus ortólogos distantes, como HearNPV y CpGV con una identidad de secuencia de 41% y 24,8%, respectivamente (Li *et al.*, 2015). En contraste, el alineamiento de la secuencia aminoacídica entre las PEP de AgMNPV y AcMNPV muestran un 66% de identidad (Fig. 3.4a). Se necesitan estudios adicionales para caracterizar en profundidad la interacción entre los distintos componentes

que forman la envoltura del poliedro y, más específicamente, la interacción de PEP en relación con esta estructura.

A partir del análisis de proteómica se obtuvieron perfiles proteicos para las dos especies de baculovirus en concordancia con los encontrados en la bibliografía, demostrando una composición inalterada de la nucleocápside y ODV dentro de los OB. La detección de GFP::PEP_{Ag} en los dos OB baculovirales permite afirmar que la estrategia fue exitosa en el direccionamiento de la proteína recombinante expresada en *trans* en la línea celular UFLAg-GFP::PEP_{Ag}. Respecto a la cuantificación libre de marcaje, el valor normalizado de empAI mostró una baja incorporación de la proteína quimérica en los OB de AcMNPV, lo cual es consistente con las características reportadas para PEP siendo un gen especie específico (Li *et al.*, 2015). Para los futuros experimentos de cuantificación por este mismo método, se debe modificar el protocolo antes descrito y eliminar de la muestra las proteínas con muy alta expresión como, la poliedrina, para poder identificar una mayor cantidad de péptidos y no saturar la muestra.

Por otra parte, los OB empaquetados mantienen el genoma viral salvaje y exhiben un tamaño homogéneo comparable con los virus propagados en células *wild type*. Dado que se han reportado eventos de recombinación entre el genoma celular y el genoma baculoviral, analizamos los BV aislados de la línea celular UFLAg-GFP::PEP_{Ag} con el fin de evaluar la posible integración de la información genética del polipéptido de fusión y, hasta la fecha, no hemos detectado ningún rearrreglo genómico en los baculovirus utilizados (Mangor *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta que trabajamos con virus salvajes y que, por lo tanto, se encuentran en condiciones óptimas para su propagación, la probabilidad de adquirir una segunda copia completa de un gen heterólogo se minimiza al no existir una secuencia de DNA flanqueante requerida para el evento de recombinación; además, dicho evento de recombinación no representaría ninguna ventaja adaptativa que determine su selección en el virus. Sin embargo, no se puede descartar de manera absoluta la posibilidad de integración de fragmentos de DNA celular en el genoma viral. Aunque la estrategia plantee

un único pasaje de amplificación en la línea celular UFLAg-GFP::PEP_{Ag}, será necesario para futuras aplicaciones realizar análisis exhaustivos para descartar cualquier rearrreglo en el genoma baculoviral.

La localización subcelular tan marcada de GFP::PEP_{Ag} antes y después de la infección permite pensar en nuevas estrategias para encarar el estudio funcional de la proteína PEP. Los nuevos interrogantes apuntan a caracterizar los dominios N-terminal y C-terminal de los cuales no se conocen motivos estructurales o funcionales. Entre estas nuevas incógnitas, es importante determinar cuál es el rol de la fosforilación en estas proteínas. Para ello, se han comenzado los estudios de co-inmunoprecipitación con el sistema GFP-TRAP (Chromotek®) para la purificación de la proteína recombinante GFP::PEP_{Ag} y sus interactores (datos no mostrados). Estos estudios permitirán identificar el/los sitio/s de fosforilación y el interactoma para determinar si el cambio de localización en el contexto de infección se debe a la fosforilación, o a una interacción proteína-proteína o ambas.

En esta parte del trabajo, se exploró el desarrollo de líneas celulares de insecto transgénicas como una nueva plataforma biotecnológica que permitirá generar cuerpos de oclusión decorados con proteínas recombinantes evitando la necesidad de modificar genéticamente los baculovirus para su uso como bioinsecticidas. Al ser la envoltura del poliedro la primera estructura que se debe desensamblar para liberar los viriones en el intestino medio, la incorporación de proteínas insecticidas seleccionadas en esta estructura contribuirá a una invasión más rápida en el epitelio intestinal del insecto plaga. La incorporación de proteínas exógenas expresadas en líneas celulares transgénicas permiten pensar nuevas perspectivas y usos biotecnológicos de los OB empaquetados, incluyendo el área de aplicación clásica como bioinsecticidas pero también su uso en la clínica, asociados a antígenos o como *delivery* de péptidos bioactivos (Fabre *et al.*, 2019; López *et al.*, 2018).

Bibliografía

- Ali, M. P., Kato, T., & Park, E. Y. (2015). Improved insecticidal activity of a recombinant baculovirus expressing spider venom cyto-insectotoxin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(23), 10261–10269. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6846-0>
- Braconi, C. T., Ardisson-Araújo, D. M. P., Leme, A. F. P., Oliveira, J. V. de C., Pauletti, B. A., Garcia-Maruniak, A., Ribeiro, B. M., Maruniak, J. E., & Zanotto, P. M. de A. (2014). Proteomic analyses of baculovirus *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus budded and occluded virus. *Journal of General Virology*, 95, 980–989. <https://doi.org/10.1099/vir.0.061127-0>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chen, L., Xiang, X., Yang, R., Hu, X., Cao, C., Malik, F. A., & Wu, X. (2013). Immobilization of foreign protein in BmNPV polyhedra by fusion expression with partial polyhedrin fragments. *Journal of Virological Methods*, 194(1–2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.020>
- Coulibaly, F., Chiu, E., Gutmann, S., Rajendran, C., Haebel, P. W., Ikeda, K., Mori, H., Ward, V. K., Schulze-Briese, C., & Metcalf, P. (2009). The atomic structure of baculovirus polyhedra reveals the independent emergence of infectious crystals in DNA and RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52), 22205–22210. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910686106>
- Fabre, M. L., Arrias, P. N., Masson, T., Ferrelli, M. L., & Romanowski, V. (2019). *Emerging and reemerging viral pathogens* (M. Ennaji, Ed.; Vol. 2). Elsevier.
- Fitches, E. C., Pyati, P., King, G. F., & Gatehouse, J. A. (2012). Fusion to snowdrop lectin magnifies the oral activity of insecticidal ω -Hexatoxin-Hv1a peptide by enabling its delivery to the central nervous system. *PloS One*, 7(6), e39389–e39389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039389>
- Haase, S., Sciocco-Cap, A., & Romanowski, V. (2015). Baculovirus insecticides in Latin America: Historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*, 7(5), 2230–2267. <https://doi.org/10.3390/v7052230>

- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., & Toprak, U. (2009). New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *Annual Review of Entomology*, *54*(1), 285–302. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090559>
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., & Mann, M. (2005). *Index (emPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein*. 1265–1272. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500061-MCP200>
- Jehle, J. A., Lange, M., Wang, H., Hu, Z., Wang, Y., & Hauschild, R. (2006). Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology*, *346*(1), 180–193. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.10.032>
- Kroemer, J. A., Kroemer, J. A., Bonning, B. C., & Harrison, R. L. (2015). Expression, delivery and function of insecticidal proteins expressed by recombinant baculoviruses. *Viruses*, *7*(1), 422–455. <https://doi.org/10.3390/v7010422>
- Li, J., Zhou, Y., Lei, C., Fang, W., & Sun, X. (2015). Improvement in the UV resistance of baculoviruses by displaying nano-zinc oxide-binding peptides on the surfaces of their occlusion bodies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(16), 6841–6853. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6581-6>
- López, M. G., Diez, M., Alfonso, V., & Taboga, O. (2018). Biotechnological applications of occlusion bodies of Baculoviruses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 10–10. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9130-2>
- López, M. G., Pallarés, H. M., Alfonso, V., Carmona, S. J., Farber, M., Taboga, O., & Wilkowsky, S. E. (2018). Novel biotechnological platform based on baculovirus occlusion bodies carrying *Babesia bovis* small antigenic peptides for the design of a diagnostic enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(2), 885–896. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8662-1>
- Lynn, D. E., & Harrison, R. L. (2016). Available lepidopteran insect cell lines. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1350). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3043-2_6
- Mangor, J. T., Monsma, S. A., Johnson, M. C., & Blissard, G. W. (2001). A GP64-Null Baculovirus Pseudotyped with Vesicular Stomatitis Virus G Protein. *Journal of Virology*, *75*(6), 2544–2556. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.6.2544-2556.2001>
- Maroniche, G. A., Mongelli, V. C., Llauger, G., Alfonso, V., Taboga, O., & Del Vas, M. (2012). In vivo

- subcellular localization of Mal de Río Cuarto virus (MRCV) non-structural proteins in insect cells reveals their putative functions. *Virology*, 430(2), 81–89.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.04.016>
- Martínez-Solís, M., Gómez-Sebastián, S., Escribano, J. M., Jakubowska, A. K., & Herrero, S. (2016). A novel baculovirus-derived promoter with high activity in the baculovirus expression system. *PeerJ*, 4, e2183–e2183. <https://doi.org/10.7717/peerj.2183>
- Megger, D. A., Bracht, T., Meyer, H. E., & Sitek, B. (2013). Label-free quantification in clinical proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1834(8), 1581–1590.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.04.001>
- Miller, L. K. (2013). *The Baculoviruses*. Springer Science & Business Media.
- Mitsuhashi, W., Kawakita, H., Murakami, R., Takemoto, Y., Saiki, T., Miyamoto, K., & Wada, S. (2007). Spindles of an Entomopoxvirus Facilitate Its Infection of the Host Insect by Disrupting the Peritrophic Membrane. *Journal of Virology*, 81(8), 4235–4243.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02300-06>
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K., & Luckow, V. A. (1994). *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. Oxford University Press. 347 pages-347 pages.
- Pombo, V., Velloso, L. M., Ribeiro, B. M., & Bão, S. N. (1998). Structural and Ultrastructural Changes during the Infection of UFL-AG-286 Cells with the Baculovirus AgMNPV. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72(3), 239–245. <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4788>
- Rohrmann, G. F. (2019). *Baculovirus Molecular Biology*, 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK543458/>.
- Sajjan, D. B., & Hinchigeri, S. B. (2016). Structural Organization of Baculovirus Occlusion Bodies and Protective Role of Multilayered Polyhedron Envelope Protein. *Food and Environmental Virology*. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9227-7>
- Shinoda, K., Tomita, M., & Ishihama, Y. (2009). EmPAI Calc-for the estimation of protein abundance from large-scale identification data by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Bioinformatics*, 26(4), 576–577. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp700>
- Sieburth, P., & Maruniak, J. (1988). Susceptibility of an established cell line of (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52(3), 453–458. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(88\)90058-4](https://doi.org/10.1016/0022-2011(88)90058-4)

- Tiedje, J. M., Colwell, R. K., Grossman, Y. L., Hodson, R. E., Lenski, E., Mack, R. N., Regal, P. J., (2014). *The Planned Introduction of Genetically Engineered Organisms: Ecological Considerations and Recommendations Published by: Ecological Society of America* 70(2), 298–315.
- Wang, R. R., Deng, F., Hou, D. H., Zhao, Y., Guo, L., Wang, H. L., & Hu, Z. H. (2010). Proteomics of the *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus Budded Virions. *Journal of Virology*, 84(14), 7233–7242. <https://doi.org/10.1128/jvi.00040-10>
- Yang, S., Zhao, L., Ma, R., Fang, W., Hu, J., Lei, C., & Sun, X. (2017). Improving baculovirus infectivity by efficiently embedding enhancing factors into occlusion bodies. *Applied and Environmental Microbiology*, May, AEM.00595-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00595-17>
- Zhu, W., Smith, J. W., & Huang, C. M. (2010). Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/840518>

Material suplementario

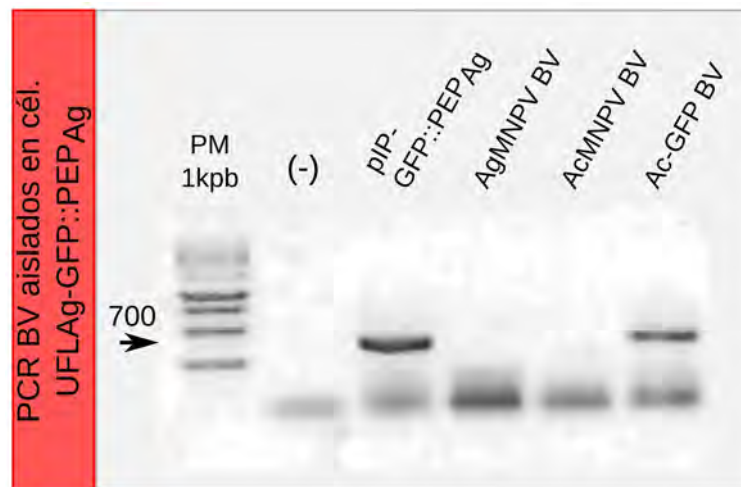


Figura S3.1. Evaluación de eventos de recombinación. Confirmación por PCR de la no incorporación de la secuencia codificante para GFP::PEP_{Ag} en el genoma baculoviral utilizando como molde una extracción de DNA genómico a partir de viriones brotantes replicados en las células UFLAG-GFP::PEP_{Ag} y como *primers* Fgfp y Rgfp (ver Anexo). Línea 1: PM: marcador de peso molecular (1 kpb), línea 2: control negativo: H₂O, línea 3: control positivo: pIP-GFP::PEP_{Ag}, línea 4: BV de AgMNPV-*wt*, línea 5: BV AcMNPV-*wt* y línea 6: control positivo de la infección: BV Ac-GFP.

Tabla S3.1. Proteínas identificadas por Orbitrap en los OB de AcMNPV o AgMNPV.

Uniprot ID	AcMNPV OB descripción	Cobertura	# Péptidos	emPAI
P04871	Polyhedrin	100	30	587800.607
Ac-pp34	pp34	68.6335404	17	648.382
A0A097PV51	Ac-vp39	64.5533141	18	65.608
P41483	Virus envelope protein E25	66.2280702	16	532.67
P41700	AC142	74.0041929	30	43.367
A0A0N7CRZ7	AcOrf-109 peptide	72.0512821	23	140.254
A0A097PV43	Ac-gp41	59.9022005	17	55.234
A0A097PUT7	Ac-odv-e66	48.8636364	21	14.399
S5G684	AcOrf-66	39.8514851	28	6.743
P41705	PIF 5	47.0744681	14	32.839
A0A097PUX5	Ac-odv-e18	41.1111111	3	3161.278
S5G911	Ac-vp80	50.5065123	36	7.633
P41684	Chitinase	48.8203267	20	5.043
A0A097PUZ2	AcOrf-114	62.0283019	19	16.378
Q70SQ1	Ac-ChiA	44.2831216	18	4.233
A0A097PUV7	Ac-helicase	30.3849304	30	1.568
P41667	ORF114	62.0283019	19	14.849
Q03209	P78/83	40.5156538	17	5.21
A0A0N6WHQ3	AcOrf-18 peptide	50.1416431	13	9
P41420	Uncharacterized 12.4 kDa	60.5504587	8	132.352
A0A097PUZ4	Ac-gp64	36.2264151	15	4.946
A0A0N7CQX9	Uncharacterized protein	45.4293629	13	9
P41435	Apoptis inhibitor 1	53.8461538	12	10.45
A0A097PV71	Ac-vlf-1	37.7308707	12	6.586
A0A097PUV2	Ac-p95	21.7237308	13	1.485
P69037	FP25	61.2149533	12	10.659
A0A097PV34	Ac-gp37	38.0794702	6	5.105
O92471	AcMNPV orf114	31.8396226	10	3.507
P14670	Polyhedrin	20.3252033	6	1.512
S5GIP5	Ac-odv-ec27	42.4137931	11	5.661
S5G8G1	Ac-sod	93.3774834	8	9
A0A097PUX0	Ac-p74-pif	29.9224806	17	2.652
A0A097PUW1	Ac-lef3	44.9350649	14	3.047
A0A097PUW0	Ac-PIF-1	18.3018868	8	1.783
S5G8F6	AcOrf-26	55.0387597	4	9
A0A1W6S692	Actin (Fragment)	34.5744681	9	2.325
A0A193DTK7	Orf-81 peptide	35.6223176	8	6.017
U3RDT0	Orf18	23.0337079	7	1.683
A0A097PV19	Ac-pk-1	40.8088235	9	3.642
S5G641	Ac-F	16.3768116	9	0.863
P24656	Tyrine-protein phosphatase	24.4047619	3	2.511
A0A097PUW4	AcOrf-51	26.4150943	8	1.291
A0A097PUX8	AcOrf-74	37.7358491	9	2.875
S5GIM6	Ac-p24	34.8484848	6	3.642
P11138	ating transcriptional regulatory	20.1030928	11	2.039
P41710	Immediate-early protein IE-0	24.137931	6	2.415
A0A126FCC1	ODV-EC43	8.39895013	3	0.73
P41423	88.7 kDa protein in PK1-LEF1	15.5963303	6	0.905
P16709	viral Ubiquitin	61.038961	5	12.895
A0A097PUX7	Ac-ME53	24.9443207	9	1.212
P11038	ble DNA polymerase sliding c	49.21875	10	2.875
S5G9L3	Ac-p35	27.7591973	8	2.981
Q00732	p48 protein	25.3229974	10	1.783
P11042	pp31	24.3636364	4	0.848
A0A097PUU1	Ac-dbp	31.9620253	9	1.462
P24729	Glycoprotein GP16	36.7924528	4	3.217
A0A097PUV6	VP1054	20.5479452	7	1.848
P24730	Protein Ac132	37.8995434	5	1.61
GFP.-PEPag	GFP.-PEPag	17.4863388	7	0.778
S5GFR9	Ac-pif-2	19.6335079	7	1.239
P24745	8.0 kDa protein in P143-LEF5	15.3125	3	0.833
A0A097PUW7	Ac-lef8	8.32383124	7	0.32
A1YRE0	p40	15	6	1.448
S5G6D8	Ac-v-cath	26.9349845	7	1.239
O92452	AcMNPV orf92	20.4633205	5	1.254
P21286	20.8 kDa protein in FGF-VUB1	17.5824176	2	0.778
P41472	1.5 kDa protein in IAP2-VLF1	60.6060606	5	5.813
A0A0B4ULF2	Uncharacterized protein	11.5273775	2	0.35
A0A097PV59	Ac-he65	10.1265823	4	0.266
Q0GY79	Uncharacterized protein	27.8606965	4	1.031
A0A224ASV4	Uncharacterized protein	26.6055046	2	2.162
P41469	mRNA (nucleide 2'-O-)-methy	9.54198473	2	0.501
P41468	PIF 6	17.1875	2	0.585
A0A097PUY6	Ac-p94	3.11332503	2	0.101
S5G8T3	Ac-p26	9.58333333	2	0.389
A0A097PV29	Ac-pkip-1	21.3017751	3	0.701
A0A097PUZ0	Ac-PIF-3	9.31372549	2	0.668
Q91GI0	Uncharacterized protein	8.33333333	2	0.52
A0A097PUY7	AcOrf-106	7.81893004	2	0.311
A0A097PUY1	Ac-PK2	10.6976744	2	0.425

Uniprot ID	AqMNPV OB descripción	Cobertura	# Péptidos	emPAI
A0A0S3IV55	Uncharacterized protein	86.7435159	36	130.826
A0A0S3IWA3	Polynucleotide kinase/ligase	79.2035398	54	55.899
A0A0S3IVH0	Nuclear matrix associated phosphoprotein	81.6091954	28	257.086
A0A0S3IUX3	He65	63.5036496	38	28.764
A0A0S3IVJ0	Occlusion-derived virus envelope protein	71.6157205	17	145.78
A0A0S3IWZ4	Polyhedrin	79.1836735	20	192.07
A0A0S3IX19	Major viral capsid protein	74.7058824	17	27.184
A0A0S3IW33	p22.2	70.6161137	18	72.564
A0A0S3IWD6	Helicase	42.5061425	51	5.579
A0A0S3J109	Ecdysteroid UDP-glucyltransferase	45.030426	17	9.926
A0A0S3J1K4	Baculovirus repeated ORF-b	70.8206687	25	25.102
A0A0S3J2J6	Baculovirus repeated ORF-a	79.8353909	21	73.989
A0A0S3IXN0	EXO III v-trex	71.3043478	15	42.94
A0A0S3IX92	p22.2	71.563981	18	45.416
A0A0S3IWA5	Immediate early protein 1	46.1267606	25	11.589
A0A0S3IVT2	Major budded virus envelope glycoprotein	46.492986	22	7.532
A0A0S3J146	EXO III v-trex	66.9565217	13	25.827
A0A0S3IWG8	Baculovirus repeated ORF	65.4761905	20	11.023
A0A0S3IWQ8	Occlusion-derived virus envelope glycoprotein	59.3667546	16	5.449
A0A0S3IVG8	Viral capsid-associated protein	36.6467066	20	2.639
A0A0S3IWH9	Uncharacterized protein	48.6187845	13	3.806
A0A0S3J0C4	p26	56.779661	10	11.115
A0A0S3J1U2	Late expression factor 3	58.2887701	13	3.365
A0A0S3IY30	Uncharacterized protein	48.4567901	13	3.217
A0A0S3IV62	Occlusion-derived virus envelope/capsid protein	42.2043011	9	2.981
A0A0S3IXP5	Baculovirus repeated ORF	59.3220339	9	6.017
A0A0S3IVL4	SsDNA binding protein	42.3452769	11	9
A0A0S3IWI3	Uncharacterized protein	48.4567901	13	3.217
A0A0S3IWX4	Occlusion-derived virus envelope protein	63.255814	11	6.017
Q6QH46	Capsid protein	71.875	11	17.738
A0A0S3IWS1	Telokin-like protein-20	41.1764706	6	4.995
A0A0S3J020	Very late factor-1	32.712766	11	2.631
A0A0S3J231	Uncharacterized protein	41.563786	15	2.047
GFP-PEPtag	GFP::PEPtag	23.3151184	8	1.276
A0A0S3IZR1	Occlusion-derived virus envelope protein OS	40.2298851	3	99
A0A0S3IX16	Uncharacterized protein	44.1326531	9	1.994
A0A0S3IWA0	Fp protein	27.2727273	7	2.162
A0A0S3J1R0	Uncharacterized protein	40.6779661	7	4.623
A0A0S3IXQ5	Uncharacterized protein	58.2644628	11	4.08
A0A0S3IUX9	DNA synthesis regulator	25.950783	9	1.154
A0A0S3IYP8	Global transactivator-like protein	23.8955823	9	0.995
A0A0S3IVX3	p87	36.7799114	14	1.707
A0A0S3IX73	Uncharacterized protein	48.4615385	7	4.995
A0A0S3IVV6	Occlusion-derived virus envelope protein	19.3548387	8	1.212
A0A0S3IVK5	Uncharacterized protein	33.3333333	3	9
A0A0S3IWW2	Etm	34.4262295	5	1.848
A0A0S3IVF9	Protein tyrosine phosphatase 1	58.045977	7	3.329
A0A0S3IWP8	Protein kinase 1	25.1851852	4	0.931
A0A0S3IW94	Uncharacterized protein	18.5714286	5	0.557
A0A0S3IX98	Uncharacterized protein	25.1184834	3	0.468
A0A0S3IXU4	p40	20.6128134	6	1.448
A0A0S3IY11	Uncharacterized protein	28.1105991	3	3.642
A0A0S3IVN3	Parp-like protein	23.0352304	6	0.738
A0A0S3J0B0	p18	42.1383648	6	3.642
Q9Q0A9	AcMNPV ORF78-like protein	42.2018349	3	2.162
A0A0S3IXS5	Uncharacterized protein	20.754717	3	0.54
A0A0S3IVB7	Uncharacterized protein	28.1553398	2	1.154
A0A0S3IXD2	p10	90.3225806	4	16.783
A0A0S3IY17	Uncharacterized protein	34.6153846	5	3.217
A0A0S3IYT0	F-protein	18.2515337	9	0.833
A0A0S3IX75	Late expression factor 6	16.0839161	2	0.585
A0A0S3J1D4	Baculovirus repeated ORF-e	9.6875	3	0.413
A0A0S3J133	Immediate early protein 0	24.3801653	5	1.069
A0A0S3IYW2	Uncharacterized protein	10.8527132	3	0.501
A0A0S3IV72	Baculovirus repeated ORF-d	24.1176471	4	0.719
A0A0S3IWF6	Putative methyltransferase	8.17843866	3	0.501
A0A0S3IZ44	Uncharacterized protein	26.8965517	3	1.154
A0A0S3IVC2	Viral capsid-associated protein	3.81097561	2	0.16
A0A0S3IVU3	Baculovirus repeated ORF	12.9411765	4	0.624
A0A0S3IWI8	Uncharacterized protein	6.42201835	1	0.096
A0A0S3IW73	Baculovirus repeated ORF-c	19.5335277	4	0.778
A0A0S3IVZ9	Late expression factor 9	12.244898	4	0.407
A0A0S3IWW3	p18	42.1383648	6	4.995
A0A0S3IWL1	Protein tyrosine phosphatase 2	11.25	1	0.389
A0A0S3IWL0	Occlusion-derived virus envelope/capsid protein	24.2424242	6	1.239
A0A0S3IWN4	Uncharacterized protein	14.4186047	3	0.874
A0A0S3IX74	Transcription regulator	3.04568528	1	0.089
A0A0S3IXQ1	Ubiquitin-like protein	37.1794872	2	0.931
A0A0S3IUV5	Pif	2.07156309	1	0.083
A0A0S3IXG4	p18	42.1383648	5	2.594
A0A0S3J2K9	Uncharacterized protein	19.7530864	1	0.334
Q6E7G7	IAP-3	7.31707317	2	0.245
A0A0S3IYB5	p48	1.71568627	1	0.093
A0A0S3IWX3	Late expression factor 7	5.11627907	1	0.179
A0A0S3IYW6	Uncharacterized protein	6.4516129	1	0.194



Capítulo 4. Estrategias para el mejoramiento de los baculovirus como agentes bioinsecticidas

Introducción

En el marco del manejo integrado de plagas agrícolas la aplicación de algunas especies como bioinsecticidas ha sido limitada por su velocidad de acción lenta y/o por su espectro de huéspedes limitado. Los baculovirus han sido estudiados como importantes candidatos bioinsecticidas y, en las últimas tres décadas, se han desarrollado varios productos comerciales (Haase *et al.*, 2015; Kroemer *et al.*, 2015). Debido a su factibilidad para la implementación como control biológico se ha buscado mejorar la velocidad de acción de los baculovirus mediante modificaciones genéticas. Las estrategias más exploradas hasta el momento consisten en: la manipulación de la fisiología de la larva hospedante, la introducción de toxinas específicas de insecto (Bonning & Hammock, 1996; Inceoglu *et al.*, 2006) y la expresión de genes que colaboran con la degradación de la membrana peritrófica (MP) (Lima *et al.*, 2013). En este capítulo, se describen dos estrategias para mejorar la capacidad insecticida de los baculovirus de AgMNPV y AcMNPV: el avance en el desarrollo de líneas celulares empaquetadoras de proteínas activas y la generación de virus recombinantes de AcMNPV como prueba de concepto para evaluar la toxicidad de proteínas insecticidas en larvas susceptibles. Adicionalmente, se plantean estrategias para mejorar la formulación de los bioinsecticidas.

Mayormente, se han diseñado baculovirus recombinantes del género *Alphabaculovirus* (NPV) para incorporar en su genoma toxinas selectivas de insecto que en general actúan sobre los canales iónicos dependientes de voltaje, como TxP-I (*tox34*) del ácaro *Pyemotes tritici* (Burden *et al.*, 2000; Tomalski & Miller, 1991) y LqhIT2 del escorpión *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Jinn *et al.*, 2006), entre otras. Recientemente, se ensayó una toxina muy prometedora aislada de la araña *Hadronyche versuta*, ω -hexatoxina-Hv1a (en adelante denominada Hv1a), por su alta especificidad en lepidópteros, aunque no se ha evaluado en el contexto de un insecticida a base de baculovirus (Nakasu *et al.*, 2014, 2015).

Referido al uso de toxinas, existe un retroceso en su uso práctico como insecticida tópico, debido a su incapacidad para ser absorbidos por la cutícula del insecto, la degradación en el ambiente y/o la disminución de la actividad insecticida cuando se administran por vía oral. Sin embargo, en este trabajo se plantea utilizar la aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA), una lectina manosa-específica, como molécula transportadora de péptidos insecticidas. Se ha demostrado que esta lectina GNA, administrada por vía oral, es resistente a la actividad proteolítica en el intestino de la larva y, luego de su unión con las glicoproteínas del epitelio intestinal, es transportada dentro de la hemolinfa para su direccionamiento al sistema nervioso (Fitches *et al.*, 2004). Esto permitiría transportar péptidos como las toxinas a través del intestino del insecto plaga y es por ello que planteamos su uso en este capítulo (Fitches *et al.*, 2012).

Por otra parte, la mayoría de los baculovirus contienen genes que codifican proteínas que intervienen en la degradación de la membrana peritrófica de la larva, como catepsinas virales (*v-cath*), quitinasas (*chiA*) y homólogos a *gp37*. Llamativamente, AgMNPV no posee ninguno de estos genes y, teniendo en consideración que estos tres genes baculovirales (*v-cath*, *chiA* y *gp37*) no han sido evaluados sinérgicamente, resultan de interés como candidatos insecticidas (Ferrelli *et al.*, 2012; Salvador *et al.*, 2014). Asimismo, algunos baculovirus codifican proteínas denominadas *enhancins*: se trata de metaloproteasas capaces de degradar las proteínas MLK (del inglés, *mucin-like proteins*) que unen las unidades de quitina de la membrana peritrófica. Se ha demostrado que la inclusión de este gen en el genoma de los NPV que normalmente no lo contienen puede devenir en un aumento de la infectividad por vía oral (Lepore *et al.*, 1996).

La finalidad de este trabajo se enfoca en la generación de un producto bioinsecticida final que posea cuerpos de oclusión con un genoma salvaje (*wt*), pero decorados en su superficie con proteínas insecticidas para potenciar su capacidad como agente de control biológico. Con este fin, se desarrollarán los vectores de expresión para la generación de líneas celulares transgénicas que expresen genes cuyos productos sean dirigidos a la

estructura del OB. De esta manera, se pretende incorporar al OB proteínas heterólogas que puedan incrementar su poder insecticida, quedando el transgén contenido en el genoma de la célula hospedadora (en *trans*). Al purificar los OB para su formulación, el producto insecticida quedaría libre del contenido transgénico en el genoma viral (Figura 4.1).

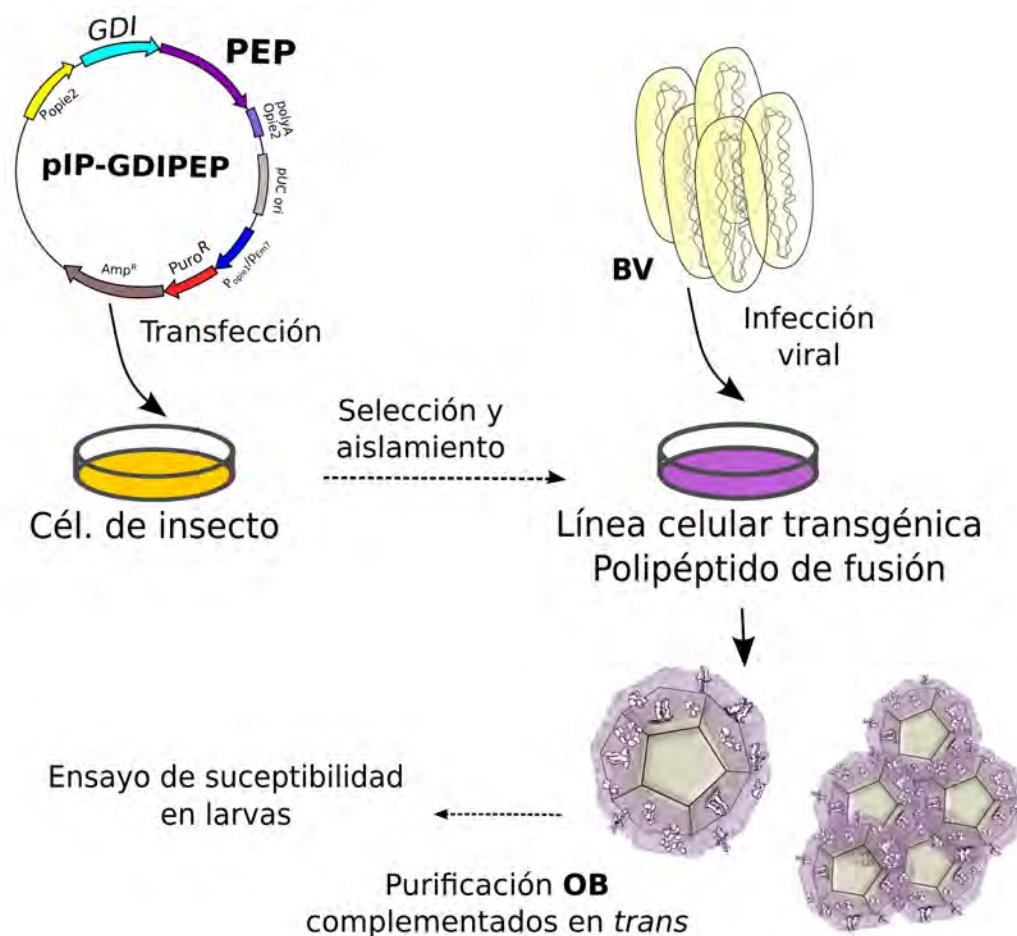


Figura 4.1. Esquema para la generación de baculovirus complementados en *trans* con proteínas heterólogas utilizando como plataforma líneas celulares de insecto transgénicas. GDI: gen de interés.

Esta estrategia supone ventajas en comparación tanto con la modificación genética tradicional de los baculovirus como con la preparación de formulaciones conjuntas de proteínas con capacidad insecticida y los OB del baculovirus *wt*, ya que no todas las proteínas bioactivas son cristalizables y en el proceso de cristalización pueden perder su

actividad bioinsecticida y, además, debe agregarse el costo adicional asociado a la producción y purificación de estas proteínas. Por otra parte, las células transgénicas susceptibles a diferentes especies de baculovirus podrán ser utilizadas para obtener distintos virus modificados y, de esta manera, se podrán evaluar poblaciones mixtas.

En este marco y en concordancia con los resultados mostrados en el capítulo anterior, se propone el desarrollo de un polipéptido de fusión compuesto por la PEP para asegurar el direccionamiento de las proteínas candidatas a la estructura del OB (Fabre *et al.*, 2020), y una proteína que contribuya a la invasión del epitelio intestinal o el sistema nervioso de la larva del insecto blanco. Dado que la envoltura poliédrica es la primera estructura que se debe desensamblar para permitir la liberación de los viriones (ODV) en el intestino medio, se espera que la incorporación de proteínas en esta estructura conduzca a una rápida acción.

Por otra parte, se desarrollarán baculovirus recombinantes de AcMNPV como prueba de concepto para evaluar la capacidad insecticida de algunas fusiones traduccionales con el fin de seleccionar aquellas con mejores efectos para continuar con la generación de las líneas celulares de insecto transgénicas. Para este fin, se utilizará el sistema de recombinación homóloga desarrollado por Je *et al.*, (2001, 2003), basado en un bácmido (genoma viral capaz de replicar en *E. coli*, denominado bApGOZA) deficiente en el gen esencial *orf1629*. El rescate de DNA viral viable se obtiene por el evento de recombinación con un plásmido de transferencia que contiene este gen *orf1629* completo junto con otros genes que se deseen expresar.

Finalmente, en el transcurso de mi doctorado se publicaron una serie de artículos sobre una innovadora estrategia bioinsecticida: el uso de oligonucleótidos antisentido cortos (del inglés, *antisense oligonucleotide*) (Oberemok & Skorokhod, 2014; Oberemok *et al.*, 2017, 2019). Los mismos son muy interesantes, ya que funcionan de forma selectiva, son biodegradables en contraste con la mayoría de los insecticidas químicos (Krupke *et al.*, 2012; Ragnarsdottir, 2000), poseen una estabilidad química relativamente alta y la síntesis

comercial de ácidos nucleicos *in vitro* se vuelve cada vez más asequible en términos económicos. Los oligonucleótidos antisentido, denominados en este capítulo como oligosDNA, pueden manipular la síntesis de proteínas en las células a través de mecanismos característicos de los oligonucleótidos antisentido (Liang *et al.*, 2017), híbridos de DNA/mRNA (Liang *et al.*, 2018; Nishina *et al.*, 2015) y/o por mecanismos que se asemejan tanto a la interferencia mediada por DNA como a la mediada por RNA (Asada *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2011). Brevemente, los oligonucleótidos antisentido de DNA, sintéticos y cortos, inducen la inhibición de la expresión luego de la hibridación específica con la secuencia blanco (RNA). El mecanismo se basa en dos propiedades; la primera es el bloqueo físico del proceso de traducción por la presencia de la región bicatenaria corta, y la segunda, es la presencia del heteroduplex de RNA-DNA el cual es susceptible a la actividad de la RNasa H celular. La misma cliva la región dúplex de RNA-DNA generada en el complejo con RNA mensajero (mRNA), evitando así la traducción. Oberemok *et al.* (2016), demostraron que las larvas poseen la capacidad de incorporar los oligoDNA de manera tópica, con el rocío de una solución de los mismos sobre el cuerpo del insecto larva. En consecuencia con lo mencionado, se plantea comenzar a explorar esta tecnología en nuestro laboratorio para en un futuro poder mejorar la formulación bioinsecticida la cual estaría compuesta de baculovirus y pequeños fragmentos cortos de DNA (oligosDNA, ~20 pb).

En resumen, en este capítulo se plantean tres estrategias para el mejoramiento de los baculovirus como agentes insecticidas. Primero, la estrategia clásica y extensamente utilizada que consiste en la generación de baculovirus recombinantes con el fin último de evaluar de manera rápida y eficiente la actividad insecticida de los genes de interés propuestos. Esta estrategia no pretende utilizar baculovirus recombinantes generados como candidatos a insecticidas comerciales, sino como prueba de concepto para el subsiguiente desarrollo de líneas celulares que expresen las proteínas evaluadas. Segundo, la producción de cuerpos de oclusión de virus salvajes incorporando toxinas o enzimas

específicas de insecto en la envoltura del poliedro mediante la fusión de estas biomoléculas a la proteína PEP. Esta estrategia resulta atractiva porque los OB quiméricos 1) continúan siendo infectivos por vía oral y pueden ejercer su acción tempranamente, antes del inicio de la replicación viral, mejorando sustancialmente así su acción bioinsecticida, 2) el genoma del baculovirus (*wt*) no contiene material genético modificado y 3) son fácilmente purificables a partir de cultivos celulares (a diferencia de la alternativa que supondría adicionar proteínas candidatas purificadas a la preparación de OB). Tercero, y como última estrategia, planteamos el diseño de oligonucleótidos sintéticos cortos de DNA (oligoDNA) con el fin de modular genes del hospedador para potenciar la infección viral.

Objetivos específicos

- Generación de una biblioteca plasmídica con genes candidatos insecticidas aislados de diferentes fuentes.
- Generación de una biblioteca de oligonucleótidos antisentido para la puesta a punto del sistema de inhibición que permita modular la infección viral en el hospedador.
- Generación de baculovirus recombinantes con el fin de analizar la capacidad insecticida de la proteína quimérica que incorpora la ω -hexatoxina (Hv1a) con la lectina GNA y por otro lado, la quimera que incorpora a las proteínas Enhancin y GP37.
- Desarrollo de vectores para la generación de líneas celulares de insecto que expresen proteínas quiméricas de fusión de un polipéptido estructural del cuerpo de oclusión (PEP) de AgMNPV con proteínas candidatas a mejorar la capacidad bioinsecticida de los virus.
- Evaluación de los parámetros bioinsecticidas de los cuerpos de oclusión de los baculovirus recombinantes generados que contienen las proteínas quiméricas en su estructura.

Materiales y métodos

Células y virus

Las células High Five™ (BTI-TN-5B1-4, derivadas de *Trichoplusia ni*) y las células Sf9 (derivadas de *Spodoptera frugiperda*) fueron mantenidas a 27°C en medio de Grace (Invitrogen™) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Internegocios S.A., Mercedes, Argentina). Todas las especies de baculovirus fueron propagadas en monocapa de células High Five™ o Sf9, y el título viral fue determinado mediante el ensayo de placas siguiendo el protocolo estándar (O'Reilly *et al.*, 1994).

Biblioteca de oligoDNA como sistema como modulador huésped-patógeno

Para el diseño de oligonucleótidos antisentido cortos de DNA (del inglés, *antisense oligonucleotides*) o oligoDNA, se utilizó el predictor siDIRECT 2.0 (<http://sidirect2.rnai.jp/>). El algoritmo utiliza las recomendaciones de Ui-Tei *et al.* (2008) para el diseño de oligos de RNA, en nuestro caso, utilizamos el algoritmo para seleccionar aquellos con mejor *score* como siRNA y los sintetizamos como oligoDNA (Ui-Tei *et al.*, 2008). Adicionalmente, el predictor hace una búsqueda de homología por BLAST contra toda la base de datos y, aquellos oligoDNA que alinean con secuencias humanas se descartan (del inglés, *off-target*). Se diseñaron 3 oligoDNA por cada uno de los genes: *ie0-ie1* de AcMNPV, *ie0-ie1* de SfGV, *gp64* de AcMNPV, *iap3* de SfGV y *dsRed* (plásmido pDsRedN1), y por cada uno de ellos se diseñó un oligoScramble control negativo, el cual cuenta con la misma composición de nucleótidos pero ordenados de manera aleatoria utilizando el programa Scramble siRNA (<https://www.invivogen.com/sirnazizard>). Finalmente, se diseñaron los *primers* para la qPCR mediante Primer-BLAST-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools>). Todos los

oligonucleótidos se sintetizaron en MacroGen Corporation, Corea del Sur (www.macrogen.com).

Biblioteca de vectores de clonado y de expresión

Purificación de DNA viral a pequeña escala

Los viriones brotantes (BV) se aislaron a partir del sobrenadante del cultivo de células infectadas. El sobrenadante se clarificó por centrifugación a 1000 x g a 4°C durante 5 min. La precipitación de los viriones se realizó centrifugando 1,5 ml de este sobrenadante a 14000-18000 rpm y 4°C durante 45 min en una microcentrífuga (Eppendorf). Luego se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces en el mismo tubo. El *pellet* de viriones se resuspendió delicadamente en buffer de lisis (Tris-HCl (pH 7,6) 10 mM; EDTA 10 mM; SDS 0,25%), se agregó proteinasa K (500 µg/ml) y se incubó a 60°C durante un mínimo de 2 h. Se realizaron tres extracciones sucesivas (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico) agregando 500 µl de solvente orgánico en cada caso. Se llevó la fase acuosa a una concentración final de NaCl 0,2 M, se agregó 500 µl de isopropanol para precipitar y, posteriormente, se lavó el *pellet* con 500 µl de etanol 70%, se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 30 min. El *pellet* se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada estéril.

Clonado de genes insecticidas candidatos en el vector pGEM-T Easy

Para la obtención de las secuencias nucleotídicas de los marcos abiertos de lectura (*del inglés: open reading frame*, ORF) de todos los genes de interés se utilizó la técnica PCR. Todos los productos de amplificación PCR fueron purificados por electroforesis en gel de agarosa y clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega®). Los genes *chiA*, *v-cath* y *gp37* se amplificaron del genoma de EpapGV (*Epinotia aporema* GV, caracterizado por nuestro equipo de investigación Genbank NC_018875.1), el gen de enhancin *ENH* del genoma de LdMNPV (*Lymantria dispar* MNPV) (Genbank: NC_001973.1). Las toxinas TxP-I (*tox34*) de *P. tritici* se amplificó a partir del plásmido pBS-Tox34 (Tomalski & Miller, 1991) y la ω -

hexatoxina (Hv1a) de *H. versuta* se sintetizó en la empresa GenScript® (Nakasu *et al.*, 2015). Los detalles del ciclado y las secuencias de los *primers* se encuentran en el Anexo (sección A.3). Para todos los genes se amplificaron dos versiones utilizando cebadores diferentes que permiten la fusión de polipéptidos en fase en el extremo N-terminal o C-terminal del ORF de PEP de AgMNPV. La diferencia entre ambas versiones son los sitios de las enzimas de restricción en los extremos flanqueantes del marco de lectura y la mutación en el codón de terminación (s/s, sin *stop*) para las fusiones en el N-terminal. Las enzimas *SacI* y *XhoI* se utilizaron para los clonados en el N-terminal en el vector pIP-PEP_{Ag} (Capítulo 3, Materiales y Métodos) y las enzimas *BamHI* y *HindIII* para el clonado en el C-terminal en el vector pIP-PEP_{Ag}. Las condiciones de digestión y ligación con la ligasa del fago T4 obedecieron a las proporcionadas por el fabricante y se detallan en el Anexo. Los plásmidos obtenidos fueron: pGEMT-chiA, pGEMT-chiAs/s, pGEMT-gp37, pGEMT-gp37s/s, pGEMT-cath, pGEMT-caths/s, pGEMT-ENH, pGEMT-ENHs/s, pGEMT-tox34, pGEMT-tox34s/s. Todas las secuencias de los plásmidos fueron evaluadas por secuenciamiento de Sanger (Macrogen Corporation, South Korea).

Construcción de vectores de transferencia para la generación de baculovirus recombinantes

Para la generación de los baculovirus recombinantes se construyeron dos plásmidos de transferencia. El primer vector de transferencia denominado pUC57S-PEP_{Ag}HtoxGNA-IRESdT se construyó como se muestra en el panel de la izquierda de la Figura 4.2. Para ello, se clonó en el sitio *EcoRV* la secuencia nucleotídica codificante del polipéptido de fusión: PEP_{Ag}HtoxGNA-IRESdT, previamente, sintetizado en la empresa GenScript® y clonado en el esqueleto del vector pUC57-simple. Este polipéptido o fusión traduccional contiene la proteína PEP de AcMNPV (GenBank *accession no.* NC_001623.1) con un *linker* flexible (residuos aminoacídicos GGGGS) fusionada en el extremo N-terminal de la secuencia de Hv1a seguida de un *linker* intermedio de 3 residuos de alanina (residuos

aminoacídicos AAA) y la secuencia completa de la lectina GNA. Por otro lado, se le anexó una fusión transcripcional incorporando un IRES y, a continuación, la secuencia del gen de la proteína fluorescente dTomato. Todas las secuencias nucleotídicas se encuentran en "Material Suplementario". El segundo vector de transferencia denominado pBK9-ENHGP37PEP_{Ag}, se diseñó para obtener el polipéptido de fusión ENHGP37PEP_{Ag} (GenScript®), que expresaría la proteína PEP de AgMNPV (descrita en el capítulo 3) fusionada en su extremo N-terminal con las enzimas *enhancin* (ENH) de *Agrotis segetum* granulovirus (AgseGV) (secuencia nucleotídica desde el nucleótido 616 hasta el 1499 del gen *enhancin* AgseGV, GenBank *accession no.* NC_005839), seguida del producto del gen *gp37* de *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) (Liu *et al.*, 2011). La construcción sintética se clonó en el vector de transferencia pBacPAK9 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* como se muestra en el panel de la derecha Figura 4.2 y en "Material suplementario". Los plásmidos fueron recibidos en papel de filtro estéril y fueron resuspendidos en 40 µl de agua estéril y utilizados para transformar *E. coli* electrocompetentes (cepa TOP10).

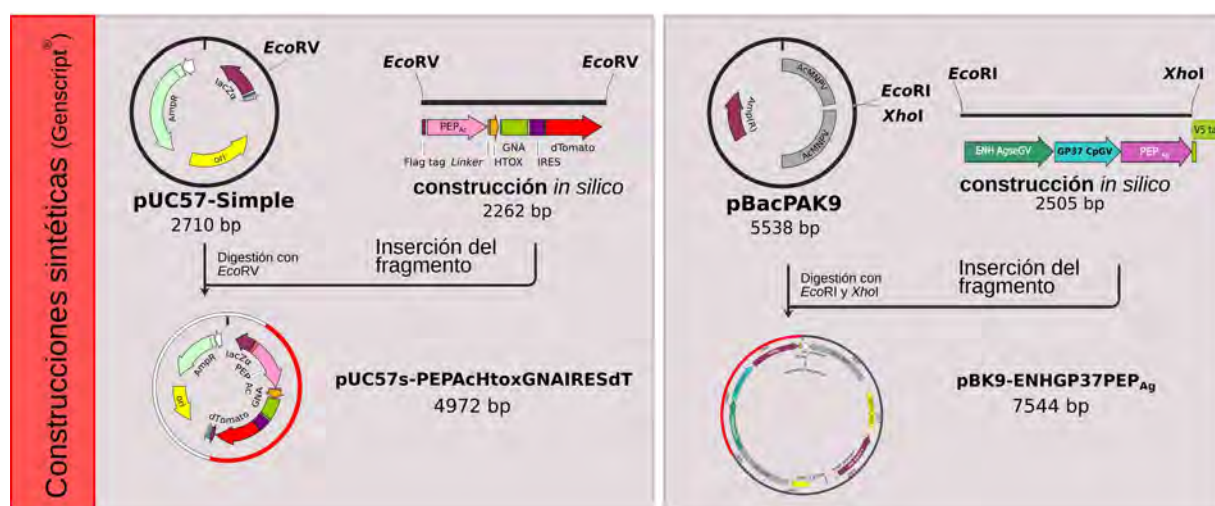


Figura 4.2. Esquema del desarrollo de las construcciones sintetizadas por la empresa Genscript®. En el panel de la izquierda, se diseñó la construcción pUC57-s-PEPAcHtoxGNAIRESdT como sigue: la secuencia de Hv1a fusionada en su extremo C-terminal a la secuencia completa de la GNA, con un linker de 3 aminoácidos: AAA y, en su extremo N-terminal, fusionada a la proteína PEP de AcMNPV con un linker de 5 aminoácidos: GGGGS. Esta construcción se digirió con la enzima de restricción *EcoRV* y se clonó en el pUC57-simple. En el panel de la derecha se diseñó la fusión traduccional como sigue: en el extremo N-terminal la secuencia de la proteína Enhancin de AgseGV, seguida de la secuencia de la proteína GP37 de CpGV y finalmente la secuencia de la proteína PEP de AgMNPV junto con la secuencia del tag V5. Este fragmento se clonó en el pBacPAK9 digiriendo con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*.

Generación de vectores de expresión para la generación de líneas celulares de insecto transgénicas

Se generaron tres vectores de expresión derivados del vector de transferencia pBK9-ENHGP37PEP_{Ag}. Se digirió la fusión traduccional ENHGP37PEP_{Ag} con las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI* (Promega®) y se purificaron por electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se subclonó en el vector pIB-V5His (Invitrogen™) previamente digerido con las enzimas *HindIII* y *XhoI*. El vector de expresión obtenido se denominó pIB-ENHGP37PEP_{Ag}. Para la generación del vector pIB-ENHPEP_{Ag} se digirió el pIB-ENHGP37PEP_{Ag} con la enzima *SacI* (Promega®), se purificó por electroforesis en gel de agarosa y se procedió a la religación. Para la obtención del pIB-GP37PEP_{Ag} se digirió el pIB-ENHGP37PEP_{Ag} con la enzima *KpnI* (Promega®), se purificó por gel de agarosa y se procedió a la religación. Las condiciones de digestión y ligación con la ligasa del fago T4 siguieron las indicaciones proporcionadas por el fabricante y se detallan en el Anexo.

Obtención de los baculovirus recombinantes: Ac-PEPAcHtoxGNAIRESdT y Ac-ENHGP37PEP_{Ag}

Se utilizó el sistema desarrollado por Je *et al.*, (2001, 2003), basado en un bÁcmido (genoma viral capaz de replicar en *E. coli*, denominado bApGOZA) deficiente en el gen esencial *orf1629* y en el rescate de DNA viral viable por recombinación con un plÁsmido de transferencia que contiene este gen junto con otros que se desea expresar. Para ello, se co-transfectó 1 µg del DNA del plÁsmido de transferencia y 1 µg del DNA del bÁcmido en células High Five™ utilizando el reactivo Cellfectin II de acuerdo a las instrucciones del

fabricante y se monitoreó el cultivo celular hasta observarse la formación de poliedros. A continuación, se tomó el sobrenadante y se lo utilizó como inóculo para infectar un T25 de células High Five al 70% de confluencia. La incorporación de la secuencia heteróloga de interés fue determinada por PCR utilizando como molde el DNA viral extraído a partir del sobrenadante de infección (ver Anexo).

Evaluación de la actividad biológica de los poliedros recombinantes en larvas susceptibles a AcMNPV.

Se realizaron bioensayos con larvas de *Spodoptera frugiperda* de primer estadio, siguiendo la metodología descrita por O'Reilly *et al.*, (1994). Para ello, los insectos a ensayar se mantuvieron desprovistos de alimento durante las 12 h y luego se les suministró una gota de suspensión viral, utilizándose sacarosa 1% como fagoestimulante y *Coomassie Brilliant Blue* 0,1% como colorante para la verificación de la ingesta. Se seleccionaron aquellas larvas en las cuales se observó el contenido de la suspensión hasta la mitad del tracto digestivo. Los ensayos se realizaron en cámara climatizada a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 50% de humedad relativa y 14:10 horas L/O. Se ensayaron diferentes dosis de AcMNPV recombinante (con proteínas quiméricas en su OB) 20, 200 y 2000 poliedros totales por el método de la gota para 30 individuos por tratamiento Hughes *et al.*, (1986). Cada tratamiento se repitió tres veces y los ensayos se realizaron dos veces. Como control positivo se utilizará el virus de AcMNPV-*wt* y, como control negativo, sólo la mezcla fagoestimulante coloreada. La mortalidad fue registrada a intervalos de 12 h.

Resultados

Biblioteca de oligoDNA como estrategia bioinsecticida

En esta sección avanzamos en el desarrollo de una estrategia basada en la inhibición de la expresión luego de la hibridación específica con la secuencia blanco (RNA) en larvas. La misma busca poder modular la expresión de los genes virales para un mejor entendimiento de la biología de aquellos baculovirus imposibles de propagar en cultivo celular, como es el caso de la mayoría de los miembros del género *Betabaculovirus*. A su vez, dentro de este género, existen virus con una gran capacidad insecticida inherente por lo que esta estrategia de inhibición mediada por oligoDNA nos permitirá modular los genes del hospedador para generar una sensibilidad mayor a la infección viral y por ende disminuir el tiempo letal medio de los baculovirus. Para la puesta a punto de esta estrategia, y como prueba de concepto, se utilizó como modelo al virus recombinante AcMNPV-dsRed previamente desarrollado en nuestro laboratorio. Los genes candidatos para el silenciamiento fueron: el gen inmediatamente temprano *ie0-ie1*, el cual es un transactivador transcripcional y el único gen susceptible a *splicing* alternativo cuya función es esencial para la infección viral; el segundo, el gen *gp64* que expresa la glicoproteína mayoritaria localizada en la membrana del virión brotante responsable de la entrada del virus en la célula del hospedador y, por último, el gen *dsRed* que nos permite hacer un seguimiento de la infección a nivel macroscópico con lupa o a simple vista debido al cambio del color de las larvas infectadas. Se diseñaron oligonucleótidos antisentido cortos sintéticos (oligoDNA) con un tamaño de 18-21 nucleótidos (desarrollado en "Materiales y Métodos") como se muestra en la Tabla 1, que permitirá poner a punto la técnica de silenciamiento en larvas a partir de secuencias cortas de DNA cuya eficiencia será evaluada de manera cuantitativa por RT-qPCR. Para el gen blanco *ie0-ie1*: se diseñaron dos oligoDNA uno para la región *ie0* y otro para la región *ie1*, para el gen *gp64*: tres oligoDNA y para *dsRed*: tres oligoDNA. Para todos los oligoDNA se diseñaron sus respectivos controles negativos, denominados

oligoScramble, los cuales se basan en la misma composición del oligonucleótidos pero ordenados de manera aleatoria (Tabla 4.1).

AcMNPV-dsRed			SfGV-wt		
Gen blanco	Nombre primer	Antisense 5'-3'	Gen blanco	Nombre primer	Antisense 5'-3'
ie01	ie01Ac1	TATCACCGTGTCGGCTCCAT	ie1	ie1SfGV1	TTTATCTTCATCGCTTCTTCAT
	ie01Ac5UTR	GTTGCGTTGCCGTTATCAAT		ie1SfGV2	CTTTACAGAATTGATGTGTACCT
	ie01Ac1scramble	GCGGTATCGCACTCACTTCT		ie1SfGV3	ATTCAAACACCTCAGTTTCGGTG
	ie01Ac5UTRscramble	GGTTATCGACCGACTTGTCT		ie1SfGV1scramble	GTTTATCCCATCTTCTTCTTAT
ie1	ie1Ac1	TCACAAAACCTGAATAGCTGTT	ie1	ie1SfGV2scramble	GTATTTAGCTAGCGTAACCTCTAT
	ie1Ac1scramble	ACAATTCTAGATACGTCTCATA		ie1SfGV3scramble	GAACGTCTTACACTCGAGATCT
gp64	gp64Ac1	TTTAATGAGCAGACACGCAGC	iap3	iap3SfGV1	CAATTTTATTATAATTAATAGCG
	gp64Ac2	TTGAATATGCATCAGGTCGCC		iap3SfGV2	AATTGTCTTACCGGTATGTTGAC
	gp64Ac5UTR	CTCAATGCTACTAGTAAATCAGT		iap3SfGV5UTR1	CAAACACATTATTGAGATTGCTG
	gp64Ac1scramble	GCCAGGCAAGTATACACTGT		iap3SfGV1scramble	GACAAATAATCAATAATCTAAAT
	gp64Ac2scramble	GATGTCCAGCCTTGAGACTAT		iap3SfGV2scramble	GTTGCACATGTTCTTCAATAGGT
	gp64Ac5UTRscramble	GCTAATAAATACCGACGTTTCATT		iap3SfGV5UTR1scramble	GCATTAGGATACATGACACTTAT
dsRed	dsR1	CTTGAAGCGCATGAACTC	RT-qPCR	ie1GVqpcrFW	TCACCGGCAAGGAACACTAC
	dsR2	TTGGAGCCGTAAGTGAAC		ie1GVqpcrRV	TATGATGTGATGCGAGCCCC
	dsR3	GGTGATGTCCAGCTTGCGG		iap3GVqpcrFW	GCGCATACTGCGAATTGTGT
	dsR1scramble	GAGCTATACGCCTTACGA		iap3GVqpcrRV	CGTGTTCAGTCGGTTCTCCA
	dsR2scramble	GGAGATGTCCGCGATCATT		dsRqpcrFW	GCCACTACCTGGTGGAGTTC
	dsR3scramble	GCGGTGAGCGCTTCGACT		dsRqpcrRV	TGGTGTAGTCCTCGTTGTGG

Tabla 4.1. Biblioteca de oligoDNA. Secuencias nucleotídicas de los oligoDNA diseñados contra AcMNPV-dsRED en verde y contra SfGV en rosa. En naranja se detallan los *primers* para realizar los experimentos de RT-qPCR. La síntesis de todos estos oligos se realizaron en Macrogen.

El mismo protocolo se aplicó para el diseño del oligoDNA con el objetivo de modular los genes del hospedador para disminuir el tiempo letal. Los genes blanco que se seleccionaron fueron: el gen *iap-3* y el gen *ie1* (como control) del granulovirus de *Spodoptera frugiperda* (SfGV). Se diseñaron tres OligoDNA para cada gen y sus correspondientes oligoScramble, todos con un tamaño entre los 18-21 nucleótidos (Tabla 4.1). La proteína IAP-3, es un inhibidor de la apoptosis que genera un estado celular propicio para el desarrollo del ciclo viral y la propagación de un número considerable de viriones. El silenciamiento de este gen permitiría una mayor actividad apoptótica generando un desequilibrio y la consiguiente muerte de la larva (Oberemok *et al.* 2014). Como resumen de esta sección, se diseñaron los primeros pasos de una novedosa estrategia para la aplicación de bioinsecticidas de forma tópica, los cuales son susceptibles a la biodegradación en contraste con la mayoría de los insecticidas químicos actuales (Figura 4.3). Debido a que las epizootias de los insectos, *Spodoptera frugiperda*, *Rachiplusia nu* y *Anticarsia gemmatalis* se producen de manera alternada y con diferente frecuencia, fue que durante el transcurso del trabajo doctoral se

obtuvieron escasos ejemplares en las trampas preparadas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Esto imposibilitó la propagación de una cría estable que permitiera desarrollar los ensayos *in vivo* planeados en los experimentos de este capítulo de tesis.

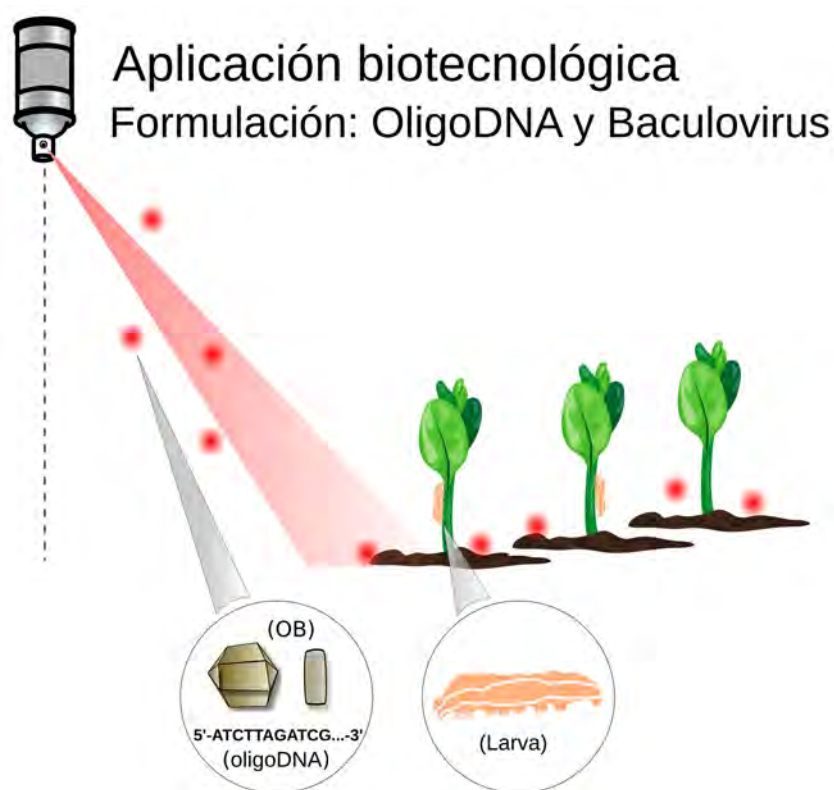


Figura 4.3. Esquema del concepto de la aplicación biotecnológica utilizando una mezcla insecticida de oligoDNA y baculovirus en el campo. Se plantea la aplicación tópica de los oligoDNA sobre las larvas cuyo efecto se verá potenciado por la ingesta de baculovirus.

Biblioteca de vectores de clonado con genes insecticidas candidatos

Para el objetivo de la generación de líneas celulares de insecto que expresen un polipéptido de fusión compuesto por la proteína de la envoltura poliédrica de AgMNPV (PEP_{Ag}) y una proteína que contribuya a mejorar las capacidades insecticidas del virus de AgMNPV se generó una biblioteca de vectores de clonado con los genes candidatos. Con tal fin se clonaron dos versiones de cada uno de los genes insecticidas candidatos, una de ellas para

generar fusiones polipeptídicas en el extremo N-terminal de PEP_{Ag} (N-ter) y, otra, para la fusión en el extremo C-terminal de PEP_{Ag} (C-ter). Para la versión denominada N-ter, el *primer reverse* introduce una mutación esencial (ver Anexo) en el codón de stop del marco de lectura del gen amplificado; además en los extremos flanqueantes se adicionan los sitios blanco de las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*. En cambio, en la versión denominada C-ter, se mantiene el marco de lectura original del gen de interés y se agregan los sitios de restricción para las enzimas *HindIII* y *BamHI*, también en las regiones flanqueantes del *primer*. Se amplificaron las dos versiones por PCR de los ORF de los genes insecticidas candidatos: *chiA*, *v-cath* y *gp37* de *EpapGV*, *enhancin* de *LdMNPV* y *tox34* de *P. tritici*. La Figura 4.4 muestra la corrida electroforética de todos los productos amplificados y purificados.

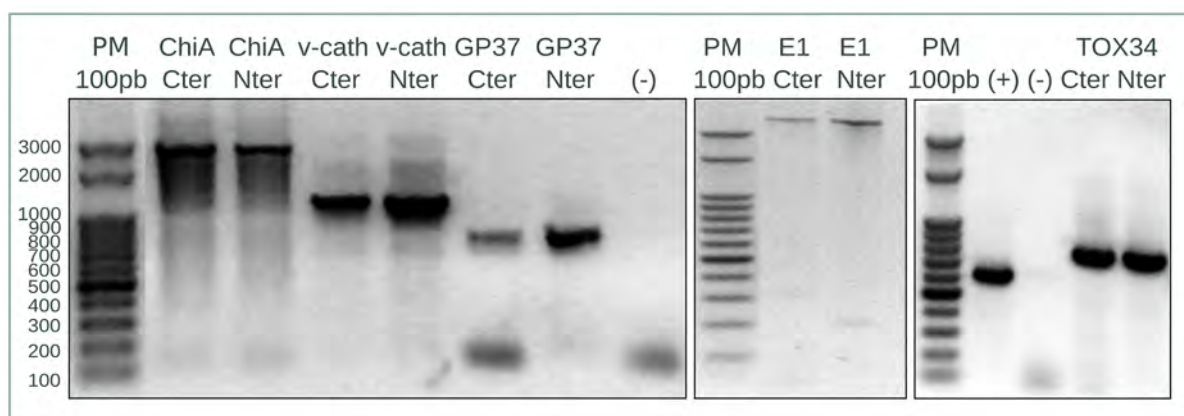


Figura 4.4. Amplificación por PCR de los genes insecticidas: en el panel de la izquierda: *chiA*, *v-cath*, *gp37* derivados del genoma *EpapGV*. En el panel intermedio el gen de *enhancin* E1 derivado del genoma de *LdMNPV*, y en el panel de la derecha el gen que codifica para la *Tox34* derivada del plásmido pBS-*Tox34*. En todos los casos el marcador de peso molecular (PM) utilizado fue el de 100 pb (Genbiotech). Gel de agarosa 0,8%.

Posteriormente, se clonaron los productos de PCR en el vector pGEM-T Easy y se confirmaron las construcciones por secuenciamiento de Sanger y se obtuvieron los vectores: pGEMT-ChiAN-TER, pGEMT-ChiAC-TER, pGEMT-GP37N-TER, pGEMT-GP37C-TER, pGEMT-v-cathN-TER, pGEMT-v-cathC-TER, pGEMT-E1N-TER, pGEMT-E1C-TER, pGEMT-TOX34N-TER, pGEMT-TOX34C-TER (Figura 4.5).

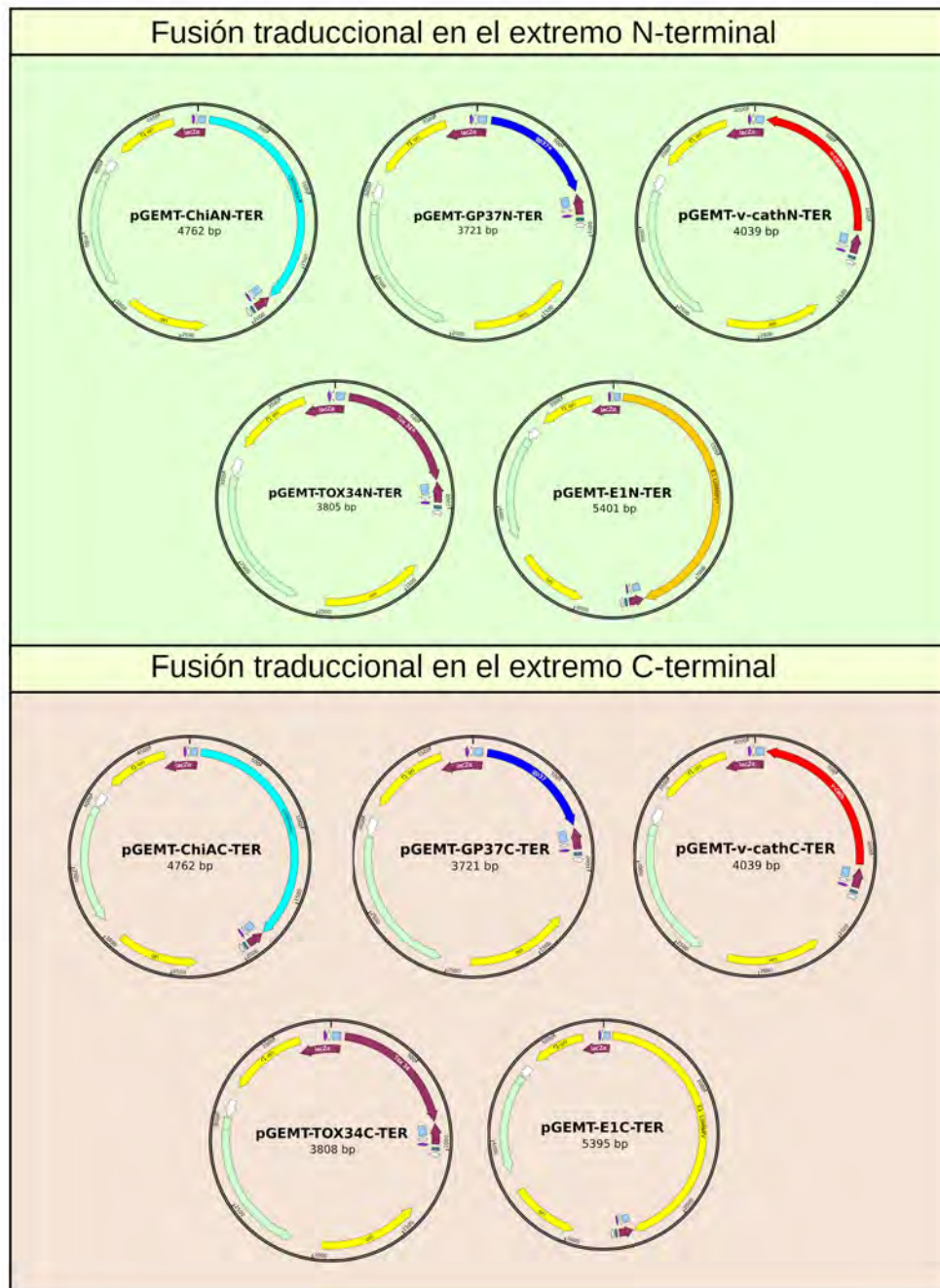


Figura 4.5. Esquema de los vectores de clonación y plásmidos recombinantes con los genes insecticidas obtenidos luego de la amplificación por PCR y posterior purificación con sílica. La denominación N-TER significa que el codón de terminación de la proteína ha sido mutado para continuar con la síntesis proteica, en cambio la denominación C-TER mantiene el codón de terminación original. Las secuencias nucleotídicas de los plásmidos se encuentran en el "Anexo-Material suplementario".

Generación de vectores de transferencia para la producción de baculovirus recombinantes

Nuestro objetivo final busca la obtención de baculovirus salvajes con capacidades insecticidas mejoradas gracias al direccionamiento de polipéptidos potenciadores en los cuerpos de oclusión. Sin embargo, y de manera paralela, se construyeron virus recombinantes como pruebas de concepto para evaluar cuáles de las proteínas recombinantes son más eficaces para, finalmente, generar las líneas celulares de insecto transgénicas. En ese sentido, se plantearon dos fusiones polipeptídicas diferentes para estudiar la toxicidad y rendimiento como insecticida: PEPAcHtoxGNAIRESdT y ENHGP37PEPAg. Con este fin, se desarrollaron dos plásmidos de transferencia (Figura 4.6). En la primera, la construcción sintética PEPAcHtoxGNAIRESdT, se buscó probar el rendimiento de la ω -hexatoxina (Hv1a) y en la segunda, ENHGP37PEPAg, evaluar la sinergia de las enzimas para degradar la membrana peritrófica de la larva. Se generó el primer vector denominado pUC57s-PEPAcHtoxGNAIRESdT (ver "Materiales y Métodos") para la expresión de un polipéptido de fusión que cuenta con la proteína de envoltura PEP de AcMNPV (para el direccionamiento al OB), seguida de la ω -hexatoxina (Hv1a) de *H. versuta* finalizando con la lectina (GNA) de *Galanthus nivalis*, esta última permite el direccionamiento al sistema nervioso central de la larva. Adicionalmente, se le agregó una secuencia nucleotídica por fuera del polipéptido, en el extremo C-terminal, que cuenta con un Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES) del *white spot syndrome virus* (WSSV) fusionado a la proteína fluorescente dTomato que permitió evaluar la expresión del mRNA y aislar fácilmente los virus recombinantes de aquellos que no lo son (Han & Zhang, 2006; Kang *et al.*, 2009). Se digirió el pUC57S-PEPAcHtoxGNAIRESdT con las enzimas de restricción *Xba*I y *Xho*I como se muestra en el Figura 4.6a y se subclonó el fragmento PEPAcHtoxGNAIRESdT en el pBacPAK9 previamente digerido con las mismas enzimas. La generación del vector de transferencia pBK9-PEPAcHtoxGNAIRESdT se corroboró por

colony PCR utilizando los primers Fw Htox y Rv GNA (ver Anexo) que amplifican el segmento Htox::GNA de 450 pb como se muestra en la Figura 4.6b.

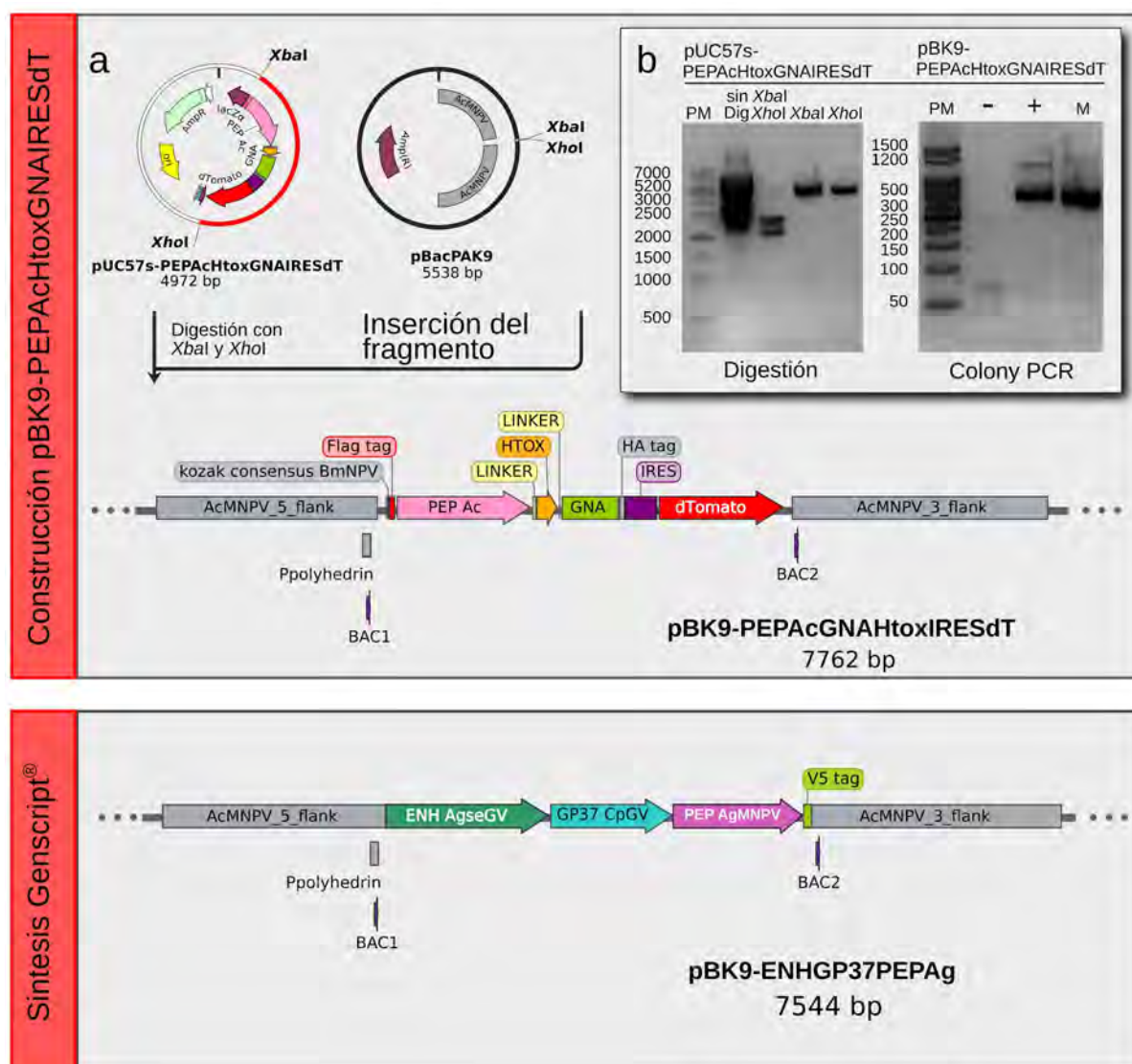


Figura 4.6. Generación de dos vectores de transferencia para el sistema de recombinación bApGOZA: en el panel superior el pBK9-PEPAcHtoxGNAIRESdT para el análisis de la toxicidad de Hv1a-GNA en larvas blanco. A. Se digirió el fragmento del vector obtenido por Genscript® con las enzimas *XbaI* y *XhoI* y se clonó direccionado en el pBacPAK9. b. Geles de agarosa: digestión del vector pUC57s-PEPAcHtoxGNAIRESdT, y colony PCR para confirmar el clonado en el vector pBK9-PEPAcHtoxGNAIRESdT (M), control positivo (+) pUC57s-PEPAcHtoxGNAIRESdT. En el panel inferior se describe la secuencia del vector de transferencia pBK9-ENHGP37PEPA_g sintetizado en Genscript® para comparar su rendimiento con los baculovirus salvajes aislados en líneas celulares empaquetadoras.

El segundo vector denominado pBK9-ENHGP37PEPA_g, se construyó de manera sintética con la empresa Genscript® para expresar la proteína PEP de AgMNPV (descrita en el

capítulo 3) fusionada en su extremo N-terminal con *enhancin* (ENH) de *Agrotis segetum* granulovirus (AgseGV) seguida de *gp37* de *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) la cual fue clonada en el esqueleto del vector de transferencia pBacPAK9 como se muestra en el panel inferior de la Figura 4.6. Las secuencias nucleotídicas de estos vectores se encuentran en el "Material Suplementario".

Obtención de los baculovirus recombinantes: Ac-PEPACHtoxGNAIRESdT y Ac-ENHGP37PEPAG

Para la generación del virus recombinante Ac-PEPACHtoxGNAIRESdT, se co-transfectaron células High Five™ con el bÁcmido bApGOZA y el plÁsmido de transferencia pBK9-PEPACHtoxGNAIRESdT (Figura 4.7a). Se procedió al seguimiento del cultivo celular por microscopía de campo claro hasta observar la formación de poliedros a las 96 horas post transfección (h p.t.). Paralelamente, se observó la aparición de fluorescencia roja, correspondiente a la expresión de la proteína reportera dTomato, mediante microscopía de epifluorescencia (Figura 4.7b). Para confirmar la presencia de la construcción génica exógena en el genoma del bÁcmido, se realizó un ensayo de PCR amplificando parte del IRES y de dTomato a partir de DNA genómico del sobrenadante del primer pasaje (P0) en cultivo celular. La Figura 4.7c. muestra la amplificación de un producto del tamaño esperado de 200 pb para ambas reacciones. El control positivo se realizó utilizando como molde el plÁsmido de transferencia pBK9-PEPACHtoxGNAIRESdT, y el control negativo con mezcla de reacción sin molde. De esta forma, se obtuvo el baculovirus recombinante Ac-PEPACHtoxGNAIRESdT que lleva en su genoma el polipéptido de fusión insecticida (PEPACHtoxGNA) y un *cassette* para evaluar la expresión del mRNA (IRESdTTomato).

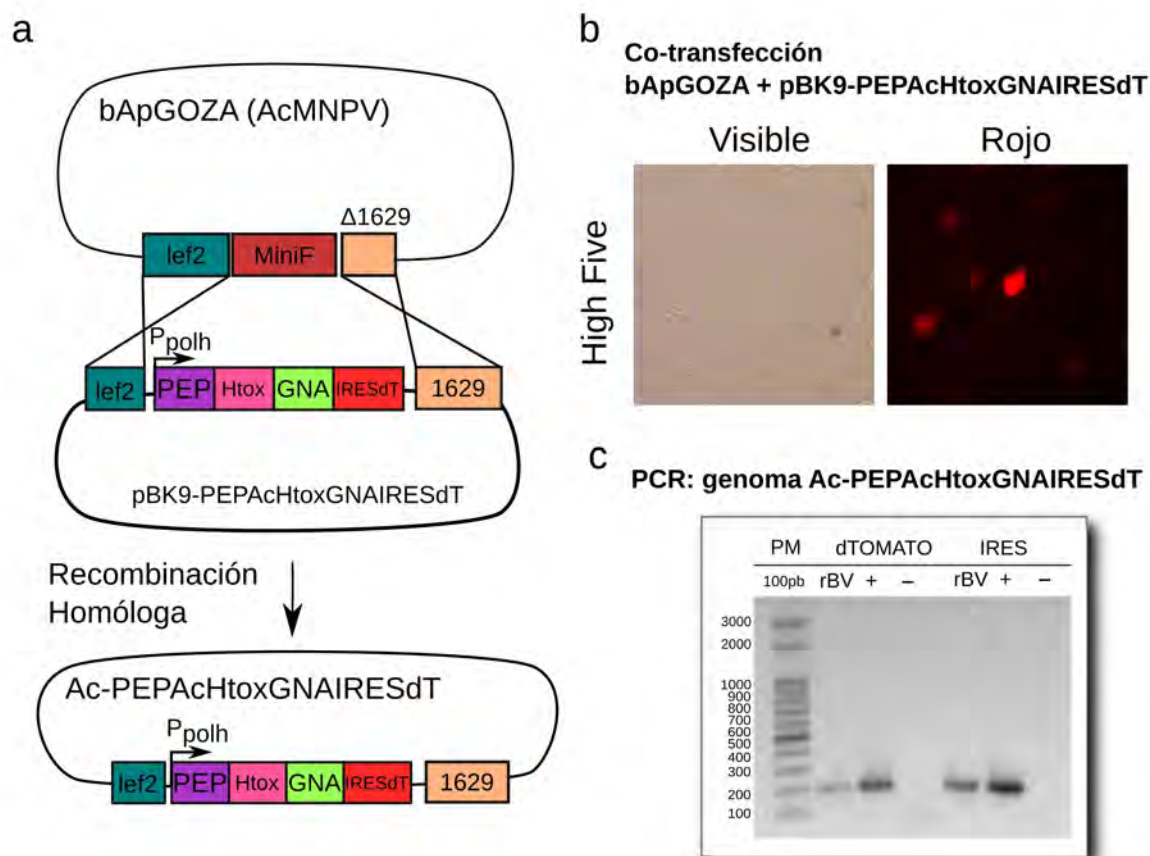


Figura 4.7. a. Esquema de la recombinación homóloga para la generación del virus AcMNPV que incorpora el polipéptido de fusión PEPACHtoXGNAIRESdT (Ac-PEPACHtoXGNAIRESdT) b. Células High Five™ co-transfectadas con el báculo bApGOZA y el plásmido pBK9-PEPACHtoXGNAIRESdT. Se observan células que expresan fluorescencia roja correspondiente a dTomato, producto de la recombinación homóloga entre el virus parental y el vector de transferencia c. Caracterización genética del virus recombinante: confirmación por PCR de la incorporación de las secuencias heterólogas en el genoma del virus recombinante utilizando como molde DNA genómico y los primers Fw dT, Rv dT, Fw Ires, Rv Ires (ver Anexo).

Paralelamente, se diseñó una segunda construcción génica basada en los estudios de Yang S. y col. (2017), los cuales han demostrado que el gen truncado de *enhancin* de AgseGV (ENH) o el gen *gp37* de CpGV fusionado a la proteína mayoritaria del poliedro, poliedrina, disminuye la dosis letal media entre 3 y 5 órdenes de magnitud. Para ello, se procedió a la generación de un virus recombinante que exprese la proteína PEP_{Ag} fusionada a estos dos genes insecticidas candidatos. Con tal fin, se co-transfectaron células High Five™ con el báculo bApGOZA y el plásmido pBK9-ENHGP37PEP_{Ag} (Figura 4.8a). En concordancia con lo expresado anteriormente, se monitoreó el cultivo por microscopía de campo claro hasta observar la formación de poliedros a las 96 h p.t. (Figura 4.8b). La Figura 4.8c,

muestra el producto de PCR del sobrenadante del primer pasaje (P0) en cultivo celular donde puede observarse el tamaño esperado de 2,5 kpb para el rBV así como para el plásmido de transferencia (+) pBK9-ENHGP37PEP_{Ag}. De este modo, confirmamos la generación del baculovirus recombinante Ac-ENHGP37PEP_{Ag} el cual lleva en su genoma el polipéptido insecticida (ENHGP37PEP_{Ag}).

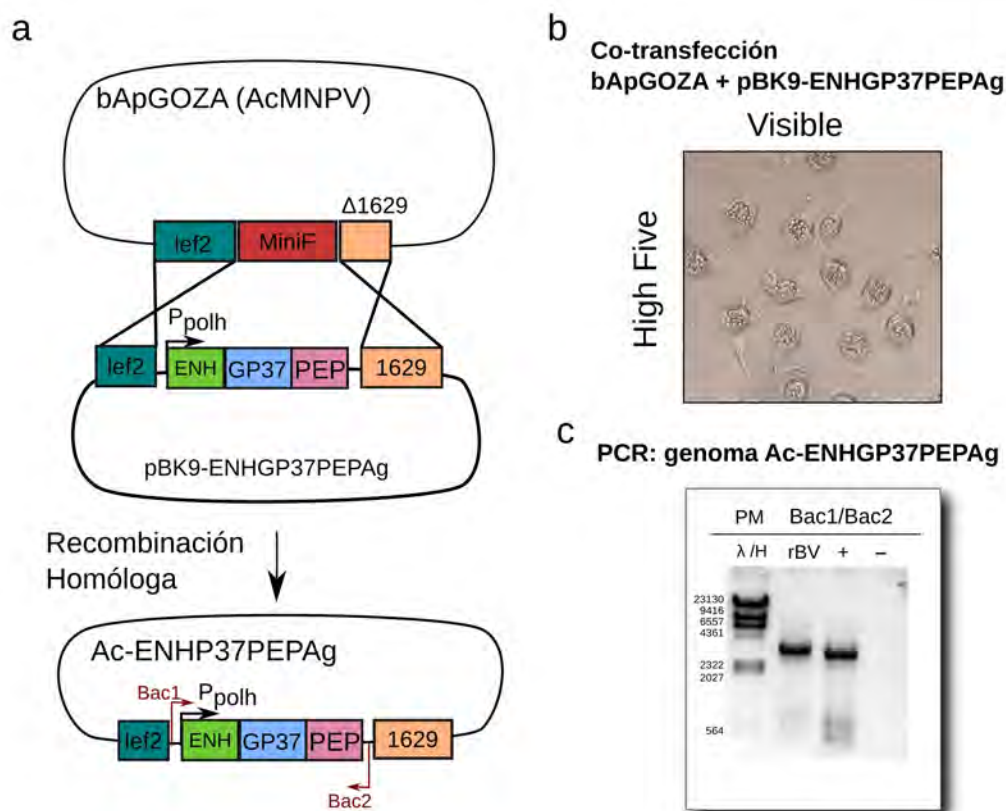


Figura 4.8. a. Esquema de la recombinación homóloga para la generación del virus AcMNPV que incorpora el polipéptido de fusión ENHGP37PEP_{Ag}. b. Microscopía óptica: aparición de poliedros en las células High FiveTM co-transfectadas con el bAcMNPV bApGOZA y el plásmido de transferencia pBK9-ENHGP37PEP_{Ag}. La aparición de poliedros en diferentes células vecinas es un indicio de la doble recombinación homóloga y producción del baculovirus recombinante Ac-ENHGP37PEP_{Ag}. c. Caracterización genética del virus recombinante: confirmación por PCR de la incorporación de las secuencias heterólogas en el genoma del virus recombinante utilizando como molde DNA genómico y los primers Bac1 y Bac2 (ver Anexo).

Generación de los vectores de expresión pIB-ENHGP37PEP_{Ag}, pIB-ENHPEP_{Ag} y pIB-GP37PEP_{Ag}

El desarrollo de líneas celulares transgénicas derivadas de High Five™ permite la expresión constitutiva de un polipéptido con características insecticidas con el fin de suplementar en *trans* la envoltura de los OB *wt* durante la infección viral. Para el desarrollo de esta estrategia, se utilizó la construcción génica ENHGP37PEP_{Ag} mostrada en la sección anterior. La fusión traduccional de los mismos está compuesta por: la proteína truncada de enhancin de AgseGV (ENH), seguida de GP37 de CpGV (GP37) o cada una de ellas individualmente; en los tres casos la fusión se diseñó en el extremo N-terminal de PEP de AgMNPV como se muestra en el Figura 4.9. Para ello, se digirió la fusión traduccional ENHGP37PEP_{Ag} del plásmido de transferencia pBK9-ENHGP37PEP_{Ag} y se subclonó en el vector pIB-V5His (Invitrogen™) previamente digerido con las enzimas *HindIII* y *XhoI*. El vector de expresión obtenido se denominó pIB-ENHGP37PEP_{Ag} (Figura 4.9a). Para la generación del vector pIB-ENHPEP_{Ag} se digirió el pIB-ENHGP37PEP_{Ag} con la enzima *SacI*, se purificó por gel de agarosa y se procedió a la religación (Figura 4.9b,c). Para la obtención del pIB-GP37PEP_{Ag} se digirió el pIB-ENHGP37PEP_{Ag} con la enzima *KpnI*, se purificó por gel de agarosa y se procedió a la religación (Figura 4.9b,c). Todas las secuencias de los plásmidos fueron evaluadas por secuenciamiento de Sanger (Macrogen Corporation, Corea del Sur). Debido a la situación extraordinaria de la pandemia, la generación de las líneas celulares de insecto transgénicas se reprogramaron para más adelante.

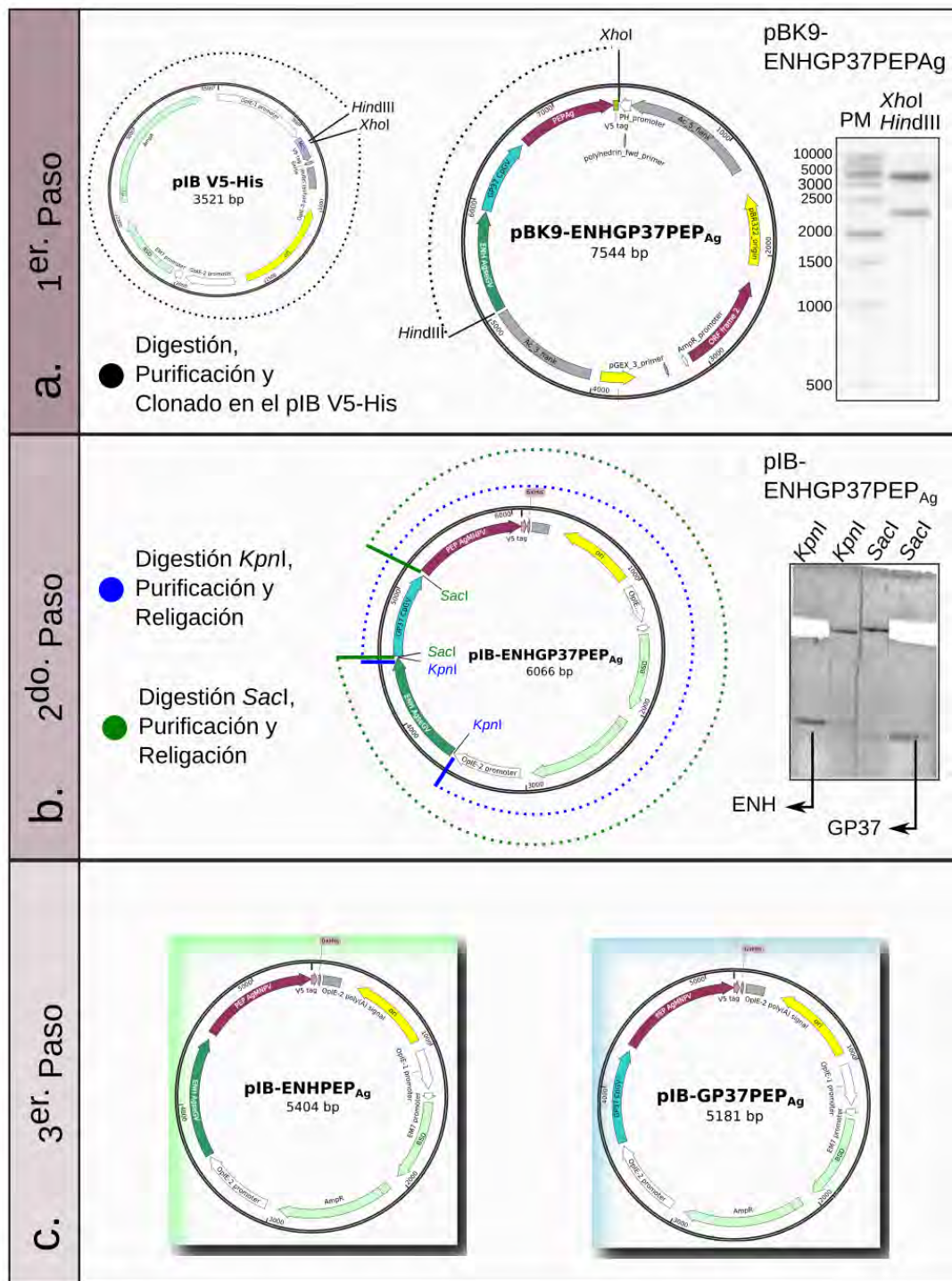


Figura 4.9. Esquema de la construcción de los vectores de expresión para la generación de líneas celulares transgénicas. a. Primer paso: Clonado por enzimas de restricción. Digestión del polipéptido de fusión ENHGP37PEP_{Ag} del vector de transferencia y ligación en el vector de expresión pIB-V5/His para generar el pIB-ENHGP37PEP_{Ag}. Electroforesis en gel de agarosa con el patrón de digestión del vector de transferencia con las enzimas *XhoI* y *HindIII*. b. Segundo paso: Digestión del vector pIB-ENHGP37PEP_{Ag} para eliminar GP37 (*SacI*) o ENH (*KpnI*). Purificación por electroforesis en gel de agarosa, digestión del vector de expresión con las enzimas *SacI* o *KpnI* por duplicado. Con flechas negras se muestran los fragmentos liberados y el recorte corresponde al plásmido digerido y de interés. c. Tercer paso: Los productos purificados fueron re-ligados para la generación del vector pIB-GP37PEP_{Ag} y pIB-ENHPEP_{Ag}. Las secuencias nucleotídicas se encuentran en el Anexo.

Evaluación de la actividad biológica de los poliedros recombinantes en larvas susceptibles a AcMNPV

Para estudiar la infectividad de los poliedros de AcMNPV recombinantes en larvas plaga de *Spodoptera frugiperda* se realizó un bioensayo con tres grupos, cada uno con diferentes tratamientos sobre 30 larvas de primer estadio por tratamiento. Los tratamientos se realizaron por triplicado y los bioensayos por duplicado. Los grupos se diferenciaron por el tipo de inóculo: Grupo 1: inoculadas con OB obtenidos por infección de células con el baculovirus recombinante Ac-PEPACHtoxGNAIRESdT (1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 OB/mL), grupo 2: inoculadas con poliedros Ac-wt (1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 OB/mL) y el grupo 3: inoculadas con la mezcla fagoestimulante coloreada. Luego de la infección, la mortalidad y la aparición de fluorescencia roja (dTomato), según corresponda, se registró a intervalos de 12 h hasta el momento en que las larvas control alcanzaron el estado de pupa. De los inóculos 10^4 y 10^5 OB/mL pertenecientes a los grupos 1 y 2 no se observaron signos de infección, ya sea registrando la aparición de fluorescencia, disminución del crecimiento y movilidad, o por licuefacción (Figura 4.10). Ambos subgrupos alcanzaron el estado de pupa, no observándose diferencias entre los diferentes bioensayos. Del inóculo 10^6 OB/mL perteneciente al grupo 1 infectado con AcPEPACHtoxGNAIRESdT, se observó un 10 % de larvas infectadas para el primer bioensayo, pero ninguna larva infectada en el segundo bioensayo. Con respecto al inóculo 10^6 OB/mL en el grupo 2 infectado con Ac-wt no se observaron larvas infectadas y lo mismo para las diferentes réplicas. Finalmente, el grupo 3 o grupo control, presentó un desarrollo normal del estadio de las larvas, todas alcanzando el estado de pupa, no observándose diferencias entre los bioensayos. Estos bioensayos muestran una gran resistencia a la infección probablemente debido a que las larvas de *Spodoptera frugiperda* las cuales no son su hospedador natural y a la atenuación de los baculovirus debido a los sucesivos pasajes por cultivo celular (Zherebtsova, 1978). Debido a la situación extraordinaria de la pandemia, la evaluación en larvas *Rachiplusia nu* de los OB

de Ac-ENHGP37PEPAg y la repetición de los bioensayos antes descritos, se reprogramaron para más adelante.

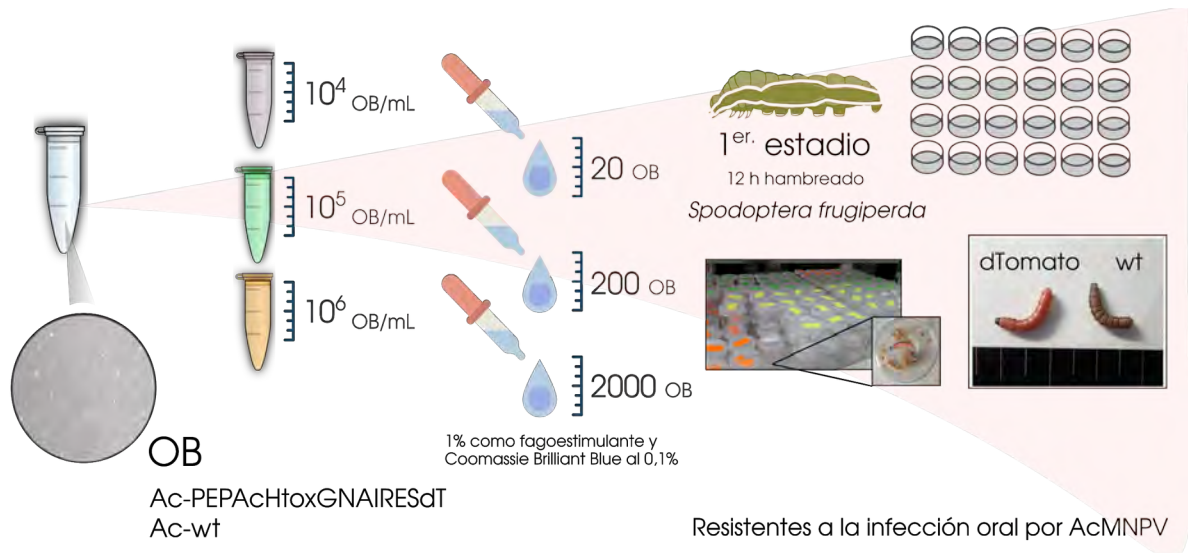


Figura 4.10. Bioensayo de larvas de *Spodoptera frugiperda* en pocillos individuales donde se infectó por el método de la gota (3 grupos, colores: naranja, verde y amarillo) y un grupo control sin infectar (color: blanco). Las suspensiones de OB purificados de de Ac-PEPACHtoxGNAIRESdT (rBV) y AcMNPV-wt se prepararon en agua destilada y sacarosa al 1% (p/v) . Fotografías: Larvas de *Spodoptera frugiperda* infectada con Ac-PEPACHtoxGNAIRESdT y control expuestas a luz visible.

Discusión

Diversos miembros de la familia *Baculoviridae* son utilizados como agentes de control biológico; sin embargo, la aplicabilidad de algunas especies en el manejo de plagas agrícolas ha sido limitada por su velocidad de acción lenta y rango de huéspedes estrecho. En nuestro país, un lepidóptero noctuido nativo de América, *Anticarsia gemmatalis*, es considerado plaga para el cultivo de soja y otras leguminosas. Presenta las mayores infestaciones en la región Pampeana en los cultivos de soja (Aragón, 2003, Iannone, 2007). La estrategia explorada en este trabajo consiste en mejorar la velocidad de acción del baculovirus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV). Para ello, se planteó la incorporación de proteínas insecticidas en *trans* direccionadas al cuerpo de oclusión mediante la fusión a la proteína de la envoltura del virus (PEP_{Ag}). De esta manera, los OB actúan como *carriers* de proteínas que colaboran con la degradación de la barrera primaria en el insecto, y/o toxinas que afectan al sistema nervioso de la larva. Si bien, nuestro objetivo pretende mejorar la capacidad insecticida de AgMNPV, debimos modificar la especie de baculovirus y la plaga blanco ante la falta de *Anticarsia gemmatalis* en el país en los últimos años. Por ello, se plantearon y desarrollaron pruebas de concepto en el baculovirus modelo de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) mientras se concretan colaboraciones en el exterior para poder llevar a cabo los bioensayos con AgMNPV.

En la primer etapa, enfocada en la investigación básica, se efectuaron análisis bioinformáticos para el diseño *in silico* de las fusiones traduccionales a la proteína PEP de AgMNPV y se obtuvo una biblioteca de genes insecticidas candidatos: *chiA*, *v-cath* y *gp37* de EpapGV, *enhancin* ENH de LdMNPV y la toxina TxP-I del ácaro *Pyemotes tritici*. En base a la información obtenida en el capítulo anterior se determinó el uso de la secuencia nucleotídica de PEP_{Ag} completa, y la inserción de proteínas candidatas en su extremo N-terminal. Esta biblioteca de vectores se utilizará para desarrollar diferentes combinaciones

de fusiones traduccionales para el desarrollo de líneas celulares de insecto empaquetadoras. Paralelamente, se comenzó con las pruebas de concepto utilizando el virus de AcMNPV y el sistema de recombinación puesto a punto para la generación de baculovirus recombinantes de AcMNPV. Esto supuso una ventaja a la hora de modificar el sistema de estudio, ya que, además, permitió realizar investigación básica sobre la potencialidad de genes insecticidas nuevos y seleccionar la mejor estrategia. Con este fin, se desarrollaron dos baculovirus recombinantes: Ac-PEPAcHtoxGNAIRESdT para el estudio de la potencialidad de la ω -hexatoxina fusionada en el extremo N-terminal de la lectina GNA que la direccionará al sistema nervioso de la larva, y el virus Ac-ENHGP37PEP_{Ag} que habilita a hacer estudios comparativos sobre la capacidad insecticida entre un virus recombinante y un virus salvaje empaquetado en líneas celulares de insecto transgénicas que expresan la misma fusión traduccional. Para ello, se incorporó al vector de transferencia una fusión transcripcional: IRES-dTomato. La incorporación del IRES para el inicio de la traducción del ORF del gen indicador *dTomato*, permite detectar y verificar que la construcción génica haya sido introducida en el genoma de interés. Asimismo, esta modificación en el vector de transferencia, permite ensayar y evaluar proteínas recombinantes sin necesidad de realizar la fusión a un gen indicador, que podría modificar la función proteica que se desea estudiar.

Para la evaluación de la actividad biológica del baculovirus Ac-PEPAcHtoxGNAIRESdT se realizaron dos ensayos biológicos con larvas de *Spodoptera frugiperda*. En ambos experimentos, se pudo determinar que el baculovirus recombinante Ac-PEPAcHtoxGNAIRESdT es infectivo y que expresa la construcción génica, ya que se observó un fenotipo de infección diferencial, apareciendo los tejidos de la larva teñidos de rojo debido a la expresión de la proteína indicadora dTomato. Sin embargo, no se observó una diferencia en los efectos de la infección entre el baculovirus salvaje y el recombinante (rBV). Más aún, no se obtuvieron altos rendimientos de infección con ninguno de los dos virus indicando una alta resistencia a la infección por AcMNPV en larvas de *Spodoptera frugiperda* como se ha señalado en bibliografía. Como conclusión de estos experimentos, se ha comenzado un

proyecto de colaboración para repetir los ensayos biológicos y determinar la capacidad insecticida de la construcción PEPAcHToxGNAIRESdT, pero utilizando larvas de *Rachiplusia nu* (hospedador natural de AcMNPV).

En la segunda etapa, enfocada en la investigación aplicada, se desarrollaron tres vectores de expresión para la generación de las líneas celulares de insectos transgénicas que expresan la proteína truncada de *enhancin* de AgseGV y/o GP37 de CpGV en el extremo N-terminal de PEP de AgMNPV. Como perspectiva, se propuso obtener cuerpos de oclusión de AcMNPV y AgMNPV empaquetados en estas las líneas celulares para analizar la capacidad insecticida de las diferentes construcciones génicas y, a su vez, considerando que los genes candidatos expresados pueden tener una acción aditiva o sinérgica en la infectividad, se llevarán a cabo bioensayos con formulaciones combinadas con cuerpos de oclusión de los diferentes virus. Paralelamente, se podrá comparar el tiempo letal medio de los baculovirus salvajes empaquetados en líneas celulares de insecto con el virus recombinante Ac-ENHGP37PEP_{Ag} que expresa las mismas construcción insecticida.

Con respecto a la investigación de la formulación insecticida, se realizaron versiones sintéticas de oligonucleótidos antisentido cortos, oligoDNA, para que confieran propiedades insecticidas potenciadoras a los baculovirus, actuando como silenciadores de genes anti-apoptóticos. Se generó una biblioteca de oligoDNA, y en estos momentos, se ha comenzado con los ensayos en larvas para la puesta a punto del sistema. Adicionalmente, la metodología de oligonucleótidos antisentido permitirá al laboratorio investigar y generar información sobre el ciclo de infectivo de aquellos baculovirus no susceptibles a la propagación mediante cultivo celular pero con una alta capacidad insecticida.

Estos resultados, me acercan al objetivo final que se centra en la obtención de baculovirus con capacidades insecticidas mejoradas gracias al direccionamiento de polipéptidos potenciadores en el cuerpos de oclusión. En este sentido, debido a que nuestro laboratorio no cuenta con una insectario y que nuestro material para realizar los bioensayos depende de la disponibilidad de larvas en el ambiente, es que se presentó la limitación para

responder a todas las preguntas respecto a la capacidad insecticida de esta estrategia. Actualmente, todos los ensayos en larvas se desarrollan en colaboración con el INTA Castelar.

Bibliografía

- Aragón, J.R. (2003). En la Región Pampeana Central, Insectos Perjudiciales de la Soja. Soja, idiaXXI, 75-82.
- Asada, K., Ito, K., Yui, D., Tagaya, H., & Yokota, T. (2018). Cytosolic Genomic DNA functions as a Natural Antisense. *Scientific Reports*, 8(1), 8551. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26487-1>
- Bonning, B. C., & Hammock, B. D. (1996). Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annu Rev Entomol*, 41, 191–210.
<https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.001203>
- Burden, J. P., Hails, R. S., Windass, J. D., Suner, M. M., & Cory, J. S. (2000). Infectivity, speed of kill, and productivity of a baculovirus expressing the itch mite toxin txp-1 in second and fourth instar larvae of *Trichoplusia ni*. *J Invertebr Pathol*, 75(3), 226–236.
<https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4921>
- Fabre, M. L., Masson, T., Haase, S., Ferrelli, M. L., & Romanowski, V. (2020). A simplified strategy to package foreign proteins into baculovirus occlusion bodies without engineering the viral genome. *Journal of Biotechnology*, 307, 175–181.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.10.017>
- Ferrelli, M. L., Salvador, R., Biedma, M. E., Berretta, M. F., Haase, S., Sciocco-Cap, A., Ghiringhelli, P. D., & Romanowski, V. (2012). Genome of *Epipotia aporema* granulovirus (EpapGV), a polyorganotropic fast killing betabaculovirus with a novel thymidylate kinase gene. *BMC Genomics*, 13, 548–548. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-548>
- Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis*, Cambridge: Cambridge University Press.
- Fitches, E. C., Pyati, P., King, G. F., & Gatehouse, J. A. (2012). Fusion to snowdrop lectin magnifies the oral activity of insecticidal ω -Hexatoxin-Hv1a peptide by enabling its delivery to the central nervous system. *PLoS One*, 7(6), e39389–e39389.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039389>
- Fitches, E., Edwards, M. G., Mee, C., Grishin, E., Gatehouse, A. M. R., Edwards, J. P., & Gatehouse, J. A. (2004). Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: Snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. *Journal of Insect Physiology*, 50(1), 61–71.

- <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2003.09.010>
- Haase, S., Sciocco-Cap, A., & Romanowski, V. (2015). Baculovirus insecticides in Latin America: Historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*, 7(5), 2230–2267. <https://doi.org/10.3390/v7052230>
- Han, F., & Zhang, X. (2006). Internal initiation of mRNA translation in insect cells mediated by an internal ribosome entry site (IRES) from shrimp white spot syndrome virus (WSSV). *344*, 893–899. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.229>
- Hughes, Patrick, van beek, Nikolai and Wood, Harry. (1986). A modified droplet feeding method for rapid assay of *Bacillus thuringiensis* and baculoviruses in noctuid larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 48. 187-192. [10.1016/0022-2011\(86\)90122-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(86)90122-9).
- Iannone, N. (2007). ALERTA! Plagas de Soja. Editado por C. s. d. Alerta: INTA Pergamino.
- Inceoglu, A. B., Kamita, S. G., & Hammock, B. D. (2006). Genetically Modified Baculoviruses: A Historical Overview and Future Outlook. *Advances in Virus Research*, 68(06), 323–360. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)68009-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)68009-3)
- InsectSelect™ BSD System, I. (2008). For Stable Expression of Heterologous Proteins in Lepidopteran Insect Cell Lines using pIB/V5-His. *Catalog Nos. K820-01, K825-01, V8020-01*.
- Je, Y. H., Chang, J. H., Roh, J. H., & Jin, B. R. (2001). Generation of Baculovirus expression vector using defective *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome maintained in *Escherichia coli* for occ+ virus production. *Int. J. Indust. Entomol.*, 2(2), 155–160.
- Je, Y. H., Jin, B. R., Park, H. W., Roh, J. Y., Chang, J. H., Seo, S. J., Olszewski, J. A., O'Reilly, D. R., & Kang, S. K. (2003). Baculovirus expression vectors that incorporate the foreign protein into viral occlusion bodies. *Biotechniques*, 34(1), 81–87.
- Jinn, T.-R., Tu, W.-C., Lu, C.-I., & Tzen, J. T. C. (2006). Enhancing insecticidal efficacy of baculovirus by early expressing an insect neurotoxin, LqhIT2, in infected *Trichoplusia ni* larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(6), 1247–1253. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0431-5>
- Kang, S., Leu, J., Wang, H., Chen, L., Kou, G., & Lo, C. (2009). Polycistronic mRNAs and internal ribosome entry site elements (IRES) are widely used by white spot syndrome virus (WSSV) structural protein genes. *Virology*, 387(2), 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.012>

- Kroemer, J. A., Kroemer, J. A., Bonning, B. C., & Harrison, R. L. (2015). Expression, delivery and function of insecticidal proteins expressed by recombinant baculoviruses. *Viruses*, 7(1), 422–455. <https://doi.org/10.3390/v7010422>
- Krupke, C. H., Hunt, G. J., Eitzer, B. D., Andino, G., & Given, K. (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLOS ONE*, 7(1), e29268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029268>
- Lepore, L. S., Roelvink, P. R., & Granados, R. R. (1996). Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J Invertebr Pathol*, 68(2), 131–140. <https://doi.org/10.1006/jipa.1996.0070>
- Liang, X.-H., Nichols, J. G., Sun, H., & Crooke, S. T. (2018). Translation can affect the antisense activity of RNase H1-dependent oligonucleotides targeting mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 46(1), 293–313. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1174>
- Liang, X.-H., Sun, H., Nichols, J. G., & Crooke, S. T. (2017). RNase H1-dependent antisense oligonucleotides are robustly active in directing RNA cleavage in both the cytoplasm and the nucleus. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 25(9), 2075–2092. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.06.002>
- Lima, A. A., Aragão, C. W. S., de Castro, M. E. B., de Oliveira, J. V. C., Sosa Gómez, D. R., & Ribeiro, B. M. (2013). A recombinant *Anticarsia gemmatalis* MNPV harboring chiA and v-cath genes from *Choristoneura fumiferana* defective NPV induce host liquefaction and increased insecticidal activity. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074592>
- Liu, X., Ma, X., Lei, C., Xiao, Y., Zhang, Z., & Sun, X. (2011). Synergistic effects of *Cydia pomonella* granulovirus GP37 on the infectivity of nucleopolyhedrovirus and the lethality of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Virology*, 156(10), 1707–1715. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1039-3>
- López, M. G., Pallarés, H. M., Alfonso, V., Carmona, S. J., Farber, M., Taboga, O., & Wilkowsky, S. E. (2018). Novel biotechnological platform based on baculovirus occlusion bodies carrying *Babesia bovis* small antigenic peptides for the design of a diagnostic enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(2), 885–896. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8662-1>
- Nakasu, E Y, Williamson, S. M., Edwards, M. G., Fitches, E. C., Gatehouse, J. A., Wright, G. A., &

- Gatehouse, A. M. (2014). Novel biopesticide based on a spider venom peptide shows no adverse effects on honeybees. *Proc Biol Sci*, 281(1787).
<https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0619>
- Nakasu, Erich Yt, Karamaouna, F., Partsinevelos, G. K., Abd El Halim, H. M., Fitches, E. C., Pyati, P., Gatehouse, J. A., Gatehouse, A. M., & Edwards, M. G. (2015). Sublethal effects of the insecticidal fusion protein ω -ACTX-Hv1a/GNA on the parasitoid *Eulophus pennicornis* via its host *Lacanobia oleracea*. *Pest Management Science*, May. <https://doi.org/10.1002/ps.4030>
- Nishina, K., Piao, W., Yoshida-Tanaka, K., Sujino, Y., Nishina, T., Yamamoto, T., Nitta, K., Yoshioka, K., Kuwahara, H., Yasuhara, H., Baba, T., Ono, F., Miyata, K., Miyake, K., Seth, P. P., Low, A., Yoshida, M., Bennett, C. F., Kataoka, K., Yokota, T. (2015). DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide for highly efficient gene silencing. *Nature Communications*, 6(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8969>
- Oberemok, V. V., Laikova, K. V., Gal'chinsky, N. V., Useinov, R. Z., Novikov, I. A., Temirova, Z. Z., Shumskykh, M. N., Krasnodubets, A. M., Repetskaya, A. I., Dyadichev, V. V., Fomochkina, I. I., Bessalova, E. Y., Makalish, T. P., Gninenko, Y. I., & Kubyshkin, A. V. (2019). DNA insecticide developed from the *Lymantria dispar* 5.8S ribosomal RNA gene provides a novel biotechnology for plant protection. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-42688-8>
- Oberemok, V. V., Laikova, K. V., Zaitsev, A. S., Gushchin, V. A., & Skorokhod, O. A. (2016). The RING for gypsy moth control: Topical application of fragment of its nuclear polyhedrosis virus anti-apoptosis gene as insecticide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 131, 32–39.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.01.006>
- Oberemok, V. V., Laikova, K. V., Zaitsev, A. S., Shumskykh, M. N., Kasich, I. N., Gal'chinsky, N. V., Bekirova, V. V., Makarov, V. V., Agranovsky, A. A., Gushchin, V. A., Zubarev, I. V., Kubyshkin, A. V., Fomochkina, I. I., Gorlov, M. V., & Skorokhod, O. A. (2017). Molecular alliance of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus and a short unmodified antisense oligonucleotide of its anti-apoptotic IAP-3 gene: A novel approach for gypsy moth control. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112446>
- Oberemok, V. V., & Skorokhod, O. A. (2014). Single-stranded DNA fragments of insect-specific nuclear polyhedrosis virus act as selective DNA insecticides for gypsy moth control. *Pesticide*

- biochemistry and physiology*. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.05.005>
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K., & Luckow, V. A. (1994). *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. Oxford University Press. 347
- Ragnarsdottir, K. V. (2000). Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. *Journal of the Geological Society*, 157(4), 859–876. <https://doi.org/10.1144/jgs.157.4.859>
- Salvador, R., Ferrelli, M. L., Sciocco-Cap, A., & Romanowski, V. (2014). Analysis of a chitinase from EpapGV, a fast killing betabaculovirus. *Virus Genes*, 48(2), 406–409. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-1019-7>
- Zherebtsova, E.N. Replication of baculoviruses in established insect cell lines: Phenomenon of attenuation. *Archives of Virology* 57, 283–290 (1978). <https://doi.org/10.1007/BF01320067>
- Tomalski, M. D., & Miller, L. K. (1991). Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. *Nature*, 352, 82–85. <https://doi.org/10.1038/352082a0>
- Ui-Tei, K., Naito, Y., Nishi, K., Juni, A., & Saigo, K. (2008). Thermodynamic stability and Watson-Crick base pairing in the seed duplex are major determinants of the efficiency of the siRNA-based off-target effect. *Nucleic Acids Research*, 36(22), 7100–7109. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn902>
- Wang, Y., Zhang, H., Li, H., & Miao, X. (2011). Second-Generation sequencing supplies an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in Pest Insect Control. *PLOS ONE*, 6(4), e18644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018644>
- Yang, S., Zhao, L., Ma, R., Fang, W., Hu, J., Lei, C., & Sun, X. (2017). Improving baculovirus infectivity by efficiently embedding enhancing factors into occlusion bodies. *Applied and Environmental Microbiology*, May, AEM.00595-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00595-17>



Capítulo 5. Desarrollo de plataformas para la aplicación de los baculovirus en la salud

Introducción

Los vectores virales como vehículo para la incorporación de genes que regulen rutas metabólicas en las células blanco ha sido fundamental para el desarrollo de las terapias génicas. Entre los vectores más utilizados podemos mencionar a los: adenovirus, poxvirus, lentivirus y baculovirus. En la década de 1980, se demostró que el genoma baculoviral era capaz de transducir células de mamífero y expresar de forma transitoria genes heterólogos bajo un promotor activo en estas células y desde entonces, los viriones brotantes (BV), se convirtieron en una herramienta de ingeniería genética accesible en los laboratorios de biología molecular para el estudio y desarrollo de un sistema de expresión de proteínas recombinantes en células de insecto (del inglés, *baculovirus expression vector system* BEVS) (Goodwin *et al.*, 1970; Smith *et al.*, 1983). Actualmente este sistema es considerado una herramienta útil, eficiente y necesaria tanto para el desarrollo científico abarcando áreas como la biotecnología, la bioquímica clínica, la medicina molecular y la industria (López *et al.*, 2018). Entre las ventajas, cabe destacar que los baculovirus no presentan problemas como la inmunidad preexistente y tampoco patogenicidad en humanos y que, su ciclo infectivo está restringido únicamente a células de insecto. Otra ventaja distintiva, es la capacidad de transducir, tanto *in vivo* como *in vitro*, un amplio espectro de células de mamífero y que, en una etapa posterior, el genoma viral es degradado sin posibilidad de incorporarse al genoma celular en ausencia de una presión de selección (Airenne *et al.*, 2010; Boyce & Bucher, 1996; Carbonell *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2005; Kost *et al.*, 2005).

El mecanismo de transducción comienza con el ingreso de los viriones brotantes (BV) y, por consiguiente, su material genético en la célula. Este mecanismo es mediado por la interacción entre la glicoproteína viral GP64 y un receptor celular. Aunque el receptor celular de GP64 no ha sido claramente identificado se han sugerido diferentes hipótesis en lo relativo a la interacción entre la membrana plasmática celular y los viriones brotantes entre las que se destacan: la unión a fosfolípidos ácidos en la membrana plasmática, la unión a

un amplio número de proteínas celulares e incluso la ausencia de un receptor (Blissard & Theilmann, 2018). A continuación de la unión a la superficie celular, los BV ingresan a la célula por endocitosis mediada por clatrina tanto en células de insecto permisivas como de mamífero no permisivas. Poco se conoce del tráfico endosomal inmediatamente después del ingreso a la célula, pero varios estudios han identificado componentes esenciales para la formación y el tráfico de vesículas. Entre ellos, se encuentran proteínas del complejo ESCRT (del inglés, *endosomal sorting complex*) y el factor sensible a la N-etilmaleimida NSF (del inglés, *N-ethylmaleimide sensitive factor protein*) (Guo *et al.*, 2017; Yue *et al.*, 2017). Luego de la internalización, se produce la acidificación del interior del endosoma a pH 5,5 y la fusión de las membranas viral y endosómica mediada por GP64; de esta manera se liberan las nucleocápsides al citoplasma para su direccionamiento al núcleo celular mediante un proceso que involucra la reorganización del citoesqueleto de actina (Goley *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2015). Dentro del núcleo, el DNA del baculovirus es liberado y reconocido por la maquinaria de transcripción celular para finalmente expresar las proteínas recombinantes.

En terapia génica, el modelo de estudio es el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), con un genoma de 134 kpb, una nucleocápside de un tamaño de 15-40 x 200-300 nm y un amplio espectro de células de mamífero susceptibles (Airenne *et al.*, 2010; Hüser & Hofmann, 2003; Makkonen *et al.*, 2013). Sin embargo, para ciertos tipos celulares la eficiencia de transducción es baja comparada con otros vectores virales. En particular, el virus de la estomatitis vesicular (VSV) es un rhabdovirus cuya glicoproteína G ha sido ampliamente utilizada para generar virus terapéuticos pseudotipados (Kolangath *et al.*, 2014; Mangor *et al.*, 2001; Tani, 2014). La unión de VSV en la superficie celular está mediada por la glicoproteína G (VSV G) y un receptor ubicuo que se une a lipoproteínas de baja densidad (del inglés, *low-density lipoprotein receptor* LDLR) (Finkelshtein *et al.*, 2013; Nikolic *et al.*, 2018). Finalmente, el complejo VSV G-LDLR es internalizado en las células por endocitosis mediada por clatrina (Sun *et al.*, 2005). Se sugiere que la mejor eficiencia de transducción se debe al uso de un receptor ubicuo,

ampliamente distribuido en diferentes tipos celulares y a que VSV G se distribuye en forma homogénea en la superficie de los viriones brotantes, mientras que la glicoproteína GP64 se localiza sólo en los extremos apicales de los BV (Mangor *et al.*, 2001).

El sistema de expresión BEVS ha sido ampliamente utilizado para la terapia génica, la expresión de antígenos y el desarrollo de vacunas virales tanto para el uso veterinario como humano (Cox, 2012; Yamaji, 2014; Fabre *et al.*, 2019). En los últimos años, se han concentrado esfuerzos para mejorar este sistema en el ámbito de la salud mediante modificaciones del genoma baculoviral y, en menor medida, modificando el genoma de las células de insectos hospedadoras. En este trabajo, se propone investigar y desarrollar este último aspecto tan esencial del sistema: las células de insecto.

Por un lado, se plantea generar una línea celular que permita decorar, con la glicoproteína G de VSV, la superficie de los viriones brotantes recombinantes desarrollados en nuestro laboratorio para mejorar su eficiencia de transducción y, por otro lado, líneas celulares que faciliten el proceso de purificación para favorecer el estudio y producción de proteínas recombinantes, más específicamente para el desarrollo de vacunas del tipo VLP (del inglés, Virus Like Particles). Para esto último, nos propusimos regular la expresión de la proteína GP64 y el evento de brotación de los baculovirus recombinantes. De acuerdo a los resultados de estudios anteriores, se observó que la delección del gen *gp64* resultó en una disminución de la brotación de BV de 95% aproximadamente (Oomens y Blissard, 1999). De manera similar, la disminución de la expresión de esta glicoproteína mediada por dsRNA contra al gen *gp64* inhibió el ensamblaje viral y su brotación (Jiang *et al.*, 2013). Por lo tanto, nos propusimos regular la expresión de la proteína GP64 para mejorar el estudio y la producción de VLP en el sistema de células de insecto (BEVS), ya que la mayor desventaja del sistema es la presencia concomitante de los BV en el medio de cultivo celular, que hace necesario sumar etapas de pre-purificación para la formulación del producto farmacéutico.

En este trabajo, se explora la herramienta de silenciamiento mediado por RNA de interferencia (RNAi) que permite regular negativa y selectivamente la expresión de proteínas y péptidos (Aagaard & Rossi, 2007; Fowler *et al.*, 2015; Gottardo *et al.*, 2018; Makkonen *et*

al., 2015; Saleh *et al.*, 2006). El mecanismo de acción de los RNAi consiste en el silenciamiento post-transcripcional mediado por moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA). El silenciamiento del gen blanco estará mediado por moléculas de DNA que se expresan directamente en el interior de la célula y que codifican para una pequeña molécula de RNA no codificante que se ensambla en una estructura secundaria de horquilla para formar el shRNA (del inglés, *short hairpin* RNA). Para la construcción del vector de expresión que contenga al shRNA es necesario elegir e incorporar un promotor adecuado que controle su transcripción. El promotor utilizado en este trabajo es el del gen del RNA U6 derivado de humano que es reconocido por la RNA polimerasa III en células de insecto (Kim *et al.*, 2012; Snyder *et al.*, 2009), encargada de sintetizar moléculas de RNA pequeños en la célula. En diferentes trabajos se demostró que es muy eficiente en la transcripción de shRNA (Kim *et al.*, 2012; Nandety *et al.*, 2014; Weng *et al.*, 2017). Finalmente, la construcción del vector debe incorporar una señal de terminación de la transcripción que sea reconocida por la RNA polimerasa III. Una vez expresado el shRNA en el interior de la célula, la molécula de dsRNA resultante continúa por el camino de maduración característico de los miRNA y a continuación, lleva adelante su función regulatoria. El shRNA es una molécula de RNA bicatenario de aproximadamente 20 pb, cuya secuencia es complementaria al gen blanco. Los shRNA al transcribirse se pliegan en forma de horquilla con un loop simple cadena de entre 5 y 10 pb (Liao *et al.*, 2015). En este trabajo, se plantea el diseño y la generación de una línea celular monoclonal de insecto que exprese constitutivamente dos shRNA diferentes y en tándem con el fin de silenciar el gen de la glicoproteína *gp64* de AcMNPV para minimizar la concentración de BV en el sobrenadante celular (Lee *et al.*, 2015) y facilitar el proceso de purificación de las VLP (Figura 5.1).

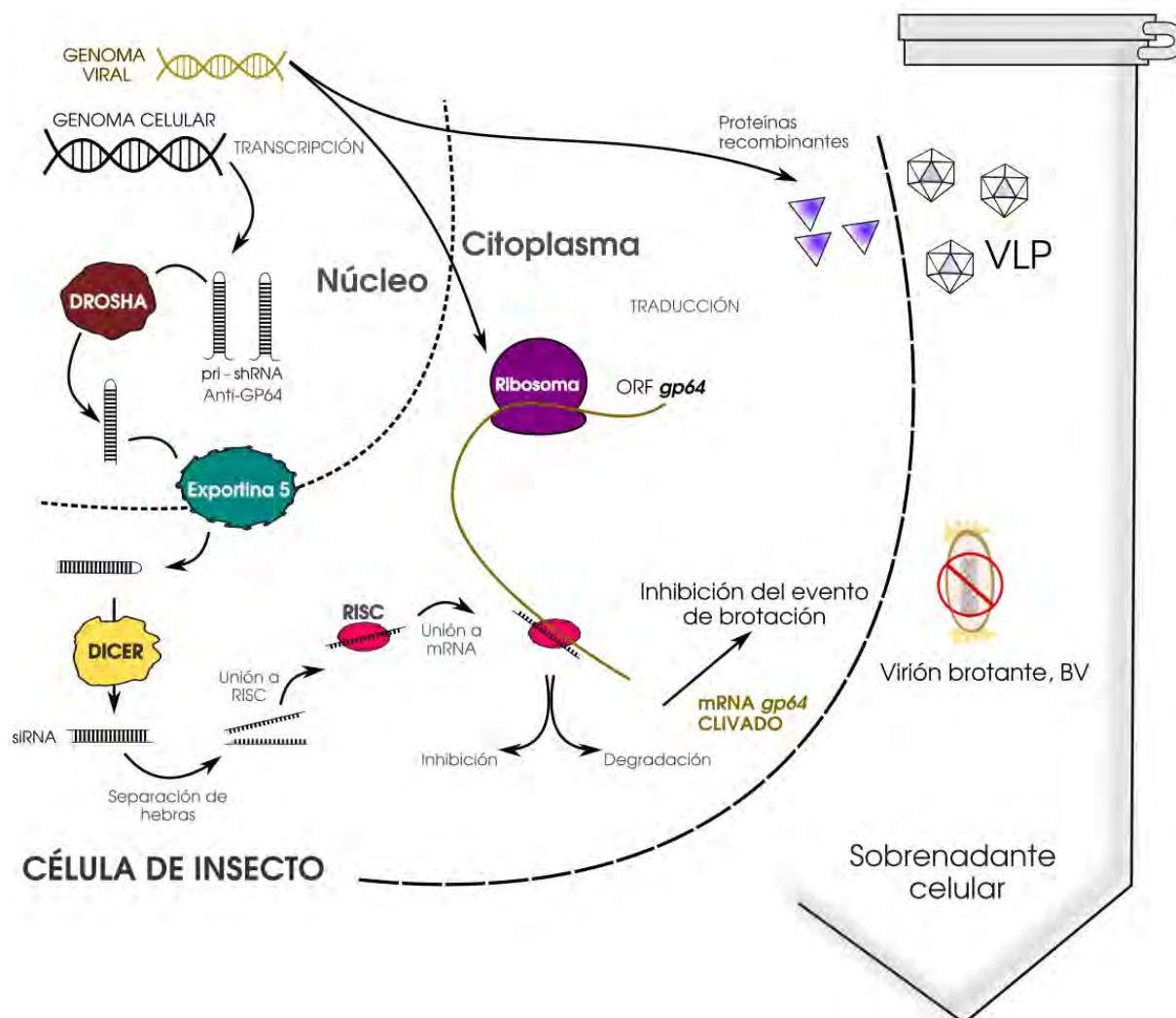


Figura 5.1. Esquema explicativo de la maduración y función de un shRNA en una línea celular de insecto transgénica como plataforma biotecnológica para mejorar el paso de pre-purificación en el desarrollo de vacunas VLP. Brevemente, el virión brotante (BV) ingresa a la célula por endocitosis, la nucleocápside en el citoplasma es direccionada al núcleo, donde el DNA es liberado. Esta célula con el genoma modificado expresa el shRNA, que es procesado secuencialmente por las proteínas Drosha (en el núcleo) y DICER (en el citoplasma). Finalmente, una de las hebras del RNA doble cadena resultante es cargada por el complejo formado por RISC y AGO2 para ejercer su función regulatoria sobre el mRNA del gen *gp64* del baculovirus que se está replicando. Al bloquear la expresión de la proteína GP64 se inhibe la brotación del baculovirus por la membrana citoplasmática sin interferir con la brotación de las VLP.

Objetivos específicos

- Desarrollo de los vectores de expresión para la modificación génica de las líneas celulares de insecto
- Generación de la línea celular monoclonal de insecto que expresa constitutivamente la glicoproteína G del virus VSV para ampliar la eficiencia de transducción de los viriones brotantes
- Evaluar el tropismo de los viriones brotantes de AcMNPV decorados con la glicoproteína VSV G en diferentes líneas celulares de mamífero.
- Generación de la línea celular monoclonal de insecto que expresa constitutivamente shRNA con el fin de silenciar la glicoproteína GP64 de AcMNPV, disminuir la producción de BV y facilitar la purificación de VLP.

Materiales y métodos

Clonado del gen G del virus de la estomatitis vesicular

El plásmido pHDM-G se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* para liberar el ORF del gen G. El producto de digestión se purificó y clonó en el vector de expresión pIP-V5/His para la selección de cultivos celulares de insecto transgénicos. Este vector permite la expresión del gen heterólogo bajo el control del promotor viral temprano constitutivo del gen *ie-1* de *Orgyia pseudotsugata* MNPV y posee un gen que le confiere resistencia a la puromicina para la selección de las células transgénicas. El clonado se corroboró por *colony PCR* utilizando los *primers* Fw pIB-check y Rv pIB-check los cuales flanquean al sitio de clonado múltiple en el pIP-V5/His (ver Anexo).

Clonado de la construcción sintética de los shRNA

Se diseñó una construcción génica *in silico* que consiste en dos shRNA bajo el promotor del gen U6 humano para la RNA la polimerasa III (hU6) y seguidos por sendos terminadores. Este DNA sintetizado por la empresa Genscript® se clonó en el vector pUC57-Kan. Se seleccionaron dos shRNA contra el gen de la glicoproteína *gp64* de AcMNPV, que habían sido previamente caracterizados por Lee y col. (2015) en el contexto de un baculovirus recombinante. Adicionalmente, se realizó una búsqueda de posibles genes blanco contra toda la base de datos no redundante de BLAST, no encontrándose resultados positivos excepto por el gen *gp64* de AcMNPV. La secuencia de los shRNA diseñada *in silico* se muestran en el Figura 5.2 (resaltado violeta o rosa), donde la secuencia resaltada en verde corresponde al *loop* que conecta ambas hebras de la horquilla y en negro el terminador. Se adicionaron dos sitios para enzimas de restricción *HindIII/BamHI* ubicados en los costados de la construcción génica para permitir su clonado en el vector de expresión pIP-V5His como se muestra en la Figura 5.2. El vector de expresión resultante pIP-shGP64 se corroboró por *colony PCR* usando los *primers* pIB-check (ver Anexo).

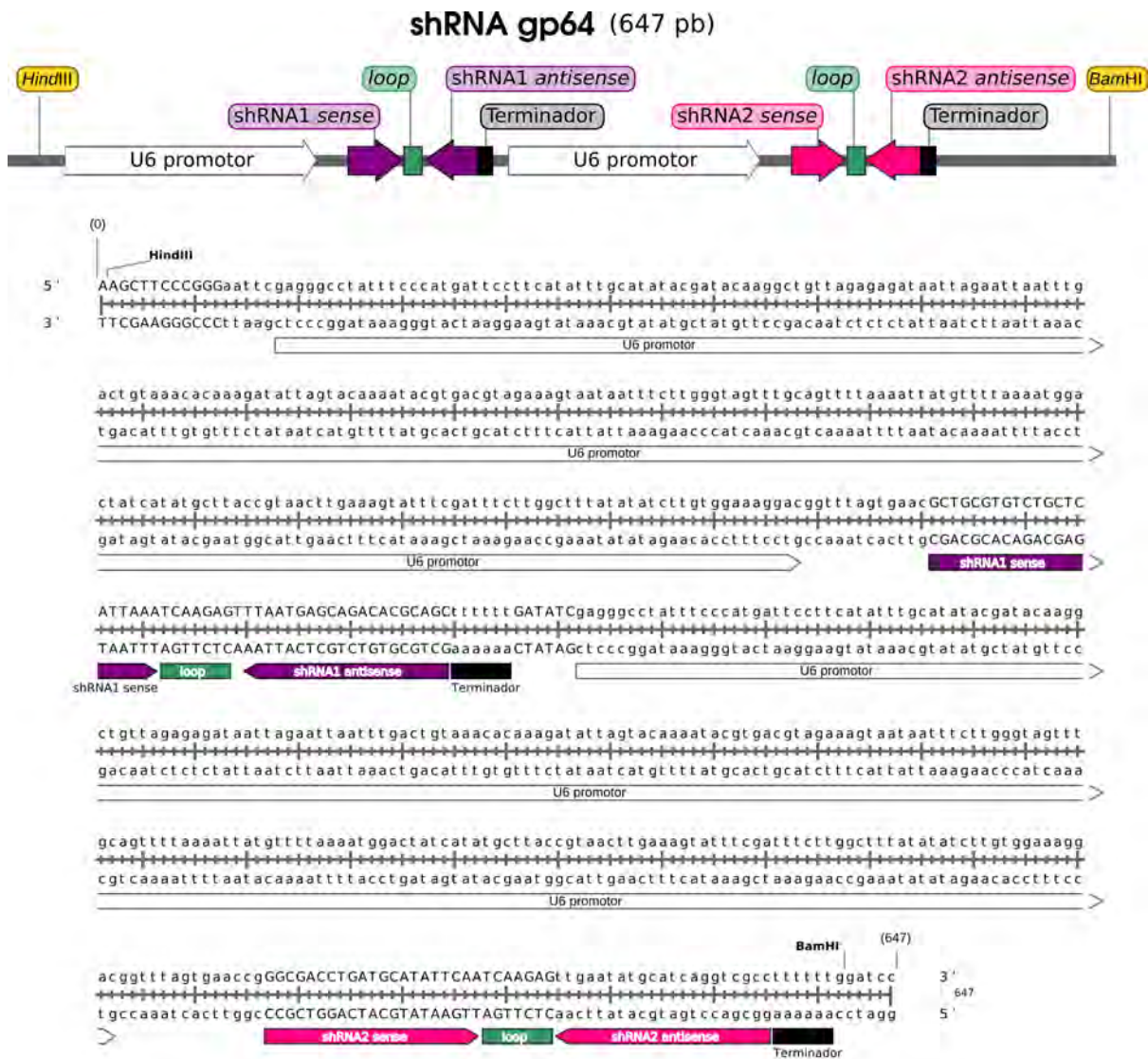


Figura 5.2. Esquema del cassette de silenciamiento sintetizado por Genscript® que incorpora las secuencias que codifican para dos shRNA específicos contra el gen *gp64* bajo el control del promotor del gen RNA U6 (humano) reconocido por la RNA pol III (U6-P), en los extremos se ubican las enzimas de restricción para el clonado en el vector de expresión (*HindIII/BamHI*). Panel inferior: Secuencia nucleotídica de la construcción génica.

Generación de las líneas celulares transgénicas

Las células High Five™ se transfectaron utilizando una solución de polietilenimina (*Polyethylenimine 'Max'*, PEI, linear, MW 25000, Polysciences, Inc.). Se incubaron 1 µg de DNA del plásmido pIP-VSVG y 3 µl de polietilenimina (PEI, 1 mg/ml) para formar el complejo DNA:PEI en 100 µl de una solución de NaCl 150 µM. A continuación, para favorecer la formación del complejo DNA:PEI la solución se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente (Ogay *et al.*, 2006). La línea celular transgénica resultante se

denominó: Hi5-vsvG. Paralelamente, para la generación de la línea celular Hi5-shGP64 que expresa los shRNA contra la glicoproteína GP64 de AcMNPV se transfectó el plásmido pIP-shGP64 en las mismas proporciones mencionadas de DNA:PEI. Luego, la solución DNA:PEI se agrega a las células con una confluencia del 70% en placa de poliestireno de 6 pocillos. A las 48 h p.t., se procedió al agregado de puromicina 10 µg/µl sostenido en el tiempo hasta que no se observa supervivencia en las células control sin transfectar por microscopía de campo claro. Posteriormente, se procedió al aislamiento de una línea celular monoclonal que expresa de manera estable la proteína VSV G o shRNA mediante un protocolo de aislamiento clonal por dilución terminal (ver Anexo) (InsectSelect™ BSD System, 2008). Los diferentes clones se conservan en crioviales en nitrógeno líquido N₂(L) y para los experimentos que se presentan a continuación se utilizó un único clon.

Evaluación de la expresión e incorporación de la proteína VSV G

La línea celular de insecto transgénica Hi5-vsvG fue analizada por inmunofluorescencia. Las células Hi5-*wt* y Hi5-vsvG fueron incubadas con el anticuerpo primario de conejo anti-VSVG (Genscript®) por 1 h a temperatura ambiente y lavadas 3 veces con PBS con 0,01% Tween 20. A continuación, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo-Cy3 por 1 h en completa oscuridad. Finalmente, los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. A continuación, los preparados fueron montados con Polymount y cubreobjetos para ser observados con posterioridad por microscopía confocal. Para la electroforesis en gel de poliacrilamida se cuantificaron las muestras por la técnica de Bradford, como indica el fabricante (Bradford, 1976). A continuación, en cada calle se siembran 30 µg de proteínas totales de las muestras: células Hi5-*wt*, y células Hi5-vsvG resuspendidas en buffer RIPA con una dilución 1:100 del inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE (10% acrilamida) y visualizadas luego de la tinción de los geles con Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% p/v (Sambrook *et al.*, 1989).

Ensayos de transducción en células de mamífero

Para los ensayos de transducción se utilizaron las células de mamífero: Vero, A549 y HepG2. A los baculovirus control Ac-dT^{wt} o el virus pseudotipado Ac-dT^{VSVG}, según corresponda. Previamente a la transfección, se centrifugan 2 ml de los virus (10^7 UFP/ml) a 14000 rpm por 60 min y se resuspenden en 200 μ l de PBS 1X. Las células de mamífero se siembran en una placa de 12 pocillos con un 60 % de confluencia, se quita el medio de cultivo y se hacen 2 lavados con PBS. A continuación, las células se incuban con el baculovirus control o con el baculovirus pseudotipado por 2 h a temperatura ambiente con agitación orbital. Finalmente, se les agrega 1 ml de medio de cultivo MEM con 10 % SFB y se incuban a 37 °C por 48 h. Para el cálculo de la eficiencia de transducción, se procedió a la fijación, permeabilización y tinción de las células con DAPI (1/5000, 10 min). Las células se analizaron por microscopía de fluorescencia, por triplicado y tomando 3 campos distintos de cada pocillo. Los gráficos y la estadística se realizaron con el Graphpad Prism y calculando el Student's *t*-test.

$$\% \text{ de transducción} = \frac{n^{\circ} \text{ de cél. transducidas (rojas)}}{n^{\circ} \text{ de cél totales (núcleos azules)}} \times 100$$

Evaluación de la expresión de los shRNA en ensayos de expresión transitoria

Para los ensayos de expresión transitoria, se transfectaron células High Five™ con el plásmido pIP-shGP64 y el plásmido control pIP-V5/His utilizando el reactivo de transfección PEI (ver Anexo). Para ello, se sembraron 10^6 células High Five en placas de 6 pocillos y una vez adheridas se incubaron las mismas con 1 μ g del plásmido correspondiente y el reactivo de transfección. A las 48 h p.t., se retiró el medio de transfección, se lavaron las células dos veces con PBS y se procedió a la infección con el virus Ac-dsRed (10^8 UFP/ml) previamente desarrollado en nuestro laboratorio. Luego de 1 hora de adsorción, se retiró el sobrenadante (SN) de infección y se lavó con PBS. Finalmente, se calculó el número de placas de células

infectadas a las 48 h post infección (h p.i.) analizando la dispersión distal de la expresión de dsRed en las células vecinas. Se contó como placa de infección aquellos cúmulos con más de una célula dsRed positiva (dsRed⁺).

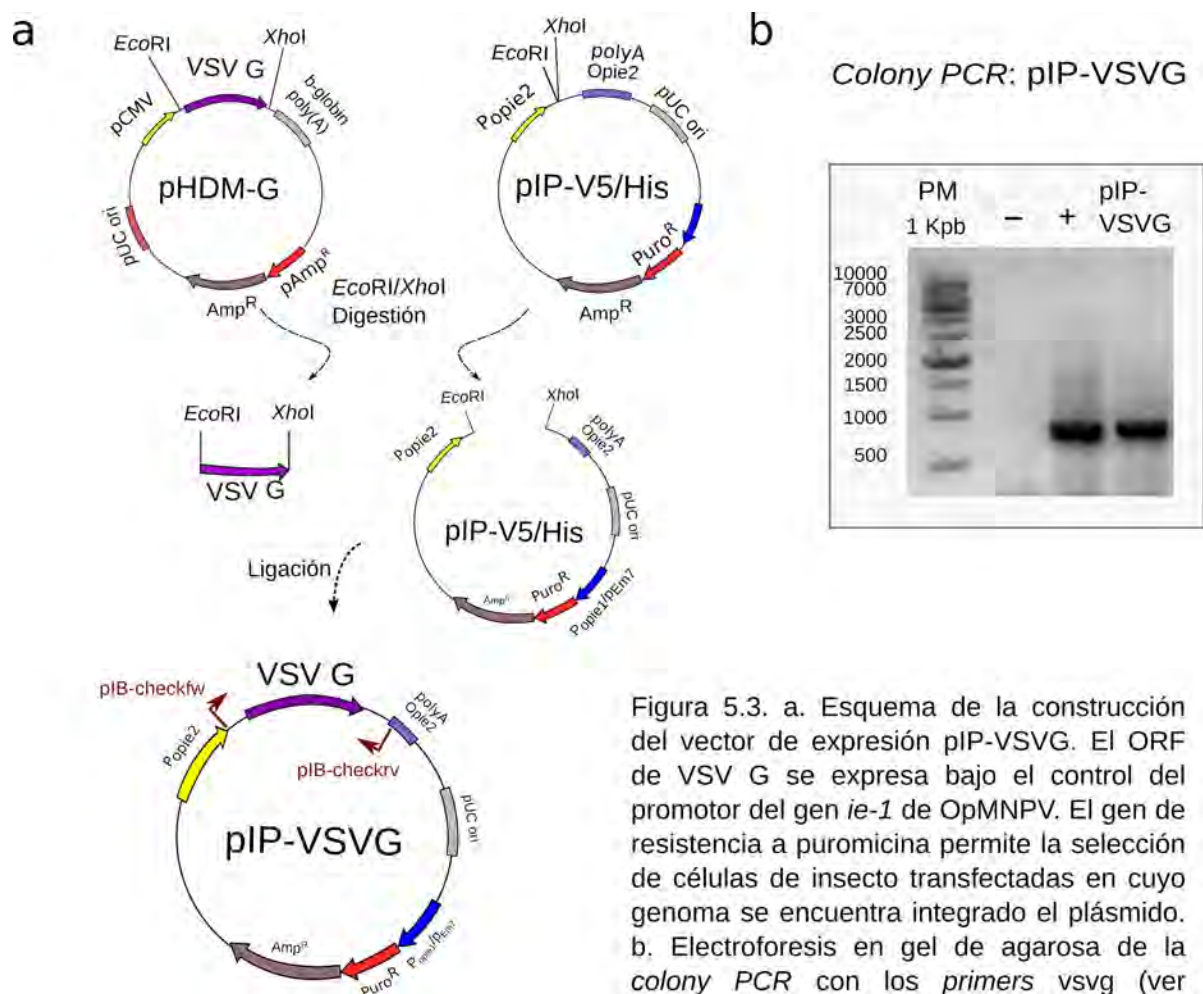
Evaluación de la expresión de los shRNA en ensayos de expresión constitutiva

Se procedió de manera similar al ensayo de expresión transitoria. Brevemente, se infecta con el baculovirus recombinante Ac-dsRed (10^8 UFP/ml), las células Hi5-*wt* y Hi5-shGP64 en placas de 12 pocillos. Las células Hi5-*wt* y Hi5-shGP64 cultivadas en placas de 12 pocillos se infectaron con el baculovirus recombinante Ac-dsRed (10^8 UFP/ml). Pasadas las 48 h p.i., se tomaron los medios de cultivo sobrenadantes y se clarificaron por centrifugación a 500 rpm por 5 min para eliminar restos celulares. Esta prueba se realizó por duplicado. A continuación, se calcula el título viral de ambos sobrenadantes analizando la expresión de dsRed por el método de dilución final en células Hi5-*wt* (ver Anexo). Los gráficos y la estadística se realizaron con el Graphpad Prism y calculando el test *t* de Student. Para la electroforesis en gel de poliacrilamida se cuantificaron las muestras por la técnica de Bradford, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. A continuación, se sembraron 30 µg de las muestras: SN de las células Hi5-*wt*, y SN de las células Hi5-shGP64 resuspendidas en buffer RIPA con una dilución 1:100 del inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). Los perfiles de proteínas fueron analizados mediante SDS-PAGE (10% acrilamida) y tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% p/v (Sambrook *et al.*, 1989).

Resultados

Generación de la línea celular monoclonal de insecto Hi5-vsvG

Se generó el vector de expresión pIP-VSVG para la expresión constitutiva del gen G de VSV (VSV G) en células de insecto High Five™ (Figura 5.3a). Para ello, se digirió el plásmido pHDM-G y, luego de la purificación del gen G, se incorporó en el vector de expresión pIP-V5/His como se muestra en la Figura 5.3a. Los clones positivos fueron seleccionados por *colony PCR* utilizando los *primers* Fw vsvG y Rv vsvG (ver Anexo) que amplifican un segmento interno de VSV G de 700 pb como se muestra en la Figura 5.3b. La secuencia del gen G en el plásmido pIP-VSVG fue confirmada por secuenciamiento de Sanger (Macrogen Corporation, Corea del Sur).



Caracterización de la línea monoclonal Hi5-vsvG

La expresión de la proteína recombinante VSV G en células Hi5-vsvG se evaluó por SDS-PAGE y por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales anti-vsvG. Como control negativo y positivo, se utilizaron las células Hi5-wt y células A549 infectadas con VSV, respectivamente. En el gel de proteínas se advierte un aumento de la banda de 65 kDa en las células Hi5-vsvG correspondiente a la sobreexpresión de VSV G y no así en el control negativo (Figura 5.5a). En la inmunofluorescencia se observó la presencia de la glicoproteína G en la membrana plasmática de la célula Hi5-vsvG y en el control positivo, confirmando la expresión, un correcto procesamiento y el direccionamiento de la proteína recombinante VSV G en la célula monoclonal de insecto Hi5-vsvG (Figura 5.5b). Finalmente, se infectaron las células Hi5-wt y Hi5-vsvG con el virus Ac-dT para obtener los stock virales Ac-dT^{wt} y Ac-dT^{VSVG}.

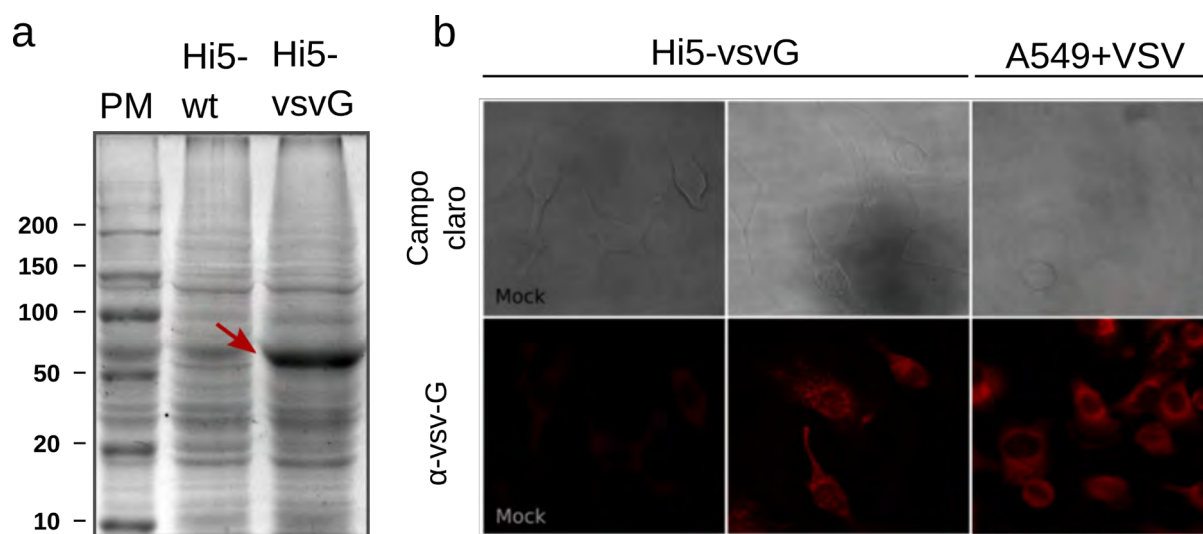


Figura 5.5. a. SDS-PAGE (10%) de la línea celular Hi5-vsvG resuspendidas en buffer RIPA en presencia de inhibidores de proteasas y, Hi5-wt, como control. Se observa una banda de ~60 kDa de tamaño esperado para VSV G en las células Hi5-vsvG. b. Inmunofluorescencia de las células Hi5-vsvG y como control positivo células A549 infectadas con el virus VSV. Ambas incubadas con el anticuerpo primario (anti-VSV G) y el secundario (anti-conejo-Cy3). Mock: células Hi5-vsvG incubadas únicamente con el anticuerpo secundario.

Eficiencia de transducción en células de mamífero

Para los ensayos de transducción se utilizó el baculovirus AcMNPV-dTomato (Ac-dT) el cual expresa en células de mamífero el gen indicador *dTomato* bajo el control del promotor del gen temprano *ie1* del citomegalovirus humano (CMV-IE). La eficiencia de transducción en distintos tipos celulares se realizó comparando los BV en la versión pseudotipada con la glicoproteína VSV G (AcMNPV-dT^{VSVG}) y otra, sin pseudotipar (AcMNPV-dT^{wt}) (Figura 5.6, panel izquierdo). La eficiencia de transducción de los baculovirus pseudotipados y no pseudotipados fueron comparadas incubando Ac-dT en células de mamífero: Vero, A549, HepG2 a diferentes MOT: 0,01 y/o 0,1. En la Figura 5.6 se muestra la microscopía de fluorescencia de células Vero transfectadas con los virus Ac-dT^{wt} y Ac-dT^{VSVG} a las 48 h post transfección (h p.t.). Se observó la fluorescencia roja correspondiente a la expresión del gen reportero *dTomato* y, en azul, a los núcleos celulares teñidos con DAPI. El mismo patrón se vio en los experimentos de transducción de las células A549 y HepG2.

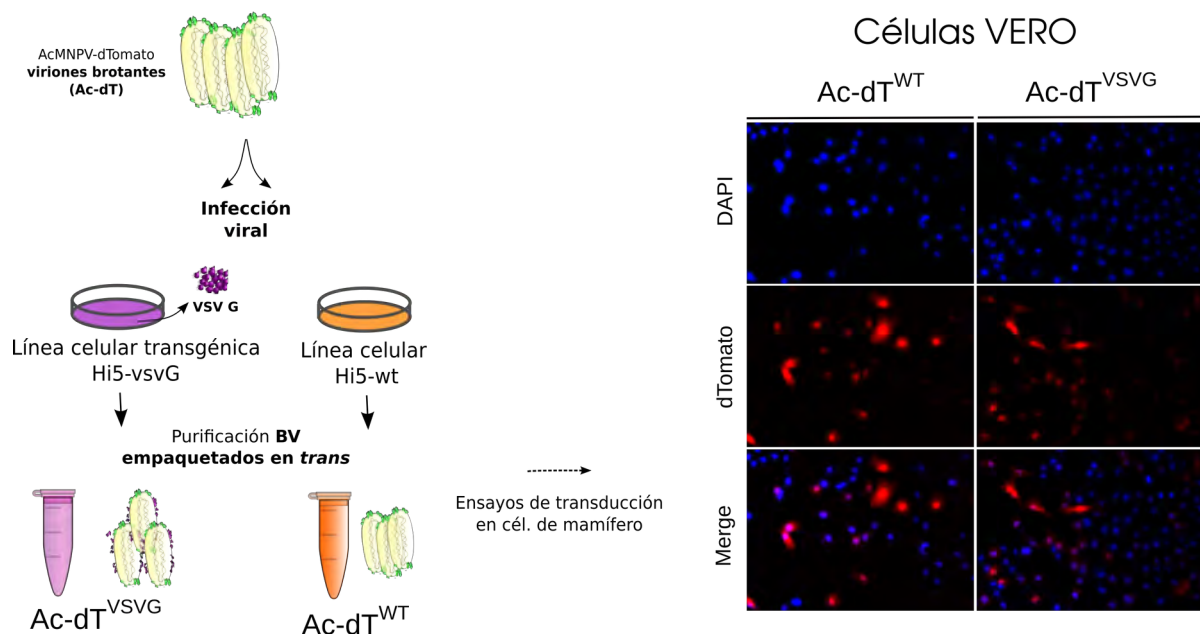


Figura 5.6. Esquema del ensayo de transducción de células Vero con el baculovirus pseudotipado: Ac-dT^{VSVG} y el baculovirus no pseudotipado: Ac-dT^{wt} (panel izquierdo). Microscopía de fluorescencia evidenciando la expresión de *dTomato* (panel derecho).

El estudio de las imágenes se realizó por triplicado con el software ImageJ para el cálculo de número de células fluorescentes en el total de células. Para MOT entre 0,01 y 0,1, el análisis estadístico determinó que los baculovirus pseudotipados con VSV G poseen una capacidad de transducción entre 4-12% y 12% en A549 y HepG2, respectivamente (Figura 5.7). En cambio, para el caso de las células VERO no se observaron diferencias entre ambos virus, con una capacidad de transducción del 60% (Figura 5.7).

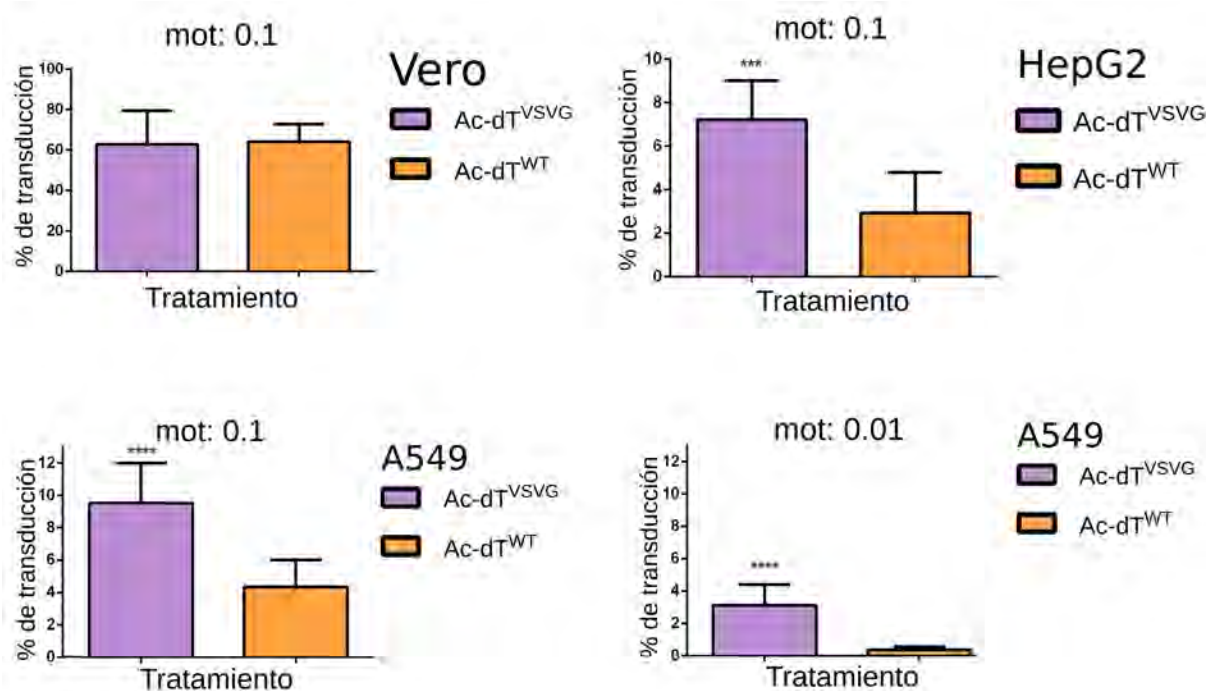


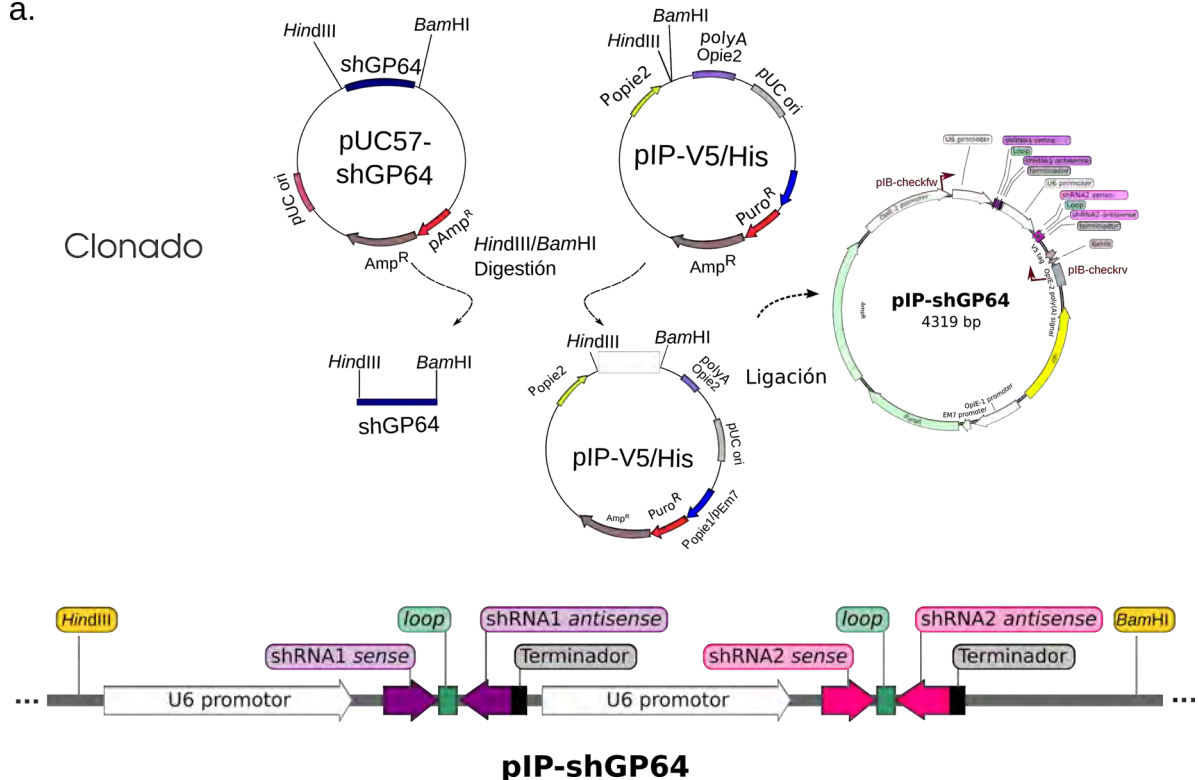
Figura 5.7 . Cuantificación del número de células dTomato positivas para estimar la eficiencia (%) de la transducción en células Vero, HepG2 y A549. Diferencias significativas relativas a Ac-dT^{wt} se realizaron con el test *t* de Student: *****P* < 0,001.

Generación de la línea celular monoclonal de insecto Hi5-shGP64

Se generó el vector de expresión pIP-shGP64 para la expresión constitutiva de dos shRNA bajo el promotor del gen del RNA U6 derivado de humano que es reconocido por la RNA polimerasa III en células de insecto High Five™ (Figura 5.8a). El vector pUC57-shGP64 obtenido en Genscript® (ver "Materiales y Métodos") se digirió con las enzimas de restricción *Hind*III y *Bam*HI y se subclonó en el vector de expresión pIP-V5His previamente digerido

con las mismas enzimas (Figura 5.8b. Panel izquierdo). Por la técnica de *colony PCR* se corroboró la incorporación de la construcción génica en el sitio de clonado múltiple del vector pIP-shGP64 utilizando un par de *primers* que flanquean el sitio de clonado múltiple (pIB-check, ver Anexo) (Figura 5.8b.). En la Figura 5.8b., panel derecho, se observa la banda de 900 pb correspondiente a la construcción sintética de shGP64, como control positivo se utilizó un vector pIP desarrollado en el laboratorio. A continuación, las células High Five™ se transfectaron con el plásmido obtenido y se generó la línea celular que expresa constitutivamente múltiples shRNA para el silenciamiento de la glicoproteína GP64 de AcMNPV (ver "Materiales y Métodos"). La línea celular monoclonal se denominó Hi5-shGP64.

a.



b.

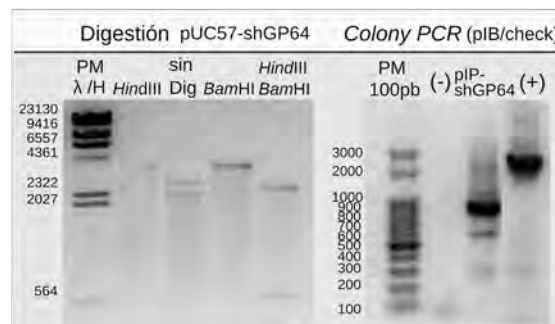


Figura 5.8. a. Esquema de clonado del vector de expresión pIP-shGP64. El gen de resistencia a la puromicina permite la selección de células de insecto transfectadas en cuyo genoma se encuentra integrado el plásmido. Esquema del *cassette* de silenciamiento sintetizado por Genscript® que incorpora las secuencias que codifican para dos shRNA específicos contra el gen *gp64* bajo el control del promotor U6 de la RNA pol III (U6-P), en los extremos se ubican las enzimas de restricción para el clonado en el vector de expresión (*HindIII/BamHI*). b. Digestión del vector pUC57-shGP64 (construcción sintética) con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI* y sus respectivos controles con una única enzima (panel izquierdo). *Colony PCR* del vector pIP-shGP64 con los *primers* pIB-check (ver Anexo), observándose la banda esperada de ~900 pb (panel derecho).

Ensayos de funcionalidad de la construcción silenciadora shGP64

Para determinar el efecto del silenciamiento de los shRNA se decidió evaluar en células infectadas la capacidad de generar viriones brotantes midiendo el título viral. Para evaluar si la inhibición de GP64 afecta la brotación de los viriones del baculovirus Ac-dsRed (previamente desarrollado en nuestro laboratorio) en las células de insecto High Five™ se realizaron, en primera medida, ensayos de expresión transitoria mediante la transfección *in vitro* con el plásmido pIP-shGP64. En la Figura 5.9a. se muestra una imagen representativa del esquema de trabajo, las células Hi5-*wt* se transfectaron, en experimentos paralelos, con el plásmido control pIP-V5/His (Mock) y el plásmido pIP-shGP64 (shGP64). Luego, a las 48 h p.t. se infectaron con el virus Ac-dsRed midiendo el número de placas dsRed-positivas (dsRed⁺) a las 48 h p.i. En la Figura 5.9b, se puede observar la disminución de la fluorescencia roja correspondiente a la expresión del gen *dsRed* en las células que expresan los shRNA comparada con la *wild type*. Mediante la cuantificación de las placas de infección en células Hi5 dsRed⁺ pudo observarse una disminución de la dispersión distal de los BV (50 %) utilizando 1 µg de DNA (Figura 5.9c).

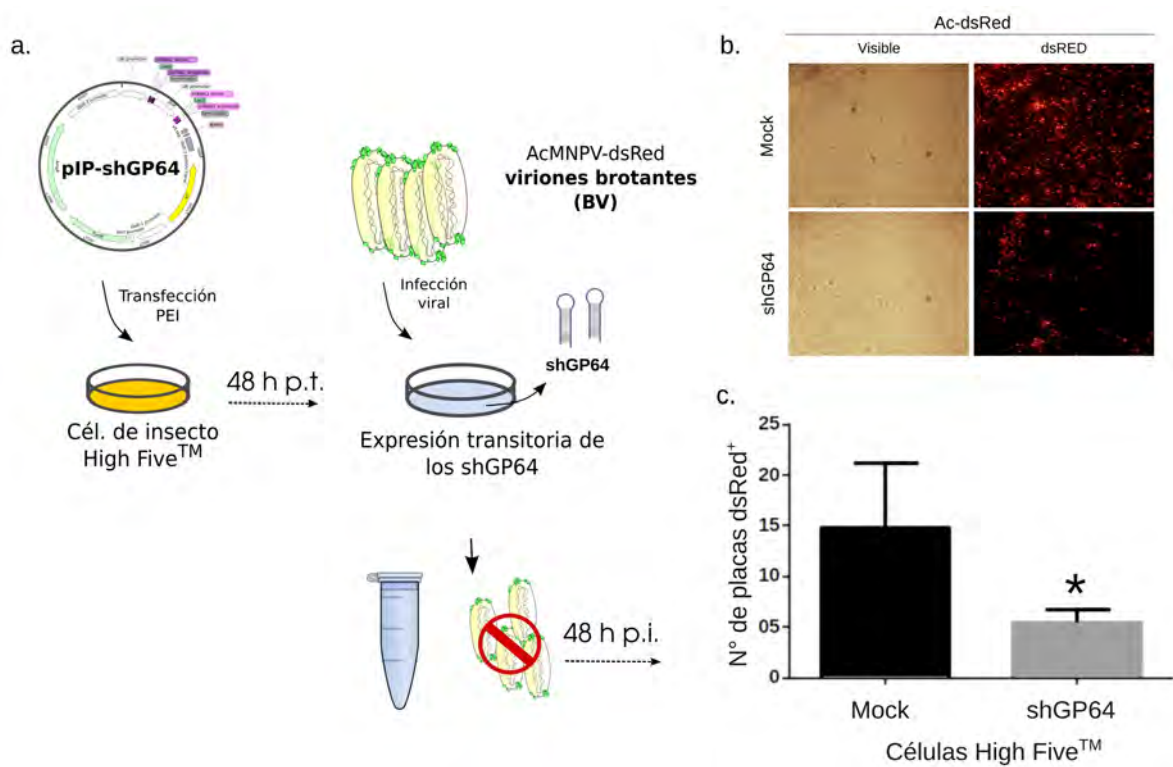


Figura 5.9. a. Esquema de los ensayos para evaluar los efectos de la expresión transitoria de los shRNA contra el gen *gp64*. b. Imágenes representativas de la microscopía de fluorescencia de células Hi5-*wt* y Hi5-shGP64 infectadas con Ac-dsRed. c. Medición del número de placas de infección en células High Five transfectadas con el plásmido control pIP-V5/His o el plásmido pIP-shGP64 y luego, infectadas con Ac-dsRed. Diferencias significativas del número de células con dispersión distal relativas a las células Hi-5 transfectadas con el plásmido control se realizaron con el test *t* de Student: * $P < 0,001$.

A continuación, se utilizó la línea celular de insecto transgénica que expresa múltiples shRNA contra la glicoproteína GP64 del virus de AcMNPV (Hi5-shGP64) para medir el efecto de silenciamiento en un contexto de expresión constitutiva de los mismos. Se infectaron con el baculovirus recombinante Ac-dsRed las células Hi5-*wt* que reflejan los niveles de expresión normales para el baculovirus, y las células Hi5-shGP64 que expresa de manera constitutiva los shRNA (silenciadoras). Pasadas las 48 h p.i. se tomaron los sobrenadantes (SN), se clarificaron para eliminar restos celulares y se calculó el título viral por el método de dilución final en células Hi5-*wt* (ver Anexo). En la figura 5.10a., se muestran dos réplicas del experimento en un gel de proteínas con los sobrenadante de los cultivos celulares clarificados. En todos los sobrenadantes se observa el patrón característico de los viriones brotantes de AcMNPV, en la calle *wt* y su duplicado *wt*_(d) se

observa un mayor contenido proteico, y en las calles de sh_{GP64} y $sh_{GP64(d)}$ una disminución del mismo indicando que en el sobrenadante de la infección en las células Hi5- sh_{GP64} hay una menor proporción de BV. Este resultado se corresponde con el valor del título final obtenido $\sim 10^8$ /mL y $\sim 10^7$ /mL luego del primer pasaje en células Hi5-*wt* o Hi5- sh_{GP64} , respectivamente (Figura 5.10b.). Se realizaron ensayos de western blot, pero el control positivo de los mismos no fueron reactivos contra GP64 debido a la calidad del anticuerpo, imposibilitando realizar estudios cuantitativos para determinar la capacidad del silenciamiento. Finalmente, este primer avance sobre el estudio del silenciamiento, mostró que la expresión de los shRNA de interferencia generan una disminución en un orden de magnitud en la producción de BV en las células Hi5- sh_{GP64} para una MOI 10, cuando se compara el título viral producido por la línea celular silenciadora con las células wild type.

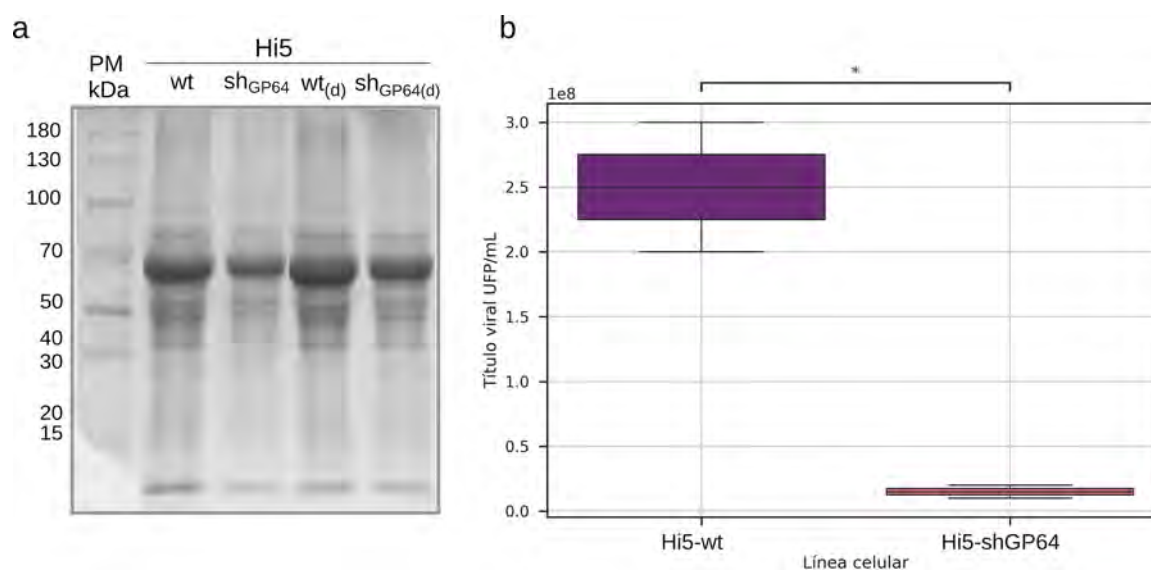


Figura 5.10. Efectos del silenciamiento en la replicación viral de Ac-dsRed en la línea celular transgénica células Hi5- sh_{GP64} . a. SDS-PAGE (10%) de los sobrenadantes de infección de células Hi5-*wt* o Hi5- sh_{GP64} con el virus Ac-dsRed (48 h p.i.). Se observa una disminución de la cantidad de proteína total en los sobrenadantes de células Hi5- sh_{GP64} (silenciadora) comparada con los del *wild type*. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. b. Titulación de los sobrenadantes de infección de células Hi5-*wt* o Hi5- sh_{GP64} con el virus Ac-dsRed (48 h p.i.) por el método de dilución terminal en células Hi5-*wt*. Diferencias significativas del título viral de Ac-dsRed replicado en las células Hi5-*wt* o células Hi5- sh_{GP64} se realizaron con el test *t* de Student: * :1,0e-02 < p <= 5,00e-02.

Discusión

En las últimas décadas, los baculovirus han sido investigados como un eficiente sistema para la expresión de genes heterólogos en terapia génica, debido a su alto tropismo y a su incapacidad de replicar en células de mamíferos (van Loo *et al.*, 2001). Aunque no se ha esclarecido la presencia o no de un receptor celular para el ingreso de estos virus, varios grupos de investigación han hecho avances identificando diversos factores del hospedador que interaccionan con la glicoproteína baculoviral GP64. Colectivamente, se ha establecido que el colesterol en la membrana plasmática, la endocitosis dependiente de clatrina y la macropinocitosis tienen un rol preponderante en la entrada de los baculovirus en las células de mamífero, aunque la ruta de internalización podría ser dependiente del tipo celular (van Loo *et al.*, 2001, Li & Blissard, 2009; Blissard & Theilmann, 2018). Aún poseyendo un amplio tropismo, los baculovirus han sido modificados para obtener una mejor eficiencia de transducción en células blanco. Entre las estrategias empleadas para ello, el pseudotipado de los viriones brotantes con la glicoproteína G de VSV ha sido la más explorada para mejorar la transducción *in vivo* e *in vitro* (Kaikkonen *et al.*, 2006; Kaneko *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Ono *et al.*, 2018). En este trabajo, se planteó el desarrollo de una plataforma celular que exprese la proteína VSV G de manera constitutiva para modificar la envoltura de los baculovirus que se propaguen en ella. La línea celular monoclonal Hi5-vsvG obtenida fue eficiente en la expresión de la proteína recombinante VSV G y en la inserción de esta proteína en los viriones brotantes. El baculovirus pseudotipado Ac-dT^{VSVG} presenta una mayor eficiencia de transducción en comparación con el virus no pseudotipado para el caso de las células tumorales A549 y HepG2. En las células Vero, el porcentaje de transducción fue del 60%, un valor saturante, característico de esta línea celular posiblemente por la ausencia de respuesta al interferón (Young *et al.*, 2003), sin observarse diferencias entre ambos virus.

Por otro lado, se desarrolló una plataforma de células de insecto con el objetivo de facilitar el proceso de producción y purificación de proteínas recombinantes, más específicamente

para el desarrollo de vacunas VLP. En este sentido, se decidió evaluar la inhibición de la expresión mediada por RNA de interferencia de la glicoproteína GP64 encargada de la brotación por la membrana citoplasmática de los viriones del baculovirus para evitar así altas concentraciones del baculovirus en la mezcla final de las VLP. Se diseñó un vector de expresión con múltiples shRNA con el fin de direccionar dos RNAi a diferentes regiones del gen *gp64* para obtener así una sinergia en el efecto de silenciamiento. Junto con esto, se estableció una guía para la aplicación de la tecnología de RNA de interferencia de manera constitutiva en líneas celulares de insecto transgénicas para el desarrollo de nuevas estrategias según las necesidades de las líneas de investigación. La línea celular silenciadora Hi5-shGP64 demostró ser susceptible a la infección y, la primera aproximación, que prevé un ciclo infectivo de 48 h y una MOI de 10 permitió disminuir el título viral en un orden de magnitud, pasando de $\sim 10^8$ a 10^7 UFP/mL. Resta avanzar en la puesta a punto de este sistema de semi-purificación, mejorando las condiciones de cultivo celular que permita la producción de VLP con el menor título viral contaminante.

Este trabajo apuntó a obtener nuevas herramientas para aplicaciones biotecnológicas de los baculovirus. Partiendo de un proyecto de colaboración con miembros del grupo de investigación, integramos dos perspectivas: una línea que se concentra en modificar los genomas virales para incorporar genes heterólogos destinados a estudiar una problemática en salud en particular y, por otro lado, mejorar la plataforma tecnológica de células de insecto que permitan ampliar el tropismo celular en mamíferos y, resolver problemas asociados al proceso de producción y purificación. Como perspectiva, se plantea continuar desarrollando líneas celulares que permitan direccionar los viriones a un tipo celular específico. El direccionamiento es posible mediante la inserción de péptidos en la glicoproteína VSV G diseñados para establecer interacciones con receptores celulares específicos. De esta manera, se obtendría una colección de líneas celulares de insecto que permitirían obtener virus pseudotipados que, a su vez, dirijan al baculovirus recombinante a un sitio blanco específico. Además, se plantea, finalizar con la caracterización minuciosa de

la estrategia de RNA de interferencia en células de insecto que, por cuestiones coyunturales que atañen al sistema científico, no pudimos concretar.

Bibliografía

- Aagaard, L., & Rossi, J. J. (2007). RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(2–3), 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.005>
- Airenne, K. J., Makkonen, K.-E., Mähönen, A. J., & Ylä-Herttuala, S. (2010). In vivo application and tracking of baculovirus. *Current Gene Therapy*, 10(3), 187–194. <https://doi.org/10.2174/156652310791321206>
- Blissard, G. W., & Theilmann, D. A. (2018). Baculovirus Entry and Egress from Insect Cells. *Annual Review of Virology*, 5(1), 113–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043356>
- Boyce, F. M., & Bucher, N. L. (1996). Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6), 2348–2352. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2348>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Carbonell, L. F., Klowden, M. J., & Miller, L. K. (1985). Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *Journal of Virology*, 56(1), 153–160.
- Chen, C., Lin, C., Chen, G., & Hu, Y. (2011). Baculovirus as a gene delivery vector: Recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications. *Biotechnology Advances*, 29(6), 618–631. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.004>
- Cox, M. M. J. (2012). Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*, 30(10), 1759–1766. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.016>
- Fabre, M. L., Arrias, P. N., Masson, T., Ferrelli, M. L., & Romanowski, V. (2019). *Emerging and reemerging viral pathogens* (M. Ennaji, Ed.; Vol. 2). Elsevier.
- Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., & Rubinstein, M. (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(18), 7306–7311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214441110>
- Fowler, D. K., Williams, C., Gerritsen, A. T., & Washbourne, P. (2015). Improved knockdown from artificial microRNAs in an enhanced miR-155 backbone: A designer's guide to potent multi-target RNAi. *Nucleic Acids Research*, 44(5), 1–16. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1246>

- Goley, E. D., Ohkawa, T., Mancuso, J., Woodruff, J. B., D'Alessio, J. a, Cande, W. Z., Volkman, L. E., & Welch, M. D. (2006). Dynamic nuclear actin assembly by Arp2/3 complex and a baculovirus WASP-like protein. *Science*, *314*(5798), 464–467. <https://doi.org/10.1126/science.1133348>
- Goodwin, R. H., Vaughn, J. L., Adams, J. R., & Louloudes, S. J. (1970). Replication of a nuclear polyhedrosis virus in an established insect cell line. *Journal of Invertebrate Pathology*, *16*(2), 284–288.
- Gottardo, M. F., Pidre, M. L., Zuccato, C., Asad, A. S., Imsen, M., Jaita, G., Candolfi, M., Romanowski, V., & Seilicovich, A. (2018). Baculovirus-based gene silencing of Humanin for the treatment of pituitary tumors. *Apoptosis*. <https://doi.org/10.1007/s10495-018-1444-0>
- Guo, Y., Yue, Q., Gao, J., Wang, Z., Chen, Y.-R., Blissard, G. W., Liu, T.-X., & Li, Z. (2017). Roles of cellular NSF protein in entry and nuclear egress of budded virions of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, *91*(20), e01111-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01111-17>
- Ho, Y.-C., Chung, Y.-C., Hwang, S.-M., Wang, K.-C., & Hu, Y.-C. (2005). Transgene expression and differentiation of baculovirus-transduced human mesenchymal stem cells. *The Journal of Gene Medicine*, *7*(7), 860–868. <https://doi.org/10.1002/jgm.729>
- Hüser, A., & Hofmann, C. (2003). Baculovirus vectors: Novel mammalian cell gene-delivery vehicles and their applications. *American Journal of Pharmacogenomics: Genomics-Related Research in Drug Development and Clinical Practice*, *3*(1), 53–63.
- Kaikkonen, M. U., Rätty, J. K., Airene, K. J., Wirth, T., Heikura, T., & Ylä-Herttua, S. (2006). Truncated vesicular stomatitis virus G protein improves baculovirus transduction efficiency in vitro and in vivo. *Gene Therapy*, *13*(4), 304–312. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302657>
- Kaneko, H., Suzuki, H., Abe, T., Miyano-Kurosaki, N., & Takaku, H. (2006). Inhibition of HIV-1 replication by vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein pseudotyped baculovirus vector-transduced ribozyme in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *349*(4), 1220–1227. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.184>
- Kim, N. Y., Baek, J. Y., Choi, H. S., Chung, I. S., Shin, S., Lee, J. I., Choi, J. Y., & Yang, J. M. (2012). Short-hairpin RNA-mediated gene expression interference in *trichoplusia ni* cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*(2), 190–198. <https://doi.org/10.4014/jmb.1108.08045>
- Kolangath, S. M., Basagoudanavar, S. H., Hosamani, M., Saravanan, P., & Tamil Selvan, R. P.

- (2014). Baculovirus mediated transduction: Analysis of vesicular stomatitis virus glycoprotein pseudotyping. *VirusDisease*, 25(4), 441–446. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0229-5>
- Kost, T. A., Condreay, J. P., & Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 23(5), 567–575. <https://doi.org/10.1038/nbt1095>
- Lee, H. S., Lee, H. Y., Kim, Y. J., Jung, H. D., Choi, K. J., Yang, J. M., Kim, S. S., & Kim, K. (2015). Small interfering (Si) RNA mediated baculovirus replication reduction without affecting target gene expression. *Virus Research*, 199, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.015>
- Li, Z. & Blissard, G. (2009). The Autographa californica Multicapsid Nucleopolyhedrovirus GP64 Protein: Analysis of Transmembrane Domain Length and Sequence Requirements. *Journal of Virology* Apr 2009, 83(9) 4447-4461. <http://doi.org/10.1128/JVI.02252-08>
- Liang Jiang, Ping Zhao, Genhong Wang, Tingcai Cheng, Qiong Yang, Shengkai Jin, Ping Lin, Yang Xiao, Qiang Sun, Qingyou Xia. (2013). Comparison of factors that may affect the inhibitory efficacy of transgenic RNAi targeting of baculoviral genes in silkworm, *Bombyx mori*. *Antiviral Research* 97 (3), 255-263. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.12.020>.
- Liao, F., Xu, H., Torrey, N., Road, P., & Jolla, L. (2015). Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs Xavier. *Methods*, 2(74), 157–166. <https://doi.org/10.1126/scisignal.274pe36>.Insulin
- Liu, Y. P., Haasnoot, J., ter Brake, O., Berkhout, B., & Konstantinova, P. (2008). Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron. *Nucleic Acids Research*, 36 (9), 2811–2824. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn109>
- López, M. G., Diez, M., Alfonso, V., & Taboga, O. (2018). Biotechnological applications of occlusion bodies of Baculoviruses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 10–10. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9130-2>
- Makkonen, Kaisa-Emilia, Airene, K., & Ylä-Herttulala, S. (2015). Baculovirus-mediated Gene Delivery and RNAi Applications. *Viruses*, 7(4), 2099–2125. <https://doi.org/10.3390/v7042099>
- Makkonen, K.-E., Turkki, P., Laakkonen, J. P., Ylä-Herttulala, S., Marjomaki, V., & Airene, K. J. (2013). 6-O- and N-Sulfated Syndecan-1 Promotes Baculovirus Binding and Entry into Mammalian Cells. *Journal of Virology*, 87(20), 11148–11159. <https://doi.org/10.1128/JVI.01919-13>

- Mangor, J. T., Monsma, S. A., Johnson, M. C., & Blissard, G. W. (2001). A GP64-Null baculovirus pseudotyped with Vesicular Stomatitis Virus G protein. *Journal of Virology*, 75(6), 2544–2556. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.6.2544-2556.2001>
- Nandety, R. S., Kuo, Y. W., Nouri, S., & Falk, B. W. (2014). Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. *Bioengineered Bugs*, 6(1), 8–19. <https://doi.org/10.4161/21655979.2014.979701>
- Nikolic, J., Belot, L., Raux, H., Legrand, P., Gaudin, Y., & A. Albertini, A. (2018). Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein. *Nature Communications*, 9(1), 1029. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03432-4>
- Ogay, I. D., Lihoradova, O. A., Azimova, S. S., Abdukarimov, A. A., Slack, J. M., & Lynn, D. E. (2006). Transfection of insect cell lines using polyethylenimine. *Cytotechnology*, 51(2), 89–98. <https://doi.org/10.1007/s10616-006-9022-7>
- Ono, C., Okamoto, T., Abe, T., & Matsuura, Y. (2018). Baculovirus as a Tool for Gene Delivery and Gene Therapy. *Viruses*, 10(9), 510. <https://doi.org/10.3390/v10090510>
- Oomens, A.G., Blissard, G.W., 1999. Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multi capsid nucleopolyhedrovirus. *Virology* 254 (2),297–314.
- Saleh, M. C., van Rij, R. P., Hekele, A., Gillis, A., Foley E., O'Farrell P. H., & Andino R. (2006). The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell Biology*, 8(8), 793–802. <https://doi.org/10.1038/ncb1439>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Smith, G. E., Summers, M. D., & Fraser, M. J. (1983). *Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector*. 1983.
- Snyder, L. L., Ahmed, I., & Steel, L. F. (2009). RNA polymerase III can drive polycistronic expression of functional interfering RNAs designed to resemble microRNAs. *Nucleic Acids Research*, 37(19), 1–10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp657>
- Sun, X., Yau, V. K., Briggs, B. J., & Whittaker, G. R. (2005). Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology*, 338(1), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.05.006>
- Tani, H. (2014). Analysis of entry mechanisms of novel emerging viruses using pseudotype VSV

- system. *Tropical Medicine and Health*, 42, S71–S82. <https://doi.org/10.2149/tmh.2014-S10>
- van Loo, N. D., Fortunati, E., Ehlert, E., Rabelink, M., Grosveld, F., & Scholte, B. J. (2001). Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: Mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *Journal of Virology*, 75(2), 961–970. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.2.961-970.2001>
- Wang, Y., Zhang, Y., Han, S., Hu, X., Zhou, Y., Mu, J., Pei, R., Wu, C., & Chen, X. (2015). Identification of a novel regulatory sequence of actin nucleation promoting factor encoded by *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of Biological Chemistry*, 290(15), 9533–9541. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.635441>
- Weng, Y., Shi, Y., Xia, X., Zhou, W., Wang, H., & Wang, C. (2017). A multi-shRNA vector enhances the silencing efficiency of exogenous and endogenous genes in human cells. *Oncology Letters*, 15, 1553–1562. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5672>
- Yamaji, H. (2014). Suitability and perspectives on using recombinant insect cells for the production of virus-like particles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 1963–1970. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5474-9>
- Young DF, Andrejeva L, Livingstone A, et al. Virus replication in engineered human cells that do not respond to interferons. *J Virol*. 2003; 77 (3): 2174-2181. <https://doi:10.1128/jvi.77.3.2174-2181.2003>
- Yue, Q., Yu, Q., Yang, Q., Xu, Y., Guo, Y., Blissard, G. W., & Li, Z. (2017). Distinct roles of cellular ESCRT-I and ESCRT-III proteins in efficient entry and egress of budded virions of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 92(1), JVI.01636-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01636-17>

Conclusiones

En el presente trabajo doctoral se abordó el uso de los baculovirus como herramientas biotecnológicas aplicadas al mejoramiento del cuidado del ambiente y la salud humana. En este sentido, se han desarrollado líneas celulares de insecto monoclonales que expresan proteínas recombinantes para su final incorporación en los dos morfotipos baculovirales: en los cuerpos de oclusión para el desarrollo de bioinsecticidas y en los viriones brotantes para el desarrollo de terapias génicas.

De los estudios de la proteína de envoltura del poliedro (PEP) en este trabajo se desprende que, dependiendo del género, los baculovirus presentan un número diferente de genes *pep*. Sin embargo, los estudios bioinformáticos indicaron **un origen monofilético para las PEP de los géneros *Alpha-* y *Betabaculovirus***. Mientras los alfabaculovirus codifican proteínas PEP con dominios Baculo_PEP_N y Baculo_PEP_C, los betabaculovirus poseen tres copias de *pep*: *pep-1* y *pep-2*, que codifican un solo dominio Baculo_PEP_N, y *pep/p10*, que codifica tanto el dominio N- como el C-terminal. Aunque las estructuras de la proteína PEP y sus sitios de unión e interacción con otras moléculas aún no se ha esclarecido, la presencia de proteínas PEP con diferente composición de dominio y niveles de diversidad podría conducir a cambios en la estructura del OB; sin embargo, se requieren más estudios para demostrarlo de manera concluyente.

El análisis por homología de la secuencia aminoacídica de PEP de AgMNPV indicaría que en el dominio N-terminal se encuentra una **secuencia consenso de dominio de unión a DNA (BRO-N)** conservada en el grupo I y, con ciertas modificaciones, en el grupo II de los miembros del género *Alphabaculovirus*. La presencia de **un motivo básico muy conservado** en el dominio N-terminal así como la composición de aminoácidos en **región desordenada entre dominios** indicarían sitios putativos de fosforilación y de interacción proteína a proteína. Finalmente en el dominio C-terminal de PEP se observó **un motivo**

coiled-coil cuya naturaleza permite pensar en una probable región para la interacción con otras proteínas o consigo misma.

Las líneas celulares de insecto poseen la capacidad de expresar exitosamente la proteína de envoltura PEP sin alterar la biología de la célula ni la susceptibilidad a la infección por los baculovirus de AcMNPV y AgMNPV.

La proteína quimérica GFP::PEP_{Ag} se direcciona y localiza en los cuerpos de oclusión (OB) de los virus salvajes de AcMNPV y AgMNPV sin afectar el ensamblado de la envoltura del poliedro. Se trata de una prueba de concepto satisfactoria; aunque, los estudios proteómicos muestran que **la incorporación de GFP::PEP_{Ag}(heteróloga) es 100 veces menor en los OB de AcMNPV.**

La incorporación de GFP::PEP_{Ag} en los poliedros indicaría que la generación de otras quimeras de PEP serían ensambladas en la misma localización y que **las interacciones proteína-proteína en un sistema donde se co-expresan diferentes PEP baculovirales no serían *per se* excluyentes** sino, por el contrario, la plausibilidad de la interacción entre proteínas heterólogas **dependerá en gran medida de la similitud de secuencia y la distancia evolutiva entre las mismas.**

Los estudios de microscopía de epifluorescencia de la proteína PEP indicaron un cambio en la localización subcelular en el contexto de infección viral. **En etapas tempranas de la infección se localiza mayormente en el citoplasma y luego, en etapas tardías, se verifica una mayor concentración en el núcleo.**

Los bioensayos en larvas *Spodoptera frugiperda* no permitieron evaluar el tiempo letal de los virus de AcMNPV ya que mostraron una **alta resistencia a la infección oral.** Adicionalmente, podría existir una atenuación de los cuerpos de oclusión producto de los sucesivos pasajes por cultivo celular.

Se obtuvieron baculovirus pseudotipados con la proteína VSV G expresada de manera constitutiva en una línea celular de insecto. Los virus recombinantes propagados en esta línea fueron **significativamente más eficientes** en la **transducción de células humanas tumorales (objetivo final: terapia génica)**.

Se diseñaron dos **RNA de interferencia** específicos de la **glicoproteína GP64** capaces de regular negativamente la expresión de la misma y, en consecuencia, **reducir la producción de los viriones brotantes (BV)** en cultivos de células de insecto. La expresión transitoria empleando un vector plasmídico demostró que **los shRNA son funcionalmente activos y causan una disminución significativa en la dispersión distal de la placa de infección**.

Finalmente, la expresión constitutiva de estos **shRNA en una línea celular de insecto transgénica** redujo la producción de BV en un orden de magnitud a MOI altas. Estos resultados permitirán **mejorar la etapa de pre-purificación en la producción y el desarrollo de vacunas a VLP utilizando BEVS**.

En conclusión, la modificación de células de insecto es una herramienta muy versátil e innovadora para modificar y mejorar a los baculovirus como vectores virales para su aplicación como bioinsecticida, producción de complejos de proteínas extracelulares (por ejemplo: VLP) o como agente terapéutico.

Perspectivas

- Profundizar los estudios de caracterización y localización de los dominios de la proteína PEP por medio de análisis mutacionales.
- Realizar ensayos de co-inmunoprecipitación y análisis proteómicos para determinar el estado de fosforilación de PEP antes y después de la infección, así como identificar las proteínas que interaccionan con PEP al momento de formar los viriones brotantes y/o los cuerpos de oclusión.
- Repetir los ensayos biológicos para evaluar la capacidad insecticida de los baculovirus recombinantes en larvas del hospedador natural *Rachiplusia nu* y realizar colaboraciones con investigadores extranjeros para los bioensayos en *Anticarsia gemmatalis*.
- Desarrollar las líneas celulares transgénicas de insecto que expresen las fusiones traduccionales de PEP con las proteínas insecticidas y comparar los desempeños en términos de tiempo letal medio de los virus salvajes propagados en estas células con los baculovirus recombinantes que expresan las mismas quimeras.
- Realizar la puesta a punto y prueba de concepto del silenciamiento con los oligoDNA en larvas de *Spodoptera frugiperda*. Para ello, se utilizará el virus recombinante AcMNPV-dsRed y se aplicará de manera tópica una mezcla de oligosDNA (anti-dsRed, anti-ie1) en agua. El curso y/o inhibición de la infección se evaluará con el marcador de fluorescencia.
- Realizar ensayos *in vivo* en modelos animales para evaluar la eficiencia de la transducción de los baculovirus pseudotipados con la proteína recombinante G de VSV.
- Desarrollar líneas celulares que expresen la proteína G de VSV fusionada a péptidos que permitan direccionar a los baculovirus a tejidos específicos para generar terapias dirigidas.

- Confirmar el efecto de los shRNA de la glicoproteína GP64 cuantificando los niveles de mRNA y proteína. Determinar aquella multiplicidad de infección que permita obtener el mejor balance entre los niveles de producción de viriones brotantes (silenciamiento) y la(s) proteína(s) recombinante(s) expresada(s) como VLP.

Anexo

Materiales y Métodos

A.1. Materiales

A.1.1. Productos químicos y enzimáticos

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron reactivos de grado analítico o de grado biología molecular suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, EE.UU.) y Carlo Erba (Milano, Italia). Las enzimas utilizadas fueron provistas por las empresas Stratagene (La Jolla, EE.UU.), Promega (Madison, EE.UU.), New England Biolabs (Beverly, EE.UU.) y Gibco BRL- Life Technologies (Grand Island, USA). Los componentes de los medios de cultivo para bacterias se adquirieron en Difco (Detroit, EE.UU.). Los medios de cultivo de células eucariotas fueron suministrados por Gibco BRL (Grand Island, EE.UU.) y los sueros fetales por Bioser (Buenos Aires, Argentina). Las cajas de Petri y los frascos de poliestireno, utilizados en el cultivo de células fueron provistos por Nunc (Kamstrup, Dinamarca) y Corning (EE.UU.). Las fotografías se obtuvieron con un equipo de Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak digital science) o capturador de imágenes Epichemi3 Darkroom (UVP Bioimaging Systems). Para la toma de imágenes se utilizó un escáner VistaScan 240. La cuantificación de muestras se realizó por medidas de absorbancia; con el programa LabWorks™ 4.6 (Image Acquisition and Analysis Software) o con Nanodrop Spectrophotometer ND-1000.

A.1.2. Soluciones

Todas las soluciones preparadas fueron esterilizadas por tratamiento de calor en autoclave a 121°C a 1 atmósfera de sobrepresión. Las soluciones termolábiles fueron esterilizadas por filtración con filtro de diámetro de poro de 22 µm. El agua utilizada en las soluciones fue bidestilada, filtrada por columna de intercambio iónico y esterilizada en autoclave.

A.1.2.1 Soluciones para la extracción de plásmidos

Alcoholes: Etanol 96% y 70%.

Solución I: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM (pH=8) EDTA 1 mM

Solución II: NaOH 0,2 N; SDS 1%

Solución III: AcOK 5M. pH=4.8

Buffer TE: Tris-HCl 10 mM (pH=8) EDTA 1 mM

NaAcO 3 M : se pesó 246.1 gramos de NaAcO y se disolvió en agua bidestilada. Se llevó a pH 5,2 con ácido acético glacial y se añadió agua hasta llegar a un volumen final de 1 L.

Cloroformo:Isoamílico (24,1): 24 partes de cloroformo y 1 parte de alcohol isoamílico.

Fenol: Solución de fenol equilibrada con fase acuosa pH 8

A.1.2.2. Soluciones de antibióticos

Los antibióticos se disolvieron en agua bidestilada estéril a una concentración final de 100 mg/ml y se esterilizaron por filtración.

A.1.2.3. Soluciones para la resolución de ácidos nucleicos mediante electroforesis

Buffer de corrida TAE (Tris-HCl, ácido acético, EDTA) 50 X: 242 Tris base, 57,1 ml ácido acético glacial y 100 mM EDTA 0,5 M pH=8,0. Completado a 1 L con agua.

TAE 1X: Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM.

Solución Stock Bromuro de etidio: 10 mg/ml BrEt, conservado en oscuridad.

Geles Agarosa: Agarosa 0,3% - 2% en buffer TAE 1X.

Solución de siembra: TAE 1X, Glicerol 30% y colorantes Xilen cianol FF y azul de bromofenol.

A.1.2.4. Soluciones para el análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

Gel separador: 12, ó 10% dependiendo del experimento. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (29:1) diluyendo en buffer de separación 1 X: 0,375 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS. Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0,1 y 0,01%, respectivamente.

Gel concentrador: 5%. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (30;0,8) diluyendo en buffer concentrador 1 X: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS. Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0,1 y 0,01%, respectivamente.

Buffer de corrida 1 X: Tris base 25 mM glicina pH 8,3 250 mM SDS 0,1%

Solución para siembra de muestras 4 X: Tris-HCl pH 6,8 200 mM glicerol 40,0% SDS 8,0% β -mercaptoetanol 8,0% azul de bromofenol 0,4%.

Solución de tinción: Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% p/v metanol 45% v/v ácido acético 10% v/v Se lleva a 100 ml con H₂O.

Solución desteñidora: etanol 30% v/v ácido acético 10% v/v

A.1.2.5. Soluciones utilizadas en reacciones enzimáticas:

Las distintas reacciones de digestión se llevaron a cabo incubando el DNA a digerir con la enzima correspondiente, teniendo en cuenta la actividad de la enzima y utilizando el buffer de digestión, la cantidad de enzima y el tiempo y temperatura de incubación recomendados por el proveedor. Los volúmenes de digestión variaron con la masa de DNA digerido de 5 μ l a 100 μ l.

A.1.3. Cepas bacterianas

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* DH5 α TM y Top10, que poseen los siguientes genotipos:

DH5 α TM: F- ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (rk-, mk+) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1 tonA* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Top10: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 deoR recA1 endA1 ara* Δ 139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ - *rpsL*(StrR) *nupG* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A.1.4. Medios

A.1.4.1. Medios para cultivo de bacterias

Medio LB: se disuelven 5 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura en aproximadamente 700 ml de agua destilada, se lleva a pH neutro. Una vez disueltos los reactivos se ajusta el volumen a 1 litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave. Para preparar medios sólidos se agrega 15 g de agar por cada litro de medio líquido.

A.1.4.2. Antibióticos para cultivo de bacterias

Ampicilina: se disuelven 100 mg en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

A.1.4.3. Medios para cultivo de células de insectos

Grace's, Thermo-Fischer / Life Sciences / Invitrogen™ (Grand Island, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser, Buenos Aires, Argentina).

A.1.4.4. Antifúngicos y Antibióticos para cultivo de células

Anfotericina B: se disuelven 2,5 mg en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

Gentamicina: se disuelven 50 mg en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

A.2. Métodos

A.2.1. Técnicas que involucran DNA

Se utilizaron las técnicas de clonado generales detalladas en (Green & Sambrook, 2012) .

A.2.1.2. Preparación de DNA plasmídico

La purificación de DNA plasmídico se efectuó por el método de lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979). Se crecieron bacterias *E. coli* (DH-5 α o TOP10) en medio LB hasta saturación con el antibiótico correspondiente. Se centrifugó 1,5 ml de estos cultivos a 14000-18000 x g durante 30 segundos en un tubo Eppendorf y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió cinco veces sobre el mismo Eppendorf. Se añadieron 200 μ l de Solución I al sedimento obtenido y se lo resuspendió con vórtex. Luego se agregó 400 μ l de Solución II. Después se invirtió suavemente el tubo 5 a 10 veces o hasta observar la clarificación de la suspensión y se incubó en agua-hielo durante 5 min. Luego se neutralizó el pH con 300 μ l de Solución III (a 4°C) y se incubó durante 2-5 min en agua-hielo. El tubo Eppendorf se centrifugó 5 minutos a 14.000-18.000 x g a 4°C y se extrajo el sobrenadante (DNA plasmídico) evitando tomar el precipitado de DNA cromosómico, restos celulares y proteínas acomplejadas con el SDS. Los RNA celulares de esta solución se degradaron por incubación con RNAsa A (20 μ g/ml) durante 30 min a 37°C. EL DNA plasmídico se aisló de las proteínas por dos extracciones sucesivas con fenol y cloroformo/isoamílico (24:1) y se concentró por precipitación etanólica o con isopropanol. La preparación plasmídica se purificaron luego con polvo de sílica.

A.2.1.3. Extracción fenólica

Este método se empleó para separar proteínas de soluciones de ácidos nucleicos de preparaciones de viriones de AgMNPV y AcMNPV tratados con proteinasa K. El DNA se extrajo con un volumen de fenol para eliminar proteínas. Una vez añadida la solución orgánica al tubo, se mezcló suavemente por inversión durante 10 min y se centrifugó durante 5 min a 14-18000 x g y se tomó la fase acuosa tratando de no extraer material de la interfase. El procedimiento se repitió con cloroformo-isoamílico (24:1).

A.2.1.4. Precipitación de ácidos nucleicos

Los DNA virales fueron precipitados mediante la adición de 0,1 volúmenes (vol) de AcNa 3 M más 2,5 volúmenes de etanol 96%. Alternativamente, se precipitaron los DNA por adición de 0,3 vol de AcNa 3M más 0,6-0,9 volúmenes de alcohol isopropílico. En cualquiera de los dos protocolos, las soluciones se centrifugaron a 14.000 x g 4°C durante 30 min. Las sales fueron lavadas con solución de etanol 70%, preparado con agua bidestilada estéril. El sedimento se secó a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en agua bidestilada estéril.

A.2.1.5. Electroforesis en geles de agarosa

Se pesó agarosa en un frasco de vidrio, se añadió buffer TAE (con Bret 0,5 µg/ml) y se calentó en horno microondas hasta disolución de la agarosa en el buffer. Una vez que la agarosa se enfrió, pero aún se encontraba en estado líquido, se colocó un volumen conveniente sobre un molde acrílico con un peine para generar calles de siembra de muestra. Una vez gelificada la agarosa, el gel se colocó en una cuba de electroforesis y se lo cubrió con buffer TAE. Las muestras de DNA se mezclaron con buffer de muestra en una relación buffer/muestra correspondiente y se depositaron dentro de las calles del gel. Los DNA se resolvieron en geles de agarosa aplicando un voltaje entre 80-120 V en caso que los tamaños de los fragmentos fueran pequeños o de 50-70 V para fragmentos grandes y porcentajes de geles bajos (0,3- 0,6%). Los geles de agarosa se resolvieron en aparatos BIO-RAD. Los DNA se visualizaron por iluminación con transiluminadores de luz ultravioleta de 310 nm (Fotodyne, EE.UU. o Stratagene, EE.UU.) y las imágenes se capturaron con un aparato de documentación de geles Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak Digital Science).

A.2.1.6. Purificación de fragmentos de DNA por adsorción a polvo de sílice

Los fragmentos de DNA o de productos de amplificación, se purificaron a partir de geles de agarosa por adsorción a polvo de sílice (Geneclean Bio 101 Inc.). Se extrajo la porción del gel con la banda de interés y se incubó en 3 volúmenes de NaI saturado durante 5 min a 60°C. Posteriormente, se resuspendió en 20 µl de polvo de sílice (previamente resuspendido) y se incubó con agitación durante 5 min. La solución fue centrifugada durante 10 segundos a 14-18.000 X g. El sobrenadante se descartó y el precipitado fue lavado con 200 µl de solución New Wash (NaCl, etanol y agua), este paso se repitió 2 veces. Este precipitado fue secado durante 5 min a temperatura ambiente y luego resuspendido en una cantidad conveniente de agua bidestilada. Se centrifugó 30 seg a 14-18.000 X g y el sobrenadante conteniendo el DNA de interés se transfirió a otro tubo que fue conservado a -20 °C hasta su uso. El protocolo anterior fue adaptado para la

purificación de minipreps. En este caso, se agregaron 3 volúmenes de NaI a la solución de miniprep y 20 µl de polvo de sílice, siendo el resto de los pasos iguales.

A.2.2. Métodos de transformación y screening

A.2.2.1. Preparación de bacterias *E. coli* electrocompetentes

Se crecieron bacterias *E. coli* DH5α hasta saturación. Ese cultivo se diluyó 1/20 en medio LB sin NaCl (1.000 ml) y se cultivó a 37 °C con agitación de 180-220 rpm hasta alcanzar 0,5 a 0,6 unidades de densidad óptica a 600 nm. En este punto, el cultivo se enfrió en agua hielo durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 2800 G durante 20 minutos a 4 °C y el sedimento de bacterias se resuspendió en 500 µl de glicerol 10% (v/v) preparado en agua bidestilada estéril. El proceso de resuspensión y centrifugación se repitió dos veces, disminuyendo el volumen de glicerol utilizado en los lavados, reuniendo los sobrenadantes resuspendidos de dos recipientes en uno. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10% o medio GYT, se separaron en alícuotas y se congelaron rápidamente a -80 °C hasta el momento de su uso.

A.2.2.2. Transformación de *E. coli* por electroporación

La transformación de bacterias electrocompetentes se realizó en un electroporador Gene Pulser™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Se mezclaron 50 µl de bacterias electrocompetentes con 2 µl reacción de ligación. Esta mezcla se colocó en una cubeta de electroporación fría de 0,2 cm de distancia entre los electrodos y la mezcla se sometió a un pulso de 2,2 kV. Las variables capacitancia y resistencia se fijaron en 25 µF y 200 ohm (Ω), respectivamente. Inmediatamente luego del pulso eléctrico, se añadió 1 ml de medio LB sin antibiótico a las bacterias y se las incubó 1 h a 37 °C con agitación. Se sembraron 200 y 300 µl de cultivo en placas de LB con el agregado de antibiótico de selección (Ampicilina 100 µg/ml). Las placas se incubaron 18-24 h a 37 °C.

A.2.2.3. Colony PCR

Con palillos estériles se tomaron las colonias resultantes de las diferentes transformaciones y fueron estriadas en una placa con antibiótico. El remanente de bacterias fue depositado en un tubo eppendorf con agua estéril, reuniendo hasta 10 colonias en cada tubo. Los tubos eppendorf fueron hervidos durante quince minutos, para provocar la lisis celular y liberación del DNA plasmídico. Posteriormente, cada tubo se centrifugó a 14-18.000 X g durante 5 min. Las reacciones de amplificación se realizaron en las condiciones descritas anteriormente, utilizando 1 µl del sobrenadante como molde en 10 µl de volumen final y empleando los *primers* correspondientes. Los pools que presentaron una señal positiva por PCR fueron analizados en una *colony PCR* individual, con una colonia por tubo, a partir de las estrías del proceso anterior.

A.2.2.4. Reacciones de amplificación por PCR

Las reacciones de amplificación de DNA fueron llevadas a cabo en los cicladores térmicos Eppendorf (Mastercycler Gradient) y Thermo (PCR Sprint). Las reacciones en las que se iba a utilizar el producto de amplificación para clonación se utilizó la polimerasa Taq (Embiotec) si el producto era menor a 1000 pb. En las reacciones de caracterización se usó la misma

polimerasa. La mezcla de reacción fue diseñada de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes la enzima. La mezcla de reacción fue diseñada de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes la enzima, variando únicamente la concentración de $MgCl_2$. Para el clonado de productos de más de 1000 pb se utilizó la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerases (Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

A.2.3. Métodos que involucran cultivo celular.

A.2.3.1. Mantenimiento de células

Las células High Five™ (BTI-TN-5B1-4) y UFLAg-286 se mantuvieron a 27°C en medio de Grace (Invitrogen™) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser).

A.2.3.2. Congelamiento

Para el congelamiento se parte de monocapas de células confluentes de frascos t25. Se extrae el medio de cultivo y se agregan 5 ml de medio de Grace con 10% SFB y 10% DMSO. Se suspenden las células mecánicamente y se alicuotan en crioviales. Luego se procede a un congelamiento graduado hasta -80°C, colocando los crioviales en contacto con una suspensión de etanol o glicerol y finalmente en $N_2(L)$.

A.2.3.3. Transfecciones

Como reactivo de transfección se utiliza Cellfectin II (Invitrogen™) o PEI (*Polyethylenimine*, linear, MW 25000, Polysciences, Inc.). Se utiliza el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, para la transfección de una placa de 10 cm² se realiza una mezcla de DNA a transfectar con 200 μ l de medio sin suero y otra mezcla de 5 μ l de Cellfectin y 200 μ l de medio sin suero. Las mezclas de DNA y Cellfectin se mezclan por goteo suave y se espera 15 minutos (Cellfectin II) para permitir la formación de complejos DNA-Reactivo de transfección. Se retira el sobrenadante de la placa de cultivo a transfectar y se lava 3 veces con medio sin suero. Finalmente, se gotea suavemente la mezcla de transfección sobre la placa. Luego se agregan 400 μ l adicionales de medio sin suero para completar el volumen mínimo de medio requerido por la placa para la supervivencia de las células. Al día siguiente se extrae el medio de transfección y se agregan 2 ml de medio completo. Para la transfección con el reactivo PEI las células se sembraron en una placa de 6 pocillos (2 x 10⁶ células/pocillo) y se transfectan con 1 μ g de DNA plasmídico utilizando 3 μ l de 1 mg / ml de polietilenimina (PEI). Brevemente, 1 μ g del DNA plasmídico se mezcló con 100 μ L de NaCl 150 mM y se mezcló suavemente con PEI. Después de la incubación a Se añadió a las células temperatura ambiente durante 5 minutos de complejo de DNA-PEI.

A.2.3.4. Generación de líneas celulares transgénicas.

Para el aislamiento de poblaciones celulares clonales se utilizó el método de dilución terminal (InsectSelect™ BSD System, 2008). En este método se siembran diluciones seriadas de las células previamente transfectadas en placas multipocillo. Se utiliza una placa de 96 pocillos y las células se diluye de tal manera que en la primera fila de la placa (12 pocillos) se siembran 1000 células por pocillo. En la segunda fila se siembran 500 células por pocillo y se continúa diluyendo 2 veces la concentración cada fila. Luego las diluciones sembradas en cada pocillo son seleccionadas mediante el agregado de

antibiótico (Blasticidina 40 µg/ml ó Puromicina 10 µg/ml). En algunos pocillos de alguna dilución sobrevivirá una única célula que formará una microcolonia luego de varios días. Se considera que cada pocillo en el cual se formó una única microcolonia proviene de una única célula y por lo tanto representa una población clonal. Cada población clonal es repicada e infectada para observar la expresión del transgén. Para asegurar la homogeneidad genética de los clones, la dilución terminal se vuelve a repetir dos o tres veces más, rescatando en cada repetición células de una única microcolonia.

A.2.3.5. Métodos que involucran manipulación de baculovirus en cultivo celular

Para el mantenimiento de virus en cultivo celular, se siguieron los protocolos sugeridos en los libros de referencia "Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual" (O'Reilly *et al.*, 1994) y "Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols" (Murhammer, 2008).

A.2.4. Métodos que involucran proteínas.

A.2.4.1. Reducción, alquilación y precipitación con TCA de muestras en solución (Servicio del CEQUIBIEM).

- Agregar DTT hasta una concentración final 10 mM en HCO₃NH₄ 50 mM, pH=8 (se puede utilizar cualquier otro buffer de pH= 7-8, o en buffer con Urea 8M)
- Incubar 60 min a 56°C
- Agregar Iodoacetamida hasta una concentración final 20mM en HCO₃NH₄ 50 mM
- Incubar 60 min en oscuridad a temperatura ambiente.
- Agregar 1/5 de volumen de TCA 100% por cada 1 volumen de muestra
- Dejar reposar durante 2 horas a -20°C
- Centrifugar al máximo en microcentrífuga durante 10 min
- Lavar el pellet 3 veces con Acetona a -20°C
- Dejar secar al aire durante 5 min.
- Guardar el pellet en frío.

A.2.5. Análisis estadístico

En los gráficos de barras, los datos han sido expresados como promedio ± error estándar de la media o SEM (del inglés, *standard error of the median*). Las diferencias entre los grupos se determinaron con la prueba *t* de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

A.3. Lista de *primers* utilizados

Gen/Molde	PRIMER	SECUENCIA
GP37 (EpapGV genoma)	FwGP37	GGTACCACTGAGCTCGATATGATAGTACTGATAATATT G (KpnI-SacI)

	RvGP37	GGATCCAACTGCAG TT AAAACCTCGTCATTTTGT (BamHI)
	RvGP37s/s	GGATCCCAAT G AAAACCTCGTCATTTTGT (BamHI)
V-Cath (EpapGV genoma)	FwV-Cath	GGTACCACTGAGCTCTTAATGTCTGAATTATATTCTTAT ACTGTTA (KpnI-SacI)
	RvV-Cath	GGATCCT T ACAAGACCGCCGATGCTGCGTAGG (BamHI)
	RvV-Cath s/s	GACTGGATCCT G ACAAGACCGCCGATGCTGCGTAGG (BamHI)
ChiA (EpapGV genoma)	FwChiA	GGTACCACTGAGCTCAGTATGAAAACCTAGCAATTGTGT C (KpnI-SacI)
	RvChiA	GGATCC CT ATCCTTTACAGAACGCGTCAAGTCC (BamHI)
	RvChiA s/s	GGATCC CC ATCCTTTACAGAACGCGTCAAGTCC(BamH I)
Enhancin 1 (LdMNPV genoma)	FwE1	GGTACCACTACAATGAGCAATACGACTAC (KpnI)
	RvE1	GATCGGATCCT T ACACACGCTGCAGC (BamHI)
	RvE1 s/s	GGATCCT G ACACACGCTGCAGC (BamHI)
eGFP (pEGFP-N3 plásmido)	Fegfp	GGTACCACTGAGCTCAGATCT AT GGTGAGCAAGGGC GAG (KpnI-SacI-BglII)
	Rvegfp	GGATCCTCTAGAT T ACTTGTACAGCTCGTCCATGCC (XbaI-BamHI)
	Regfp s/s	GACTGGATCCTCTAGAT G ACTTGTACAGCTCGTCCAT GCC (XbaI-BamHI)
Tox34 (pBS-Tox34 plásmido, <i>Pyemotes tritic</i>)	Fwtox34	GGTACCACTGAGCTCATGGATAATGGCAATGTCTGAAT C (KpnI-SacI)
	RvTox34 s/s	GGATCCACACAGTCT T GAATCACTTTTTG (BamHI)
	Rvtox34	GGATCCT T AACACAGTCTTGAATCACTTTTTG (BamHI)
PEP (AgMNPV genoma)	FpepC-ter	AAGCTTCGCTGTACCTACAATATAATTC (HindIII)
	RpepC-ter s/s	GGATCCGAGCTCGGTACCGCTTCCGCCTCCGCCT G A TTTGCGACTGCCCATC (BamHI-SacI-KpnI)
	FpepN-ter	GAGCTCACTGGATCCGGCGGAGGCGGAAGCTACGCT GTACCTACAATATCATT(SacI-BamHI)

	RpepNter	GACTCTCGAGTTATTTGCGACTGCCCATC (XhoI)
Ω-hexatoxina (Hv1a, <i>H. versuta</i>)	Fw H-tox	GGTACCACTGAGCTCATGAGCCCCACCTGCATCCCCA GC (SacI-Knpl)
	Rv H-tox	GGATCCTTAATCGCAGCGCTTCACGGTGTTG (BamHI)
	RvH-tox s/s	GGATCCATCGCAGCGCTTCACGGTGTTG (BamHI)
GNA (snowdrop lectina)	Fw GNA	AGATCTATGGCCGCTGACAATATT
	Rv GNA	CTCGAGTTAGGCGTAGTCAGGCAC
IRES (White spot virus)	Fw Ires	ATCCTCTAGAACCCTGGCTTACTGTA
	Rv Ires	AGTGGGATCCGACGAGTTTTTTTTCTTTATC
VSV-G (p-HDM-G)	Fw vsvG	TGCCCGTCAAGCTCAGATTT
	Rv vsvG	AGCATGACACATCCAACCGT
Puromicina	Fw puro	CCATGGCAATGACCGAGTACAAGCCCACGG (NcoI)
	Rv Puro	CGCAAGCCCGGTGCCTGACGAGATCT (BglIII)
dTOMATO	Fw dt	GCGAGGAGGTCATCAAAG
	Rv dt	GAGCCGTACATGAACTGG
pIB-check	Fw pIB-check	CGCAACGATCTGGTAAACAC
	Rv pIB-check	GACAATACAACTAAGATTTAGTCAG
pIP-GFPPEP (plásmido)	Fw pIPGFPPEPNter	GTATCCGGAATTCGCGTACCGGTCATCATCACCATC (EcoRI)

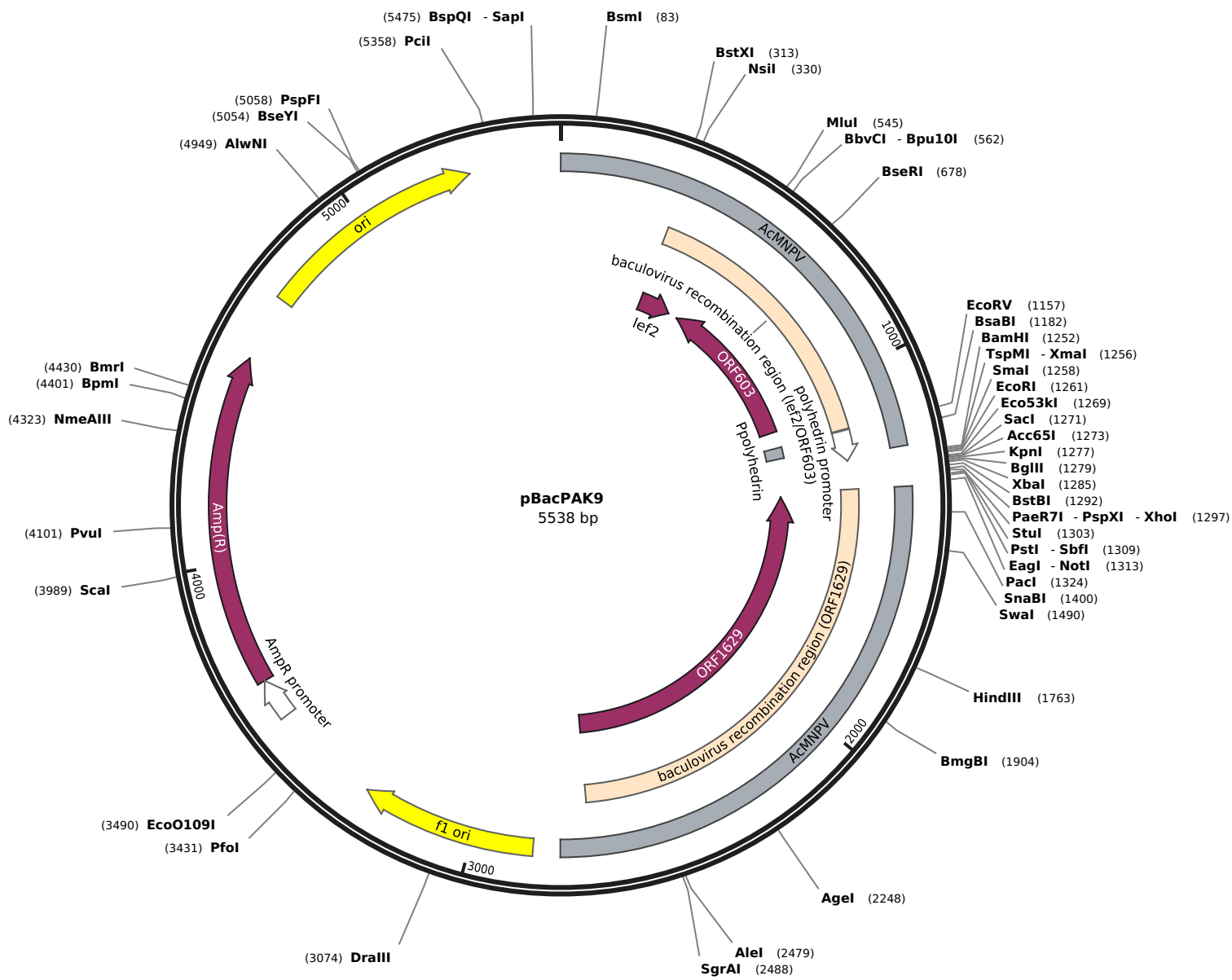
A.4. Bibliografía

- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- InsectSelect™ BSD System, I. (2008). For Stable Expression of Heterologous Proteins in Lepidopteran Insect Cell Lines using pIB/V5-His. *Catalog Nos. K820-01, K825-01, V8020-01*.
- Murhammer, D. W. (2008). Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 388. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-457-5>
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K., & Luckow, V. A. (1994). *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. (p. 368). Oxford University Press.

Material Suplementario

(Vectores plasmídicos)

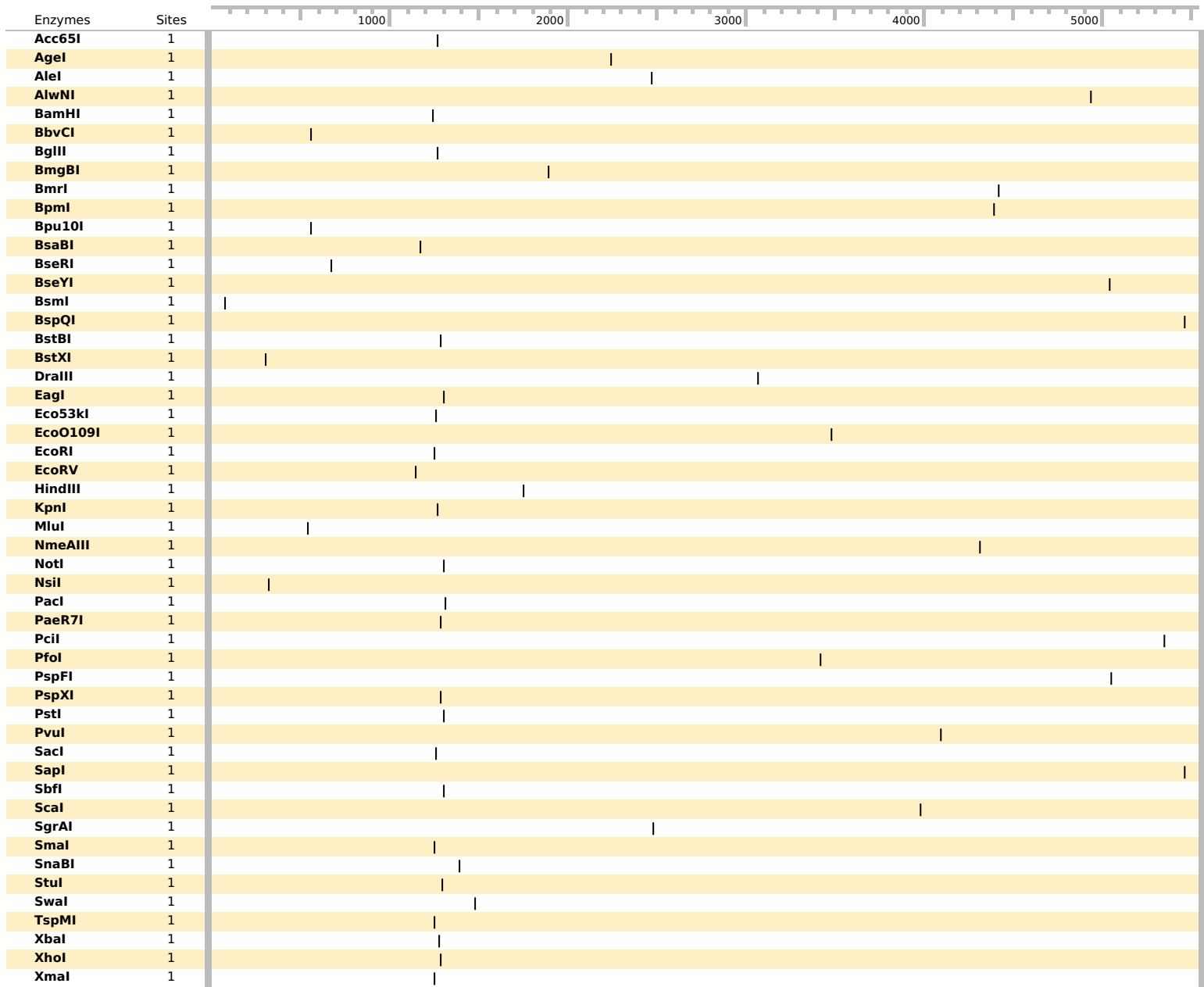
6 features are not displayed



































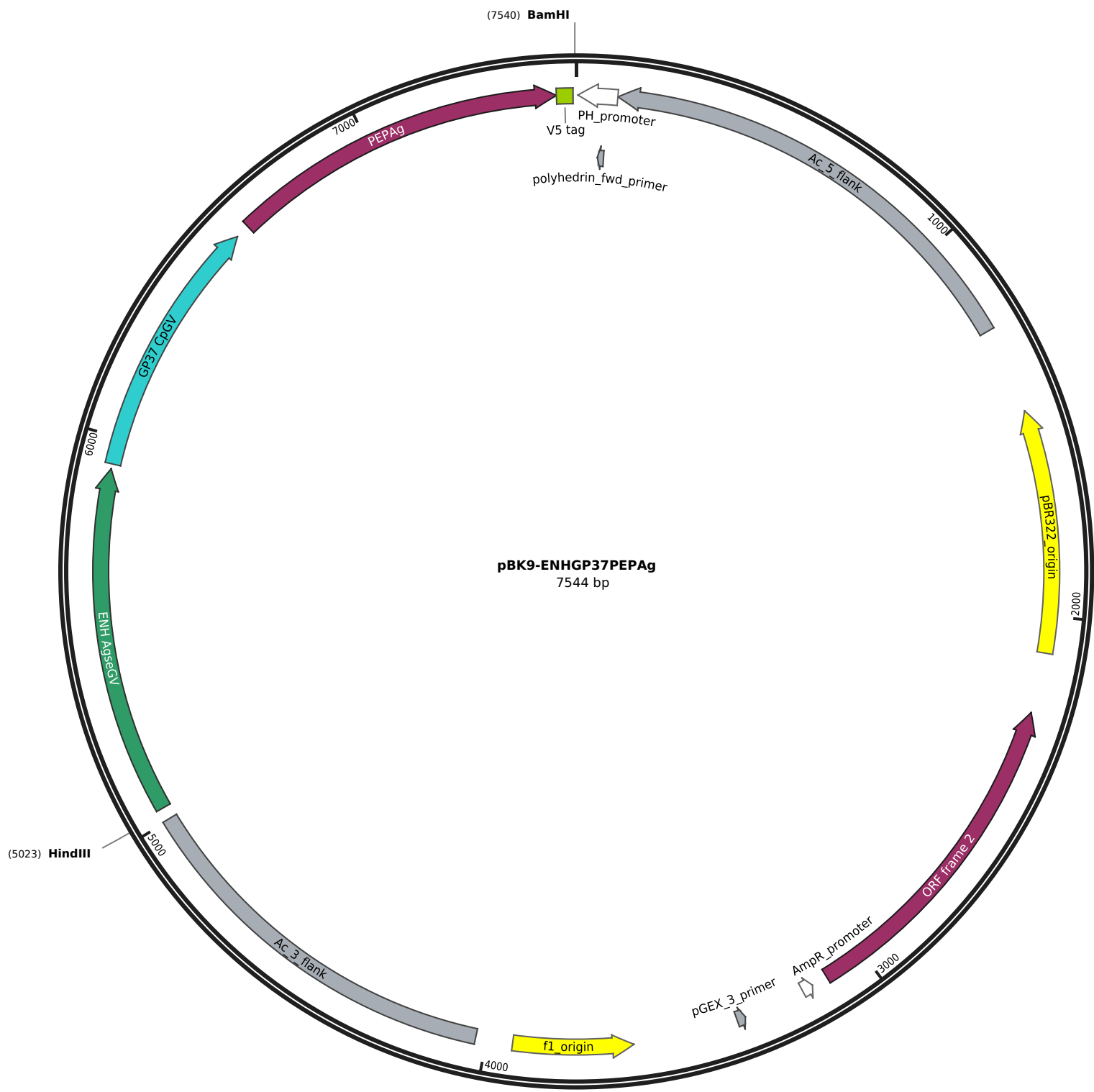
```

... aacggtcgcgcccactattaatgaaattaaaaattccaattttaaaaaacgcagcaagagaaacatttgtatgaaagaatgcttagaagg 90
aaagaaaaatgtcgtcgacatgctgaacaacaagattaatatgcctccggtatataaaaaaaatattgaacgatttgaaagaaaacaatgt 180
accgcgcgccggtatgtacaggaagagggttataactaaactgttacattgcaaacgtggtttcgtgtgccaagtgtgaaaaaccgattgttt 270
aatcaaggctctgacgcatttctacaaccacgactccaagtggtgggtgaagtcattgcatctttaaatacaaatcccaagatggtataaa 360
accacaaaactgccccaaaaatgaaaactgtcgacaagctctgtccgtttgctggcaactgcaagggctcaatcctattttgtaattattg 450
aataataaaaacaattataaatgctaaatttgttttttatacagatacaaaacaaacgcaacaagaacattttagtattatctataatt 540
gaaaacgcgtagttataaatgctgaggtatttataaatatttataaatgatttcaacagtttaatttgcgacaataaatttattttca 630
cataaactagacgcttgtctctcttctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct 720
ccatataatgtatctatcgtatagagtaaattttttgggtgcataaaatataatgtcttttttaattgggggtgatagtagccgctgcgca 810
gtttttctgtaatttacaacagtgctattttctggtagttcttcggagtggttgccttaatttataaatttataaatcaatgaatttg 900
ggatcgtcgggtttgtacaatatttggcgcataagtcacgactttctctcaattacaccattttttagcagcaaccggatataaca 990
taactttccaaaatgtgttacgaaccgttaaacaaaaacagttcacctccctttctatactattgtctgagcagctgtgtgtgtgtta 1080
aaaaaacagcatttgaatgagacgcacaactaatatcacaactggaaatgtctatcaatataatagttgctgatcatggagataa 1170
ttaaaatgataaccatctcgcaataaaatagtttttactggttttcgtaacagtttggtaataaaaaaacctataaaatcggatcccgg 1260
gaattcggactcggtagaccagatctctctagattcgaactcgaagcctcgaagcctcgaagcctcgaagcctcgaagcctcgaagcctcga 1350
tattaagcgttagattctgtgctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt 1440
tatgttagagcgaatacaaatgattttcagcgtctttatatactgaatttaaatataaatcctcaatagatttgtaaaatagggttcga 1530
ttagttcaaacagggtgtgttttccgaaccgtaggtgactatctaaatggatttcgctcaacgcccacaaaacttgccaaatcttgt 1620
agcagcaactcagctttgtcgaatatttggctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt 1710
ctttcatcactgctgttagtgtacaattgactcgacgtaaacacgtaaaataaagctggacataatttaacatcgggcggtgttagcttta 1800
ttagccgattatcgtcgtcgtcccaaccctcgtcgttagaagttgctccgaagacgattttgcatagccacacgacgctatataatt 1890
gtgtcggctaacacgctccgcgatacaaatgttagttgagcttttggaaattatttctgattgcccgggttttgggggggttcaactta 1980
actgtgcccgttttaattcagacacaacagcttagaaagcattgtgcaagcgttggaacatttcagacgcccacaaacttgacgccc 2070
gggtgtggagctgatgataaactaccatcgggtggaggcgcagggcgggctggcggcggaggcggaggcggagggtgtgtgtgtgtgtgca 2160
gacggcgggttaggctcaaatgtctcttttagcaacacagctcggcacctcaactatgtactggtttcgggcgcccgttttgggttgacc 2250
ggcttgagacgagtgccatttttctgttctaaatagcttccaacaattgtgtctgtctgcttaaaaggtgcagcgggttgaggttccgct 2340
ggcatgtgtggagcggggcggcaatcagacatcagatgggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt 2430
ggcgggtgccgcccgtataaattgttctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt 2520
ggctgtctgtctcgaggcagccttgggggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt 2610
atctcgtatcgtttaccggtccgataatttaaacaccgctcaatgtaagcaattgtatgttaagagattgtctcaagctcggatcgtatc 2700
ccgacgcccatacaaccctttcatttttactaacacagcttagaagcattgtgtgagacacttcgctgtcgtcgcctgatgcccgtatttct 2790
ttacgcatctgtgcccgtattttcacaccgcatacgtcaaaagcaaccatagtagcgcctgttagcggcattaaagcggcgggggtgtgtgt 2880
ggttacgcccagcgtgaccgctacacttgcagcggccttagcggcggcctctttcgtcttcttcccttcttctcgcaccgcttcgcccgg 2970
ctttcccgcgtcaagcttaaatcgggggctcccttttaggggttccgatttagtgccttacggcaccctcgacccccaaaaaacctgatttggg 3060
tgatgtttcagctagttggccatcgccctgatagacgggttttccgcttttgacgttggagtcacggttctttaaagtgagcttctgtt 3150
ccaaactggaacaaacactcaaccctatctcgggctattcttttgattataagggattttgcccgatctcggcctattgggtaaaaaatga 3240
gctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaaatttaacgtttacaattttatgggtgactctcagtaacaatctgctctgatgc 3330
cgcatagttaagcagcccgcacaccgccaacaccgctcagcggcctgacggcctgtctgctcccggcatccgcttacagacaagc 3420
tgtgaccgcttcggggagctgtgtcagaggttttcaccgctcaccgaaacgcgagacgaaagggcctcgtgatccgctatf 3510
ttttaggttaatgtcatgataaataatggtttcttagacgctcaggtggcacttttcggggaaatgtgctcgggaaccccctatttggttat 3600
tttcaaatacatcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagagtatgagat 3690
tcaaatttccggtgctgcccctattcccctttttgcccgaatttgcctctcctgttttgcctcaccagaaacgctggtgaaagttaaaga 3780
tgctgaagatcagttgggtgacaggtgggttacatcgaactggattcaccgctcaccagcggtaagatccttgagagtttccgcccgaagaac 3870
ttttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgggtattatcccgtattgacgcccggcaagagcaactcggctcggcgc 3960
acactattctcagaatgacttgggtgagtagctcaccagctacagaaaagcattctacggatggcatgacagtaagagaattatgagtagc 4050
tgccataaccatgagtgataaacactcggcccaacttactctgacaacgatcggaggcgaaggagcctaacgcttttttgcaacaat 4140
gggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccgagctgaaatgaagccataccaaacgagcgtgacaccacagatgcttgtagc 4230
aatggcaacaacgttgcgcaaacatttaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaataatagactggatggaggcggataa 4320
agttgcaggaccacttctgctcggccctcggcctgctgtgtttatgtctgataaactcggagccgggtgagcgtgggtctcggggtat 4410
cattgcagcactggggcagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatag 4500
acagatcgtgagataggtgctcactgattaaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcataatactttagattgatttaaaact 4590
tcattttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgaccaaaatcccctaacgtgagtttctgttccactgagc 4680
gtcagaccctgtagaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcccgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaacaccgct 4770
accagcgggtgggtttgttgcggatcaagagctaccaactctttttccgaaggttaactggcttcagcagagcgcagataccaataactgt 4860
ccttctagttgtagccgtagtttagccaccacttcaagaactctgtagcaccctacatacctcgtctgctaatcctgttaccagtgcc 4950
tgctgcccagtgccgataagctgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacggggg 5040
ttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagataacctacagcgtgagctatgagaaagcggcaccctcccga 5130
agggagaacggcggcaggtatccggtaagcggcagggctcggaaacggagagcgcaggggagcttccagggggaacaccgctggatct 5220
ttatagctctgtcgggtttcggccactctgacttgagcgtcgtattttgtgtgctcgtcagggggggcggagcctatggaaaacgcccag 5310
caacgccccttttacgggttctcggccttttgcctggccttttgcctcacatgttcttctcctgcttatcccctgattctgtggataaccg 5400
tattaccgctttgagtgagctgataccgctcggcgcagccgaacgacggcagcagcagctagtgagcggagggaagcgggaagcggcc 5490
aatacgcaaacggcctctccccggcgttggccgattcattaatgcaag ... 5538

```



Feature	Location	Size			Type
✓ AcMNPV	1 .. 1233	1233 bp			misc_feature
✓ baculovirus recombination region (lef2/ORF603)	327 .. 1154	828 bp			misc_recomb
/note	= contains ORF603 and part of lef2				
✓ lef2	327 .. 451	125 bp			CDS
/codon_start	= 3				
/product	= baculovirus late expression factor 2				
/translation	= HLLIKSQDVYKPPNCQKMKTVDKLPCFAGNCKGLNPICNY* 40 amino acids = 4,5 kDa				
✓ ORF603	489 .. 1094	606 bp			CDS
/product	= baculovirus ORF603 protein				
/translation	= MAVIFNNKQLLADNSIEKGGLFLFNGSYNILESYVNPVLLKNGVIELEEAAYAGNILYKTDKPFIDYINLIKATHSEELPENSTVVNYRKTMRSGTIHPKIKDIYIDNKKFTLYDRYIYGY DNNYVNFYEEKNEKEKEYEEEDDKASSLCENKIILSQINCESFENDFKYLLSDYNYAFSIIDNTTNVLVAFGLYR* 201 amino acids = 23,6 kDa				
✓ polyhedrin promoter	1158 .. 1249	92 bp			promoter
/gene	= <i>polh</i> from <i>Autographa californica</i>				
/note	= promoter for the baculovirus polyhedrin gene				
✓ Ppolyhedrin	1158 .. 1201	44 bp			misc_feature
✓ BAC1	1181 .. 1200	20 bp			primer_bind
/note	= Primer para secuenciación (Forward)				
✓ AcMNPV	1337 .. 2770	1434 bp			misc_feature
✓ baculovirus recombination region (ORF1629)	1337 .. 2694	1358 bp			misc_recomb
/note	= contains part of ORF1629				
✓ ORF1629	1353 .. 2694	1342 bp			CDS
/codon_start	= 2				
/product	= baculovirus capsid-associated protein				
/note	= required for viral replication				
/translation	= PSLRQSLYNTIAYIERLLNIGTVNDSEITMLIADFYDLYSNYNIELPPPQALPRSRPVVQPAAPAPVPTIVREQTKPEQIIPAAPPPPPSPV/PNIPAPPPPPPSMSELPAPMPMTEPQPAAP LDDRQQLLEAIRNEKNRRLRPVKPKTAPETSTIVEVPTVLPKETFEKPPSASPPPPPPPPPPAPPAPPPMVDLSSAPPPPLVDLPSEMLPPAPSLNVLSELKSGTVRLKPAQKRPOS EIIPKSSSTTNLIADVLADTINRRRVAMAKSSSEATSNDEGWDDDDNRPNKANTPDVKYVQALFNVFTSSQLYTNDSDERNTKAHNILNDVEPLLQNKQTQTNIDKARLLLQDLASFALSE NPLDSPAIGSEKQPLFETNRNLFYKSIEDLIFKFRYKDAENHLIFALTYHPKDYKFNELLYVQQLSVNQRTSSA* 446 amino acids = 49,2 kDa				
✓ BAC2	1355 .. 1374	20 bp			primer_bind
/note	= Primer para secuenciación (Reverse)				
✓ f1 ori	2841 .. 3296	456 bp			rep_origin
/direction	= RIGHT				
/note	= f1 bacteriophage origin of replication; arrow indicates direction of (+) strand synthesis				
✓ AmpR promoter	3578 .. 3682	105 bp			promoter
/gene	= <i>bla</i>				
✓ Amp(R)	3683 .. 4543	861 bp			CDS
✓ ori	4714 .. 5302	589 bp			rep_origin
/direction	= RIGHT				
/note	= high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication				







































```

... CGTA TTTATAGGTTTTTTTATTACAAAACGTACGAAAACAGTAAAATACTTATTTATTTGGCAGATGGTTATCATTTTAATTATCTCC 90
ATGATATCAGCACTATATATTGATAGACATTTCCAGTTTGTGATATTAGTTTGTGCTCTCATTACAATGGCTGTTATTTTTAAACAACA 180
AACCACTGCTCGCAGCAATAGTATAGAAAAGGGAGGTAAGCTGTTTTTGTAAACGGTTCGTACAACATTTTGGAAAGTTATGTTAATC 270
CGGTGCTGCTAAAAAATGGTGAATTTGAAC TAGAAGAAGCTGCGTACTATGCCGGCAACATATTGTACAAAACCGACGATCCCAAATTC 360
TTGATTATATAAAATTTAATAATTTAAAGCAACACACTCGAAGAACAACAGAAAATAGCATTGTGTAATTCAGAAAAACATATGCGCA 450
GCGGTACTATACACCCCAATAAAAAAGACATATATTTAGACAACAAAAAATTTACTATACGATAGATACATATAGGATACGATA 540
ATAACTATGTTAAATTTTTATGAGGAGAAAATGAAAAAGAGAAGGAATACGAAGAAGAAGACGCAAGGCGCTAGTTTATGTGAAAATA 630
AAATTATATTGTCGCAATTAACGTGAATCATTGAAAATGATTTTAAATATTACCTCAGCGATTATAACTACGCGTTTTCAATTATAG 720
ATAACTACTACAAATGTTCTTGTGCGTTTTGATCGTTAATAAAAAACAAATTTAGCATTATAAATGTTTTATTATCAATAAAT 810
ACAAATAGGATTGAGACCTTGACGTTGCCAGCAACGAGCAGTGTGCGACAGTTTTTCATTTTTTGGCAGTTTTGGTGGTTTTATAC 900
ATCTTGGGATTTGATTAAGAGTGCATGACTTCCACCCACACACTTGGAGTCGTGGTGTAGAAAATGCGTACAGCGCTGATTAAACATCG 990
GTTTTACACTTGGCACACGAAACCACGTTTGAATGTAACAGTTTAGTATAAACCTCTTCTGTACATACCGCCGCGCGGTACATTGTT 1080
TTCTTCAAATCGTTCAATATTTTTTTATACACGGAGGCATATAATCTTGTGTTTCAGCATGTCGACGACATTTTTCTTCTCTCTAC 1170
GCATTTCTTACATAAAATGTTCTCTTCTGCGTTTTTAAATTTGAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTT 1260
ATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGCGTTTTGCGTATTGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTGCGTCTGCTTCCG 1350
GCTGCGGGGAGCGGTATCAGCTCAAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAA 1440
AGGCCAGCAAAAGCCAGGAACCGTAAAAAGGC CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCG 1530
ACGCTCAAGTCAAGAGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACGAGCGTTTTCCCGCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCC 1620
GACCTCGCGCTTACCGGATCCTGCTCCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTC 1710
GGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAACCCCGTTTCCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGA 1800
GTCCAAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGTTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGA 1890
GTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAG 1980
AGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGTAGCGGTGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAGG 2070
ATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATC 2160
AAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTTAAATTAATAAAGAAATTTAAATCAATTAAGATATAATGAGTAAACTTGGCTGACAGTTA 2250
CCAATGGTTAATCAGTAGGACACTCTCAGCGATCTGTATTTTCCGTTTATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTGCTGTAGATAACTAC 2340
GATACGGGAGGGCTTACCATTGCTGGCCCAAGTGTGCAATGTATACCCGAGACCCACGCTCACGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCA 2430
GCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAG 2520
TAGTTGCGCAATTAATAGTTTGCACAACCTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGTGTCACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAG 2610
CTCCGGTTCCCAACGATCAAGCGAGTTACATGATCCCTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCTGCTCCGCTCCGATCGTTGTCAG 2700
AAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTACTGTCAATCCGATCCGTAAGATGCTTTTCTGT 2790
GACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGGGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGC 2880
GCCACATAGCAAACTTTAAAGAGTCTCATCTATTGAAAACGTTTCTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAG 2970
TTCGATGTAACCCACTCGTGCACCAACTGATCTTCAGCATCTTTTCCAGTCTTTTCCAGCGCTTTCTGGGTGAGCAGCAAGGAAAGCA 3060
TGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCA TACTCTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTTACAGGGTTA 3150
TTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTCCACCTGA 3240
CGTCTAAGAAACCATTTATATCATGACATTAACCTGATAAAAAATAGGCTATCACGAGGCCCTTTCTGCTCGCCGCTTTCCGGTATGACGG 3330
TGAAAACCTCTGACACATGCAGTCCCGGAGACGTTACAGCTTGTGTAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTC 3420
AGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGCACCAATAAAATTTGAACGTTAA 3510
TATTTGTTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAA 3600
AGAATAGCCGAGATAGGGTTGAGT TTTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCAAAGCTCAAAAGGGCGAAA 3690
AACCGTCTATGAGGGCGATGGCCACTACGTAACCTACCCAAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCGGTAAGCACTAAATCGGAA 3780
CCCTAAAGGAGCCCGCGATTTAGAGCTTACGCGGGAAGCCGCGCAAGCTGGCGAGAAAGGAAAGGAAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGC 3870
TAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCGTGCAGCTGACCCACACCCGCGCGCTTAATGC GCGCTACAGGGCGGCTACTATGGTTG 3960
CTTTGACGTATGCGGTGTGAATACCCGCACAGATCGTAAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGACGACAGCGAAGTGTCTGCGCACTACA 4050
TGCTGTAGTAAAAATGAAAAGCTTGTATCGCGCTGGGGATCGATCCGAGCTTGAGACAATCTTTTACAATACAATGCTTACATTT 4140
AGCGGTTGTTAAATATCGGCACGGTAAACGATAGCGAAATTAACAATGCTTATAGCAGATTTTTACGATTTGATTTCAATATAAATTTG 4230
AATTGCCACCACCCCAAGCGCTGCTCGAAGCAGACGACCTTCCGTTGTGACGCCAGCGGCGCTGCGCCGGTGCCACAATCGTGCAGCG 4320
AACAACATAACAGAAACAAATATACCCGCGGACCCGCGCACCCCTTCTCCGCTGCCTAACATTTCCAGCGCTCCACCACCACCAC 4410
CACCATCGATGCTGAATTTGCGGCGCTCCACCAATGCCGACGAACTCAACCCGCTGCACCTTTAGACAGCAGACAACAATTTGTGG 4500
AAGCTATTAGAAACGAAAAAATCGCACTCGTCTCAGACCGGTCAAAACCAAAAAAGCGCGCCGAAACAGTACAATAGTTGAGGTGCCGA 4590
CTGTGTTGCCTAAAGAGACATTTGAGCCTAAACCGCGCTGTCATCACGCCACCACCTCCGCTCCGCTCCGCGCCAGCCCGCGCTG 4680
CGCTCCACCGATGGTAGATTTATCATCAGCTCCACCACCGCCATTAAGTAGATTTCCGCTGTAATGTTACACCCGCTGCACCAT 4770
CGCTTCTAAGCTGTGTCTGCTGAAATAAAATCGGGACAGTTAGATTTAAACCCGCAAAACCGCCGCAATCAGAAAATTTCCAAAAA 4860
GCTCAACTACAATTTGATCGCGGACGTGTAGCCGACACAATTAATAGCGCTGCTGTGGCTATGGCAAAATCGTCTTGGAAAGCAACTT 4950
CTAACGACGAGGGTTGGGACGACGACGATAATCGGCCTAATAAAGCTAACACGCCGATGTTAAATATGTCCAAGCTTGGTACCATGTTT 5040
TTTAAACAAGATCTCAGCGGGTCCGGAGCTGCTTATATTGACCGTTTTTGGATTTGGTGTGACCACGCAATTTTTCGATCTTTTACAA 5130
GTCTCCATTTCAAATTTGAAATGCTTATGATGGGTACCGCTACGATTTTGGTTGCTAATAGCAAATCAATATGTAAGAGAGCG 5220
TGGCGGAGCATATTTGCCGATAGATATCAATTTTTTAGATCTACCAAAATGGAACGTTATCTAACAAAACACGGTCTTTGGACCACAATG 5310
TATTCACAAATTTACTGATATCAATATTTGTTCTCGGCCAGAACTCTTTTCCGCTTGGCCAGAGTTTGAAGAACTATTAATTTTA 5400
TCTCTAAATTTAAATACAAAACACGGAGAAGATGGGTTAGAGAGTTAAATCGCTCATTTAGACGAAAGCAGATTTGAAATGGTATTTGAG 5490
AGCGGTCAAATCTCTCTTTGCTGCGGAACTACGCTATGATCTTTATTTTAAATGATTTTAAAGATTTTAAAGATTTTAAAGATTTTAA 5580
GACTATTACATGCATTACACCAACGCTGACAATAAATTTTAAACCTACTATCATCAGTATGAAAGGTTGGCTCGGAATAAACAATGC 5670
TTGAATAGTCTAAACAGTGAATTAACAATAATGCTCTCGAAAGCTATTCAGACCATTAATTAACAACATATTACGACACCCAGTTTCG 5760
TTGGTTACCCCAACGGACGTTTTTACCCTATAATAACGGTTTCCGACCATTTTAAATTTAGAGCGGTCAGTGGTACACATATTTTAAAC 5850
GACTTAGTTGGTAAACAATCAATTTAATAAGACGGTACTGTTGGTTGAAAGATGTATAAATCGTCTTGGTACACGAGCTATGCCGTTG 5940
GCGAGACAGCGCACTGTTACAATGGACAGGACTACTATTGGCCGGTGGACGGTGGCCGATCAAGGATGAGGGGTGTCGCGCTGCCTT 6030
CAACAGCTTACACTAGGAACGGTAACAATAGTGTGCGGCACAGGCCATGTTCAACGAGAAGCAGAGTATGCCGCAATGGCGGGAAAA 6120
GATTATAGGAATTTGACACACATTAAGGAGAGTGTGGTGCACAAATTTTATGTTGGCGGGGCTGCAACCGCTAGGCTAGGTTGGT 6210
GACAAGTGGGATGGACACGGTGAATGTGACGTGGCGCAAAACACTGTGCTTACAAAGAGCGGTGACACTTTTTATTTTTGTCGGACC 6300
GCCGTGCACGAACCTGGCTACTTTGAGGTGTATGTGTCCGAGAAGGTTATGATGCGGGCAAAAGTAGTTGCAAGTGGTCCGATTTGGAG 6390
TTGGTGTACAGTAAATACGTTCAATTTGGTGAACCAAGAAATTTGGACTGTGTAGTAGTGAATGACGAGTTGAGGGATGTGAAAAT 6480
CCGTTAAGGAGTGGTGGTTGTGATGTGAGATGGCAAGGAGGATGTGGCGGAGGGTTTTCTATAAATTTGTTGGATGTTGTT 6570
CACAAGCAAAACGAAAGATGTTTTGAGCTCGCGGAGGCGAAGCATCAGCTCATCTTGTATGACGCGCAACAACACTATGTTTGAC 6660
GACGCGTGGTCAATGTGGATTGACGCGACTACATTTTTCAAACCTTAAATGCGGTTGTCCAGCTTTCAACAGCTGTTGTTTTCCATT 6750
CCGTGAAAACCGCAAGATGATAAACGATATCGGCAATCGCCGCTTGTTCGTTTCCACCTTCAATAACAGCGTCAAGTACATGGTG 6840
GACATTTACGGCCCGCGGTTGACAAATGCTTGCCTGCTGTTGTTTTCCGACAGTTGCTCACCCAGTTTTATTGCAATAAATATATG 6930
AGCTTTTGAACCGCAACCGCGGTGCCAACACCACCGTGCACACCGCAAAACCGCGCGTTGATTTGCTTCAAAGCAAAATTTGGAG 7020
GCGTTGGAAAACTGGCGCACCAAAATGACCTGCTCATCAACAGCGTCAACCAAAATTTGCTAAATCAATCCAACCAATTTCTAGAAATG 7110
CGCAGCGAGTACGCGCAGATTTGGCCGCGTTGGAAAGCGCAAAAGACACAATTAACCGTCTCAACGTTTGTAGTGGATAAATAAA 7200
GCCGCGTTGCTGACCAAGTCCGCTCAGCTGACGGAACAATTTGACAAATTTGTTGAAAGCAATCAACGTTGGTGGCAACGTTTACGCG 7290
GAAATGAACAACCAACTCTATTTTGAACCAACTTTGGCTCCAGCATACCAACATTAACAGTACATTAACAATTTGTTGAATGCCATC 7380
GAAGGCATAACGGCGGCGAAGGCGCGGATTTGGGTGACGCGGACCGTCAAAAGTTGAGCGAGTGTCTGATCTGGTACCGGAAATAAGA 7470
AGCATTTTGTGAGGGCAGTCGAAAAGGTAAGCTATCCCTAACCTCTCTCGGTCTCGATTCTACGTAAGGATC ... 7544

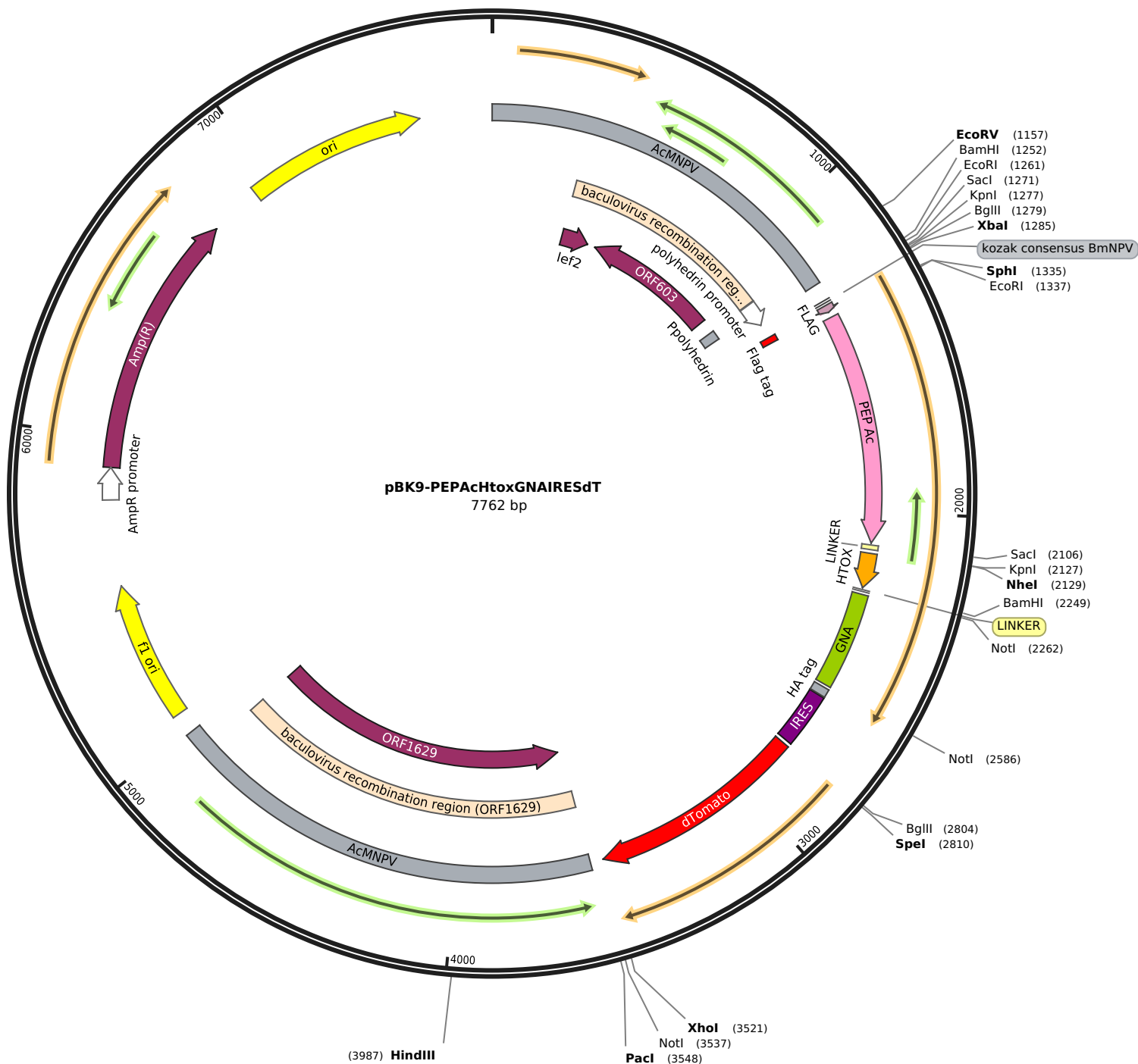
```



Feature	Location	Size			Type
miscellaneous	1 .. 7544	7544 bp			misc_feature
/note	= /comment=Molecule is created with Unipro UGENE v1.32				
/note	= /ugene_name=source				
✓ PH_promoter	5 .. 105	101 bp			promoter
/label	= PH_promoter				
/note	= /translation=MAVIFNNKQLLADNSIEKGGELFLFNNGSYNILESYVNPVLLKNG VIELEEAAAYAGNLYKTDDPKFIDYINLIKATHSEELPENSTVVNYRKTMRSGTIH PIKKDIYIDNKKFTLYDRYIYGYDNNYVNFYEEKNEKEKEYEEEDDKASSLCENKII LSQINCESFENDFKYLLSDYNYAFSIIDNTTNVLFVAFGLYR*				
✓ polyhedrin_fwd_primer	62 .. 79	18 bp			misc_feature
/label	= polyhedrin_fwd_primer				
/note	= /translation=MAVIFNNKQLLADNSIEKGGELFLFNNGSYNILESYVNPVLLKNG VIELEEAAAYAGNLYKTDDPKFIDYINLIKATHSEELPENSTVVNYRKTMRSGTIH PIKKDIYIDNKKFTLYDRYIYGYDNNYVNFYEEKNEKEKEYEEEDDKASSLCENKII LSQINCESFENDFKYLLSDYNYAFSIIDNTTNVLFVAFGLYR*				
✓ Ac_5_flank	106 .. 1252	1147 bp			misc_feature
/label	= Ac_5_flank				
ORF frame 2	159 .. 764	606 bp			CDS
/label	= ORF frame 2				
/translation	= MAVIFNNKQLLADNSIEKGGELFLFNNGSYNILESYVNPVLLKNGVIELEEAAAYAGNLYKTDDPKFIDYINLIKATHSEELPENSTVVNYRKTMRSGTIHPIKKDIYIDNKKFTLYDRYIYGYDNNYVNFYEEKNEKEKEYEEEDDKASSLCENKII LSQINCESFENDFKYLLSDYNYAFSIIDNTTNVLFVAFGLYR* 201 amino acids = 23,6 kDa				
✓ pBR322_origin	1474 .. 2093	620 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
/label	= pBR322_origin				
/note	= /translation=MSIQHFRVALIPFFAAFLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGY IELDLSNGKILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRRIHYSQNDLVE YSPVTEKHLTDGMTVRELC SAAITMSDNTAANLLTTIGGPKELTAF LHNMGDHTVRL DRWEPENEAIPNDERDTT MPMVAMATTLRKLTTGELLTLASRQQLIDWMEADKAVAGPL LRSALPAGWFIADKSGAGERSGRIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIA EIGASLIKHW*				
✓ ORF frame 2	2248 .. 3108	861 bp			CDS
/label	= ORF frame 2				
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLSNGKILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRRIHYSQNDLVEYSVTEKHLTDGMTVRELC SAAITMSDNTAANLLTTIGGPKELTAF LHNMGDHTVRL DRWEPENEAIPNDERDTT MPMVAMATTLRKLTTGELLTLASRQQLIDWMEADKAVAGPLLR SALSALPAGWFIADKSGAGERSGRIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW* 286 amino acids = 31,6 kDa				
Ampicillin	2248 .. 3108	861 bp			gene
/gene	= Ampicillin				
/label	= Ampicillin				
/note	= /translation=MLIADFDYDLYSNYIELPPQALPRSRPVSVPQAPAPVPTIV REQTKPEQIIPAPPPPPSPVNPAPPPPPPSMSELPPAPMPTEPQAPALDDRQ QLLEAIRNEKNRTRLRPVKPKTAPETSTIVEVPTVLPKETFEKPPSAPPPPPPPP PPAPPAPPPMVDLSSAPPPPLVDLPSEMLPPPAPSLSNVLSSELKSGTVRLKPAQKRP QSEIIPKSSTTNLIADVLDATINRRRVAMAKSSSEATSNDEGWDDDDNRPNKANTPDV KYVQALFNVFTSSQLYTNDSDERNTKAHNILNDVEPLLQNKQTQTNIDKARLLLQDLAS FVALSENPLDSPAIGSEKQPLFETNRNLFYKSIEDLIFKFRYKDAENHLIFALTYHPK DYKFNELLYVQQLSVNQQRTESSA*				
✓ AmpR_promoter	3150 .. 3178	29 bp			promoter
/label	= AmpR_promoter				
/note	= /translation=MLIADFDYDLYSNYIELPPQALPRSRPVSVPQAPAPVPTIV REQTKPEQIIPAPPPPPSPVNPAPPPPPPSMSELPPAPMPTEPQAPALDDRQ QLLEAIRNEKNRTRLRPVKPKTAPETSTIVEVPTVLPKETFEKPPSAPPPPPPPP PPAPPAPPPMVDLSSAPPPPLVDLPSEMLPPPAPSLSNVLSSELKSGTVRLKPAQKRP QSEIIPKSSTTNLIADVLDATINRRRVAMAKSSSEATSNDEGWDDDDNRPNKANTPDV KYVQALFNVFTSSQLYTNDSDERNTKAHNILNDVEPLLQNKQTQTNIDKARLLLQDLAS FVALSENPLDSPAIGSEKQPLFETNRNLFYKSIEDLIFKFRYKDAENHLIFALTYHPK DYKFNELLYVQQLSVNQQRTESSA*				
✓ pGEX_3_primer	3337 .. 3359	23 bp			misc_feature
/label	= pGEX_3_primer				
/note	= /translation=MLIADFDYDLYSNYIELPPQALPRSRPVSVPQAPAPVPTIV REQTKPEQIIPAPPPPPSPVNPAPPPPPPSMSELPPAPMPTEPQAPALDDRQ QLLEAIRNEKNRTRLRPVKPKTAPETSTIVEVPTVLPKETFEKPPSAPPPPPPPP PPAPPAPPPMVDLSSAPPPPLVDLPSEMLPPPAPSLSNVLSSELKSGTVRLKPAQKRP QSEIIPKSSTTNLIADVLDATINRRRVAMAKSSSEATSNDEGWDDDDNRPNKANTPDV KYVQALFNVFTSSQLYTNDSDERNTKAHNILNDVEPLLQNKQTQTNIDKARLLLQDLAS FVALSENPLDSPAIGSEKQPLFETNRNLFYKSIEDLIFKFRYKDAENHLIFALTYHPK DYKFNELLYVQQLSVNQQRTESSA*				
✓ f1_origin	3627 .. 3933	307 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
/label	= f1_origin				
/note	= /translation=MLIADFDYDLYSNYIELPPQALPRSRPVSVPQAPAPVPTIV REQTKPEQIIPAPPPPPSPVNPAPPPPPPSMSELPPAPMPTEPQAPALDDRQ QLLEAIRNEKNRTRLRPVKPKTAPETSTIVEVPTVLPKETFEKPPSAPPPPPPPP PPAPPAPPPMVDLSSAPPPPLVDLPSEMLPPPAPSLSNVLSSELKSGTVRLKPAQKRP QSEIIPKSSTTNLIADVLDATINRRRVAMAKSSSEATSNDEGWDDDDNRPNKANTPDV KYVQALFNVFTSSQLYTNDSDERNTKAHNILNDVEPLLQNKQTQTNIDKARLLLQDLAS FVALSENPLDSPAIGSEKQPLFETNRNLFYKSIEDLIFKFRYKDAENHLIFALTYHPK DYKFNELLYVQQLSVNQQRTESSA*				
✓ Ac_3_flank	4028 .. 5003	976 bp			misc_feature
✓ ENH AgseGV	5035 .. 5919	885 bp			misc_feature
/note	= /ugene_name=ENH				
✓ GP37 CpGV	5932 .. 6594	663 bp			misc_feature
/note	= /ugene_name=gp37				
✓ PEPAg	6631 .. 7494	864 bp			CDS
/translation	= MTPNNNVMFDDASVMWIDADYIFQNSKMPLSTFQQLLSIPSXHRKMINDIGNPPSCSFPPSNNTVKYMVDIYGAAVLTMRCPSLFSQDQLLTTFIANNYSFCNRQRPCQPPPCQPQTP PFDCVQKQIVDALEKLAHQNDLLINSVNOISLQSNQFLERLTQYAQIMAALAESAKDITILNRLNVLDEIKAALPDQSAQLQEIQDKLLEAINVVAQTLRSEMNTNSILTNLASSITNINS TLNLLNAIEGITGGEGGLGDADRQKLSVDLVLTEIRSILMGSRK 288 amino acids = 32,0 kDa				

	Feature	Location	Size			Type
✓	V5 tag	7495 .. 7536	42 bp			misc_feature

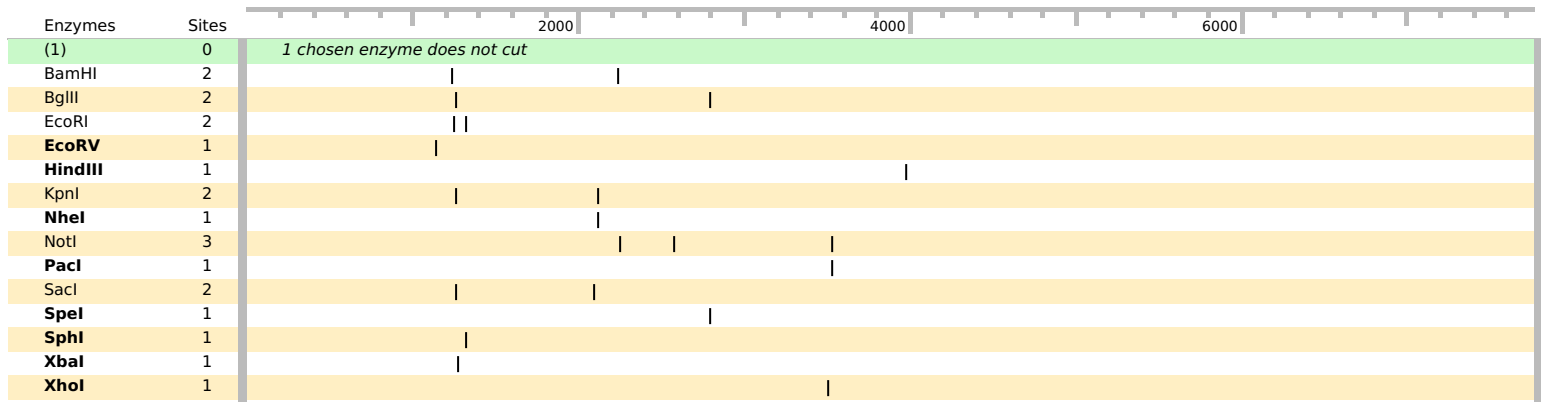
10 features are not displayed



























































```

... aacgctccgcccactattaatgaaattaaaaatccaattttaaaaaacgcagcaagagaacatttggatgaaagaatgctgtagaag 90
aaagaaaaatgctgctgacatgctgaacaacaagattaatattgctcctggtataaaaaaaatattgacagatttgaagaaacaatg 180
accgcggcggtatgtacagagaaggtttatactaactgtttacatgtcaaacggtgtttcgtgccaagtgtgaaaaccgatgttt 270
aatcaaggctctgacgcatcttcaaccacgactccaagtggtggtggaagtcacatctttaaatacaatcccaagatggtataa 360
accacaactcccaaaaaatgaaaactgctgacaagctctgtccgtttgctggcaactgcaagggctcaatcctatttgaattatt 450
aataataaaaaatgataaattgtaattgttttttaacgatacaaaacgaacaagaacattttagtattattctataatt 540
gaaaacgcgtagttataatcgtctgaggttaattttaaatactttcaaatgattccacagtttaatttgcgacataataattttca 630
cataaactagacgcttgtctcttctctcttctcttttctctctcataaaaaataacatagttattatcgtat 720
ccatataatgatactatcgtatagagtaaatttttgtgtcataaataatattgcttttttaattgggggtgatagtagccgctg 810
gttttctgtaatttacaacagtgctattttctggtgcttctcggagtggttcttaatttataaatcaatgaattt 900
ggatcgtggtttgtacaatatgttgcggcatagtagccagctctctagtttcaattacaccatttttttagcagaccggat 990
taactttccaaaatgtgtgacgaaccgttaaacaaaaacagttcaccctcctttctatactattgctgagcaggtgtgtgtg 1080
aaaaataacgacattgtaatgagacgcacaacataatatacaaaactggaattgctatcaatataatagttgctgatatac 1170
ttaaataagataaccatctcgcaataaataagttttactggtttctgtaacagtttgaatataaaaaaacataaatacggatccc 1260
gaattcagagctcggtagaccagatcttCTAGAAAAAatcaccatggggcgtatataaggtgacgacgataaagGCATGCGAATTC 1350
GCCGACGAATAACGTTATGTTTCGACGACGCGTCCGTCCTTTGGATCGACACGGACTACATTTATCAAAATTTAAAAATGCC 1440
GTTTCAACAACATTTTGTCCACCATTTCCATTAACATAGAAAAATGATCAACGATCGGGCGGATCGTGTCTAACACGGTCAA 1530
GGTGGACATTTACGGAGCGCCGTTCTGGTTTTGCGAAGCCCTTGCTGTTGCCGACCAAGTTGTTGAGCACATTTTATGCAAA 1620
TTTGTACTACTTTTACCGTCGTCGCCGATACAGTACAGCTCACGATCACGCTCGCGATCACGTTCTCCTCATTTGCAGACCT 1710
CTCTCCTCATTGACAGACCTCGTTCGCGATCTCGGTCCCGGTCgAGATCGCGGTACGTTTCATCGTCTCCAGGCGAGGGCG 1800
ATTCGACGCGTGGAAAAGATTGCTCATCAAAACGACATGTTGATGAGCAACGTAACCAAAATAATCTCAACCAAACTAATCA 1890
AGAATTGCTCAACATGATGACGGGCGCGCAATCAAAACGTCAGCTCTCGCGGTTGGAACCGCTAAAGATGTTATTTGACC 1980
ATTAACACATATGCTGCGAGATTACAGACTCGTTACCAGACTGACTGACGCTCCATGTTAGATAAATTAGCTGAACAATTT 2070
CAACACGGTGCAGCAAACCTGCGCAACGAGTgAGCTCGGCGGAGGCGGAAGCGGTACCGTAGCagccccacctgcatccccagc 2160
GCCCTGCCCTACACAGAGAAGCTGCTGCAGCCAGAGCTGCACCTTCAAGGAGAACGAGAACGGcaaccaccgtgaagcgctgc 2250
ATCCGCCGCTGCGGCGCTgacaatatttggactcgggtgagactctctacaggggaatttctcaactacggaagtttctgttt 2340
catgcaagaggatcgaactcgttctgtacgacgtggcaagccaatctgggcaacaacacaggtggtctctccgtagctctct 2430
cagcctgcagactgatgggaacctcgtggtgtacaaccatcgaacaaaccgatttgggcaagcaacactggaggccaaaatgg 2520
cgtgtgcatcctacagaaggataggaatgttggatctacggaactgatcgttgggctactggaGCGGCGCAtatccttacgac 2610
tgactacgcttaaacctggcttactgtaacagaaaaagatgaaaggcagacgctcgttgcacattgtctgttactctgtgt 2700
tttcaagaggttctcaccacaaaggttaacctttttttgtcctcgcgcacaaacacacatcttaataaccacgaaccgttc 2790
aaaaaacctcgtcAGATCTACTAGTatggtgagcaagggcgaggaggtcatcaagagttcatgctcgttcaaggtgcgcatg 2880
catgcaagggccacgagttcagatcagggcgagggcgagggcccgccctacagggcaccagaccgcaacgtgaaggtgacaa 2970
cggcccttgccttgcctggacatcctgtccccagctcatgacggctcaggtcgaagggcagcccgccgacatccccga 3060
ttacaagaagctgtccttccccgagggctcaagttggagcgcgtgtgaacttcgaggacggcgtctggtgaccgtgaccagg 3150
ctcctcgcaggacggcagcgtgatctacaaggtgaagatgcgcgccacaaacttccccccgacggcccgtaatgcagaaga 3240
gggctgggagggctccaccgagcgtgtacccccgcagcggcgtgtgaagggcgagatccaccagggcctgaagctgaagga 3330
ccactaccgttggagttcaagaccatctacatggcaagaagccctgcgaactcggcctactactgagaccacaaagctggac 3420
caccctccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtagcagcgtccgagggccgcccaccacctgttctctgaccggtg 3510
gtacaagtaaCtcgagggcctgcagggcgccgcttaattaatgattcgggttattagtacatttataagcgtagattctgtg 3600
ttgatttacagacaattgttgcagttttaaataatcattaaatttataatcttaggggttatgttagagcaaaaatcaaatg 3690
ttcagcgttttataatgtaattaaataatcctcaatagattgtaaaataggtttcgtatagtttaacaacagggttgttttc 3780
cgaaccgatggctggactatctaatgatttctgctcaaccacaaacattgccaatctttagcagcaatctagcttctgata 3870
cgtttgtgttttgtttgtataaagggttcgacgtcgtcaaaaatattatgctcttgtatttcttctacactgctgttaggt 3960
ttgactcgacgtaaacacgtttaaataaagcttggacatattaaactcgggctgttagctttataggccgatatacgtcgt 4050
accctcgtctgtagaagttgcttcgaagacgattttgcatagccacacgacgctatfaatgtgtcggcgaacacccgca 4140
atgttagttgagcttttgaattttctgattgctggggcgttttggcggggttcaatcctaactgtgcccgattttaattc 4230
cacgttagaaagcagtggtgacggcgggtgtaacattcagacggcaacttactaatggcggcggtggtgagctgatgataa 4320
catcgttgagggcgagggcgggctggcggcgagggcgaggggtggtggcggtgatgacagcggcggtttaggctcaaat 4410
tttaggcaacagctggccacctcaactatgtactggtttcgggcccgttttggttgacggcttgagacgagtgcattttt 4500
gtttcctaataagctccaacaattgttctgtctcaaaaggtgcagcgggttgaaggttccgtcggcatgtgtgagcggcg 4590
agacatcgatggtggtggtggtggtgagggcgtggaatgttaggcacgggagaaggtggtggcggcggtgcccgggtata 4680
tggtttagttgttcgacacgatgtgggcacggcgacggcggcctggctgcaaacgggaaggtcgtcgtctcagggcagcg 4770
gggtggtggcaattcaattataatggaatacaaaactgtaaaaactgctataagcattgtaatttctgatactgattaccg 4860
atttacaacaccgctcaatgtaagcaattgtatgtaaagagattgtctcaagctcgatcccgacggcagataacaagcct 4950
ttttactacagcattgtagtggggagacacttccgtctcgtcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtat 5040
cgcatacgtcaaaacacacatagtagcggcctgtagcggcattaaagcggcggggtgtgtgtgttacgcgcagcgtgaccg 5130
ttggcagcggcctagcggccgctcctttcgtcttcttcccttctctcgcacagttcggcggcctttcccgtcaagcttaaat 5220
ggctcctcttagggttccgatttagtgctttacggcacctcgaaccccaaaaaactgatttgggtgatggttcaagtagtg 5310
cctgatagacgggttttccgctttagcgttggagttccacgttctttaaataagtgagctcttgttccaaactggaacaac 5400
tctcggctattcttttgaattataagggattttggcgtattcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaat 5490
attttaacaaaaattaacggttacaatttatggtgactctcagtaacatctgctctgagccgcatagttagccagcccgac 5580
cgccaaccccgctgacgcccctgacgggcttctgtctccggctcggcttacagacaagcttgaccgcttccgggagctgcat 5670
gtcagaggttttaccgctcatcaccgaaacgcgagacgaaagggcctcgtgatagcctattttataggttaatgtcatgata 5760
tggtttcttagacgtcaggtggcacttttcgggaaattgtagcggaaaccctatttggttatttttcaataacattcaaat 5850
cgctcatgagacaataaacctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagatagtagtatacaactcctgctgcccct 5940
cctttttgcggttttgccttctgttttgcctaccacagaacgctggtgaaagttaaagattgctgaagatcagttgggtg 6030
tgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttctgcccgaagaacgtttccaatgatgagcact 6120
ttctgctatgtggcggcgttatctccgtattgacggcgggcaagacacactcggctcggcataacatactcagaatgact 6210
agtactaccagtcacagaaaagcattctacgattgcatgacagtagagaattatgcagctgcccataaacatgagtgataa 6300
cggccaacttactctcgaacacgatcggaggacggaaggactaacccgtttttgcacaacatgggggatcgaactgacct 6390
gttgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgctgtagcaatggcaacacagttg 6480
taactggcgaacttacttactgcttcccggcaacaattaatagactggatggagcgggataaagttgacagaccacttgc 6570
ccctcggctgctgttttattgctgataaactggagcgggtgagctgggtctcgggtatcattgacagcactgggcccag 6660
agccctccgctatcgtagttatctacacgaggggactcaggcaacttggatgaacgaaatgacagatcgtgagatggtc 6750
tgattaagcattggttaactgtcagaccaagttactcataatatactttagattgattttaaactcatttttaatttaa 6840
tgaagatccttttgaataatctcatgacaaaaatccttaacgtgattttcgtttccactgagcgtcagaccctgagaaa 6930
gatcctcttgagatcctttttctgctgctaatctgctgcttgcacaaacacacccgctaccagcgtgtgtttgtttgc 7020
aagagctaccaactccttttccgaaggttaactggcttccagagcgcagatacacaactctgctctctagttgagcgt 7110
accacttcaagaactctgtgacaccgctacatacctcgtctgcttaactctgttaccagttggctgctgcccagtg 7200
ttaccgggttggactcaagcagatagttaccggcaaaagcgcagcggctcgggctgacgggggttctgtgcaacacag 7290
gaacgactacacccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaagcggccacgcttcccgaagggagaaagcgg 7380
taagcggcaggggtcgaacaggaagcgcagcaggggacttccaggggaaacgctgggtatctttatagctctg 7470
tctgacttgagcgtcgatttttggatgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaacgcccagcaacgcccctttt 7560
ccttttctggccttttctcactatgttcttctcgtcttaccctgattctgtggataaccgctattaccgctttgag 7650
ccgctcggcagccgaacgacgagcgcagcagtcagtgagcgggaagcgggaagcggcccaatacgcacaaccgctct 7740
gttggccgattcattatgacg ... 7762

```



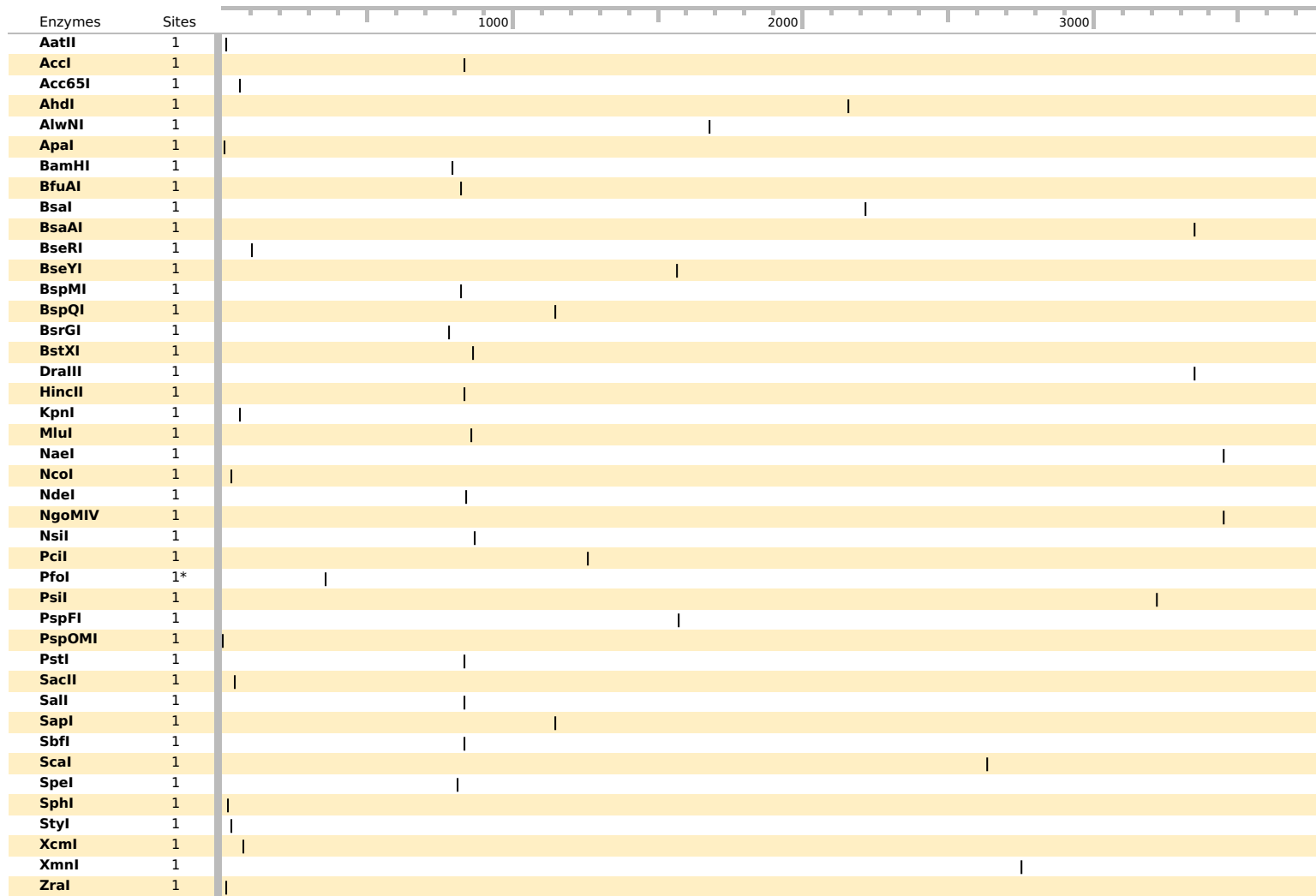
Feature	Location	Size			Type
✓ AcMNPV	1 .. 1233	1233 bp			misc_feature
✓ baculovirus recombination region (lef2/ORF603)	327 .. 1154	828 bp			misc_recomb
/note	= contains ORF603 and part of lef2				
✓ lef2	327 .. 451	125 bp			CDS
/codon_start	= 3				
/product	= baculovirus late expression factor 2				
/translation	= HLLIKSQDVYKPPNQCQMKMTVDKLCPFAGNCKGLNPICNY* 40 amino acids = 4,5 kDa				
✓ ORF603	489 .. 1094	606 bp			CDS
/product	= baculovirus ORF603 protein				
/translation	= MAVIFNNKQLLADNSIEKGGELFLFNNGSYNILESYVNPVLLKNGVIELEEAAYAGNILEYKTDKPKFIDYINLIKATHSEELPENSTVVNRYKTMRSGTIHPKIDYIYDNKKFTLYDRYIYGY DNNYVNFYEEKNEKEKEYEEEDDKASSLNCENKILSQINCESFENDFKYLLSDYNYAFSIIIDNTTNVLFVAFGLYR* 201 amino acids = 23,6 kDa				
✓ polyhedrin promoter	1158 .. 1249	92 bp			promoter
/gene	= <i>polh</i> from <i>Autographa californica</i>				
/note	= promoter for the baculovirus polyhedrin gene				
✓ Ppolyhedrin	1158 .. 1201	44 bp			misc_feature
✓ BAC1	1181 .. 1200	20 bp			primer_bind
✓ kozak consensus BmNPV	1291 .. 1298	8 bp			misc_feature
/note	= paper Effect of ATG initiation codon context motifs on the efficiency of translation of mRNA derived from exogenous genes in the transgenic silkworm, <i>Bombyx mori</i> Ken-ichiro Tatematsu*, Keiro Uchino, Hideki Sezutsu and Toshiki Tamura				
✓ FLAG	1307 .. 1330	24 bp			CDS
/product	= FLAG® epitope tag, followed by an enterokinase cleavage site				
/translation	= DYKDDDDK 8 amino acids = 1,0 kDa				
✓ Flag tag	1307 .. 1330	24 bp			misc_feature
✓ PEP Ac	1349 .. 2101	753 bp			misc_feature
✓ LINKER	2108 .. 2122	15 bp			misc_feature
✓ HTOX	2135 .. 2248	114 bp			misc_feature
✓ LINKER	2255 .. 2260	6 bp			misc_feature
✓ GNA	2270 .. 2584	315 bp			misc_feature
✓ HA tag	2594 .. 2620	27 bp			misc_feature
✓ IRES	2624 .. 2803	180 bp			misc_feature
✓ dTomato	2816 .. 3517	702 bp			CDS
/translation	= MVSKGEEVIKEFMRFKVVRMEGSMNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQAKLVTKGGPLPAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKLSFPEGFKWERVMNFEDGGLVTVTQDSSLQDQ TLIYKVKMRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASTERLYPRDGVLKGEIHQALKLKDGGHYLVEFKTIYMAKPKVQLPGYVYVDTKLDITSHNEDYTIVEQYERSEGRHHLFLYGMDELYK 234 amino acids = 27,0 kDa				
✓ AcMNPV	3561 .. 4994	1434 bp			misc_feature
✓ baculovirus recombination region (ORF1629)	3561 .. 4918	1358 bp			misc_recomb
/note	= contains part of ORF1629				
✓ ORF1629	3577 .. 4918	1342 bp			CDS
/codon_start	= 2				
/product	= baculovirus capsid-associated protein				
/note	= required for viral replication				
/translation	= PSLRQSLYNTIAYIERLLNIGTVNDSEITMLIADFYDLYSNYNIELPPPQALPRSRPVSVVQPAAPAVPTIVREQTKPEQIIPAPPPPPSPVNPAPPPPPPPSMSELPPAPMPTEPQPAAP LDDRQQLLEAIRNEKNRRLRPVKPKTAPETSTIVEVPTVLPKETFEKPPSASPPPPPPPPPPAPPAPPPMVDLSSAPPPPLVDLPSEMLPPPAPSLSNVLSLKGSTVRLKPAQKRPOS EIIPKSSTNLIADVLADTINRRRVAMAKSSSEATSNDGWDDEDDNRPNKANTPDVYKVALFNFTSSQLYTNDSDERNTKAHNILNDVEPLLQNKQTQTIDKARLLLQDLASFALSE NPLDSPAIGSEKQPLFETNRNLFYKSIEDLIFKFRYKDAENHLIFALTYHPKDYKFNELLYVQQLSVNQQRTESSA* 446 amino acids = 49,2 kDa				
✓ BAC2	3579 .. 3598	20 bp			primer_bind
✓ f1 ori	5065 .. 5520	456 bp			rep_origin
/direction	= RIGHT				
/note	= f1 bacteriophage origin of replication; arrow indicates direction of (+) strand synthesis				
✓ AmpR promoter	5802 .. 5906	105 bp			promoter
/gene	= <i>bla</i>				
✓ Amp(R)	5907 .. 6767	861 bp			CDS



































Feature	Location	Size			Type
✓ ori	6938 .. 7526	589 bp			rep_origin
/direction	=	RIGHT			
/note	=	high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication			


```

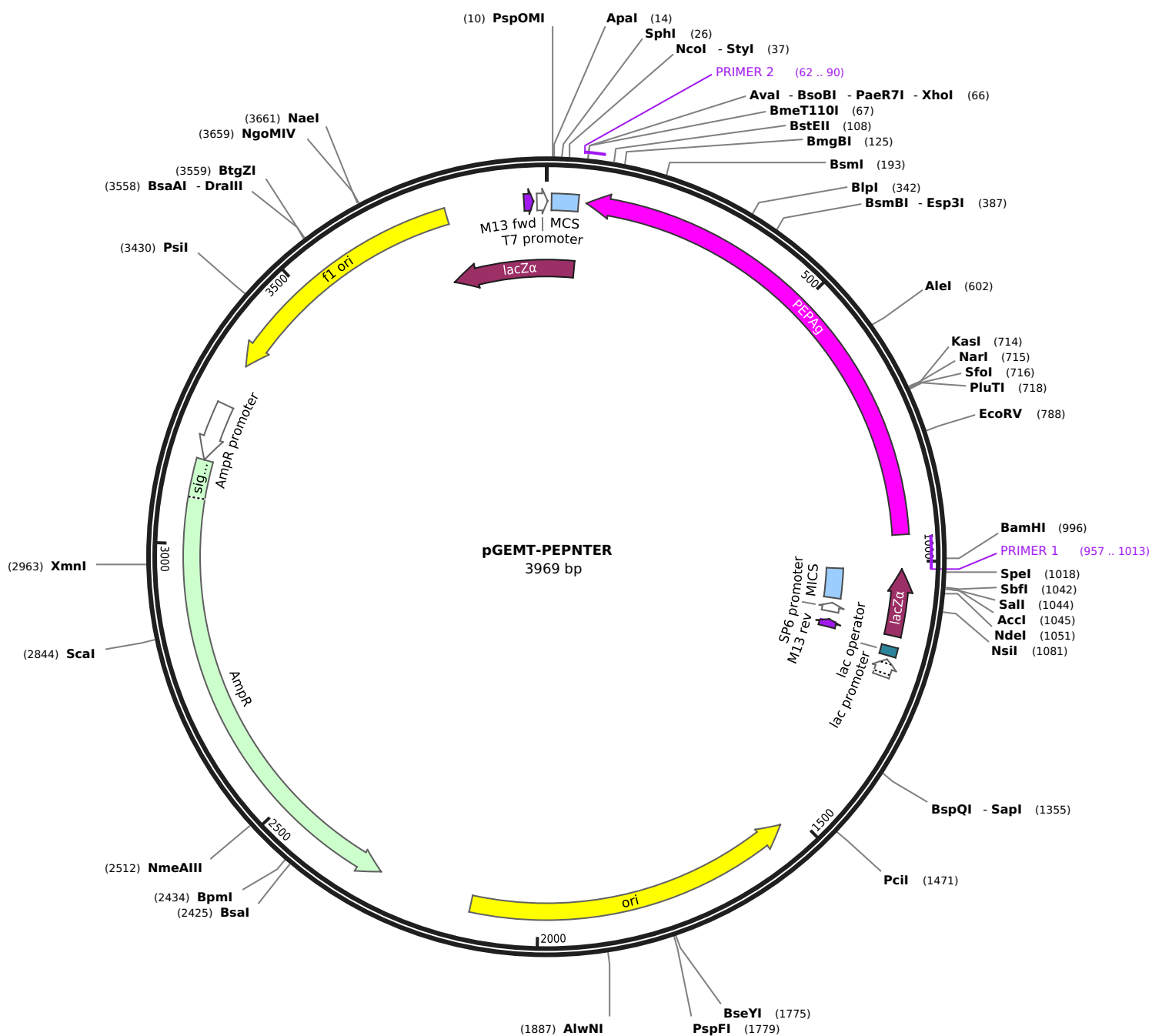
... GGCGCAATTGGGCCCGACGTGCGCATGCTCCCGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTGactggtaggactgagctcATGGTGAGCA 90
AGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGG 180
GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCA 270
CCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCCGACACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACG 360
TCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCA 450
TCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGTCTATATCA 540
TGGCGACAAGCAAGCAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACC 630
AGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACG 720
AGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCAggatccagtc 810
AATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAATATCTATAGTGT 900
CACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCAAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGA 990
AGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAC 1080
CTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCCGCTCACTGAC 1170
TCGCTGCGCTCGGTGCTTGGTGGTGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA 1260
GGAAAGAACATGTGACAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAAGCCGCGTTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCCCT 1350
GACGAGCATCACA AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACAGGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCC 1440
CTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCAGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCA 1530
CGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTGAGGTGCTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTACGCCGACCCGCTGCGCTTA 1620
TCCGTAAGTATCTGCTTGAAGTCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATAGCAGAGCGAGG 1710
TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAG 1800
CCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACCAACCAGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTCGCAAGCAGCAG 1890
ATTACGGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAAGAAGATCCTTTGATCTTTTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACACGTTAAGGG 1980
ATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAG 2070
TAAACTTGGTCTGACAGTTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATCCATAGTTGCTGACTC 2160
CCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCACGCTCACCGGCTCCA 2250
GATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAATTGT 2340
TGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCC 2430
TTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTC 2520
GGTCTCCGATCGTTGTGAGAAAGTAAGTTGGCCGCAAGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCA 2610
TCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCACTTGTGAGAATAGTGTATGGCGGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGG 2700
TCAATACGGGATAATAACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGA AAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATC 2790
TTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTACGATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGA 2880
GCAAAAACAGGAAGGCAAAAATCCCGCAAAAAGGGGAATAAGGGCGACAGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTAT 2970
TGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACA AATAGGGGTTCCGGCGCACATTT 3060
CCCCGAAAAGTGCCACCTGATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGAAATTTGTAAGCGTTAATATT 3150
TTGTTAAAATTCGGGTTAAAATTTTTGTTAAAATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCGGAAAATCGGCAAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAA 3240
TAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACC 3330
GTCTATCAGGGGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCC 3420
AAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTACGCGGGAAAGCCGGCGAACGTTGGCGAGAAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAGCGGGCGTAGG 3510
GCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCTAACCCACACACCCGCCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTGCGCATTC 3600
GGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAA 3690
GTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTA AACGACGCGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATA ... 3766

```

Feature	Location	Size			Type
✓ MCS	10 .. 57	48 bp			misc_feature
✓ MCS	63 .. 68	6 bp			misc_feature
✓ EGFP	81 .. 798	718 bp			CDS
▶ 3 segments					
/translation	= M,V,SKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNVSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGVSQVLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDEL YK 239 amino acids = 26,9 kDa				
✓ lacZα	812 .. 931	120 bp			CDS
/translation	= MTMITPSYLGDTIEYSSYASNALGALPYGRPAGGREFTSD 40 amino acids = 4,3 kDa				
✓ MICS	815 .. 879	65 bp			misc_feature
✓ SP6 promoter	891 .. 909	19 bp			promoter
✓ M13 rev	927 .. 943	17 bp			primer_bind
✓ lac operator	951 .. 967	17 bp			protein_bind
✓ lac promoter	975 .. 1005	31 bp			promoter
▶ 3 segments					
✓ ori	1329 .. 1917	589 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
✓ AmpR	2088 .. 2948	861 bp			CDS
▶ 2 segments					
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFA,HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGDMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLNHMGDHYVTRLDRWEPELNEAIPNDERDTPMPVAMATTLRKLTLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVVAGPLLRSLPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLKHWH* 286 amino acids = 31,6 kDa				
✓ AmpR promoter	2949 .. 3053	105 bp			promoter
✓ f1 ori	3131 .. 3586	456 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
✓ lacZα	3563 .. 60	264 bp			CDS
/translation	= IEFPRPPWRPGACDVGPNPSESYNSLAVVLQRDRWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDRPSQQLRSLNGEWTRPVAAH* 87 amino acids = 10,0 kDa				
✓ M13 fwd	3727 .. 3743	17 bp			primer_bind
✓ T7 promoter	3750 .. 2	19 bp			promoter

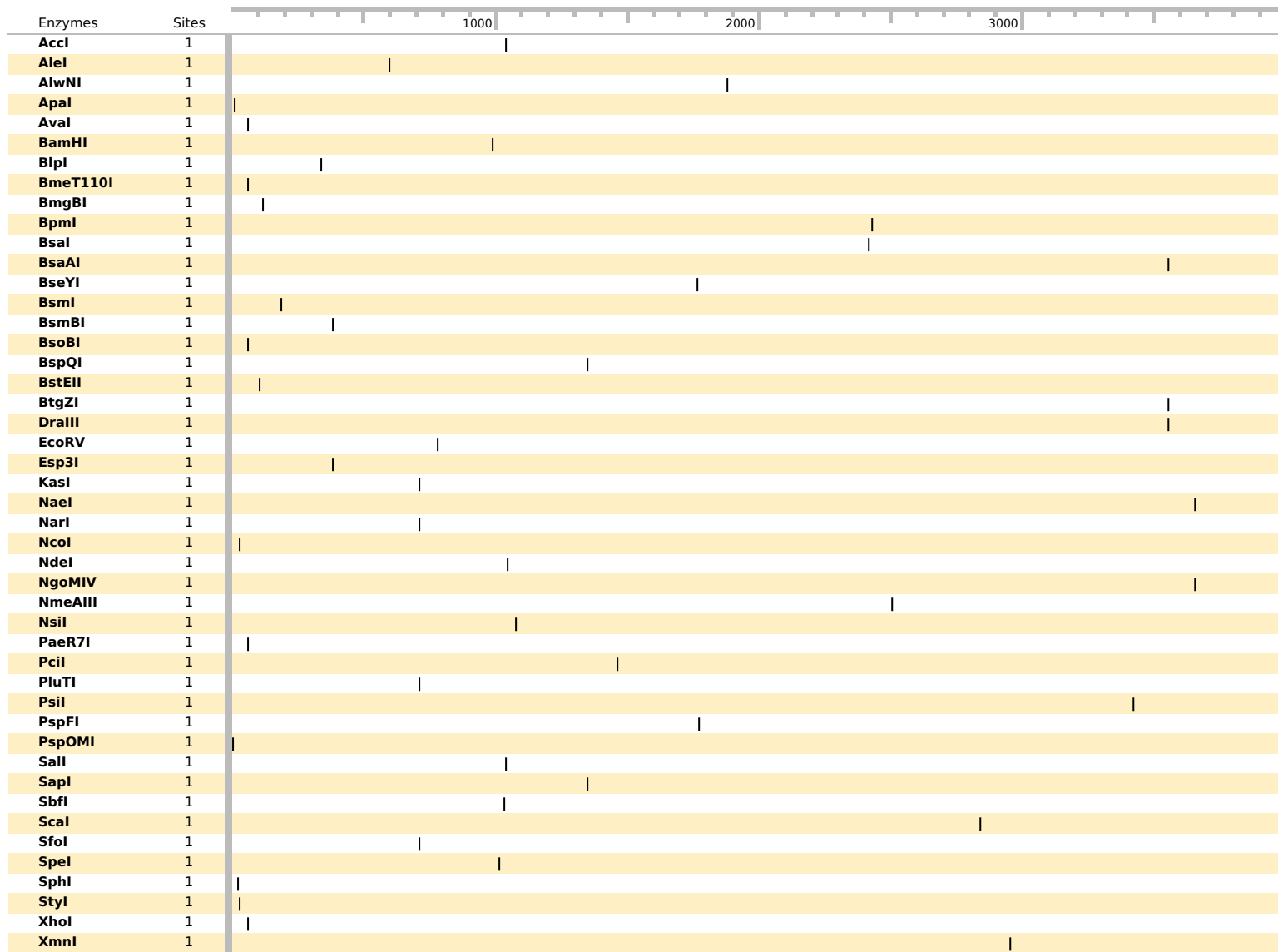
4 features are not displayed



































```

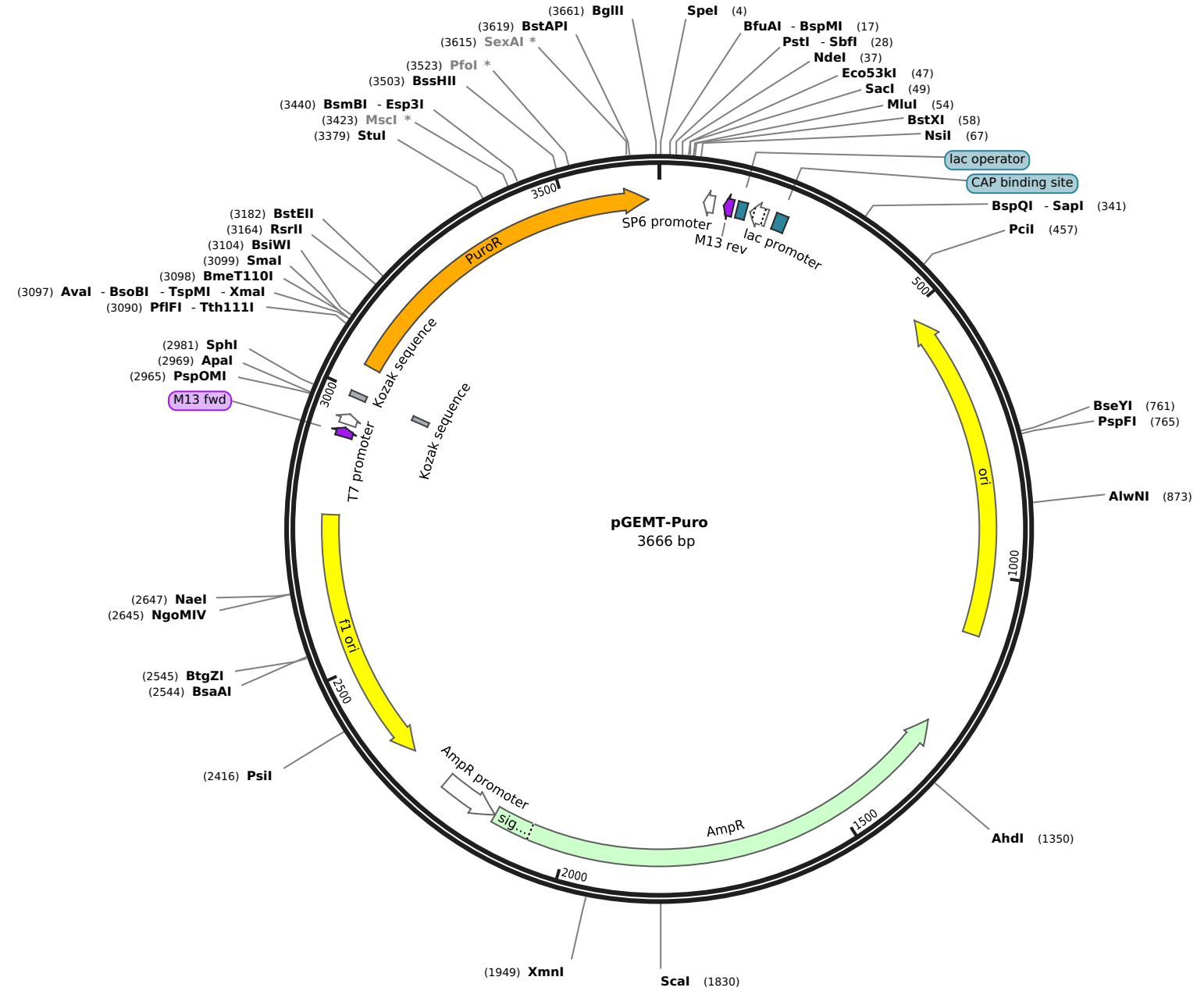
... GG|GCGAATTGGGCCGGACGTGCGATGCTCCCGCCGCGCCATGGCGGGCGCGGGAATTCGATTGACTCTCGAGTTATTTGCGACTGCCCATC 90
aaaatgcttcttatttcgggtcaccagatcaagcacgtcgtcaacttttgacggtcggcgtcacccaatccgccccttcgcccggcgtt 180
atgcttcgatggcattcaacaaattgtttaatgtactgttaatgttgggtatgctggacgccaagtgggtcaaaatagagtgggtgtt 270
ttcatttcgctgcgtaacggttggcgcaaccacggtgatggcttcaagcaatttgtcaatttgttccctgcagctgagcgggactggtcaggc 360
aacggcgctttaaatttcacccactaacacgttgagacggttaagtattgtgtcttggcgcttccaacgcgccataatctgcgcttac 450
tgcgtgcgcaattctaagaattgggtggattgatttagcgaaatttgggtgacgctgttgatgagcagggtcatttgggtgcccagtttt 540
tccaacgctccacaatttggctttgaacgcaatcaaacggcggttggcggttggcacgggtgggtgggtggcacggccgttgcggtta 630
caaaagctcatataattattggcaataaacggtgtagcaactggctggaaaaacaacgacgggcaacgcatgtcaacacgcgggcgccg 720
taaatgtccaccatgtacttgacggtgttattggaaggtggaacgaacaagacggcggttggcgatctggttatcatcttgcggtgt 810
ttcgacggaatgaaaaacaacagctgttgaacggtggaacaacggcattttagagtttggaaaaatgtagtcggcgctcaatccacatgac 900
gacgctgctgcaaacatgacgttgggttggcgctcatacaagatgacgtcatattgaatGatatgttaggtacagcgtgAGCTTCCGCCT 990
CCGCggatccAGTgagctcagtAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGC 1080
ATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAA 1170
TTCCACA|CAACATA|CGAGCCGGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCAC 1260
TGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGGCGTTTGCGTATTGGGGCGCT 1350
CTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGCTCGGTCGTTGGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTAT 1440
CCACAGAATCAGGGGATAACGCGAGGAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCCGCTTGTGGCGT 1530
T|TTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAC 1620
AGGGCTTTCCCGCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAA 1710
CGGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAACCCCGC 1800
TTCAGCCCAGCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG 1890
GTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTAT 1980
TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAAACACCCGCTGCTAGCGGTG 2070
GTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACCGCGCAGAAAAAAGGATCTCAA|GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGT 2160
GGAACGAAAACCTACGTTAAGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTA 2250
AATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTT 2340
GTTTACCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGC 2430
GAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCG 2520
CCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAG 2610
GCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGT 2700
GCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGC 2790
ATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTTGAGAATAGTGTATGCGGC 2880
GACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCTCAATACGGGATAAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAAGTGTCTATCATTGGAAAACGTTCTT 2970
CGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTA 3060
CTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCA 3150
T|ACTCTTCTTTTTCAATATTTATGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCCTATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAAC 3240
AAATAGGGGTTCCGCG|CACATTTCCCCGAAAAGTGCCACTGATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATC 3330
AGG|AAATGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCA 3420
AAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTTGGACT 3510
CCAACGTCAAAGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCC 3600
GTAAAGCACTAAATCGGAACCCATAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTTGGCGAGAAAAGGAAGGAAGA 3690
AAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTAC 3780
AGGGCGCGT|CCATTGCGCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGG 3870
GGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTACGACGTT|GTA AACGACGGCCAGT|GAATTG|TAATACGA 3960
CTCACTATA ... 3969

```



Feature	Location	Size			Type
✓ MCS	10 .. 57	48 bp			misc_feature
✓ PEPAg	72 .. 953	882 bp			CDS
/translation	= MTSSCMTPNNNVMFDDASVMWIDADYIFONSKMPLSTFQQLLFSIPSKHRKMINDIGNPPSCSFPPSNNTVKYMVDIYGAAVLTMRCPSLFSDQLLTTFIANNYMSFCNRQRPCQPPPC QPQTPPFDCVQKQIVDALEKLAHQNDLLINSVNOISLNQSNQFLELRTOYAIQIMAALESADKTLNRLNVLVDEIKAALPDQSAQLQEIQDKLLEAINVVAQTLRSEMNTNSILTNLASSI TNINSTLNNLLNAIEGITGGEGGGLGDADRQKLSDVLDLVTEIRSILMGSRK* 293 amino acids = 32,5 kDa				
✓ lacZα	1015 .. 1134	120 bp			CDS
/translation	= MTMITPSYLGDTIEYSSYASNALGALPYGRPAGGREFTSD 40 amino acids = 4,3 kDa				
✓ MICS	1018 .. 1082	65 bp			misc_feature
✓ SP6 promoter	1094 .. 1112	19 bp			promoter
✓ M13 rev	1130 .. 1146	17 bp			primer_bind
✓ lac operator	1154 .. 1170	17 bp			protein_bind
✓ lac promoter	1178 .. 1208	31 bp			promoter
▶ 3 segments					
✓ ori	1532 .. 2120	589 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
✓ AmpR	2291 .. 3151	861 bp			CDS
▶ 2 segments					
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFA,HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLSNGKILESFRPEERFPMMSDFKVLCCGAVLSRIDAGQEQLGRRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLNHMGDHTVRLDRWEPELNEAIPNDERDTPVAMATTLRKLTLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRALPAGWFIADKSGAGER GSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW* 286 amino acids = 31,6 kDa				
✓ AmpR promoter	3152 .. 3256	105 bp			promoter
✓ f1 ori	3334 .. 3789	456 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
✓ lacZα	3766 .. 60	264 bp			CDS
/translation	= IEFPRPPWRPGACDVGPNSPYSESYYNSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDRPSQQLRSLNGEWTRPVAAH* 87 amino acids = 10,0 kDa				
✓ M13 fwd	3930 .. 3946	17 bp			primer_bind
✓ T7 promoter	3953 .. 2	19 bp			promoter

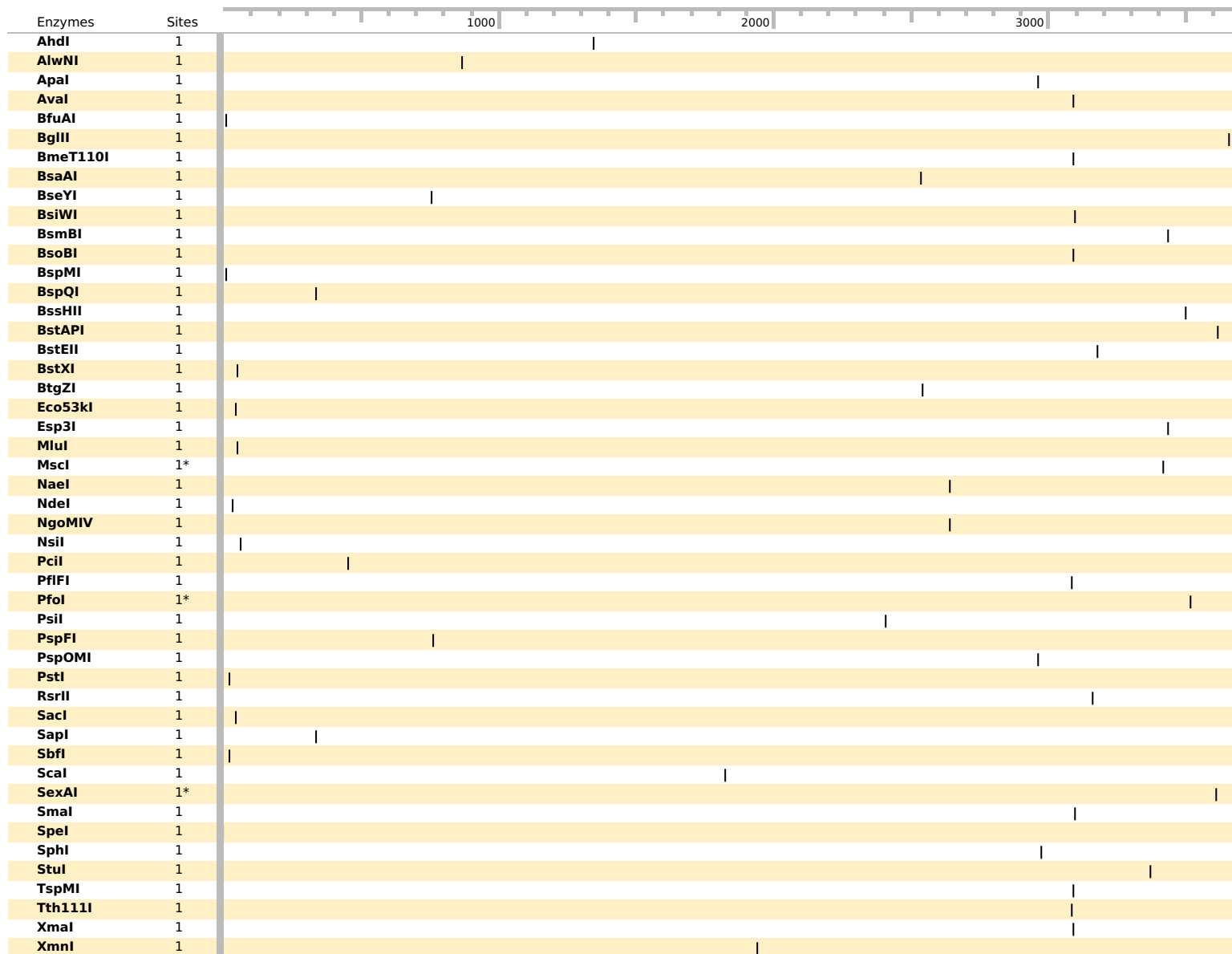
1 feature is not displayed

































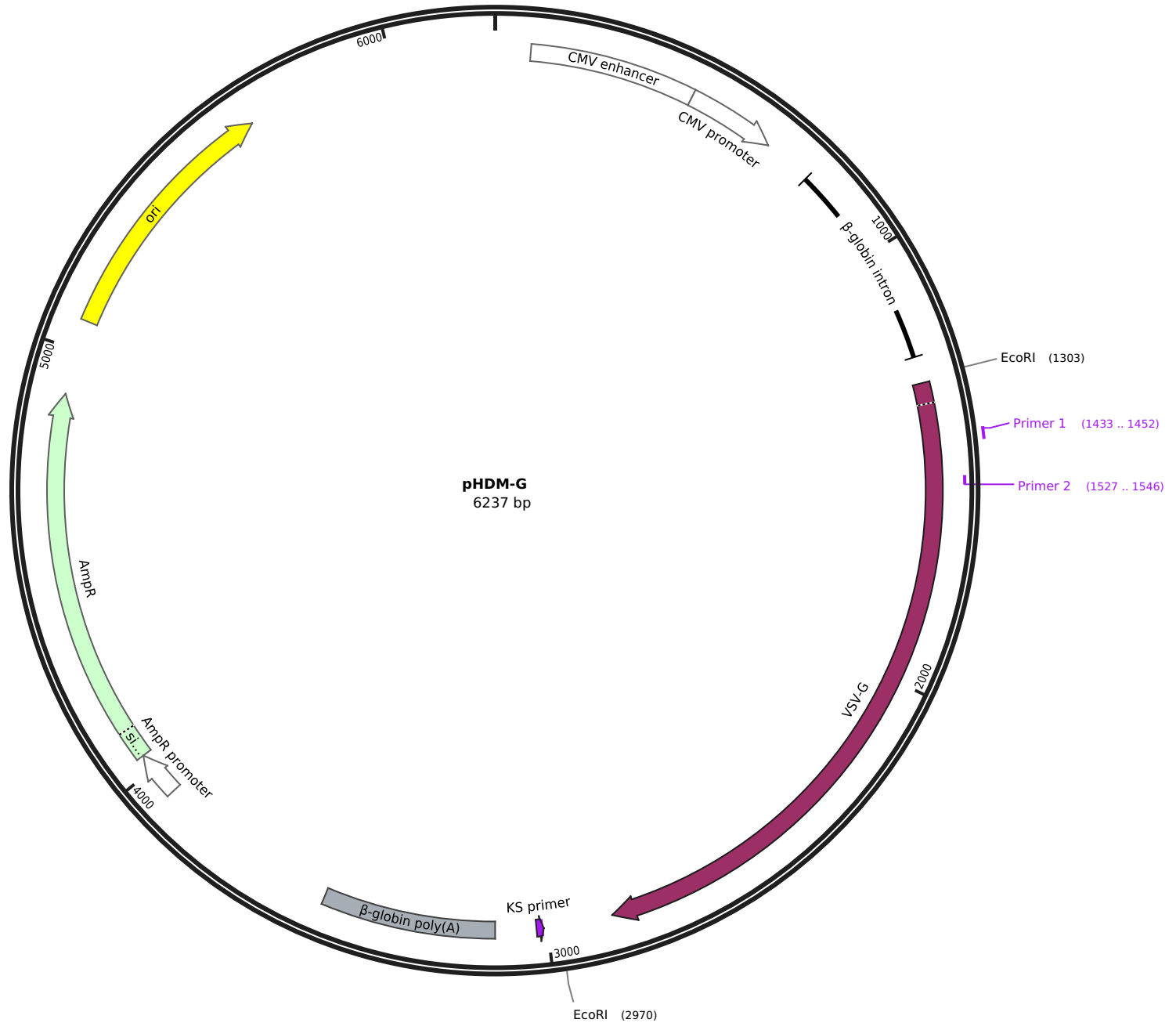
```

... ATCTACTAGTGAATTTCGCGGCCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATCTTATAGTGTCT 90
ACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGTCATAGCTGTTCTGTGAAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAA 180
GCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGGCTTGCCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACC 270
TGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGGCGTTTGGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACT 360
CGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATAACGCAG 450
GAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTG 540
ACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCCTTCCCCCTGGAAAGCTCCC 630
TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCAGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCCGGAAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAC 720
GCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTCAAGCCGACCGCTGCGCCTTAT 810
CCGGTAACTATCGTCTTGAAGTCAACCCGGTAAGACACGACTTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGT 900
ATGGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAGAAGAACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAAG 990
CAGTTACCTTCCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCCAGCGTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGA 1080
TTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGA 1170
TTTTGGTATGAGATTATCAAAAAGGATCTCACCTAGATCTTTAAATAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCAAAGTATATATGAGT 1260
AAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGACTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCCTGACTCC 1350
CCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCTCACCGGCTCCAG 1440
ATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTT 1530
GCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCCAGCTCGTGT 1620
TTGGTAGGCTTCACTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGCGAGTTACATGATCCCCCATAGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCG 1710
GTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCACTGTTATCACTCATGTTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTATGCCAT 1800
CCGTAAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGAAGTCAACCAAGTCACTTGAAGAATAGTGTATGCGCGCAGCCAGTTGCTCTTCCCGGCGT 1890
CAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAGTTTAAAGTGTCTCATCTTTGAAAACGTTCTTCCGGGGCAAAACTCAAGGATCT 1980
TACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTCCAGCGTTTTCTGGGTGAG 2070
CAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATT 2160
GAAGCATTTATCAGGGTTATTGCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC 2250
CCGAAAAGTGCCACCTGATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGAAATTTGAAGCGTTAATATTT 2340
TGTTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAAATCAAAAAGAA 2430
AGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGAGTGGACTCCAACGTCAAAGGGGCAAAAACCG 2520
TCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCGGTAAGCACTAAATCGGAACCTA 2610
AAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGCAGGGGAAAGCCGGCAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGG 2700
CGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCAACACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTGCCATTGAG 2790
GCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAG 2880
TTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCAAGGCTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTTGGGCC 2970
GACGTCGCATGCTCCCGGCCGCATGGCGGCGCGGGAAATTCGATGCGGCGCGGGAAATTCGATTCGTTCCATGGCAATGACCGAGTACA 3060
AGCCACGGTGCAGCTCGCCACCCGCGACGACGTCCCCGGGCGTACGCACCCCTCGCCGCGCGTTTCGCGGACTACCCGCGCACGCGCC 3150
ACACGGTCGACCCGGACCGCCACATCGAGCGGGTCCAGGAGCTGCAAGAAGTCTTCTCACGCGGTCGGGCTCGACATCGGCAAGGTGT 3240
GGGTCGCGGACGACGCGCGCGGTTGGCGGCTGGAACACGCGGAGAGCGTCAAGCGGGGGCGGTGTTCCGCGAGATCGGCCCGCGCA 3330
TGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCAACAGATGAAAGGCTCCTGGCGCCGACCGGCCAAAGGAGCCCGGTGGTTCC 3420
TGGCCACCGTGGCGTCTCGCCGACCAAGGGCAAGGGTCTGGGCAAGCGCCGTCGTTCTCCCGGAGTGGAGGCGGGCGAGCGCGCCG 3510
GGGTGCCCGCTTCTGGAGACTCCGCGCCCGCAACCTCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTACCGTCAACCGCGGACGTTAAGGTGC 3600
CCGAAGGACCGCGACCTGCTGCATGACCCGCAAGCCCGGTGCTGACGCGCCCGCACGAGATCT ... 3666

```

Feature	Location	Size			Type
✓ SP6 promoter	80 .. 98	19 bp			promoter
/note	= promoter for bacteriophage SP6 RNA polymerase				
✓ M13 rev	116 .. 132	17 bp			primer_bind
/note	= common sequencing primer, one of multiple similar variants				
✓ lac operator	140 .. 156	17 bp			protein_bind
/bound_moiety	= <i>lac</i> repressor encoded by <i>lacI</i>				
/note	= The <i>lac</i> repressor binds to the <i>lac</i> operator to inhibit transcription in <i>E. coli</i> . This inhibition can be relieved by adding lactose or isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG).				
✓ lac promoter	164 .. 194	31 bp			promoter
▶ 3 segments					
/note	= promoter for the <i>E. coli lac</i> operon				
✓ CAP binding site	209 .. 230	22 bp			protein_bind
/bound_moiety	= <i>E. coli</i> catabolite activator protein				
/note	= CAP binding activates transcription in the presence of cAMP.				
✓ ori	518 .. 1106	589 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
/note	= high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication				
✓ AmpR	1277 .. 2137	861 bp			CDS
▶ 2 segments					
/gene	= <i>bla</i>				
/product	= β-lactamase				
/note	= confers resistance to ampicillin, carbenicillin, and related antibiotics				
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFLPVFA,HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMSTMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLHNMGDHVTRLDRWEPELNEAIPNDRDRTTMPVAMATTLRKLTLGELLTLASRQLLDWMEADKAVAGPLLRSALPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW* 286 amino acids = 31,6 kDa				
✓ AmpR promoter	2138 .. 2242	105 bp			promoter
/gene	= <i>bla</i>				
✓ f1 ori	2320 .. 2775	456 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
/note	= f1 bacteriophage origin of replication; arrow indicates direction of (+) strand synthesis				
✓ M13 fwd	2916 .. 2932	17 bp			primer_bind
/note	= common sequencing primer, one of multiple similar variants				
✓ T7 promoter	2939 .. 2957	19 bp			promoter
/note	= promoter for bacteriophage T7 RNA polymerase				
✓ Kozak sequence	2988 .. 2997	10 bp			regulatory
/regulatory_class	= other				
/note	= vertebrate consensus sequence for strong initiation of translation (Kozak, 1987)				
✓ Kozak sequence	2992 .. 3001	10 bp			regulatory
/regulatory_class	= other				
/note	= vertebrate consensus sequence for strong initiation of translation (Kozak, 1987)				
✓ PuroR	3048 .. 3647	600 bp			CDS
/gene	= <i>pac</i> from <i>Streptomyces alboniger</i>				
/product	= puromycin <i>N</i> -acetyltransferase				
/note	= confers resistance to puromycin				
/translation	= MTEYKPTVRLATRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRHVTDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVVVADDGAAVAVWTTPESEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMKGLAPHRPKEPAWFLATVGVSPDHQKGLGSAVVLPGVEAAERAGVPAFLETSA PRNLPFYERLGFVTADVVKVPEGPRTWCMTKPGA* 199 amino acids = 21,5 kDa				























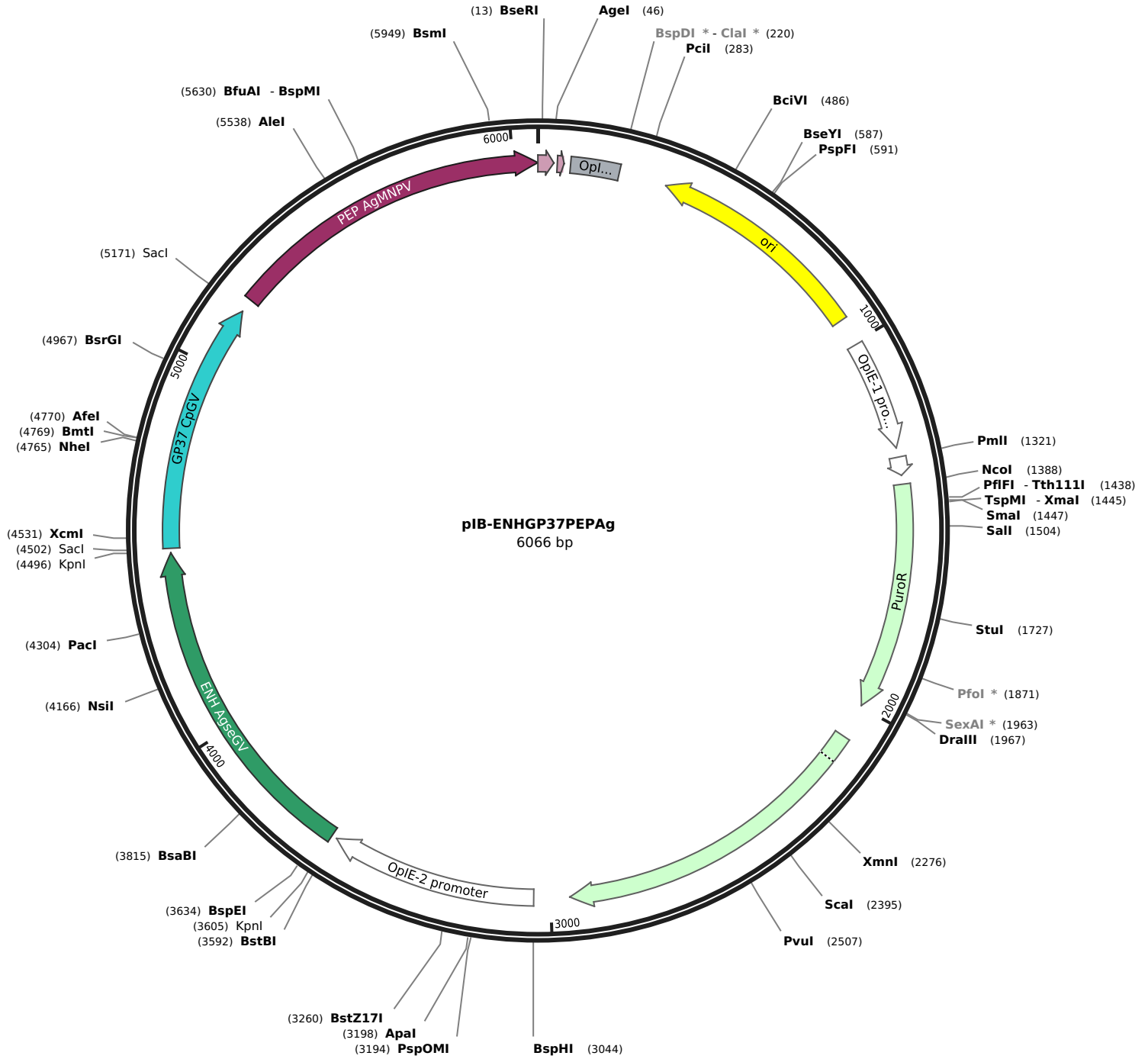
```

... agcttgGCCcattgcatacgTtGtatccatatacataatagtacatttataattggctcatgtccaacattaccgCCatgttgacattgat 90
tattgactagttat taatagtaatcaattacggggcattagttcatagccatataaggagttccggttacataaacttacggtaaatg 180
gcccgcctggctgaccGCCcaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacGCCaatagggactttccatt 270
gacgtcaatgggtggagatttaccggtaaactggccacttggcagtagatcaagttatcatatgccaagtacGCCccctattgacgtca 360
atgacggtaaatggccgctggcattatgccagtagacgttattggactttccctacttggcagtagatctacgtatttagctacg 450
ctattaccatggTgatgCGgttttggcagtagatcaatggcggtggataggcgtttgactcacggggtattccaagtctccacccttgg 540
acgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtctgaacaactccgccccattgacgcaaatggcggtg 630
ggcgtgtagcgtgggaggtctataaagcagagctcgttttagtgaaccgtcagatcgctgggagacgccatccacgctgttttgacctcc 720
atagacacaccgggacccgatccagcctccctcgaagctgatcctgaagaactcagggtgagttatgggaaccccttgattttttttt 810
cccttttttttctatgggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagggttaacacatattgacaaaatcagggttaattttgca 900
taatttttaaaaaatgcttttcttttttaataatactttttttgttttcttttttcttaatacttttccctaattcttttctttcagggcaata 990
atgatacaatgtatcatgctcttttgcaccattctaaagaataaacagtgataattttcgggttaaggcaatagcaatatttttgcataata 1080
aataattctgcataaaaaattgtaactgatgtaagagggttcatattgtaaatagcagctacaattccagctacattctgtcttttattttta 1170
tgggttgggataaggctggattattctgagttcaagctaggcccttttgcataatcagttcacaacctttatcttctccacagctcctg 1260
ggcaacgtgctggtctgtgtgctggcccatcacttttggcaagaatctgacacatgaagtgcttttggacttagcctttttattcat 1350
tggggtgaattggcaagttccacatagtttttccacacacacaaaaggaaactggaaaaatttctcttctaattaccattattgcccgtc 1440
aagctcagatttaaatggcataatgacttaataggcaacagctacaacatgccaagagtcacaaggtcatttaacagcagacgg 1530
ttggatgtgtcatgcttccaaatgggtcactacttgtgtatttccgctgggtatggaccgaagtaataaacacagttccatccgatccttcac 1620
tccatctgtagaaccaatgcaaggaaagcattgaacaaacgaaacaaggaaacttggctgaatccaggtctccctcctcaaaagtgtgggata 1710
tgcaactgtgacggatgccgaagcagtgattgtccaggtgactcctcaccatgtgctggttgtagaatcacagggagaatgggtgtgattc 1800
acagttcatcaagcgaataatgagcagcttccagcctcactcagcctcacaacctcagagtcagcttctgactataaagctcaagggtc 1890
atgtgatcttaacctcatttccatggacatcaccttctctcagaggacggagagctatcatccctgggaaaggaggggcacagggttcag 1980
aagtaactactttgcttatgaaactggaggcaaggcctgcaaaatgcaatactgcaagcattggggagtcagactcccatcagggtgtctg 2070
gttcgagatggctgataaggatctctttgtctgagccagatctccctgaaatgccagaagggtaagttatcttctgctccatctcagacctc 2160
agtgatgtaagcttaaatcaggagcttggaggatctggatttccctctcaagaactcgaagaaactggagcaaaatcaagacgtgcttctcc 2250
aatctctccagtggtatctcagctatcttctccttaaaaaaccaggaaaccggtctctgctttaccataatcaatggtaccctaaaatactt 2340
tgagaccagatacatcagagctgatattgtctcctcaagaatggctgggaatgatcagttggaactaccacagaaagggaact 2430
gtgggtagctgggaccataatgaagacgtggaaattggacccaatggagttctgaggaccagttcaggatataagtttctttatatacat 2520
gattggacatggtatgttggactcagcattctcacttcaagcctcagggttctgaagactcctcactatcaagcagctgcttctcga 2610
acttctctgatgatgagagtttatttttgggtgatactgggctatccaaaaatccaatcgagctgttagaaggttgggtcagtagttggaa 2700
aagctctattgctcttttttctttatcatagggttaatcattggactatcttgggtctccgagttgggtatccatctttgcattaaat 2790
aaagcacaccaagaaaagacagattatacagacatagagatgaaccgacttggaaagtaactcaaatcctgcacaacagattcttctatg 2880
tttggaccaaaatcaacttggataccatgctcaagagcctcaaatataattttagtttttaaattttatgaaaaaataaaacacgg 2970
aatcccgggggcggcgtcttagaggatccaagcttatcgataccgtcgactcggaggccagatctaattcaccaccagtgaggc 3060
tgctatcagaaagtgggtggctgggtgtggctaatgcccctggcccacaagtatcactaagctcgtcttcttctgctgccaattcttattaa 3150
ggttcctttgttccctaaagtccaactactaaactgggggataattatgaagggccttgagcattggattctgctcaataaaaaacattta 3240
tttctatgtaaatggttatttaaatatttctgaaatttttactaaaaagggtaattggtggagctcagtgcaattaaaaactaaagaaat 3330
gaagagctagttcaaaccttgggaaaaatacactatactttaaactccatgaagaaggtgaggctgcaaacagctaatgcacattggcaa 3420
cagccctgatgctatgcttattcactccctcagaaaaggattcaagtagaggcttgatttggaggttaagtttggctatgctgtatt 3510
ttacattacttattgttttagctgtcctcatgaatgtcttttccactaccatttgcctatctctgactctctcagccttgactccactcag 3600
ttctcttgccttagagataaccactttccctgaagtgttccctcaattatattttagtttttaaattttatgaaaaaataaaacacgg 3690
tagttgtctctgttctttagaggtctactgaagaaggaaaaacagggggcatggttgactgtcctgtgagccctcttccctgcc 3780
tccccactcagctgacccggaatccctcagatggcagcttagatcattcttgaagacgaaaggcctcgtgataccgctatttttat 3870
aggttaatgtcatgataataatgggtttcttagacgtcaggtggcacttttccgggaaatgtgCGcgggaaccctatttggttatttttct 3960
aaatacattcaaatatgtattccgctcatagacataacggctcaataatattgaaaaaggaaagtagttagattttcaac 4050
atctccgtgtcgccttattcccttttttgggcattttgccttctgtttttgtctcaccagaaacgctgggtgaaagtaaaagatgctg 4140
aagatcagttgggtgcacgagttgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgcgccgaagAACGTTTc 4230
caatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcggttatatccgatttgacgcggggcaagagcaactcggctcgcgcgatacact 4320
atctcagaactctggagcgaacgacctacaccgaactgagataacctacagcgtgagctatgagaagcgcacgcttcccgaggga 4410
taaccatgagtgataaacactcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaacggctttttgcaacaatggggg 4500
atcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgctgtagcaatgg 4590
caacaacgttgcgcaactataactggcgaactacttactttagcttccggcaacaatataagactggatggaggcggataaagttg 4680
caggaccacttctgcgtaccactttcccgctggctggtttattgctgataaaactggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattg 4770
cagcactggggccagatggtaagccctcccgatcgttagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacaga 4860
tcgctgagataggtgctcactgatgaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatataacttttagattgatttaaaacttcaatt 4950
tttaatttaaaaggatctaggtagaatccttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttttctgctccactgagcgtcag 5040
accctgagaaaaagatcaaaaggatcttcttgagatccttttttctcgcgctaactcgtgcttgcAAAcaaaaaaaacccCGctaccag 5130
cgggtgggttggtttgcgggatcaagagctaccaactcttttccgaaggttaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttc 5220
tagtttagccgttagttaggccaccacttcaagaactctgttagcaccgctacatacctcgtctgctaactcctgttaccagttggctgctg 5310
ccagttggcgataaagctgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggttctg 5400
gcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagataacctacagcgtgagctatgagaagcgcacgcttcccgaggga 5490
gaaagggggacaggtatccggtaagcggcaggtcggaaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgctgggtatctttata 5580
gtcctgtcgggtttcggccactctgacttggagcgtcgtattttgtgatgctcgtcagggggggcggagcctatggaaaAACGccagcaacg 5670
gatgCGcgcgctgCGgtgctggagatggcggacgcgatggatattcttgcgaagggttggtttggcattcacagttctccgcaagaa 5760
ttgatggctccaattcttggagttgtaactcgttagcaggtgcccggccttccattcaggtcaggttggccggcctccatgacccg 5850
cgacgcaacgCGggggagcagacaaggtataggcggcgcctacaatccatgccaaccggttccatgtgctcgcggaggcggcataaatc 5940
cccgtgacgatcagcggctccaatgatcgaagttaggctggaagagcgcgagcagatccttgaagctgtccctgatggctcgtcatctacc 6030
tgctggacagatggcctgcaacggggcctccgatcggcggaaagcagagaagaatcataatggggaaggccatccagcctcgcgtc 6120
gggagctttttgcaaaccttagcctcaaaaagcctcctcacttcttggaaatagctcagaggccgagggcctcggcctcgc 6210
ataaataaaaaaattagtcagccatg ... 6237

```



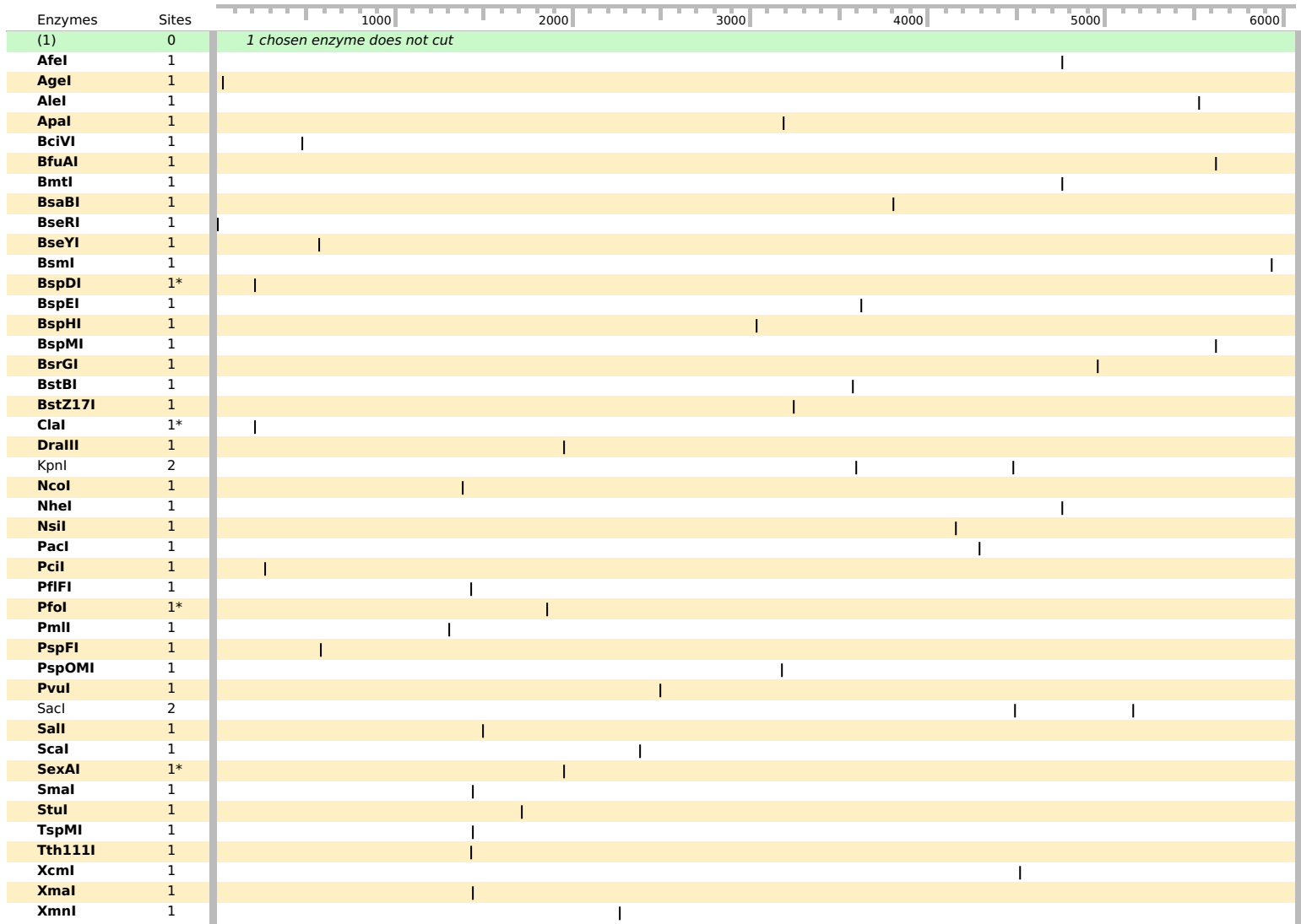
Feature	Location	Size			Type
✓ CMV enhancer	82 .. 461	380 bp			enhancer
/note	= human cytomegalovirus immediate early enhancer				
✓ CMV promoter	462 .. 665	204 bp			promoter
/note	= human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter				
✓ β-globin intron	779 .. 1254	476 bp			intron
/note	= internally truncated intron from human β-globin				
✓ VSV-G	1316 .. 2851	1536 bp			CDS
▶ 2 segments					
/product	= vesicular stomatitis virus G glycoprotein				
/note	= Indiana strain				
/translation	= MKCLLYLAFLEFIGVNC_KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTAIQVKMPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQG TWLNPGFPPQSCGYATVTDAAEAVIVQVTPHHVLDVEYTGGEWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHSDYKVKGLCDNSLISMDITFFSEDEGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACK MQYCKHWGVRLP SGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDSLAPKNPGTGPAPTIIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSR MVGMI SGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLR TSSGYKFLYMI GHGMLDSDLHLSKAQVFEHPHIQDAASQLPDESLEFFGDTGLSKNPIELVEGW FSSWKSSIASFFFIIGLIIGLF LVLRVGIHLCKIKLKHKKRQIYTDIEMNRLGK*				
	511 amino acids = 57,5 kDa				
✓ KS primer	3009 .. 3025	17 bp			primer_bind
/note	= common sequencing primer, one of multiple similar variants				
✓ β-globin poly(A)	3119 .. 3513	395 bp			polyA_site
/note	= human β-globin polyadenylation signal				
✓ AmpR promoter	3933 .. 4037	105 bp			promoter
/gene	= <i>bla</i>				
✓ AmpR	4038 .. 4898	861 bp			CDS
▶ 2 segments					
/gene	= <i>bla</i>				
/product	= β-lactamase				
/note	= confers resistance to ampicillin, carbenicillin, and related antibiotics				
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFLPVFA,HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMMSDFKLVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMVTVREL CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLNHMGDHFVTRLDRWEPELNEAIPNDERDTTTPVAMATTLRKLTLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRALPAGWFIADKSGAGER GSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW*				
	286 amino acids = 31,6 kDa				
✓ ori	5069 .. 5657	589 bp			rep_origin
/direction	= RIGHT				
/note	= high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication				





























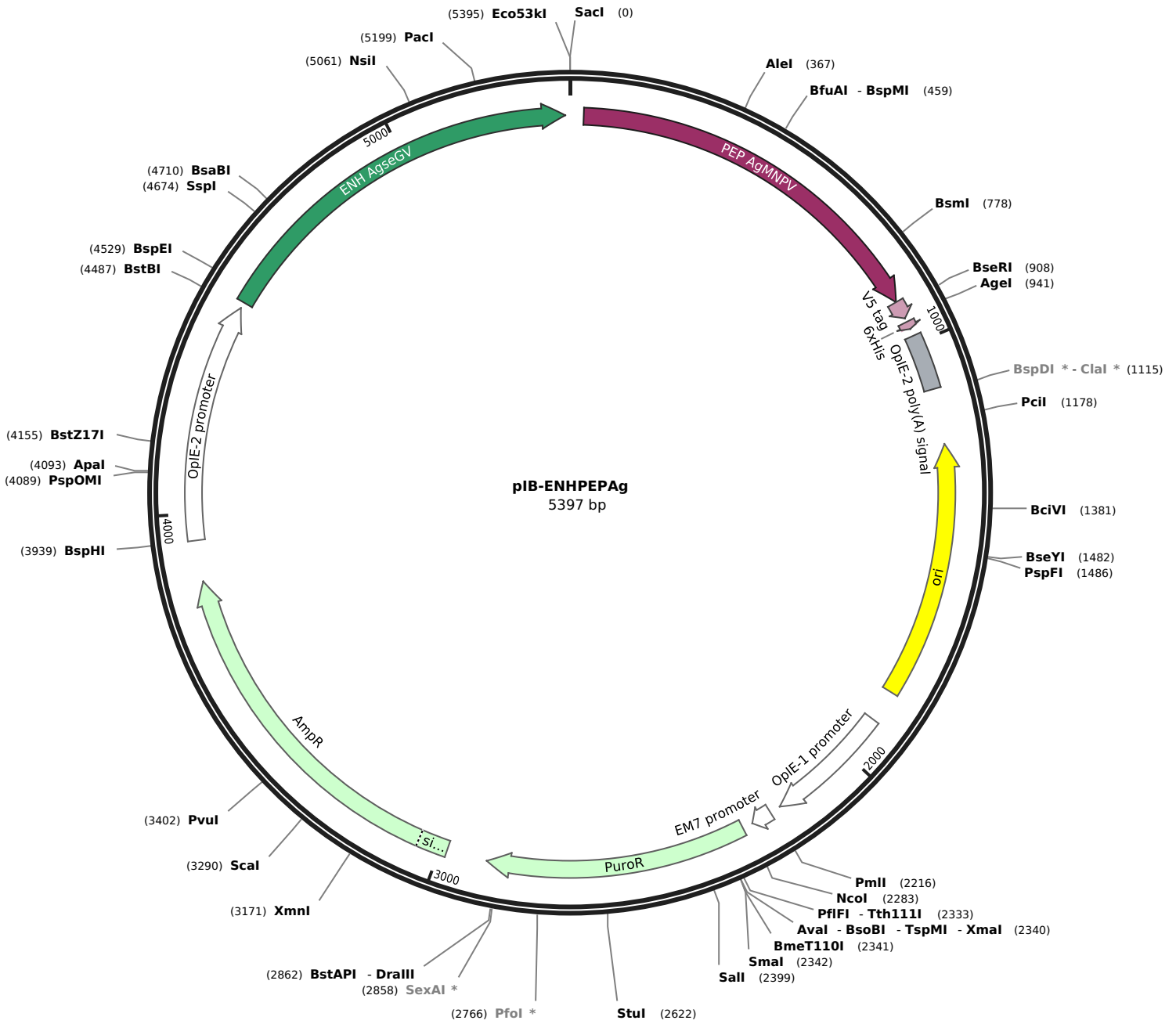
```

... GGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCCTCGGTCGATTCTACGCGTACCGGTATCATCATCACCATCACCATTGAGTTTATCTGACTAAATCT 90
TAGTTTGTATTGTCATGTTTTAATAACAATATGTTATGTTTAAATATGTTTTAATAAATTTTATAAAATAATTTCAACTTTTATTGTAAC 180
AACATTGTCCATTTACACACTCCTTTCAAGCGCGTGGGATCGATGCTCACTCAAAGCGCGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGATA 270
ACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGGC 360
CCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCTGGAA 450
GCTCCCTCGTGCCTCTCTCTGTTCCGACCTCGCCGCTTACCGGATACCTGTCCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAT 540
GCTCACCGTGTAGGTATCTCAGTTCGAGTTCAGGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGGTTTCAGCCCGACCGCTGCG 630
CCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAAGTCCAACCCGGTAAGACAGGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAG 720
CGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACCTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTCGCTCTGCG 810
TGAAGCCAGTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCCAGCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTGCAAGC 900
AGCAGATTACCGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAAGAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAAGCAAAAACTCACGTT 990
AAGGGATTTTGGTCATGCGAAACACGCACGGCGCGCACGAGCTTAGCACAAACCGGTCGTTGCACGCGCCACCCTAACCGCAGGC 1080
CAATCGGTGCGCCGGCCTCATATCCGCTCACAGCCGCTCCTATCGGGCGCGGCTTCCGCGCCCATTTGAATAAATAAACGATAACGC 1170
CGTTGGTGGCGTGAGGCATGTAAAGGTTACATCATTATCTTGTGGCCATCCGGTTGGTATAAATAGACGTTTCATGTTGGTTTTTTT 1260
CAGTTGCAAGTGTGCTGCGCGCGCAGCACCCTTTGCGGAGTCTGCGGCTGAGCAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTAT 1350
ATCGGCATAGTATAATACGACAAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCAATGACCGAGTACAAGCCACGGTGGCCCTCGCCACCCGCGACGAC 1440
GTCCCGCGGGCGTACGACCCCTCGCCGCGCGGTTCCGCGGACTACCCGCGCACGCGCCACACCGTGCACCCGACCCGCCACATCGAGCGG 1530
GTCACCGAGCTCAAGAAGCTCTTCTCACGCGGCTCGGGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGTTCGCGGACGACGGCGCCGCTGGCGGTG 1620
TGGCAAGACCGCGGAGCGTCAAGCGGGGCGGTTGTCGCGAGATCGGCAAGTGGCCGATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCGGCTGGCGCG 1710
CAGCAACAGATGAAAGGCTCCTGGCGCGCACCGGCCAAAGAGCCCGGTGGTTCCTGGCCACCGTGGCGCTCGCCCGACCCAG 1800
GGCAAGGGTCTGGCGAGCCGCTCGTGTCTCCCGGAGTGAAGGCGCGAGCGCGCGGGGTCGCCGCTTCTGAGAGCTCCGCGCC 1890
CGCAACCTCCCTTCTACGAGCGCTCGGCTTACCCTACCCGCGAGCTCAAGGTGCCGAAGGACCGCGCACCTGAGTGCATGACCCG 1980
AAGCCCGGTGCGTGAAGCGCCCGCAGAGATCTGCATGCTACTAACTCAAAAATAGAGCTTCAATTTAATTAATATCAGTTATTACC 2070
CATTGAAAAAGGAAGATGATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGCTCAC 2160
CCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGACAGAGTGGTTACATGAACTGGATCTAACAGCGGTAAGATC 2250
CTTGAGAGTTTTCCGCGGAAGAAGTTTTCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTTATCCCGTATTGACGCC 2340
GGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCAGTACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCAGGATCACAGAAAAAGCATCTTACAGTGGC 2430
ATGACAGTAAGAGAATTATGCAAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAATTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAG 2520
GAGCTAACCCCTTTTTGCAACATGAGGGGATCATGTAACCTGCCTTGTATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGAC 2610
GAGCGTGACACCGATGCTGTAGCAATGGCAACAGCTTGGCAACTATTAAGTGGCGAAGTACTTACTAGCTTCCGCGCAACAA 2700
TTAATAGACTGGATGAGGCGGATGAAAGTTGCAAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATGCTGATAAATCTGGA 2790
GCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGT 2880
CAGGCAACTATGATGAACGAAAATAGACAGATCGTGAATAGGTGCCTCACTGATTAAGCAATGGTAACTGTGACAGCAAGTTTACTCA 2970
TATATACTTAGATTGATTTTAACTTTTAAATTTAAAGGATAGAGTAAAGTACTCTTTTGGTAAATCTCATGATGATAAACAAT 3060
GTATGGTGCTAATGTTGCTTCAACAACAATTCTGTTGAACTGTGTTTTCATGTTTGGCAACAGCACCTTTATACTCGGTGGCTCCCA 3150
CCACCAACTTTTTGCACTGCAAAAAACACGCTTTTGCAGCGGGCCATACATAGTACAAACTCTACGTTTCTGAGACTATTTTACAT 3240
AAATAGTCTACACCGTTGTATACGCTCAAATACACTACACACTTGAACCTTTTTGCAGTGCAAAAAAGTACGTTGCGGAGTACAGT 3330
AGGCGGCTTATCGGGTCCGCTCTGTGTCAGTACGATACACTTACGACCGGACGAGTGTGTCTTATCGTGACAGGACGCCAGCTT 3420
CCTGTGTTGCTAACCGCAGCCGACGCAACTCCTTATCGGAACAGGACGCGCCTCCATATCAGCCGCGCTTATCTCATGCGCGTGACCG 3510
GACACGAGGCGCCGCTCCCGCTTATCGCGCTATAAATACAGCCCGCAACGATCTGGTAAACACAGTTGAACAGCATCTGTTGCAATTTA 3600
ggtaccATGTTTTTAAACAAGATCTCAGCGGGTCCGGAGCTGCTTATATGGACGTTTGGATTGGTGTGACACGCAATCTTTTCAT 3690
CTTTTCTCAAGTCTCCATTTCAAATTTGATAATGCTCATGTGATGGGTACGCTACGATTTGAGTTTGGTAAATAGCAAAATCAATA 3780
TTTGAAGAGACGTTGGGCGAGCATATTTGCGGATAGATATCAATTTTTTAGATCTACCAAAATGGAACGTTATCTAACAAACACGGCTTT 3870
GGACCACAAATGATTACAAATTTATTACTGATATCAATATATTGTTCTCGGCCAGAACTCCTTTCCCGCTTGCCAGAGTTAGAAAG 3960
CTATTAATTTTATCTAATTTTAAATCAAAAACACGGAAGATGGGTTTAGAGAGTTAAATCGCTCATTAGACGAAAGCAGATTTGGA 4050
ATGGTATTTGAGAGCGGTCAAATCTTCTTGTCTTGGTGGAAACTACTCGCATATGATGTTTATTATTATTAAATGATATTACAA 4140
GTTCCATTACTGACTATTACATGCATTACACCAACGCTGACAATATAACTTTTAAACCCTACTATCATCAGTATGAAGGGTTGGCTCGG 4230
AATAAACAATGCTGAATAGTCTAACAGTGAATTAACAATAATGCTCCGAAAGCTATTACAGACATTTAATTAACAATATTACGAC 4320
ACCCAGTTTCGCTTTGGTTACCCCAACGGACGTTTTACCCTATAATAACGGTTCGACCACATTTTATATTAGAGCGGTGAGTGGTACACAT 4410
ATATTTAATAACGACTTAGTTGGTAAAACAATCATTATAATGAACGGTGAATCTGGTTGAAGAGTGTATAAATTCGTTTGGTACCGAG 4500
CTCATGCCGTTGGCGAGACAGCGCCACTGTTACAATGGACAGGACTACTATTGGCCGGTGGACGGTGCCGGTATCAAGGATGAGGGGTGT 4590
CGCGCTGCCTTTCAACACGCTACACTAGGAACGGTAACAATAGTGTGCGGCACAGGCCATGTTCAACCAGAACGCAGAGTATGCCGCA 4680
ATGGCGGGAAAAGATTATAGGAATTTGACACACATTAGGGAGAGTGGTGGCAAAATATTTATGTGGCGGGGTGCTGCAACCGCTAGC 4770
GCTAGGTTTGGTGACAAGTCCGGTATGGACACGGTGAATGTGACGTGGCGCACAAACACTGTGCCCTTACAAGAGCGTGACACTTTTTAT 4860
TTTTGTCCGACCGCGTGCACGAACCTGGCTACTTTGAGGTGTATGTGTCGCGAAGGTTATGATGCGGGCAAAAGTAGTTTGCAGTGG 4950
TCCGATTTGGAGTTGGTGTACAGTAATACGTTCAATTTGGTGAACAAAGAAATGGACTTGTGTAGTAGTGATCGAATGTACGAGTTGAGG 5040
GATGTGAAAATCCGTTAAGGAGTGGTGGGTTTGTGATGTATGTGAGATGGCAAAGGGAGGATGTGGCGGAGAGGGTTTCTATAAATGT 5130
GTGGATGTTGTTCAAGCAAAACGAAAAGTATTTGGAGCTCGGCGGAGCGGAAGCAtgacgtcatcttggtagcgcaccaacaacaac 5220
gtcatgtttgacgacgctggtgcatgtggattgacgcccactacattttcaaaactctaaaatgcccgttgcacgtttcaacagctg 5310
ttgtttccattccgctcgaaacaccgcaagatgataaacgatatcggcaatccgctgcttggctcgtttccacctccaataaacacgctg 5400
aagtacatggtggacatttacggcgccggtggtgacaatgcttccgctgcttggtttccgaccagttgctcaccacgtttattggc 5490
aataatataatgagcttttggtaaccgacaacggcgtgccaaccaccctgccaaccgcaaacgcccgttggattgcttcaaaag 5580
caaatgtggacgcttggaaaaactggcgcccaaaatgacctgctcatcaacagctcaaccaaatctcgttaaatcaatccaacca 5670
ttctagaattgcccacgctacgcccagatgatggccgcttggaaagcgcaaacagacacaatacttaaccgctcaacgctggttagtg 5760
gatgaaataaagccgcttggctgaccagtcgctcagctgaggaaacaattgacaaattgctgaagccatcaacgctggttggcga 5850
acgttacgcagcgaatgaacaacccaactcttttggaccaacttggcgtccagcacaacaaacatttaacagctacattaaacaatttg 5940
ttgaatgccatcgaagcagcagcggcgccgagggcggcttgggtgacgcccagcgtcaaaaagttagcgcagctgcttgcctgctggt 6030
accgaaataagaagcattttGATGGGCAGTGCAAA ... 6066

```

Feature	Location	Size			Type
✓ V5 tag	1 .. 42	42 bp			CDS
/product	= epitope tag from simian virus 5				
/translation	= GKIPNPLGLDST 14 amino acids = 1,4 kDa				
✓ 6xHis	52 .. 69	18 bp			CDS
/product	= 6xHis affinity tag				
/translation	= HHHHHH 6 amino acids = 840,9 Da				
✓ OpIE-2 poly(A) signal	87 .. 216	130 bp			polyA_signal
/gene	= immediate-early gene 2 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= baculovirus polyadenylation signal				
✓ ori	344 .. 932	589 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
/note	= high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication				
✓ OpIE-1 promoter	1007 .. 1298	292 bp			promoter
/gene	= immediate-early gene 1 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= moderate constitutive baculovirus promoter for insect cell expression				
✓ EM7 promoter	1324 .. 1371	48 bp			promoter
/note	= synthetic bacterial promoter				
✓ PuroR	1396 .. 1995	600 bp			CDS
/gene	= <i>pac</i> from <i>Streptomyces alboniger</i>				
/product	= puromycin <i>N</i> -acetyltransferase				
/note	= confers resistance to puromycin				
/translation	= MTEYKPTVRLATRDDVPRVRLAAAFADYPATRHVTDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVVWVADDGAAVAVWTTPEVVEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMKLLAPHR PKPEAWFLATVGVSPDHQKGLGSAVVLPGVEAAERAGVPAFLETSAPRNLPHYERLGFVTADVKKVPEGPRTWCMTKPGA* 199 amino acids = 21,5 kDa				
✓ AmpR	2089 .. 2949	861 bp			CDS
▶ 2 segments					
/gene	= <i>bla</i>				
/product	= β-lactamase				
/note	= confers resistance to ampicillin, carbenicillin, and related antibiotics				
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFLPVFA,HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEVSPVTEKHLTDGMTVREL CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLNHMGDHTVRLDRWEPELNEAIPNDERDTTTPVAMATTLRKLTLGELLTLASRQQLIDWMEADKVGAPLLRSALPAGWFIADKSGAGER GSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW* 286 amino acids = 31,6 kDa				
✓ OpIE-2 promoter	3045 .. 3592	548 bp			promoter
/gene	= immediate-early gene 2 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= strong constitutive baculovirus promoter for insect cell expression				
✓ ENH AgseGV	3607 .. 4491	885 bp			misc_feature
✓ GP37 CpGV	4504 .. 5166	663 bp			misc_feature
✓ PEP AgMNPV	5203 .. 6066	864 bp			misc_feature



























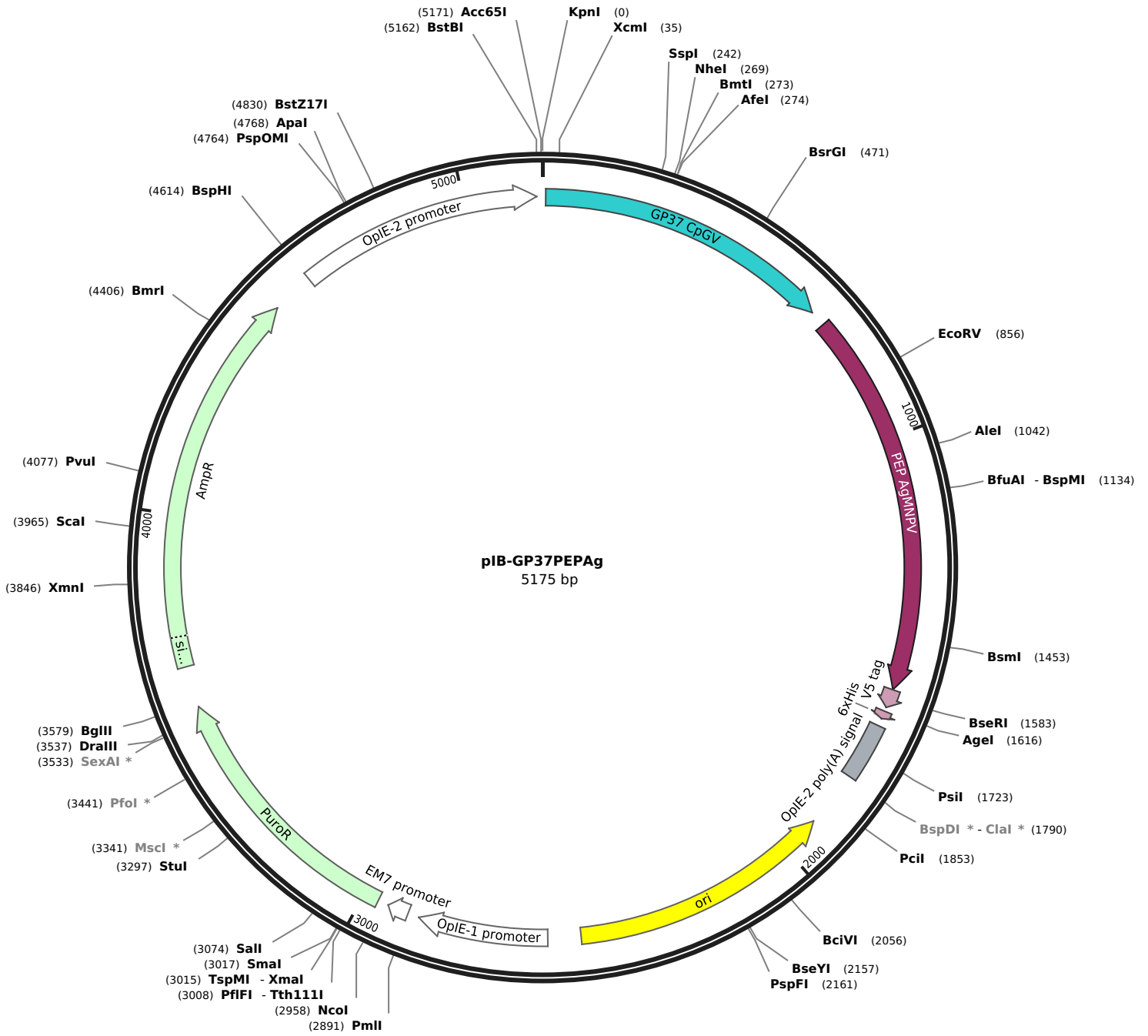
```

... CGGCGGAGGCGGAAGCatgacgtcatcttgtatgacgcccacaacaacgcatgtttgacgacgcgtcggtcatgtggattgacgccga 90
ctacatTTTTTcaaaactctaaaatgcccgtgtccacgtttcaacagctgtgttttccattccgtcgaaacaccgcaagatgataaacga 180
tatcggcaatcccgctcttgttctgtttccacctccaataaacacggtcaagtacatggtggacatttacggcgccgctgttgacaat 270
gCGTgcccgtcgtgtgttttccgaccagttgctcaccacgtttattgccaataatataatgagcttttgaaccgacaacggcgtgcca 360
accaccaccggtgccaaccgcaaacgcccgcgtttgatgtcgttcaaaaacaaattgtggacgcgttggaaaaactggcgcaccaaaatga 450
cctgctcatcaacagcgtcaaccaaatTTcgtaaatcaatccaaccaattcttagaattgCGcagcagtagcggcagatfatggcgcg 540
gttggaaagcggcaaaagacacaataactttaaccgctcacaacggtttagtggatgaaattaaagccgcttggctgaccagtcgctcagc 630
gcaggaacaaattgacaaattgcttgaagccatcaacgtggttgcgcaaacggttacgagcgaatgaacaacaccaactctattttgac 720
caacttggcgtccagcataaacacatttaacagtagacattaaacaatttgtgaatccatcgaaggcataacggcggcaaggcggcg 810
attgggtgacgcccaccgctcaaaagttagcgcagctgctgtatctggtgacggaaataagaagcattttGATGGGCGAGTCAAAGGTAA 900
GCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGGTACCGGTATCATCACCATCACCATTTGAGTTTTATCTGACTAAATCTTAGTT 990
TGTATTGTCATGTTTTAATACAATATGTTATGTTTAAATATGTTTTAATAAATTTATAAAAATAATTTCAACTTTTTATTGTAACAACAT 1080
TGTCCATTTACACACTCCTTTCAAGCGCGTGGATCGATGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA 1170
GGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCGCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTGCTGGCGTTTTCCTAGGGCTCCGCCCCCT 1260
GACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAAGGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCC 1350
CTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCA 1440
CGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGTCCAAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTACGCCCGACCGCTGCCCTTA 1530
TCCGGTAACTATCGTCTTGAAGTCCAACCGGTAAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG 1620
TATGTAGCGGCTCAGAGTCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTTAACTACGGCTACACTGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTGCTGAAAG 1710
CCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACACCCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAG 1800
ATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAAGAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGAACGAAAAACTCAGTTAAGGG 1890
ATTTTGGTCACTCGAACAACACGACGCGCGCGCACGCGCTTATGCACAACACGCGTGTGACACGCGCCACCCTAACCCGACGGCCAATC 1980
GGTGGCGGCTCATATCCGCTCACAGCCGCGCTCTATCGGGCGCGCTTCCGCGCCATTTGAATAAATAAACGATAACCGTACCGCTTG 2070
GTGGCGTGAGGCATGTAAGAAGTTACATCATTATCTTGTTCGCCATCCGGTTGGTATAAATAGACGTTTATGTTGGTTTTTTGTTTCAGTT 2160
GCAAGTTGGCTGCGCGCGCGCAGCACCTTTGCGGGATCTGCCGGCTGACGACGCTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGG 2250
CATAGTATAATACGACAGGAGGAGGAACATAACCTAGGCAATGACCGAGTACAAGCCACGGTGCCTCGCCACCCGCGACGACGCTCC 2340
CCGGCGGTACGCACTCTCGCCGCGCTTCCGGGACTACCCGACGCGCCACACCGCTCGACCCGGACACATCGAGCGGGTAC 2430
CGAGCTGCAAGAACTCTTCTCACGCGCGTGGGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGGTGCGGGACGACGGCGCCGCGGTGGCGGTCTGGAC 2520
CACCGCGAGAGCGTGAAGCGGGGGCGGTGTTCCGCGAGATCGGCCCGCGCATGCGCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCA 2610
ACAGATGAAAGCCCTCCTGGCGCGCACCGGCCAAAGGCGCGGTTCTGTCACCGTGGCGTCTCGCCGACCCGACCGGCAAGG 2700
GGGTCTGGGCGAGCGCGCTGCTGCTCCCGGAGTGGAGGCGCGGAGCGCGCGGGGTGCCCGCTTCTGGAAGCTCCGCGCCCGCAA 2790
CCTCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTACCGTACCGCGGACGTCAAGGTGCCGGAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGACCCGCAAGCC 2880
CGGTGCTGACGCCCGCCACGAGATCTGCATGTCTACTAAACTACAATAATAGAGCTTCAATTTAATTATCAGTTATTACCCATTG 2970
AAAAAGGAAGAGTATGAGTATCAACATTTCCGTCGCGCTTATCCCTTTTTTGGGCAATTTTGCCTTTCTGTTTTTGTTCACCCAGA 3060
AACGCTGGTGAAGGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGA 3150
GAGTTTTTCCCGGGAAGAAGCTTTTCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACCGCGGCA 3240
AGAGCAACTCGGTCGCGCATACACTATTTCAAGATGACTTGGTGAAGTACTCACAGTACACGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC 3330
AGTAGAGAATTTAGCAGTGTGCATACCATGAGTATAACACTGCGGCCAATTTACTTGAACAACGATGGAGGACCGAAGGAGCT 3420
AACCGTTTTTTTGCACAACATGGGGATCATGTAACCTCGCTTGTATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACAAACGACGAGCG 3510
TGACACCACGATGCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT 3600
AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG 3690
TGAGCGTGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAAGCCCTCCGATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGC 3780
AACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATAT 3870
ACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGATGATAAACATGTATG 3960
GTGCTAATGTTGCTTCAACAACAATTTCTGTTGAAGTGTGTTTTTTCATGTTTGCACAACAGCACCTTTATACTCGGTGGCTCCCCACCACC 4050
AATTTTTTGCACGCAAAAAAACACGCTTTTGCACGCGGGCCATACATAGTACAAACTCTACGTTTCGTAGACTATTTTTACATAAATA 4140
GTCTACACCGTTGTATACGCTCAAATACACTACCACACATTGAACCTTTTTTGCAGTGCAAAAAAGTACGTGTGGCAGTACAGTAGGCC 4230
GGCCTTATCGGGTGCAGTCTGTACAGTACGAATCACATTATCGGACCGGACGAGTGTGTCTTATCGTGACAGGACGCCAGCTTCTGT 4320
GTTGTAAACCGCAGCCGGACGCAACTCTTATCGGAACAGGACGCGCTCCATATCAGCCGCGGCTTATCTCATGCGCGTACCCGGACAC 4410
GAGGCGCCCGTCCGCTTATCGCGCTATAAATACAGCCCGCAACGATCTGGTAAACACAGGTTGAACAGCATCTGTTGCAATTTAGgtac 4500
CATGTTTTTTAAACAAGATCTCAGCGGGTCCGGAGCTGCTTATTATGGACGTTTTGGATTGGTGTGACCACGCAATCTTTGATCTTTT 4590
CTACAATGTCTCCATTTCAAATTTGATAATGCTTCATGTGATGGGTACGCGCTACGATTTTGGATTGCTAATAGCAAATCAATATTTGA 4680
AGAGACGTGGGCGAGCATATTTGCCGATAGATATCAATTTTTTAGTCTACAAAATGGAACGTTATTAACAACACCGGCTTTGGACC 4770
ACAAATGTATTTACAATAATTTACTGATATCAATATATGTTCTCGGCCAGAACTCCTTTCCCGCTTGGCCAGAGTTTAGAAAGCTATT 4860
AATTTTATCTCTAATTTTAAATACAAAACCGGAGAAGATGGGTTAGAGAGTTAAATCGCTCATTTAGACGAAAGCAGATTGGAATGGT 4950
ATTTGAGAGCGGTCAAATCTTCTTTGCTTCTGCGAAACTACTCGCATATGATCTTTATTATTATTTCAAATGATATTAACAAGTTCC 5040
CATTACTGACTATTACATGCATTACACCAACGCTGACAAATAACTTTAAACCCTACTATCATCAGTATGAAGGGTTGGCTCGGAATAA 5130
ACAATGCTTGAATAGTCTAAACAGTGAATTAACAATAATGCTCCGAAAGCTATTCAGACCAATTAATTAACAATATACGACACCCA 5220
GTTGCTTTGGTTACCCCAACGGACGTTTTACCCTATAATAACGGTTCGACCACATTTTATATTAGAGCGGTGAGGTACACATATATT 5310
TAATAACGACTTAGTTGGTAAACAATCATTATAATGAACGGTGTACTGTGGTTGAAGAGTGTATAATTCGCTTTGGTACCGAGCT ... 5397

```



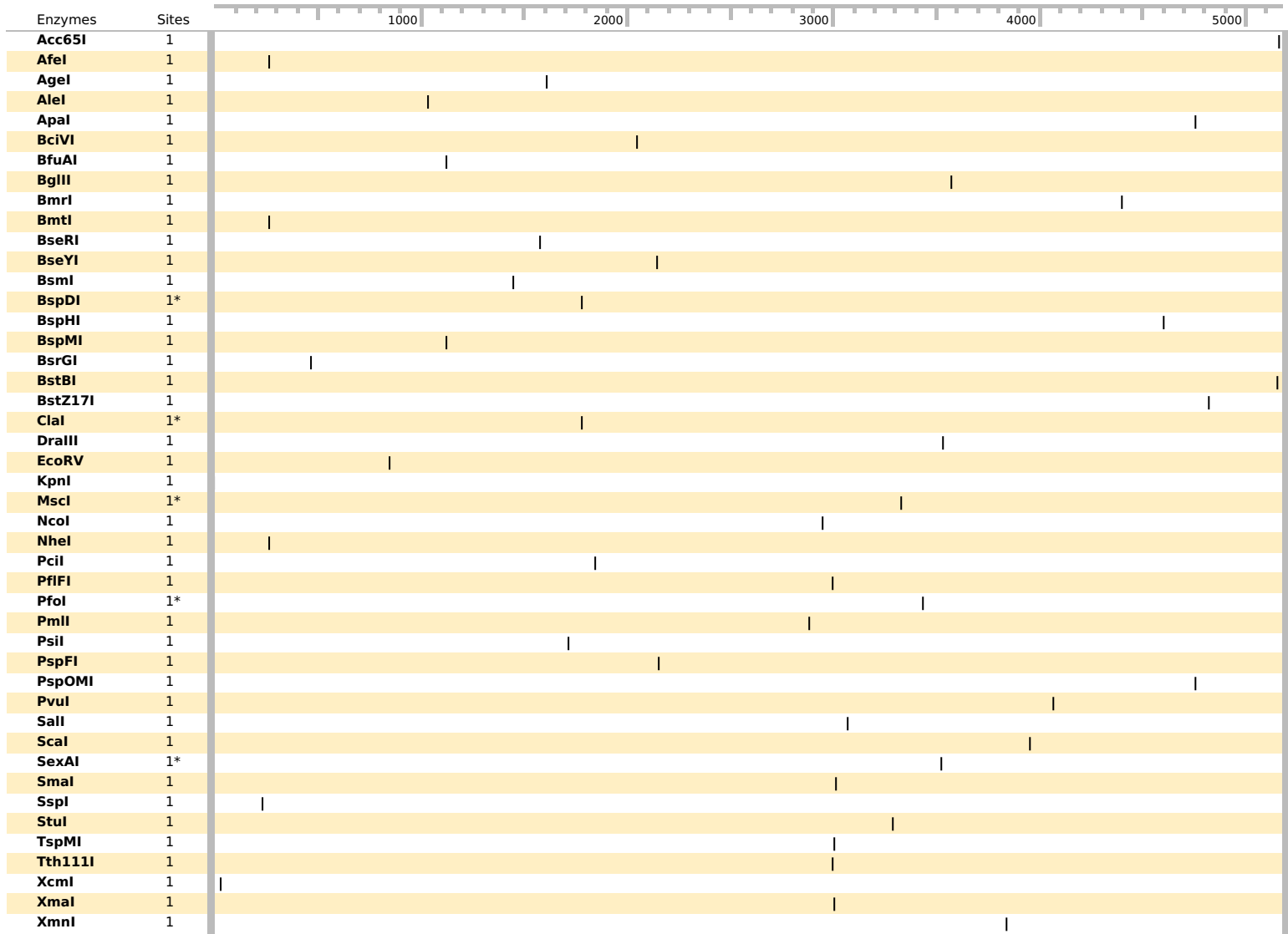
Feature	Location	Size			Type
✓ PEP AgMNPV	32 .. 895	864 bp			misc_feature
✓ V5 tag	896 .. 937	42 bp			CDS
/product	= epitope tag from simian virus 5				
/translation	= GKPIPPLLGLDST 14 amino acids = 1,4 kDa				
✓ 6xHis	947 .. 964	18 bp			CDS
/product	= 6xHis affinity tag				
/translation	= HHHHHH 6 amino acids = 840,9 Da				
✓ OpIE-2 poly(A) signal	982 .. 1111	130 bp			polyA_signal
/gene	= immediate-early gene 2 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= baculovirus polyadenylation signal				
✓ ori	1239 .. 1827	589 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
/note	= high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication				
✓ OpIE-1 promoter	1902 .. 2193	292 bp			promoter
/gene	= immediate-early gene 1 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= moderate constitutive baculovirus promoter for insect cell expression				
✓ EM7 promoter	2219 .. 2266	48 bp			promoter
/note	= synthetic bacterial promoter				
✓ PuroR	2291 .. 2890	600 bp			CDS
/gene	= <i>pac</i> from <i>Streptomyces alboniger</i>				
/product	= puromycin <i>N</i> -acetyltransferase				
/note	= confers resistance to puromycin				
/translation	= MTEYKPTVRLATRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRHVTDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVVVADDGAAVAVWTTTPESVEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMKGLLAPHR PKEPAWFLATVGVSPDHQKGLGSAAVVLPGVEAAERAGVPAFLETSAAPRNLPFYERLGFVTADVKKVPEGPRTWCMTRKPGA* 199 amino acids = 21,5 kDa				
✓ AmpR	2984 .. 3844	861 bp			CDS
▶ 2 segments					
/gene	= <i>bla</i>				
/product	= β-lactamase				
/note	= confers resistance to ampicillin, carbenicillin, and related antibiotics				
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFLPVFA,HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMMSDFKLVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLNHMGDHSVTRLDLDRWEPELNEAIPNDERDITMPVAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVVAGPLLRSLAPAGWFIADKSGAGER GSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW* 286 amino acids = 31,6 kDa				
✓ OpIE-2 promoter	3940 .. 4487	548 bp			promoter
/gene	= immediate-early gene 2 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= strong constitutive baculovirus promoter for insect cell expression				
✓ ENH AgseGV	4502 .. 5386	885 bp			misc_feature



























```

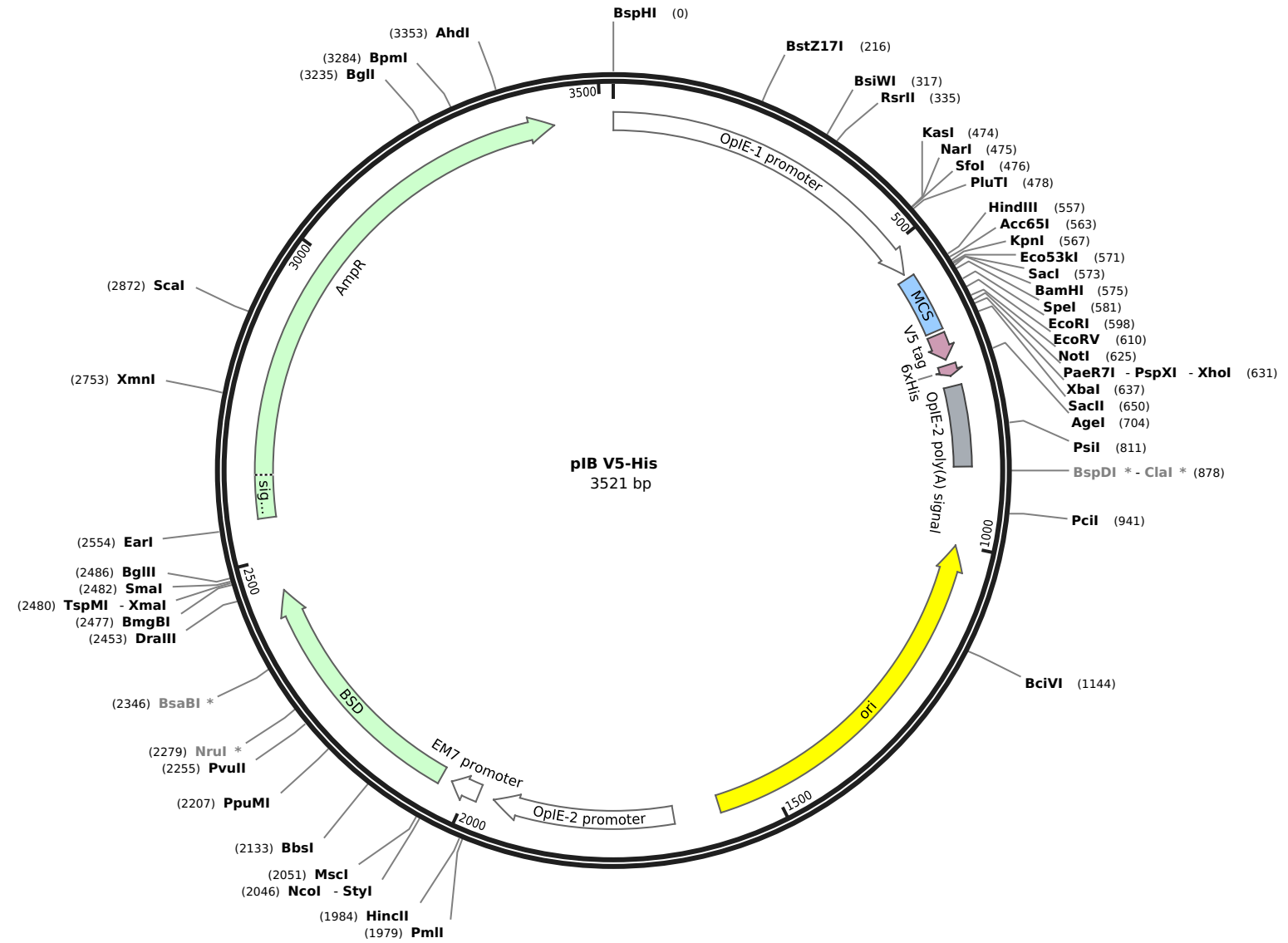
... CGAGCTCATGCCGTTGGCGAGACAGCGCCACTGTTACAATGGACAGGACTACTATTGGCCGGTGGACGGTGCCGGTATCAAGGATGAGGG
180
GTGTCGGCGTCCCTTTCAACACGCTACACTAGGAACGGTAACAATAGTGTGCGGCACAGGCCATGTTCAACCAGAACCGCAGAGTATGC
270
CGCAATGGCGGAAAAGATTATAGGAATTTGACACACATTTAGGAGAGTGTGGTGCCAAATATTTATGTGGCGCGGGTCTGCAAACGC
TAGCGCTAGGTTTGGTGACAAGTCGGGTATGGACACGGTGAATGTGACGTGGCGCACAAACACTGTGCCTTACAAAGAGCGTGACACTTT
360
TTATTTTTGTCCGACCGCCGTGCACGAACCTGGCTACTTTGAGGTGTATGTGTCCGAGAAAGTTATGATGCGGGCAAAGTAGTTTGCA
450
GTGGTCCGATTTGGAGTTGGTGTACAGTAATACGTCCAATTTGGTGACCAAGAAATGGACTTGTGTAGTAGTATGATCGAATGTACGAGTT
540
GAGGATGTGAAAATTCGGTTAAGGAGTGGGTTTGTGATGTATGTGAGATGGCAAAGGGAGGATGTGGGCGGAGAGGGTTTCTATAA
630
TTGTGTGGATGTTGTTACAAGCAAACGAAAAGTGATTTGGAGCTCGGCGGAGGGCGAAGCAtgacgtcatctgtatgacgcccaca
720
caacgtcatgtttgacgacgctcggtcatgtggattgacgcccactacatTTTTCAAACCTCAAATGCGGTgtgccacgtttcaaca
810
gctgtgttttccattccgtcgaaacaccgcaagatgataaacgataatcggaatccgcccgtctgttccgtttccaccttccaataaac
900
ggtcaagtacatggtggacatttacggcgcgctggtgtgacaatgctgtgcccgtctgttgtttccgaccagtgtccaccacgtttat
990
tgccaataattatagagctttgtaacggacaacggccgtgccaaccaccaccgtgccaaccgcaaacgcccgcgtttgatgctgttca
1080
aaagcaaatgtggacgctgtgaaaaactggcgcaccaaaatgacctgctcatcaacagcgtcaaccaaattcgctaataatcaatccaa
1170
ccaattcttagaattggcgcagcagtagcgcagattatggcgcgttggaaagcgcgaagacacaataacttaaccgtctcaacgtgtt
1260
agtggatgaaattaaagccgctgtgacctgaccagtcgctcagctcaggaacaaaatgacaaaatgcttgaagccatcaacgtgttgc
1350
gcaaacgttacgcagcgaatgaacaacaccaactctatTTGACCAACTTGGGCTCCAGCATAACCAACATAACAGTACATAAACA
1440
TTTGTGAATGCCATCGAAGCATAACGGCGGCGAAGCGGCGGATTTGGGTGACGCCGACCGTCAAAGTTGAGCGACGCTGTGATCT
1530
ggtgaccgaaataagaagcatttGTATGGGCGAGTCGCAAAGGTAAGCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTGATTTACGCGTACCG
1620
TCAATGACCACTACCATGAGTTTATCTGACTAACTCTAGTTTGTATTGTCTGTTTAAATAACAATATGTTATGTTAAATATGTTT
1710
TTAATAAATTTTATAAATAATTTCAACTTTTATTGTAACAACATTGTCCATTTACACACTCCTTTCAAGCGCGTGGATCGATGCTCAC
1800
TCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGT
1890
AAAAAGCCGCGTGTGCGCGTTTTTCCTAAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAC
1980
CCGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTTTCCCCCTGGAAAGCTCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTCGCGCTACCGGATACCTG
2070
TCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTG
2160
GGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAAGTCAAACCGGTAAGACACGACTTA
2250
TCGCCACTGGCAGCAGCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTA
2340
GGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAAGTTACCTTCGGA AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGAATCCGGCAA
2430
CAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAA GAAGATCCTTTGATCTTT
2520
TCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA TGCGAAACACGCACGGCGCGCGCAGCTTATG
2610
ACAAAACGCGTGTGTCACGCGCCACCGCTAACCCGAGGCCAATCGGTGGCGCGGCTCATATCCGCTCACCAGCCGCTCTATCGGG
2700
GCGGCTTCCGCGCCATTTTGAATAAATAAACGATAACGCCGTTGGTGGCGTGAGGCATGTAAAAGGTTACATCATTATCTTTGTCGCCA
2790
TCCGTTGGTATAAATAGACGTTTATGTTGGTTTTTGTTCAGTTGCAAGTTGGCTGCGGCGCGCGCAGCACCTTTGCGGGATCTGCGG
2880
GGCTGACGACGCTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACATAACCATGGCAATGAC
2970
CGAGTACAAGCCACGGTGCCTCGCCACCCGCGACGAGCTCCCCGGGCGTACGACCTCGCCGCGGTTTCGCGGACTACCCCGC
3060
CACGCTCAACACCGTGCACCCGACCGCCACATCGAGCGGGTCAACCGAGCTGCAAGAACTTCTCCTCACGCGCGTTCGGGCTGACATCGG
3150
CAAGTGTGGGTGCGGGACGACGGCGCCGCGTGGCGGTCTGGACCAGGCCGGAGAGCGTCAAGCGGGGGCGGTGTTCCGCGAGATCGG
3240
CCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCAACAGATGAAAGGCCCTCCTGGCGCCGACCGGCCAAAGGAGCCCGC
3330
GTGGTTCTGGCCACCGTCCGGGTCTCGCCGACCAACGGGCAAGGCTGGGCGAGCGCGTGTGCTCCCGGAGTGGAGGCGGCGGA
3420
GCGCGCCGGGGTCCCGCTTCTGAGACCTCCGCGCCCGCAACCTCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTACCCTGACCGCGGACGCT
3510
CAAGTGTCCCGAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGACCCGAAGCCCGTGCCTGACGCCCCCGCCACGAGATCTGCATGTCTACTAACT
3600
CACAATTAGAGCTTCAATTTAATATATCAGTTATTACCCATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTTGTCGCCCTTAT
3690
TCCCTTTTTTGGCAGTTTTGCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAG
3780
AGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCCGCCGAAAGACGTTTTTCCAAATGATGAGCACTTTTAA
3870
AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
3960
TGAGTACTCACCAGTCAAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
4050
TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGA
4140
TCGTTGGGAACCGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACT
4230
ATTAACGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAAGGACCACCTCTGCGCTC
4320
GGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAAGCGTGGGTTCTGCGGTTATCATTGCAAGCACTGGGGCCAGATGG
4410
TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTC
4500
ACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTA
4590
GGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGATGATAAACAATGTATGGTGTAAATGTGCTTCAACAACAATCTGTTGAAGTGTGTTTTCA
4680
TGTTTTGCCAACAAGCACCTTTTACTCGGTGGCCTCCCAACCAACTTTTTTGCAGTGCAAAAAAACACGCTTTTGCACGCGGGGCCA
4770
TACATAGTACAAACTCTACGTTTTGAGACTATTTTACATAAATAGTCTACCCGTTGTATACGCTCCAAATACACTACCACACATTTGAA
4860
CCTTTTTGCAAGTGCAAAAAGTACGTGTGGCAGTACGTTAGGCCGGCCTTATCGGGTGCCTGTGCTACGATACGAATCACATTATCGG
4950
ACCGGACGAGTGTGTCTTATCGTGACAGGACGCCAGCTTCTGTGTTGCTAACCAGCCGGACGCAACTCCTTATCGGAACAGGACGC
5040
GCCTCCATATCAGCCGCGCTTATCTCATGCGCGTGACCGGACACGAGGCGCCCGTCCCGCTTATCGCGCTATAAATACAGCCGCAAC
5130
GATCTGGTAAACACAGTTGAACAGCATCTGTTGCAATTAAGgtac ... 5175

```

Feature	Location	Size			Type
✓ GP37 CpGV	8 .. 670	663 bp			misc_feature
✓ PEP AgMNPV	707 .. 1570	864 bp			misc_feature
✓ V5 tag	1571 .. 1612	42 bp			CDS
/product	= epitope tag from simian virus 5				
/translation	= GKPIPPLLGLDST 14 amino acids = 1,4 kDa				
✓ 6xHis	1622 .. 1639	18 bp			CDS
/product	= 6xHis affinity tag				
/translation	= HHHHHH 6 amino acids = 840,9 Da				
✓ OpIE-2 poly(A) signal	1657 .. 1786	130 bp			polyA_signal
/gene	= immediate-early gene 2 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= baculovirus polyadenylation signal				
✓ ori	1914 .. 2502	589 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
/note	= high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication				
✓ OpIE-1 promoter	2577 .. 2868	292 bp			promoter
/gene	= immediate-early gene 1 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= moderate constitutive baculovirus promoter for insect cell expression				
✓ EM7 promoter	2894 .. 2941	48 bp			promoter
/note	= synthetic bacterial promoter				
✓ PuroR	2966 .. 3565	600 bp			CDS
/gene	= <i>pac</i> from <i>Streptomyces alboniger</i>				
/product	= puromycin <i>N</i> -acetyltransferase				
/note	= confers resistance to puromycin				
/translation	= MTEYKPTVRLATRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRHTVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVVWVADDGAAVAVWTTPESEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMKGLLAPHR PKPEAWFLATVGVSPDHQKGLGSAVVLPGVEAAERAGVPAFLETSAAPRNLPFYERLGFVTADVKVPEGPRTWCMTKPGA* 199 amino acids = 21,5 kDa				
✓ AmpR	3659 .. 4519	861 bp			CDS
▶ 2 segments					
/gene	= <i>bla</i>				
/product	= β-lactamase				
/note	= confers resistance to ampicillin, carbenicillin, and related antibiotics				
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFA,HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMMSDFKLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLNMGDHTVRLDRWEPELNEAIPNDERDTTTPVAMATTLRKLTTGELLTLASRQQLIDWMEADKVVAGVPLLRSAIPAGWFIADKSGAGER GSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW* 286 amino acids = 31,6 kDa				
✓ OpIE-2 promoter	4615 .. 5162	548 bp			promoter
/gene	= immediate-early gene 2 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= strong constitutive baculovirus promoter for insect cell expression				

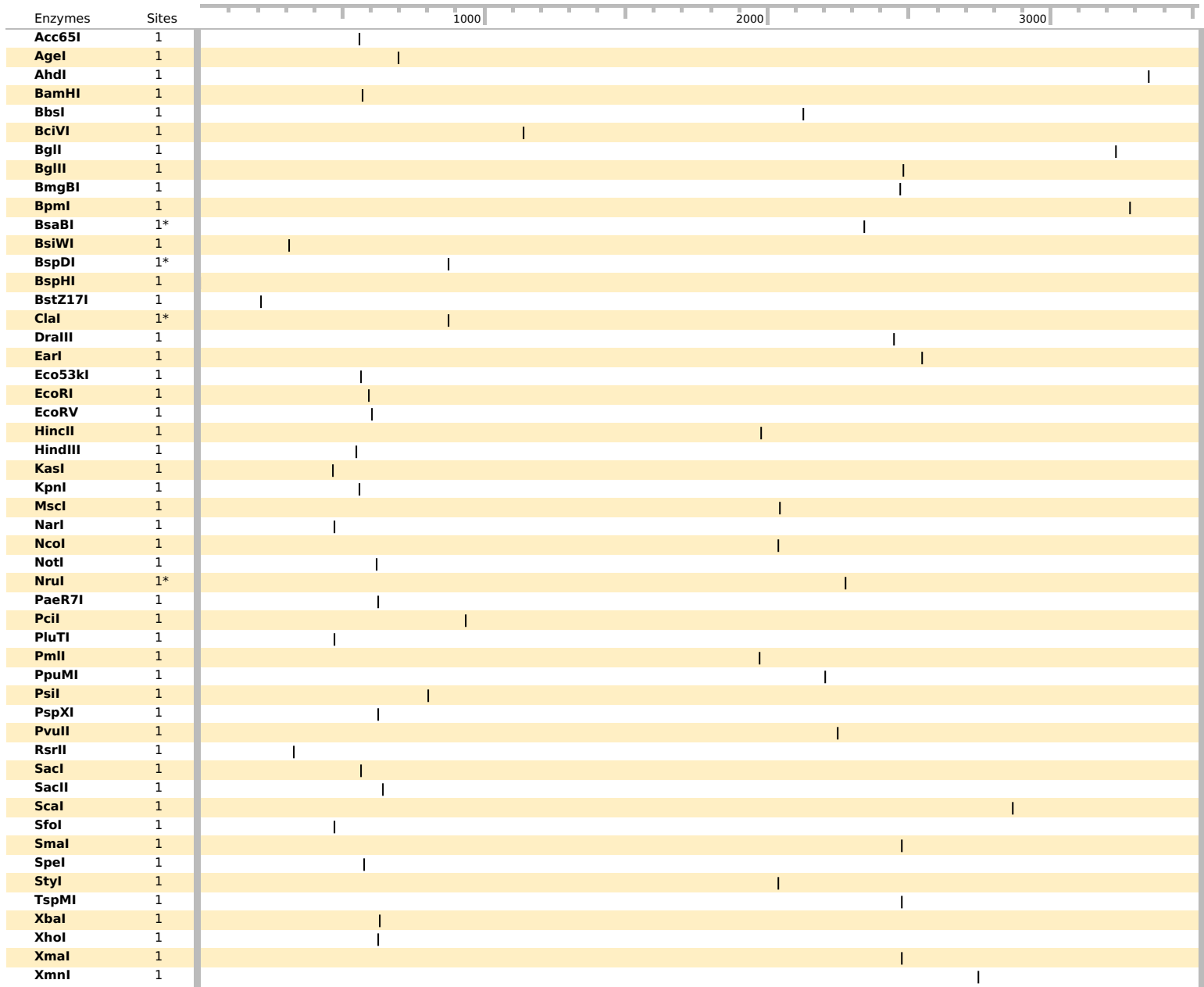
Insect cell vector for transient or stable constitutive expression of C-terminally V5-6xHis-tagged proteins.

























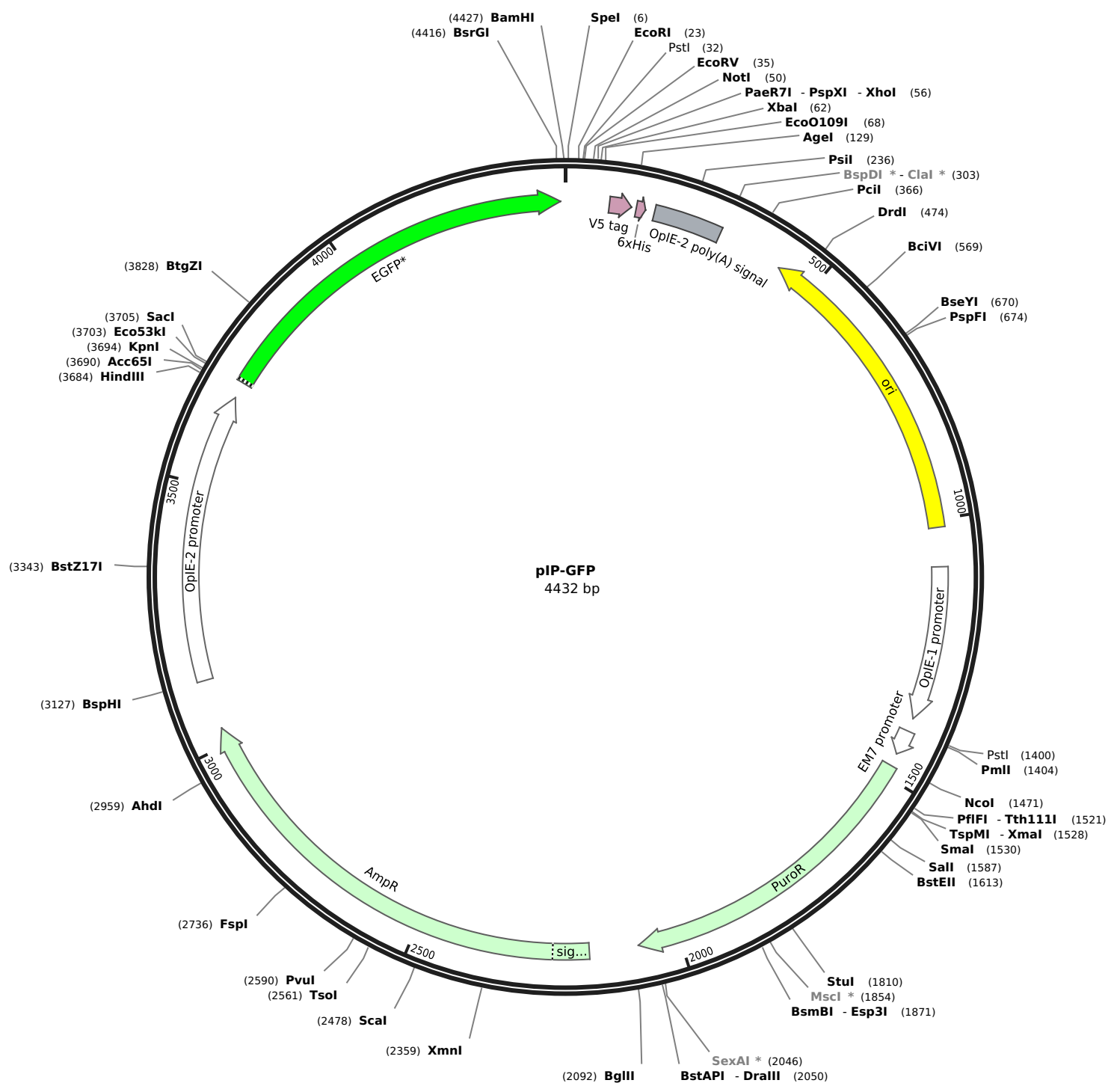
```

... CATGATGATAAACAAATGTATGGTGCTAATGTTGCTTCAACAACAATTCTGTTGAACTGTGTTTTTCATGTTTGCCAACAAGCACCTTTATA 90
CTCGGTGGCCTCCCACCACCAACTTTTTTGCCTGCAAAAAAACACGCTTTTGCACGCGGGCCCATACATAGTACAAACTCTACGTTTC 180
GTAGACTATTTTACATAAAATAGTCTACACCGTTGTATACGCTCCTAAATACACTACCACACATTGAACCTTTTTGCAGTGCAAAAAAGTAC 270
GTGTCGGCAGTACAGTAGGCCGGCTTATCGGGTTCGCGTCTGTACAGTACGAATACATTATCGGACCGGACGAGTGTGTCTTATCGT 360
GACAGGACGCCAGCTTCTGTGTTGCTAACCGCAGCCGGACGCAACTCTTATCGGAACAGGACGCGCCTCCATATCAGCCGCGCGTTAT 450
CTCATGCGCGTGACCGGACAGGCGCCCGTCCCGCTTATCGCGCTATAAATACAGCCGCAACGATCTGGTAAACACAGTGAACAG 540
CATCTGTTTTCGAATTTAAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTCGAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCG 630
CTCGAGTCTAGAGGGCCCGCGGTTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTTCATCATCACCA 720
TCACCATTGAGTTTATCTGACTAAATCTTATGTTGTATTGTCATGTTTAAATACAATATGTTATGTTTAAATATGTTTTTAAATAATTTT 810
ATAAAATAAATTTCAACTTTTATGTAACAACATTGTCCATTTACACTCCTTTCAAGCGCTGGGATCGATGCTCACTCAAAGGCGGTA 900
ATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCGCGG 990
TTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTA 1080
TAAAGATACCAGGCGTTTCCCGCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCGCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTC 1170
CCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTGAGTGTAGGTGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAC 1260
GAACCCCGCTTACGCCGACCGCTGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAAGTCCAACCCGGTAAAGACAGCACTTATCGCCACTGGCA 1350
GCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGA 1440
AGAAGAGTATTTGGTATCTGCGCTGTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCT 1530
GGTAGCGGTGGTTTTTTTTGGCAAGCAGCAGATTACGGCAGAAAAAAGGATCTCAAAGAAGATCCTTTGATCTTTTTCTACGGGGTCT 1620
GACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCTGCGAAACACGCACGGCGCGCGCACGCAGCTTAGCACAAACGCGCTCG 1710
TTGCACGCGCCACCCTAACCGCAGGCCAATCGGTGCGCGGCTCATATCCGCTCACCAGCCGCGTCTATCGGGCGCGGCTTCCGCG 1800
CCCATTTTGAATAAATAACGATAACGCCGTTGGTGGCGTGAGGCATGTAAAAGGTTACATCATTATCTTGTTCGCCATCCGGTTGGTAT 1890
AAATAGACGTTTATGTTGGTTTTTGTTCAGTTGCAAGTTGGCTGCGGCGCGCGCACCTTTGCGGGATCTGCGGGCTGCAGCACG 1980
TGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAAGCCTTTGTCTCAAGA 2070
AGAATCCACCTCATTGAAAGAGCAACGGCTACAATCAACAGCATCCCATCTCTGAAGACTACAGCGTCCGACGCGCAGCTCTCTCTAG 2160
CGACGCGCGCATCTTCACTGGTGTCAATGTATATCATTTTACTGGGGACCTTGCAGCAACTCGTGGTGTGCGGCACTGCTGCTGCTGC 2250
GGCAGCTGGCAACCTGACTTGTATCGTCGCGATCGGAAATGAGAACAGGGGCATCTTGAAGCCCTGCGGACGGTGGCAGACAGTTCTTCT 2340
CGATCTGCATCCTGGGATCAAAGCCATAGTGAAGGACAGTGTAGGACAGCCGACGGCAGTTGGGATTCGTGAATTGCTGCCCTCTGGTTA 2430
TGTGTGGGAGGGCTAAACACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTCCTCGGGAGATCTGCATGCTACTAAACTCACAAATTAGAGC 2520
TTCAATTTAATATATCAGTTATTACCCATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCACAAATTCGCGTGTCCGCTTATTCCCTTTTTTGGC 2610
GCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATC 2700
GAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTTCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGT 2790
GGCGCGGATTATCCCGTATTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCA 2880
GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGTCATAAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTA 2970
CTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGGCAACATGGGGGATCATGTAAGTAACTCGCCTTGTGCTTGGGAACCG 3060
GAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCGTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAA 3150
CTACTTACTCTAGCTTCCCGGAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCT 3240
GGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGT 3330
ATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCAT 3420
TGGTAACTGTACAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTT 3510
TTTGATAATCT ... 3521

```



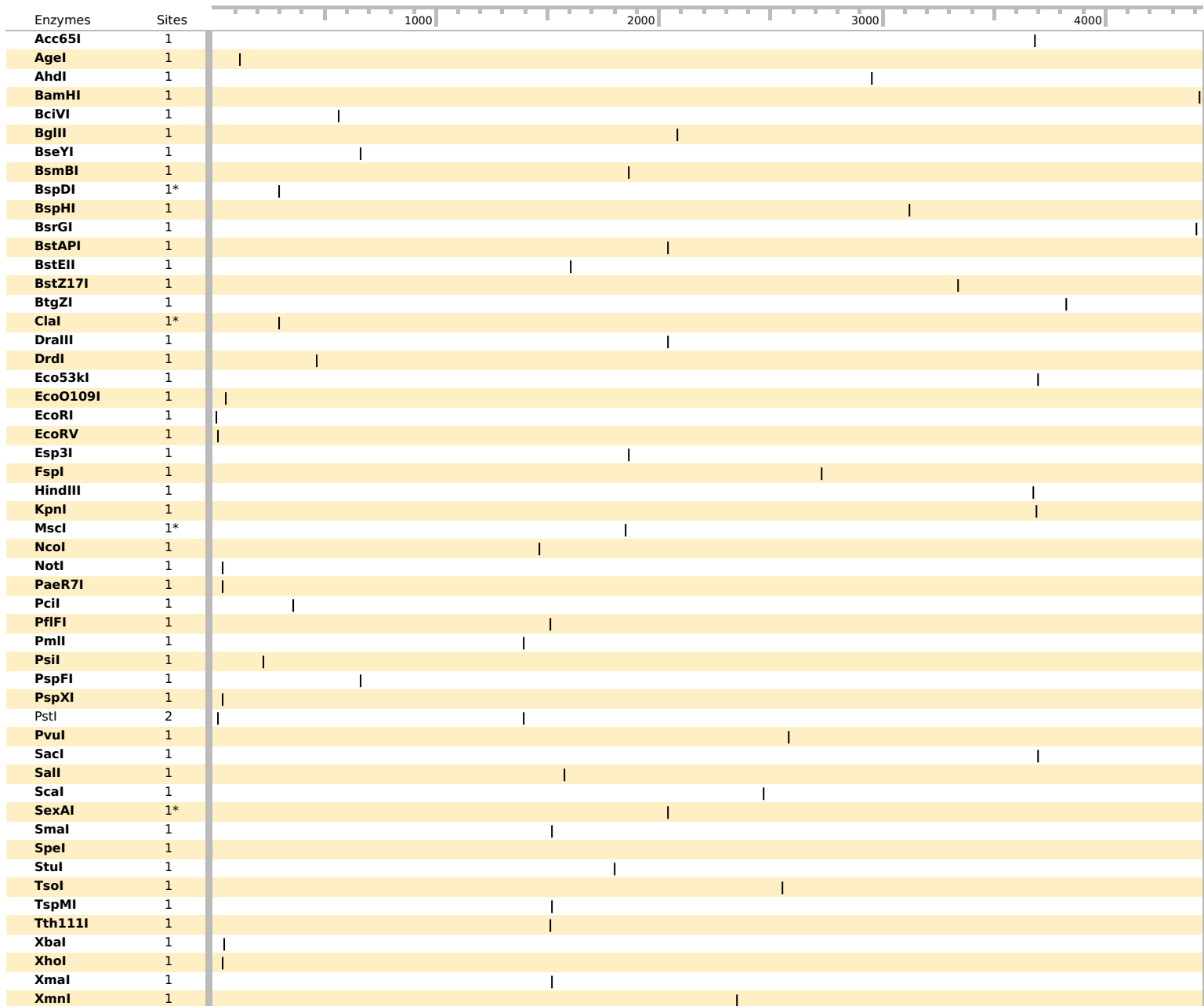
Feature	Location	Size			Type
✓ OpIE-1 promoter	1 .. 548	548 bp			promoter
✓ MCS	557 .. 652	96 bp			misc_feature
✓ V5 tag	659 .. 700	42 bp			CDS
/translation	= GKPIPPLLGLDST 14 amino acids = 1,4 kDa				
✓ 6xHis	710 .. 727	18 bp			CDS
/translation	= HHHHHH 6 amino acids = 840,9 Da				
✓ OpIE-2 poly(A) signal	745 .. 874	130 bp			polyA_signal
✓ ori	1002 .. 1590	589 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
✓ OpIE-2 promoter	1665 .. 1956	292 bp			promoter
✓ EM7 promoter	1982 .. 2029	48 bp			promoter
✓ BSD	2048 .. 2446	399 bp			CDS
/translation	= MAKPLSQEESTLIERATATINSIPISEDYSVASAALSSDGRIFTGVNVYHFTGGPCAELVVLGTAAAAAAGNLTCIVAIGNENRGILSPCGRCRQVLLDLHPGIKAIKDSLSDGQPTAVGIREL LPSGYVWEG*				
	132 amino acids = 13,7 kDa				
✓ AmpR	2566 .. 3426	861 bp			CDS
▶ 2 segments					
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFA,HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMMSDFKVLCCGAVLSRIDAGQEQLGRRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLNHMGDHTVRLDRWEPELNEAIPNDERDTPVAMATTLRKLTLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRALPAGWFIADKSGAGER GSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW*				
	286 amino acids = 31,6 kDa				

























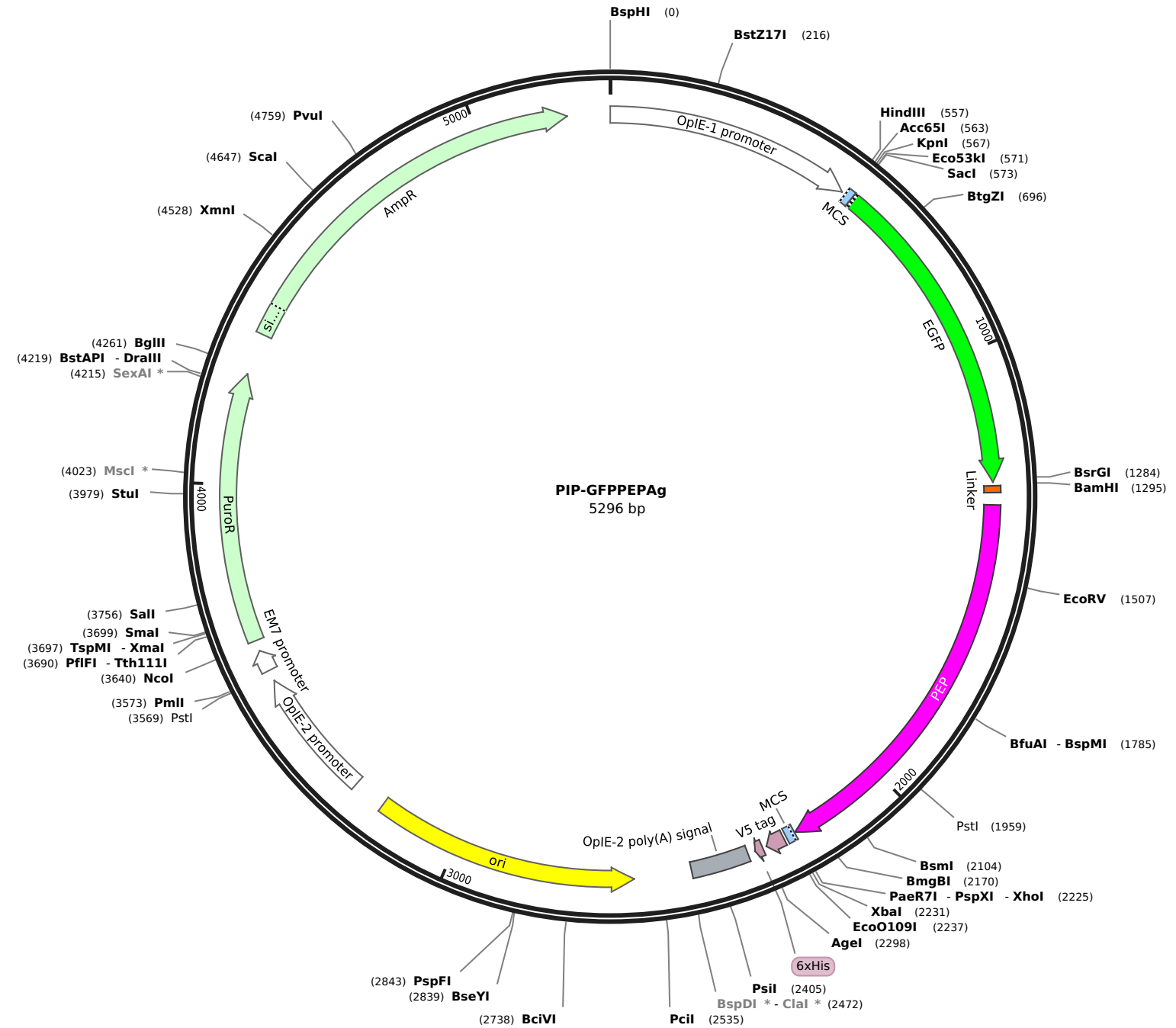
```

... GATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGCGTTTCAAGGTAAGC 90
CTATCCCTAACCCCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTTCATCATCACCATCACCATTGAGTTTATCTGACTAAATCTTAGTTTTG 180
TATTGTCATGTTTTAAATAAATATGTTATGTTTAAATATGTTTTAAATAAATTTTAAATAAATTTCAACTTTTATTGTAACAACATTG 270
TCCATTTACACACTCCTTTCAAGCGCGTGGGATCGATGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGG 360
AAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTCCTATAGGCTCCGCCCTGTA 450
CGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAAGGCGTTTCCCTGGAAAGCTCCCT 540
CGTGCCTCCTCGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCAGGATACCTGTCGCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACG 630
CTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTGAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTACAGCCGACCGCTGCGCTTATC 720
CGGTAACATATCGTCTTGGTCCAACCCGGTAAGACACAGCTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTA 810
TGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC 900
AGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGGATCCGGCAAAACAACACCAGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTGGTTTGAAGCAGCAGAT 990
TACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGAT 1080
TTTGGTCATGCGAAACACGCACGCGCGCGCACGCAAGCTTAGCACAACACGCGTTCGTCACGCGCCACCCTAACCGCAGGCCAATCGG 1170
TCGGCCGGCCTCATATCCGCTCACAGCCGCGTCTATCGGGCGCGCTTCCGCGCCATTTTGAATAAATAAACGATAACGCGCTTGGT 1260
GGCGTAGGCGTAAAAGGTTACATATTCTTGTTCGCGCATCCGCTGGTATAAATAGCGGTTTCATGTTGTTTTTTGTTTTCAGTTGCG 1350
AAGTTGGCTGCGCGCGCGCAGCACCTTTGCGGGATCTGCCGGGCTGCAGCAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCA 1440
TAGTATAATACGCAAGGTTAGGAACTAAACCATGGCAATGACCGAGTACAAGCCACGCTGCGCTCGCCACCCGCGACGACGTTCCCT 1530
GGGCGTACGCACCTCCTCCGCGCTTCCGCGACTACCCGCGCACGCGCACACCGTGCACCCGACCGCCACATCGAGCGGGTACC 1620
AGCTCAAGAAGCTTCTCCTACGCGCGCTCGGCTCGACATTCGGCAAGGTGTGGTTCGCGGACGACGCGCGCGCTGGCGGCTGGACCA 1710
CGCCGGAGAGCGTGAAGCGGGGGCGGTGTTCCGCGAGATCGGCCCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCAAC 1800
AGATAAAGGCGCTTGGCGCGCACCCGCGCAAGGAGCCCGCGTGGTTCCTGGCCACCGTCCGCGTCTCGCCGACCCACAGGGCAAGG 1890
GTCTGGGCGCGCGCTCGGCTCCCGGAGTGGAGGCGCGGAGCGCGCGGGGTCGCGCTTCTGGAGACCTCCGCGCCCGCAACC 1980
TCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTACCCTCACCGCGACCTCAAGGTGGCAGGACCGCGCACCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 2070
GTGCTGACGCGCCCGCAGAGATCTGCATGCTACTAACTCACAATAAGAGCTTCAATTTAATTATATCAGTTATTACCCATTGAA 2160
AAAGGAAGAGTATGAGTATTCACATTTCCGTTGTCGCGCTTATTCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCAACCCAGAAA 2250
CGTGGTGAAGTAAAAGATGAAGATCAGTTGGGTGACGAGTGGGTTACATCGAAGTGGTTCACAGCGGTAAGATCCTTGAGA 2340
GTTTTGCGCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCAGTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGATTATCCCGTATTGACCGCGGGCAAG 2430
AGCAACTCGGTGCGCGCATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAG 2520
TAAGAGAATTAAGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 2610
CCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 2700
ACACCACGATGCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAG 2790
ACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCATTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTG 2880
AGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAGCAGGGGAGTCAAGGCAA 2970
CTATGGATGAACAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATAC 3060
TTTAGATTGATTTAAACTTCAATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGATGATAAACAATGTATGGT 3150
GCTAATGTTGCTTCAACAACAATTTCTGTTGAACTGTGTTTTCATGTTTGCACAACAAGCACCTTTTACTCGGTGGCCTCCCAACCCAA 3240
CTTTTTGCACTGCAAAAAAACACGCTTTTGCACGCGGGCCCATACATAGTACAAACTCTACGTTTTCGTAGACTATTTTACATAAATAGT 3330
CTACACCGTTGTATACGCTCCAATAACACTACCACACATTGAACCTTTTTGCAAGTGAAGGACGAAAGTACGTTGCGGAGTACGTTAGGCCG 3420
CCTTATCGGGTTCGCTCCTGTACAGTACGAATCACATTATCGGACCGGACGAGTGTGTCTTATCGTGACAGGACGCCAGCTTCTGTGT 3510
TGCTAACCGCAGCCGACGCAACTCCTTATCGGAACAGGACGCGCCTCATATCAGCCGCGGTTATCTCATGCGCGTGACCGGACACGA 3600
GGCGCCGTCCTCGCTTATCGCGCTATAAATACAGCCCGCAACGATCTGGTAAACACAGTTGAACAGCATCTGTTTCAAGTTTAAAGCTTG 3690
GTACCGAGCTGAGCTCATGGTGAAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCAGGGGTTGGTGGCCTCCTGGTGGAGCTGGACGGCGAGTAAACGG 3780
CCACAAGTTCAGCGTGTCCGCGGAGGGCGAGGGCGATGCCACTACGGCAAGCTGACCTGAAAGTTTCACTGCAACCCGCAAGCTGCC 3870
CGTGCCTTGGCCACCCTCGTGACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCGGCTACCCGACCCATGAAGCAGCAGCAGCTTCTT 3960
CAAGTCCGCCATGCCGAAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGGAGGTGAAGTT 4050
CGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA 4140
CTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAAGTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGG 4230
CAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCA 4320
GTCCGCCCTGAGCAAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCATATGGTCTGCTGGAGTTCTGTGACCGCCCGGGATCACTCTGGCATGGA 4410
CGAGCTGTACAAGTCAGGATCC ... 4432

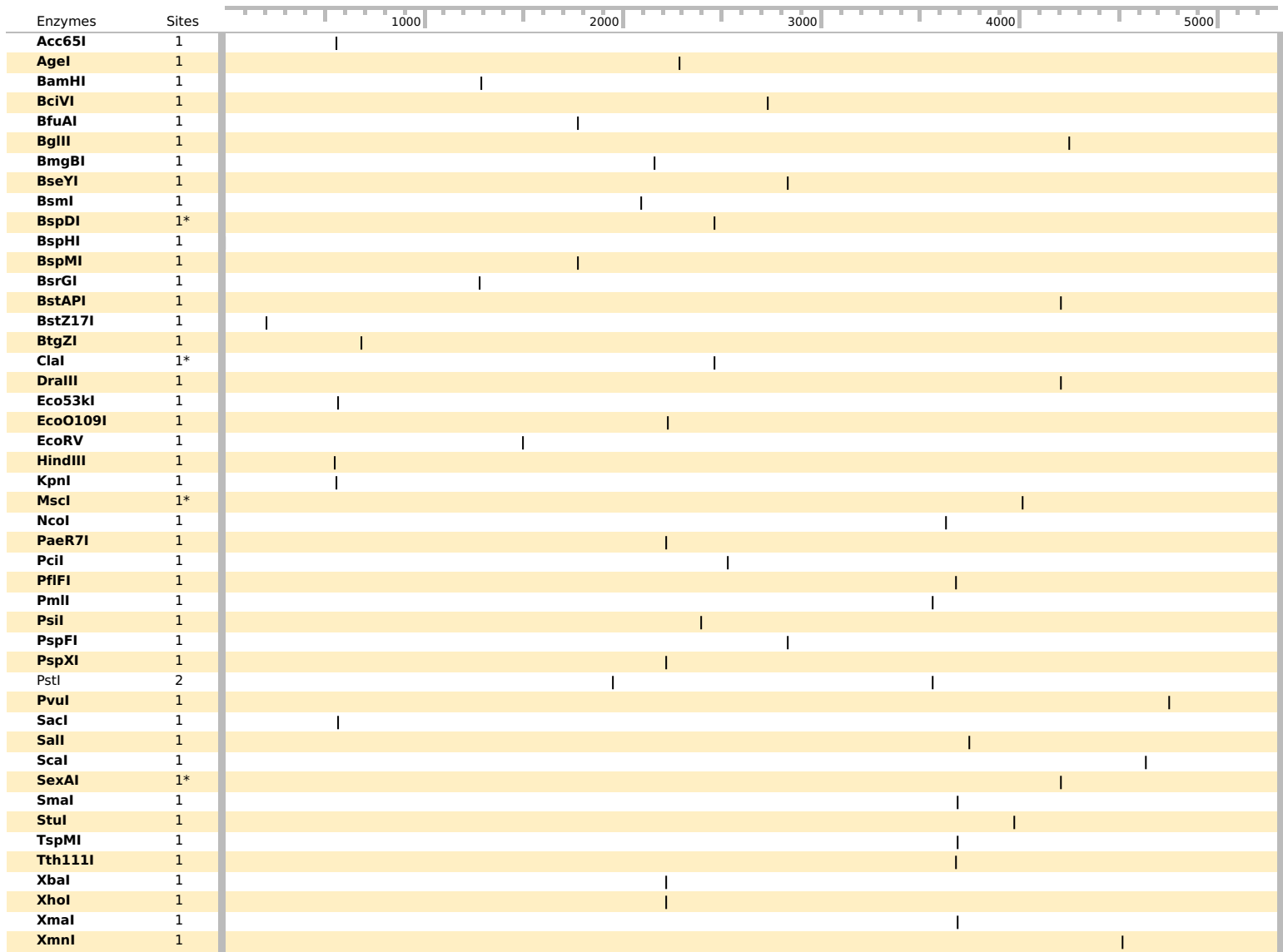
```


































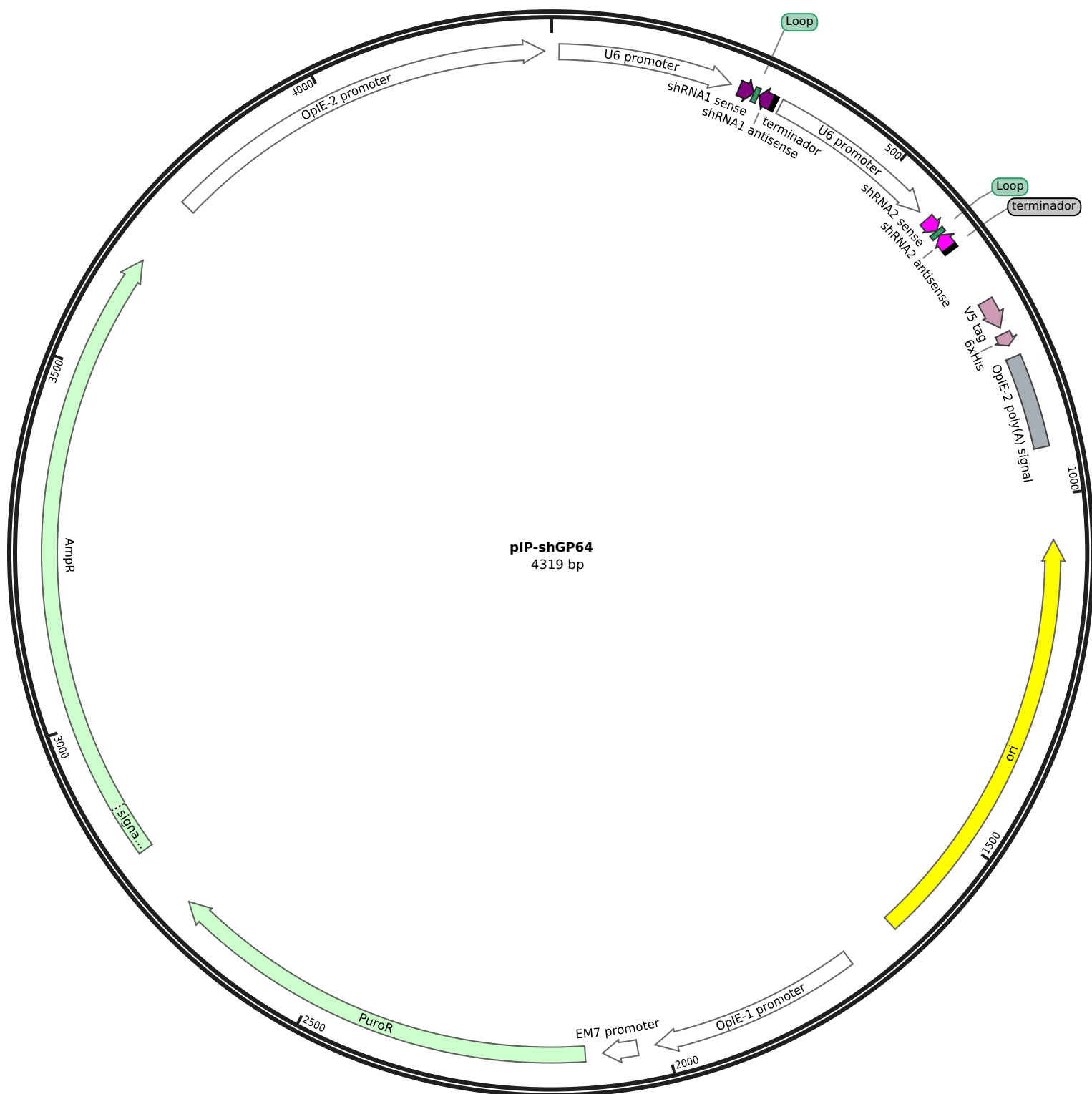
Feature	Location	Size			Type
✓ V5 tag	84 .. 125	42 bp			CDS
/product	= epitope tag from simian virus 5				
/translation	= GKIPNPLLGLDST 14 amino acids = 1,4 kDa				
✓ 6xHis	135 .. 152	18 bp			CDS
/product	= 6xHis affinity tag				
/translation	= HHHHHH 6 amino acids = 840,9 Da				
✓ OpIE-2 poly(A) signal	170 .. 299	130 bp			polyA_signal
/gene	= immediate-early gene 2 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= baculovirus polyadenylation signal				
✓ ori	427 .. 1015	589 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
/note	= high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication				
✓ OpIE-1 promoter	1090 .. 1381	292 bp			promoter
/gene	= immediate-early gene 1 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= moderate constitutive baculovirus promoter for insect cell expression				
✓ EM7 promoter	1407 .. 1454	48 bp			promoter
/note	= synthetic bacterial promoter				
✓ PuroR	1479 .. 2078	600 bp			CDS
/gene	= <i>pac</i> from <i>Streptomyces alboniger</i>				
/product	= puromycin <i>N</i> -acetyltransferase				
/note	= confers resistance to puromycin				
/translation	= MTEYKPTVRLATRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRH TVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVVWVADDGA AVAVWTTPE SVEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQMKLLAPHR PKEPAWFLATVGVSPDHQKGLGS AVVLPGVEAAERAGVPAFLETSAPRNL PPFYERLGFVTADV KVP EGPRTWC MTRKPGA* 199 amino acids = 21,5 kDa				
✓ AmpR	2172 .. 3032	861 bp			CDS
▶ 2 segments					
/gene	= <i>bla</i>				
/product	= β-lactamase				
/note	= confers resistance to ampicillin, carbenicillin, and related antibiotics				
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFLPVFA,HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPM MSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAF LHNMGD HVTRLDRWEPELNEAIPNDERD TTPVAMATTLRKL LTGELLTLASRQQLIDWMEADK VAGPLLSALPAGWFIADKSGAGER GSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW* 286 amino acids = 31,6 kDa				
✓ OpIE-2 promoter	3128 .. 3675	548 bp			promoter
/gene	= immediate-early gene 2 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= strong constitutive baculovirus promoter for insect cell expression				
✓ EGFP*	3707 .. 4423	717 bp			CDS
▶ 3 segments					
/product	= enhanced GFP				
/translation	= M,V,SKGEELFTGVVPIVLELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLT LKFICTTGKLPVWPVTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEG DTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYSNHVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDEL YK 239 amino acids = 26,9 kDa				



... CATGATGATAAACAAATGTATGGTGCTAATGTTGCTTCAACAACAATTCTGTTGAAGTGTGTTTTTCATGTTTGCCAACAAGCACCTTTATA 90
 CTCGGTGGCCTCCCACCACCAACTTTTTTGCACTGCAAAAAAACACGCTTTTGCACGCGGGCCCATACATAGTACAAACTCTACGTTTC 180
 GTAGACTATTTTACATAAATAGTCTACACCGTTGTATACGCTCCAAATACACTACACACACATTTGAACCTTTTTGCAGTGCAAAAAAAGTAC 270
 GTGTCGGCAGTACAGTAGGCCGGCTTATCGGGTTCGCGTCTGTACAGTACGAATACATTATCGGACCGGACGAGTGTGTCTTATCGT 360
 GACAGGACGCCAGCTTCTGTGTTGCTAACCCGACGCCGGACGCAACTCTTATCGGAACAGGACGCGCCTCCATATACGCCGCGCGTTAT 450
 CTCATGCGCGTGACCGGACGAGGCGCCCGTCCGCTTATCGCGCTATAAATACAGCCGCAACGATCTGGTAAACACAGTCTGAACAG 540
 CATCTGTTTCAAGTTTAAAGCTTGGTACCGAGTCTATGGTGGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCAGGGGTGGTGGCCATCCTGGTTCGAGCT 630
 GGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTACGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTG 720
 CACCACCGGGCAAGCTGCCCGTGCCTTGGCCACCCTCGTGACCACTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTTACGCGCTACCCCGACCACAT 810
 GAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGGAAGCTACGTCAGGAGCGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCACTACAAGAC 900
 CCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCGTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGG 990
 GCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAAGTCAAGATCCG 1080
 CCACAACACTGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCAGCCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTCTGTGCGCCGACAA 1170
 CCACTACTGAGCACCAGTCCGCGCTGAGCAAGAGCCCAACGAGAAGCGCATACACTGGTCTCTGTGGAGTTCGTGACCGCCGCGCG 1260
 GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCAAggatccGGCGGAGCGGAAGCtacgctgtacctacaatatCattcaatgatgacgtc 1350
 atcttgtatgacgcccacaacaacgctcatgtttgacgacgcgctcggtcatgtggattgacgcccactacatftttcaaaactctaaaat 1440
 gccgttgtccacgtttcaacagctgtgtgtttccattccgctcgaaacaccgcaagatgataaacgatatcggcaatccgcgctctgtttc 1530
 gtttccaccttccaataaacacggtcaagtagatggtggacatttacggcgccggtgttgacaatggttggccgctcgtgtgtttccga 1620
 ccagttcatcaacaggttttggccaataatataatgagctttgttaaccgacaacggccgtgccaaccaccgctgccaaccgcaaac 1710
 gccgcccgtttgatggttcaaaagcaaatgtggacgctgtgaaaaactggcgccacaaaatgacctgctcatcaacagcgtcaacca 1800
 aatftcgtaaatcaatccaaccaatcttagaattgcgacgagtagcgcagatgatggccgctgtgaaagcgcaaacagacacaat 1890
 acttaaccgtctcaacggtgttagtggatgaaataaagccggttgcctgaccagtcgctcagctgcaggaacaaatgacaaattgct 1980
 tgaagccatcaacggtgttggccaacgtagcagcgaatgaacaacaccaaactctattttgaccaacttggcgctccagcacaacaa 2070
 cattaacagtagatataacaattgttgaatgccatcgaaggcataacggcgccgaaggcgccggtattgggtgacgcccagcgtcaaaa 2160
 gttgagcgacgtgctgtagctggtgaccgaaataagaagcattttgatGGGCGAGTCGCAATAACTCGAGTCTAGAGGGCCCGCGGTTCCG 2250
 AAGGTAAAGCCTACCTAACCTCTCCTCGGTCGATCTACGCTACCGGTATCATATCACCATCACCATGAGTTTTATCTGACTAAAT 2340
 CTTAGTTTTGTATTGTATGTTTTAATAACAATATGTTATGTTTTAAATATGTTTTTAAATAAATTTTAAATAAATTTTCAACTTTTTATTGTA 2430
 ACAACATTGTCCATTTACACACTCCTTTCAAGCGCGTGGATCGATGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGA 2520
 TAACCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCG 2610
 CCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGAGCCTCAAGTCAAGGTTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGG 2700
 AAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCA 2790
 TAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTACGCCGACCGCTG 2880
 CGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAAGTCAACCCGGTAAAGCAGCACTTATCGCCACTGAGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAG 2970
 AGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTACACTGAGCAAGCAAGTATTTGGTATCTGCGCTCT 3060
 GCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAAACCACC6CTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTCAA 3150
 GCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACG 3240
 TTAAGGGATTTTTGGTATGCGAAACACGCGCGCGCCGACGCGAGCTTAGCACAACACGCGTCTGTGCACGCGCCACCGCTAACCGCAG 3330
 GCCAATCGGTCCGCGCGCTCATATCCGCTACAGCCGCGCTCTATCGGGCGCGCTTCCGCGCCATTTTGAATAAATAAACAGCATAAC 3420
 GCCGTTGGTGGCGTGAGGCTGTAAAAGGTTACATCATTATCTTGTTCGCCATCCGGTTGGTATAAATAGACGTTTATGTTGGTTTTTGT 3510
 TTCAGTTGCAAGTTGGCTGCGCGCGCGCAGCACCTTTGCCGGGATCGCCGGGCTGACGACAGTGTGACAATTAATCATCGGCATAGT 3600
 ATATCGGCATAGTATAATACGACAAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCAATGACCGAGTACAAGCCACGGTGGCCCTCGCCACCCGCGACG 3690
 ACGTCCCCGGGGCGTACGCACCTCGCCGCGCGTTCGCGGACTACCCGCCACGCGCCACCGTGCACCGGACCGCCACATCGAGC 3780
 GGGTCAACGAGCTGCAAGAACCTTCTCAGCGCGCTCGGGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGGTGCGGGACGACGGCGCGCGGTGGCGG 3870
 TCTGGACCACGCCGGAGAGCGTGAAGCGGGGGCGGTGTTGCGCGAGATCGGCCCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCGGGCTGGCCG 3960
 CGCAGCAACAGATGAAAGGCCCTCCTGGCGCGCACCCGGCCAAAGGAGCCCGCGTGGTTCTTGGCCACCGTGGCGTCTCGCCCGACCAC 4050
 AGGGCAAGGGTCTGGGCGAGCGCGTGTCTCCCGGAGTGGAGGGCGCGAGCGCGCGGGGTGCCCGCTTCTGGAGACCTCCGCGC 4140
 CCGCAACCTCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTACCCTACCGCGGACGTCAAGGTGCCGAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGACCC 4230
 GCAAGCCCGGTGCCGTGACGCCGCGCCACGAGATCTGCATGTCTACTAAACTCACAATTAGAGCTTCAATTTAATTATATCAGTTATTA 4320
 CCCATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTAACATTTCCGTTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGGGGCATTTCCTTCTGTTTTTGTCT 4410
 ACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGA 4500
 TCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCATTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACG 4590
 CCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATG 4680
 GCATGACAGTAAAGAAATTAAGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGAATAACTGCGGCCAATCTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGCA 4770
 AGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACG 4860
 ACGAGCGTGACACCACGATGCCGTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCGGCAAC 4950
 AATTAATAGACTGGATGGAGGGGATAAAGTTGCAGGACCATTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGTTTATTGCTGATAAATCTG 5040
 GAGCCGGTGAAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGA 5130
 GTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACT 5220
 CATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCT ... 5296



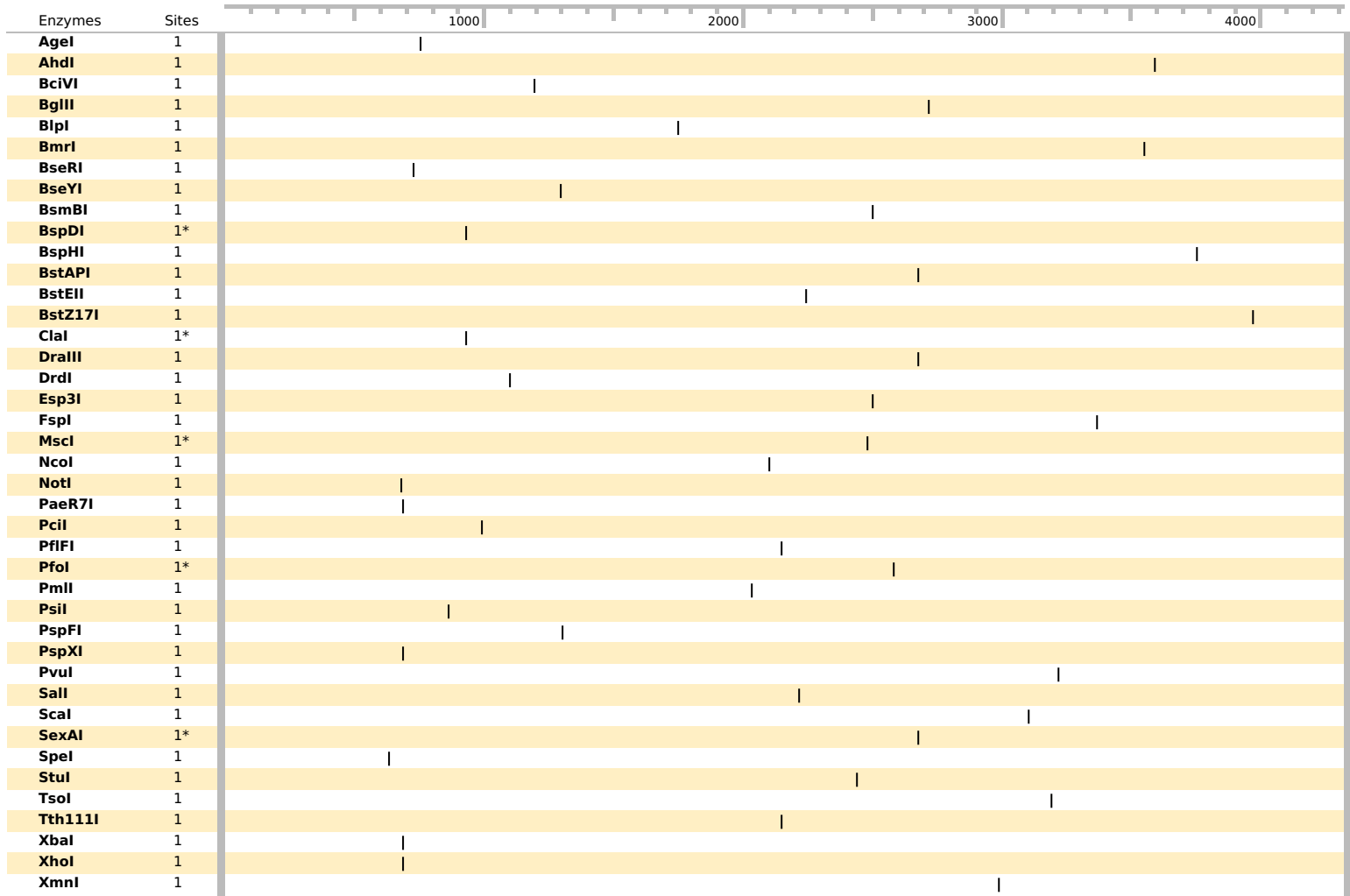
Feature	Location	Size			Type
✓ OpIE-1 promoter	1 .. 548	548 bp			promoter
✓ MCS	557 .. 573	17 bp			misc_feature
▶ 2 segments					
✓ EGFP	575 .. 1292	718 bp			CDS
▶ 3 segments					
/translation	= M,V,SKGEELFTGWVPIVVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYKGLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDEL YK				
	239 amino acids = 26,9 kDa				
✓ Linker	1301 .. 1315	15 bp			misc_feature
✓ PEP	1343 .. 2224	882 bp			misc_feature
✓ MCS	2226 .. 2246	21 bp			misc_feature
▶ 2 segments					
✓ V5 tag	2253 .. 2294	42 bp			CDS
/translation	= GKPIPPLLGLDST				
	14 amino acids = 1,4 kDa				
✓ 6xHis	2304 .. 2321	18 bp			CDS
/translation	= HHHHHH				
	6 amino acids = 840,9 Da				
✓ OpIE-2 poly(A) signal	2339 .. 2468	130 bp			polyA_signal
✓ ori	2596 .. 3184	589 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
✓ OpIE-2 promoter	3259 .. 3550	292 bp			promoter
✓ EM7 promoter	3576 .. 3623	48 bp			promoter
✓ PuroR	3648 .. 4247	600 bp			CDS
/gene	= <i>pac</i> from <i>Streptomyces alboniger</i>				
/product	= puromycin <i>N</i> -acetyltransferase				
/note	= confers resistance to puromycin				
/translation	= MTEYKPTVRLATRDDVPRVRTLAAAFADYPATRHTVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVVWVADDGAAVAVWTTTPESVEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMKGLLAPHR PKPEAWFLATVGVSPDHQKGLGSAVVLPGVAAERAGVPAFLETSAPRNLPFYERLGFVTADV KVPPEGPRTWCMTRKPGA*				
	199 amino acids = 21,5 kDa				
✓ AmpR	4341 .. 5201	861 bp			CDS
▶ 2 segments					
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFA,HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMMSSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL CSAAITMSDNTAANLLTTIGGPKELTAFLNHMGDHTVRLDRWEPELNEAIPNDERDTTTPVAMATTLRKLTLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSLPAGWFIADKSGAGER GSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW*				
	286 amino acids = 31,6 kDa				











































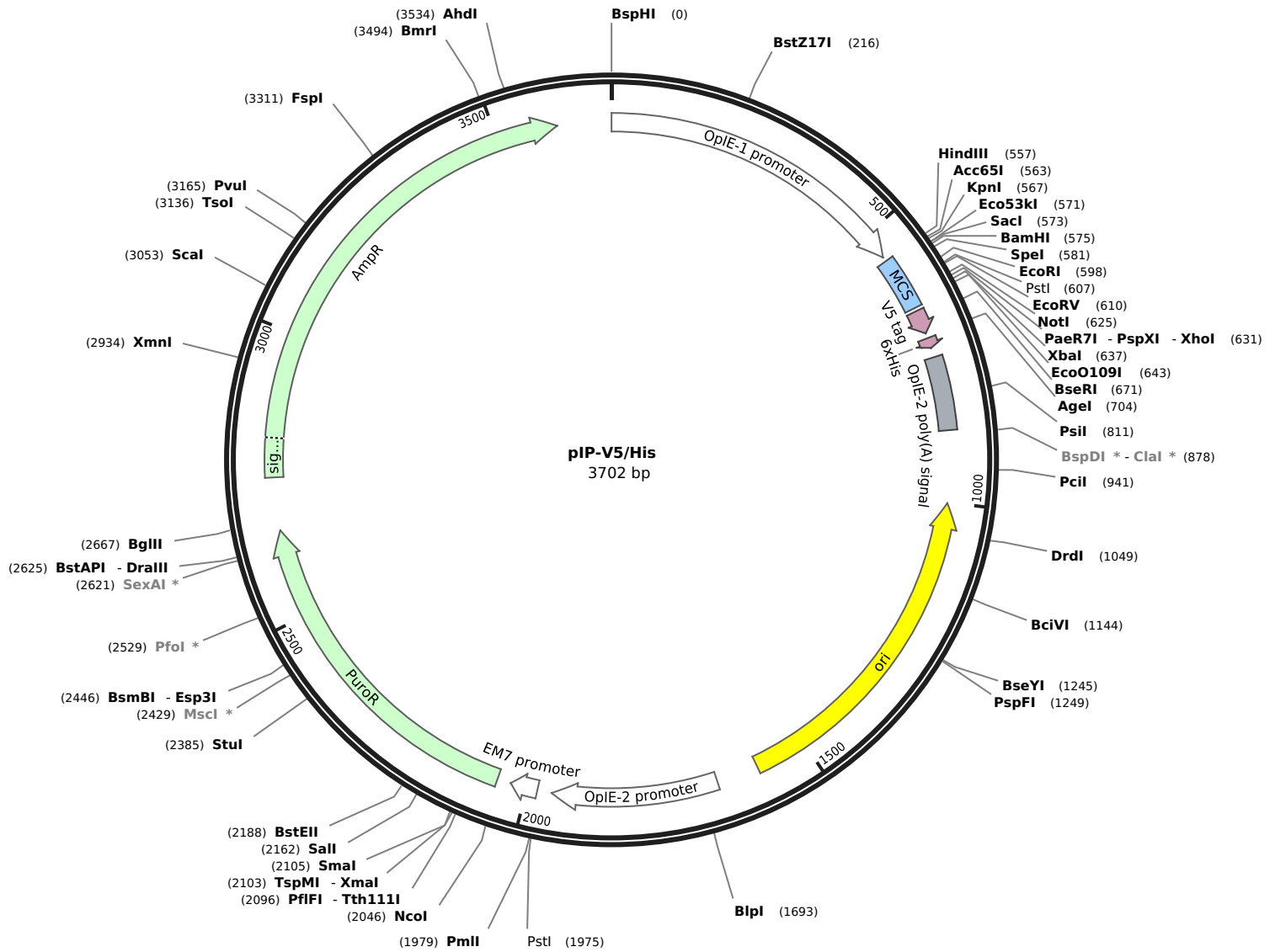
```

... CCGGGaattcGagggcctatttcccatgattccttcatatttgcataatcgatacaaggctgttagagagataaattagaattaatttga
180 ctgtaaacacaaagatatttagtacaataacgtagcgtagaagtaataatttcttgggtagtttgcagttttaaattatgttttaaaa
270 tggactatcatatgcttaccgtaacttgaagatatttccgatttcttggctttatataatcttgtggaaggacggtttagtgaacGCTGCG
360 TGCTGCTCATTAATCAAGAGTTAATGAGCAGACACGCGAGCtttttGATATCgagggcctatttcccatgattccttcatatttgc
450 tatacgatacaaggctgttagagagataattagaattaattgactgtaaacacaaagatatttagtacaataacgtagcgtagaagta
540 ataatttcttgggtagtttgcagttttaaattatgttttaaattggactatcatatgcttaccgtaacttgaagatatttccgatttctt
630 ggctttatataatcttgtggaaggacggtttagtgaaccgGCGAGCTGATGCATATTCATCAAGAGttgaatatgcatcaggctcgctt
720 ttttGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGGTTGGAAGG
810 TAAGCCTATCCCTAACCTCTCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTATCATACCATACCATTCAGTTCATCTGACTAAATCTTA
900 GTTTGATTGTCATGTTTAAACAATATGTTATGTTTAAATATGTTTAAATAAATTTATAAAATAATTTCAACTTTTATGTAACAA
990 CATGCTTACATACACACTCTTCAAGCGGTGGGATCGATGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAAC
1080 GCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCGCTTTTCCATAGGCTCCGCC
1170 CCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTCGGAAGC
1260 TCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCTTCCGCTTACCAGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGC
1350 TCACGCTGTAGGTATCTCAGTTGAGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTACGCCGACCTGCGCC
1440 TTATCCGGTAACATATCGTCTTGAAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCG
1530 AGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAGTACGCGCTACATAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG
1620 AAGCCAGTTACCTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGTATCCGGCAAAACCAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGGCAAGCAG
1710 CAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAAGAGATCCTTTGATCTTTTCAAGGCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACCTCACGTTAA
1800 GGGATTTTGGTCAATCGGAAACACGCACGGCGCGCACGACGCTTAGCACAAACGCGTCTGTTGCACGCGCCACCGCTAACCGCAGGCCA
1890 ATCGGTCGGCCGGCTCATATCCGCTCACCAAGCCGCGTCTATCGGGCGCGGCTTCCGCGCCATTTGAATAAATAACGATAACGCTCG
1980 TTGGTGGCGTGAAGCATGTAAGAAGTTACATCATTATCTGTTGCTCCGATCCGCTGGTATAAATAGACGTTTATGTTGTTTTGTTCA
2070 GTTGAAGTTGGCTGCGCGCGCGGACGACCTTTGCGGGATCTGCCGGGCTGACGACAGTGTGACAAATTAATCATCGGCATAGTATAT
2160 CGGCATAGTATAATACGACAGGTGAGGAACTAAACCATGGCAATGACCGAGTACAAGCCACGGTGCGCCCTGCCACCCGCGACGACGT
2250 CCCCAGGCGCTACGCAACCTCGCCGCGCGTTCGCGGACTACCCGCGCACGCGCCACACCGTGCACCCGACCGCCACATCGAGCGGGT
2340 CACCGAGCTGCAAGAACTCTTCTCACGCGCGTTCGGGCTGACATCGGCAAGGTGTGGTTCGCGGACGACGCGCGCGGTTGGCGGTCTG
2430 GACCAAGCGGAGAGCGTCAAGCGGGGGCGGTGTTCCGCGAGATGCGCCCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGCGCGCGCA
2520 GCAACAGATGAAAGGCTCTTGGCGCGCACCGGCCAAAGGAGCCCGGTGGTTCCTGGCCACCGTCCGGCTCTGCGCCGACACCAAGGG
2610 CAAGGCTGCGGCGAGCGCTGCTGCTCCCGGAGTGGAGGCGGCGGAGCGCGCGGGTGGCCGCTTCTGGAGACCTCCGCGCCCG
2700 CAACCTCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTCACCGTCAAGGCTGCGGAGGACCGCGCACCTGGTGCATGACCCGCAA
2790 GCCCGTGCCTGACGCCCGCCACGAGATCTGCATGCTACTAAACTCACAAATTAGAGCTTCAATTTAATTATATCAGTTATTACCCA
2880 TTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGGGCAATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCC
2970 AGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGTCCT
3060 TGAGAGTTTTCCGCCGGAAGACGTTTTTCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTATTGACGCCG
3150 GCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCAT
3240 GACAGTAAGAGAATTATGCAAGTGTCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGA
3330 GCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAATCGCCTTGTATGTTGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGA
3420 GCGTGACACCAGATGCTGTGAGCAATGGCAACAACCTTGGCGAACTATTAACCTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATT
3510 AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGTGGTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGC
3600 CGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAAGCACTGGGCGCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCA
3690 GGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACAGCAAGTTTACTCATA
3780 TATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGATGATAAACAATGT
3870 ATGGTGCTAATGTTGCTTCAACAACAATTCGTTGAACTGTGTTTTTATGTTTGGCAACAAGCACCTTTATACCTCGGTGGCTCCCAACC
3960 ACCAATTTTTTGCAGTGCAAAAAACACGCTTTTGCAGCGGGCCATACATAGTACAAACTCTACGTTTCTGAGACTATTTACATAA
4050 ATAGTCTACACCGTTGTATACGCTCAAATAACACTACACATTTGAACCTTTTTGCAGTGCAAAAAGTACGTGTGGCGAGTACAGTAC
4140 GCCGCTTATCGGGTCCGCTCCTGTCACGTACGAATCACATTATCGAACCGGACGAGTGTGCTTATCGTGACAGGACCGCAGCTTCC
4230 TGTGTTGCTAACCCGAGCCGACGCAACTCCTTATCGGAACAGGACGCGCTCCATATCAGCCGCGGTTATCTCATGCGGTGACCGGA
4319 CACGAGGCGCCGTCGCTTATCGCGCTATAAATACAGCCGCAACGATCTGGTAACACAGTTGAACAGCATCTGTTGCAATTTAA ...

```

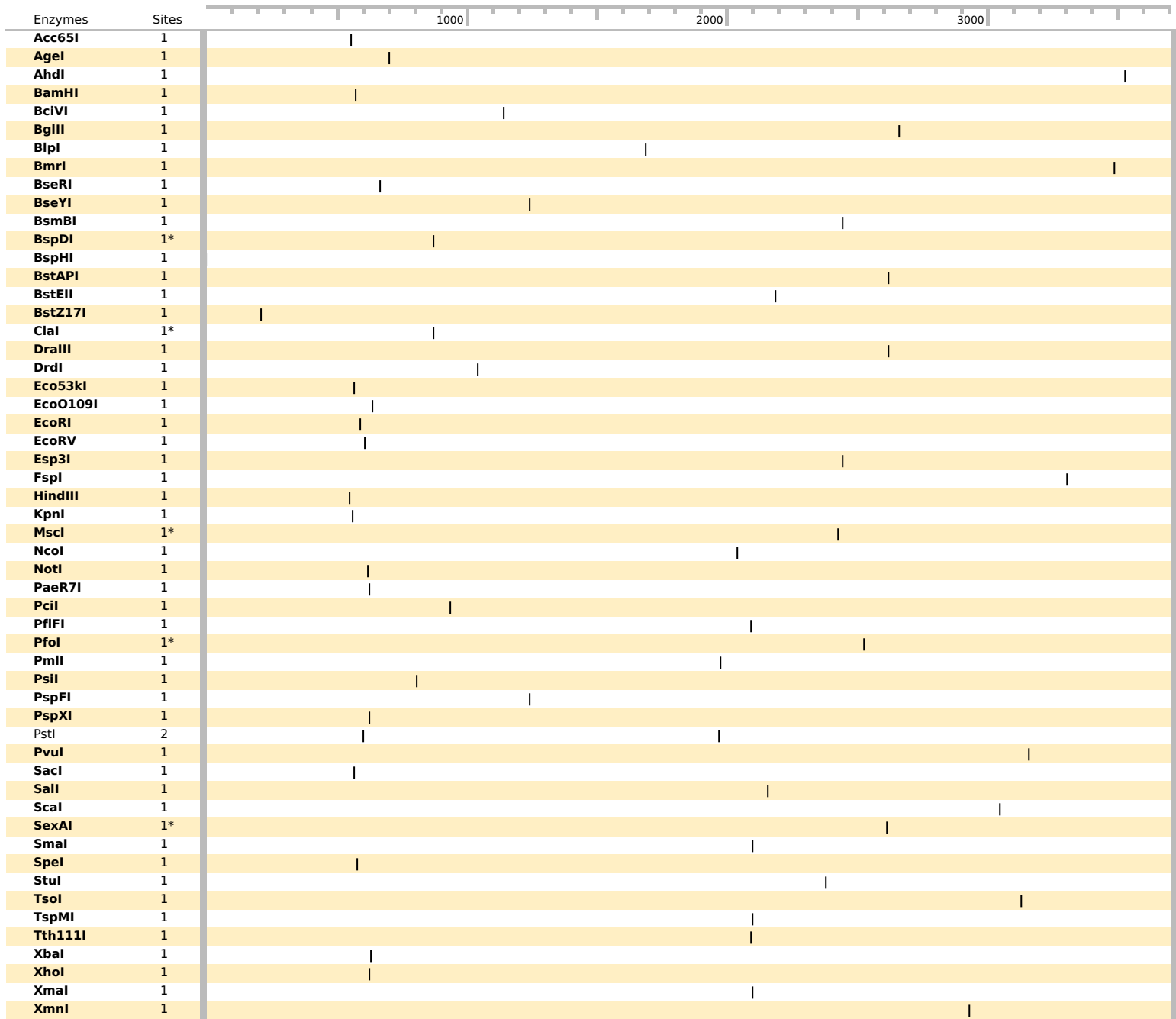

























Feature	Location	Size			Type
✓ U6 promoter	12 .. 252	241 bp			promoter
/note	= RNA polymerase III promoter for human U6 snRNA				
✓ shRNA1 sense	265 .. 285	21 bp			misc_feature
✓ Loop	286 .. 292	7 bp			misc_feature
✓ shRNA1 antisense	294 .. 313	20 bp			misc_feature
✓ terminador	314 .. 319	6 bp			misc_feature
✓ U6 promoter	326 .. 566	241 bp			promoter
/note	= RNA polymerase III promoter for human U6 snRNA				
✓ shRNA2 sense	581 .. 601	21 bp			misc_feature
✓ Loop	602 .. 608	7 bp			misc_feature
✓ shRNA2 antisense	609 .. 629	21 bp			misc_feature
✓ terminador	630 .. 635	6 bp			misc_feature
✓ V5 tag	719 .. 760	42 bp			CDS
/product	= epitope tag from simian virus 5				
/translation	= GKPIPPLLGLDST 14 amino acids = 1,4 kDa				
✓ 6xHis	770 .. 787	18 bp			CDS
/product	= 6xHis affinity tag				
/translation	= HHHHHH 6 amino acids = 840,9 Da				
✓ OpIE-2 poly(A) signal	805 .. 934	130 bp			polyA_signal
/gene	= immediate-early gene 2 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= baculovirus polyadenylation signal				
✓ ori	1062 .. 1650	589 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
/note	= high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication				
✓ OpIE-1 promoter	1725 .. 2016	292 bp			promoter
/gene	= immediate-early gene 1 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= moderate constitutive baculovirus promoter for insect cell expression				
✓ EM7 promoter	2042 .. 2089	48 bp			promoter
/note	= synthetic bacterial promoter				
✓ PuroR	2114 .. 2713	600 bp			CDS
/gene	= <i>pac</i> from <i>Streptomyces alboniger</i>				
/product	= puromycin <i>N</i> -acetyltransferase				
/note	= confers resistance to puromycin				
/translation	= MTEYKPTVRLATRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRHVTDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVVVADDGAAVAVWTTPEVVEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMKGLLAPHR PKEPAWFLATVGVSPDHQGGKGLGSAAVPLGVEAAERAGVPAFLETSAAPRNLPFYERLGFVTADVVKVPEGPRTWCMTKPGA* 199 amino acids = 21,5 kDa				
✓ AmpR	2807 .. 3667	861 bp			CDS
▶ 2 segments					
/gene	= <i>bla</i>				
/product	= β -lactamase				
/note	= confers resistance to ampicillin, carbenicillin, and related antibiotics				
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFCPLPVFA,HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMSTMFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL CSAAITMSDNTAANLLTTIGGPKELTAFLNHMGDHTVRLDRWEPELNEAIPNDERDRTMPVAMATTLRKLTLTGELLTLASRQQLIDWMEADKAVAGPLLRSALPAGWFIADKSGAGER GSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW* 286 amino acids = 31,6 kDa				
✓ OpIE-2 promoter	3763 .. 4310	548 bp			promoter
/gene	= immediate-early gene 2 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= strong constitutive baculovirus promoter for insect cell expression				

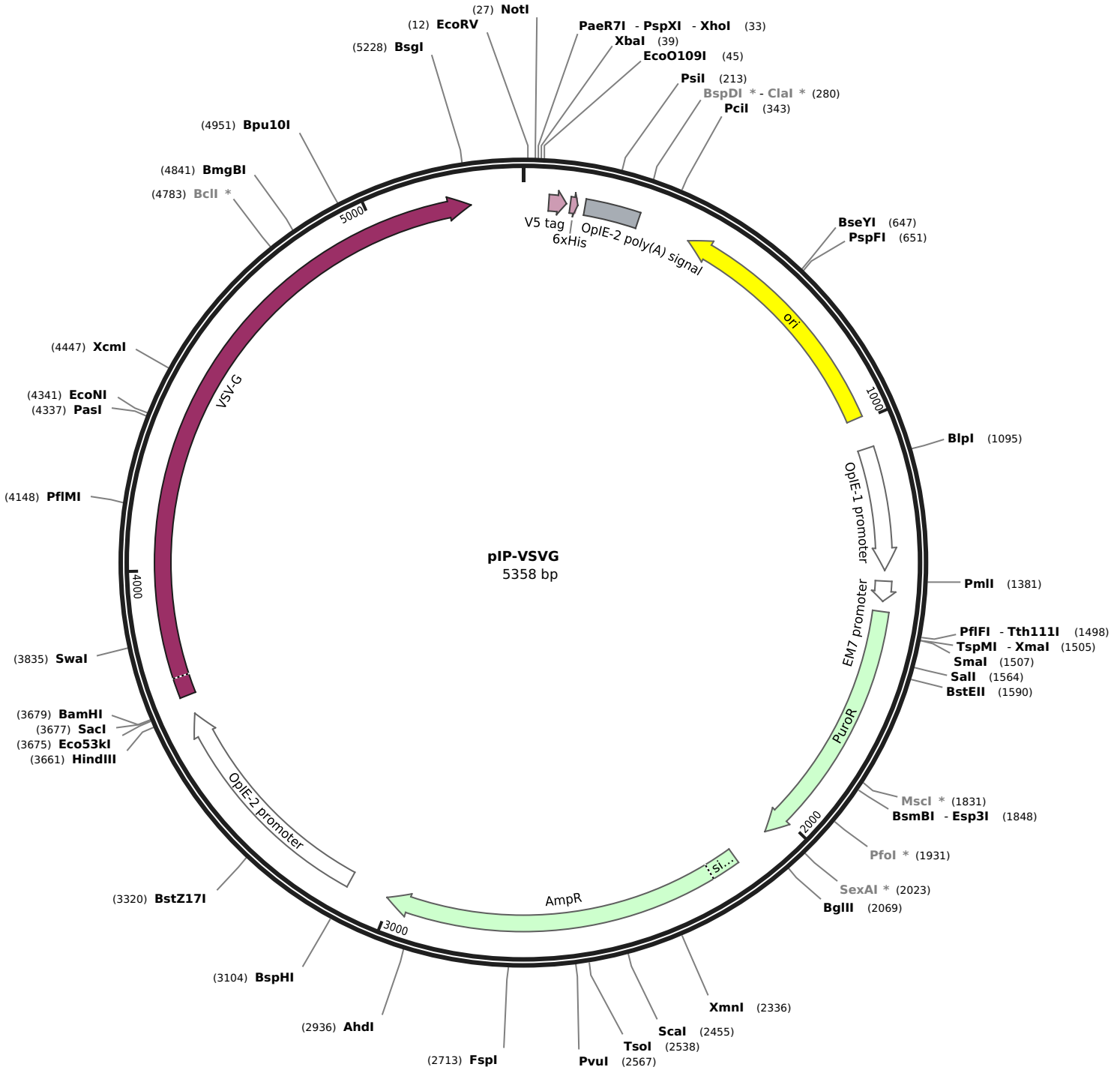


```

... CATGATGATAAACAAATGTATGGTGCTAATGTTGCTTCAACAACAATTCTGTTGAACTGTGTTTTTCATGTTTGCCAACAAGCACCTTTATA 90
CTCGGTGGCTCCCCACCACCAACTTTTTTGCCTGCAAAAAAACACGCTTTTGCACGCGGGCCCATACATAGTACAAACTCTACGTTTC 180
GTAGACTATTTTACATAAAATAGTCTACACCGTTGTATACGCTCCAAATACACTACCACACATTTGAACCTTTTTGCAGTGCAAAAAAAGTAC 270
GTGTCGGCAGTACAGTAGGCCGGCTTATCGGGTCCGCTCCTGTCACGTACGAATACATTATCGGACCGGACGAGTGTGTCTTATCGT 360
GACAGGACGCCAGCTTCTGTGTTGCTAACCCGACGCCGACGCAACTCTTATCGGAACAGGACGCGCTCCATATCAGCCGCGCGTTAT 450
CTCATGCGCGTGACCGGACACGAGGCCCGCTCCGCTTATCGCGCTATAAATACAGCCGCAACGATCTGGTAAACACAGTTGAACAG 540
CATCTGTTTTCGAATTTAAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTTGCGAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCG 630
CTCGAGTCTAGAGGGCCCGCGGTTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTTCATCATCACCA 720
TCACCATTGAGTTTATCTGACTAAATCTTAGTTGTATTGTCATGTTTAAATACAATATGTTATGTTTAAATATGTTTTTAAATAAATTTT 810
ATAAAATAAATTTCAACTTTTATGTAACAACATTGTCCATTTACACTCCTTTCAAGCGCTGGGATCGATGCTCACTCAAAGGCGGTA 900
ATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG 990
TTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTA 1080
TAAAGATACCAGGCGTTTCCCGCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCGCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTC 1170
CCTTCGGGAAGCGTGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAC 1260
GAACCCCGCTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGCTTGAAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCA 1350
GCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGA 1440
AGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTGCTGTAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGAGTTGGTAGCTTGTATCCGGCAAAACAAACCCCGCT 1530
GGTAGCGGTGGTTTTTTTTGGCAAGCAGAGATTACGGCAGAAAAAAGGATCTCAAAGAAGATCCTTTGATCTTTTTACGGGGTCT 1620
GACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCAGTTAAGGGATTGTTGTCATGCGAAACACACGACGCGCGCGCACGAGCTTAGCACAAACGCGTCCG 1710
TTGCACGCGCCACCGCTAACCCGACGGCAATCGGTCCGGCCGGCTCATATCCGCTCACCAGCCGCGTCTATCGGGCGCGGCTTCCGCG 1800
CCCATTTTGAATAAATAACGATAACGCCGTTGGTGGCGTGAGGCATGTAAGGTTACATCATTATCTTGTTCGCCATCCGGTTGGTAT 1890
AAATAGACGTTTATGTTGGTTTTTTCAGTTGCAAGTTGGCTGCGGCGCGCAGCACCTTTGCGGGATCTGCCGGCTGCAGCACG 1980
TGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCAATGACCGAGTACAAGCC 2070
CACGGTGGCCTCGCCACCCGCGACGAGCTCCCGGGCCGTACGCACCTCGCCGCGCGTTCGCGGACTACCCGCCACGCGCCACAC 2160
CGTCGACCCGGACCGCCACATCGAGCGGGTACCGAGCTGCAAGAACTCTTCTCACGCGCGTCCGGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGGT 2250
CGCGGACGACGGCGCGGGTGGCGGTCTGGACACGCGGAGAGCGTCAAGCGGGGGCGGTGTTCCGCCGAGATCGGCCCGCGCATGGC 2340
CGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCAACAGATGAAAGGCCCTCTGGCGCCGACCCGGCCAAAGGAGCCCGCTGGTTCTTGGC 2430
CACCGTGGCGTCTCGCCGACCAAGGGTCTGGGCAAGGGTCTGGGCAAGGGTCTGGGCAAGGGTCTGGGCAAGGGTCTGGGCAAGGGT 2520
GCCCGCTTCTCGAGACCTCCGCGCCCGCAACCTCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTACCCTCACCCTCACCCTCACCCTCACCCTCACCCT 2610
AGGACCGCGCACCTGGTGCATGACCCGCAAGCCGCTGCTGACGCGCCCGCCACGAGATCTGCATGTCTACTAACTCACAAATTAGAG 2700
CTTCAATTTAATTATATCAGTTATTACCCATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGC 2790
GGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACAT 2880
CGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCGCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATG 2970
TGGCGGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCAC 3060
AGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCGAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTGCAGGCAACT 3150
ACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTGCCTTGGATCGTTGGGAACC 3240
GGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGA 3330
ACTACTACTCTAGCTTCCCGCAACAATAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGC 3420
TGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCG 3510
TATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCA 3600
TTGGTAACTGTGACAGCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCTC 3690
TTTTGATAATCT ... 3702
    
```



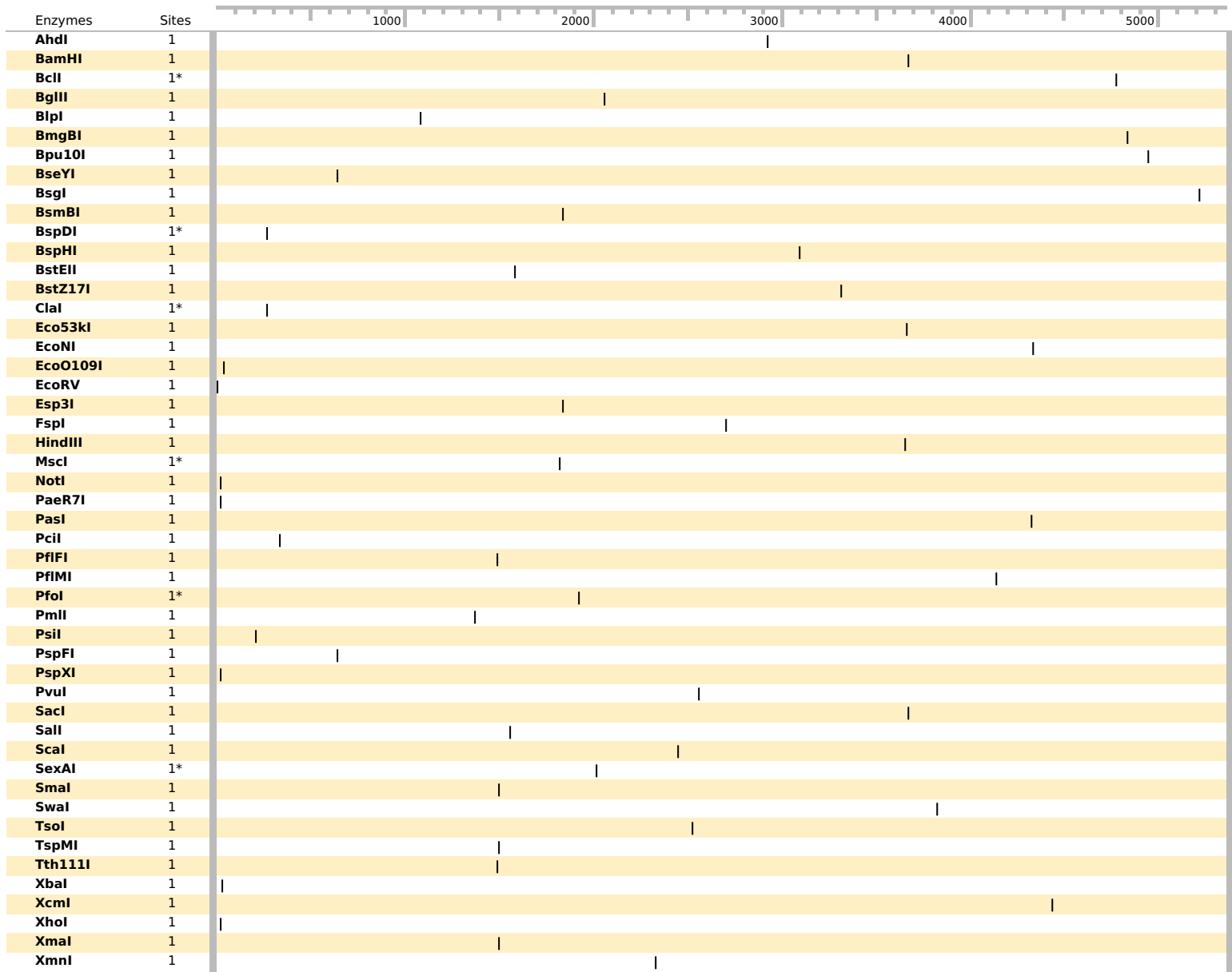
Feature	Location	Size			Type
✓ OplE-1 promoter	1 .. 548	548 bp			promoter
✓ MCS	557 .. 652	96 bp			misc_feature
✓ V5 tag	659 .. 700	42 bp			CDS
/translation	= GKPIPPLLGLDST 14 amino acids = 1,4 kDa				
✓ 6xHis	710 .. 727	18 bp			CDS
/translation	= HHHHHH 6 amino acids = 840,9 Da				
✓ OplE-2 poly(A) signal	745 .. 874	130 bp			polyA_signal
✓ ori	1002 .. 1590	589 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
✓ OplE-2 promoter	1665 .. 1956	292 bp			promoter
✓ EM7 promoter	1982 .. 2029	48 bp			promoter
✓ PuroR	2054 .. 2653	600 bp			CDS
/gene	= <i>pac</i> from <i>Streptomyces alboniger</i>				
/product	= puromycin <i>N</i> -acetyltransferase				
/note	= confers resistance to puromycin				
/translation	= MTEYKPTVRLATRDDVPRVVRTLAAAFADYPATRHTVDPDRHIERVTELOELFLTRVGLDIGKVVWVADDGAAVAVWTTPEVVEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMKGLLAPHR PKPEAWFLATVGVSPDHQKGLGSAVVLPGVEAAERAGVPAFLETSAPRNLPFYERLGFVTADVQVPEGPRTWCMTRKPGA* 199 amino acids = 21,5 kDa				
✓ AmpR	2747 .. 3607	861 bp			CDS
▶ 2 segments					
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFA,HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGDMTVREL CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLNMGDHSVTRLDLDRWEPELNEAIPNDERDITMPVAMATTLRKLTTGELLTLASRQQLIDWMEADKVVAGPLLRSALPAGWFIADKSGAGER GSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW* 286 amino acids = 31,6 kDa				

























```

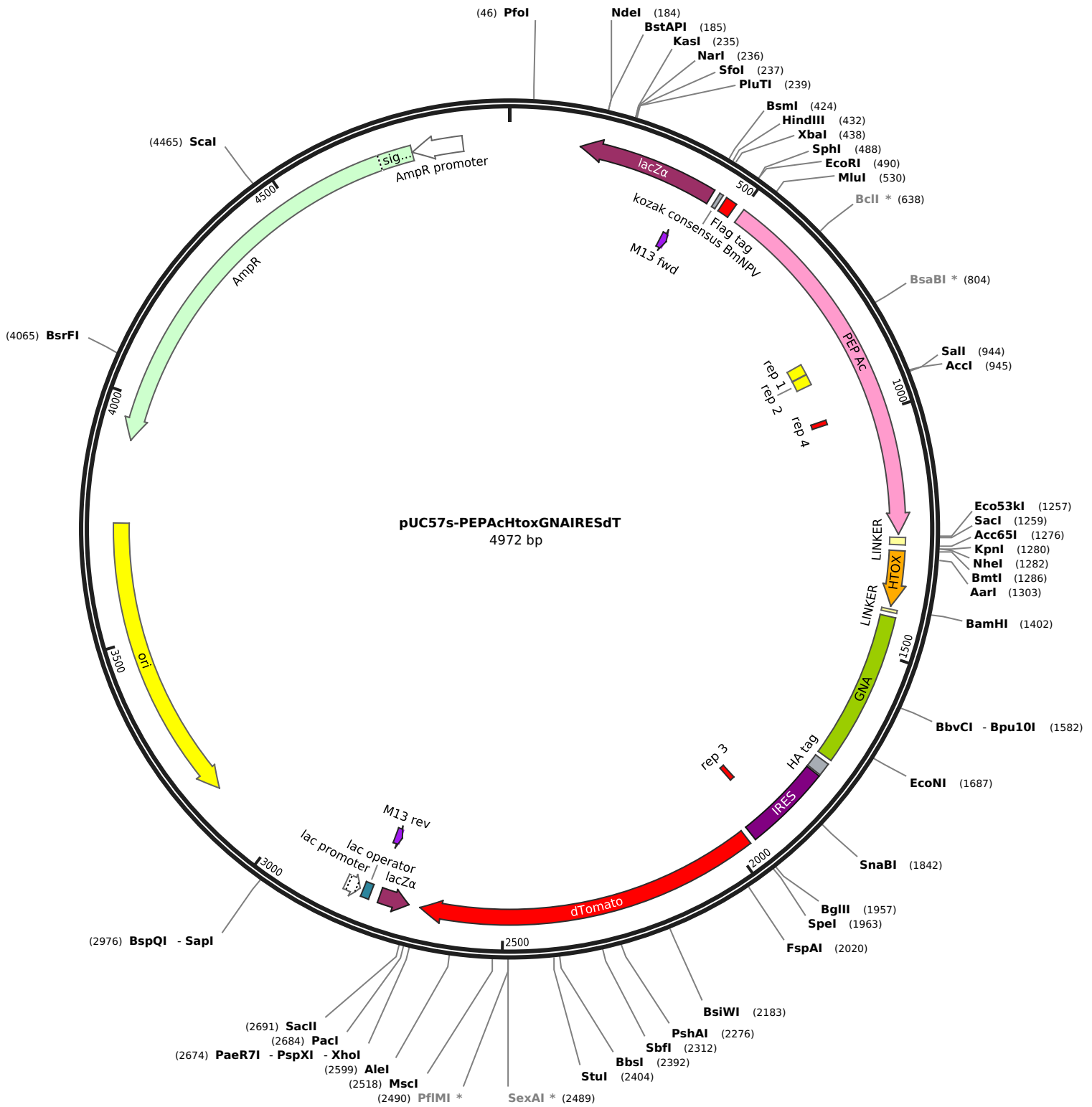
... AATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGCGGTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGT 90
CTCGATTCTACGCGTACCGGTATCATCATACCATCACCATTTGAGTTTTATCTGACTAAATCTTAGTTTTGTATTGTCATGTTTTAATAACAATA
180
TGTTATGTTTTAAATATGTTTTAAATAAATTTATAAAAATAATTTCAACTTTTATTGTAACAACATTGTCCATTACACACTCCTTTCAAG
270
CGCGTGCGATCGATGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCC
360
AGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTCATAGGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCT
450
CAAGTCAGAGGTTGGCAAACTCCAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTCTGTTCCGACCC
540
TGCCGCTTACCGGATACCTGTCAGGTTGTTCCCTTCCGTTCCGGAAGCGTGGCGCTTTCATAGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGT
630
AGGTCGTTCCGCTCAAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGGTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCA
720
ACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGGTGTACAGAGTTCT
810
TGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
900
GTAGCTCTTTGATCCGGCAAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGGTTTGCAGGACGAGATTACCGCGCAGAAAAAAGGATCTC
990
AAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGCGAAACACGCACG
1080
GCGCGCGCACGCACTTAGCACAACCGCTGTTGCACGCGCCACCCTAACCGCAGGCCAATCGGTGCGCCGCGCTCATATCCGCTCA
1170
CCAGCCGCTCCTATCGGGCGCGCTTCCGCGCCATTTGAATAAATAAACGATAACGCCGTTGGTGGCGTGAGGCATGAAAAGGTTA
1260
CATATTATCTTTGTTCCGATCCGGTTGGTATAAATAGACGTTCTATGTTGGTTTTCAGTTGCAAGTTGGCTGCGGCGCGCAGC
1350
ACCTTTGCGGGATCTGCGGGCTGACGACGTTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAAGGTGAGG
1440
AACTAAACCATGGCAATGACCGAGTACAAGCCACGGTGGCGCTCGCCACCCGCGACGAGCTCCCGGGGCTACGCACCCCTCGCCGCGC
1530
GCGTTCGGGACTACCCCGCACGGCCACACCGTGCACCGGACCGCCACATCGAGCGGGTCAACGAGCTGCAAGAACTTCTCTCACG
1620
CGCGTGGGCTCGACATCGGCAAGGTGGGTCGCGGACGACGCGCCGCGGTTGCGGCTGAGACCACGCCGAGAGCGTGAAGCGGGG
1710
GCGGTGTTCCGCGAGATCGGCCCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCAACAGATGAAAGGCCCTCTGGCGCCG
1800
CACCGGCCAAAGGAGCCCGCGTGGTTCTGCCCACCGTGGCGCTCGCCCGACCCAGGGCAAGGGTCTGGGACGCGCGCTCGTGGCT
1890
CCCGGAGTGGAGCGGCGGAGCGCGCGGGTGGCCGCTTCTGGAGACTCCGCGCCGCAACCTCCCTTCTACGAGCGGCTCGGC
1980
TTCACCTACCCGCGACGTTCAAGGTGGCGAAGGACCGCGACCTGTCATGACCCGCAAGCCGGTGCCTGACGCGCCGCCCCACGAG
2070
ATCTGCATGTCTACTAAACTCACAATTAGAGCTTCAATTTAATTAATATCAGTTATTACCCATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAA
2160
CATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCAATTTGCTTCTGTTTTTGGTTCACCCAGAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCT
2250
GAAGTACAGTTGGTGCACGAGTGGTTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCCGCCGGAAGACGTTTT
2340
CCAATGATGAGCATTAAAAGTTCTGTATGTGGCGCGGATTATCCCGTATTGACGCTGGGCAAGAGCAACTCGGTCCGCGCAGATACAC
2430
TATTTCTAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACAGTACAGAAAAGCATTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTCTGCC
2520
ATAACCATGAGTGATAAACATCGCGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACGAGGCTAACCGTTTTTGCACAACATGGGG
2610
GATCATGTAATCGCTTGTAGTGGTGGGACCGGAGCTGAATGAAGCATACCAACGACGAGCGTGACACCAGTGCCTGTAGCAATG
2700
GCAACAACGTTGGCAAACTATAACTGGCGAACTACTTACTTACTTCCCGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCAAGAAAGTT
2790
GCAGGACCACTTCTGCGCTGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGAGCGTGGGCTCGCGGTATCATT
2880
GCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAAGCCCTCCGATCTGATGTTATCTACACGAGGCGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAAATAGACAG
2970
ATCGTGTAGATAGTGCCTACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACAGTTTACTCATATACTTTAGATTGATTTAAACTTTCAT
3060
TTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGATGATAAACAATGTATGGTGCTAATGTTGCTTCAACAACAAT
3150
TCTGTTGAACTGTGTTTTCATGTTTGCCAACAAGCACCTTTATACTCGGTGGCTCCCCACCACCAACTTTTTTGCAGTCAAAAAACA
3240
CGCTTTTGCACGCGGGCCCATAGTACAAACTACTAGTTTTCGTAGACTATTTACATAAATAGTCTACACCGTTGTATACGCTCCAA
3330
ATACACTACCACATTTGAACCTTTTTGCGAGTGAACAAAGTACGTTGCGGACGACGTAAGGCGGCTTATCGGGTCCGCTCGTCA
3420
CGTACGAATACATTTATCGGACCGGACGAGTGTGTTGCTTATCGTGACAGGACGCCAGCTTCTGTGTTGCTAACCGCAGCCGGACGCAAC
3510
TCCTTATCGGAACAGGACGCGCTCCATATAGCCGCGGTTATCTCATGCGGTGACCGGACACGAGGCGCCGCTCCCGCTTATCGCGC
3600
CTATAAATACAGCCGCAACGATCTGGTAAACACAGTTGAACAGCATCTGTTGCAATTTAAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCAGaat
3690
ctgacactatgaagtgcctttgtacttagcctttttatcattggggtgaattgcaagttaccatagttttccacacaaccaaaaag
3780
gaaactggaaaaatgttccttctaattaccattattgcccgtcaagctcagatttaattggcataatgacttaataggcacagccatac
3870
aagtcaaaatgcccagagtcacaaggctatcaagcagagggttggatgtgtcatgcttccaaatgggtcactacttgtgatttccgct
3960
ggatggaccgaagtataaacacagttccatccgatcctcactccatctgtagaacaatgcaaggaaagcatgaaacaaagaaacaag
4050
gaactggctgaaatccaggcttccctcctcaaagttgtggatgcaactgtgacggatgccgaagcagtgatgtccaggtgactcctc
4140
accatgtgctggttgatgaatacacaggagaattgggttgatcacagttcatcaacggaaaatgcagcaattacatagcccaactgtcc
4230
ataactctacaacctggcattctgactataaggtcaaagggctatgtgattctaactcatttccatggacatcacttctctcagagg
4320
acggagagctatcatcctgggaaaggaggccacagggttcagaagtaactacttggcttatgaaactggaggcaaggcctgcaaaaatgc
4410
aatactgcaagcatggggagtcagactccatcaggtgtctggttcgagatggctgataaggatcctttgtcagccagatccctg
4500
aatgccagaagggtcaagtatcctgctccatctcagacctcagttgatgtaagtcataactcaggagcgttgagaggatctggattatt
4590
ccctctgccaagaacctggagcaaaatcagagcgggtcttccaatctctccagttgatctcagctatcttgctcctaaaaaccaggaa
4680
ccggtcctgcttccaccataatcaatggtaccctaaaatactttgagaccagatacatcagagtcgatattgctgctccaatcctctcaa
4770
gaatggtcggaatgatcagttgaaactaccacagaagggaactgtggatgactgggcaccataagaagacgtggaatggaccacatg
4860
gagttctgaggaccagttcagataataagttcctttatacatgattggatggtatggtggactccgatctctatcttagctcaaagg
4950
ctcaggtgttcgaacatcctcacattcaagacgctgctcgaacttctgatgatgagagtttatttttgggtgatactgggctatcca
5040
aaaatccaatcagcttgtagaaggttggttcagtagttggaaggctcatttgcctctttttctttatcatagggttaatcattggac
5130
tattcttggttcccgagttggatccatcttgcattaaataaagcaccatcaagaaagacagatttatacagacatagagatgaacc
5220
gacttggaaagtaactcaaatctgcacaacagattctcatgtttggacaaatcaacttgtgatccatgctcaagaggcctcaatt
5310
atatttgagtttttaatttttatgaaaaaaaaaaaaaaaaaacggaattc ... 5358

```

Feature	Location	Size			Type
✓ V5 tag	61 .. 102	42 bp			CDS
/product	= epitope tag from simian virus 5				
/translation	= GKIPNPLGLDST 14 amino acids = 1,4 kDa				
✓ 6xHis	112 .. 129	18 bp			CDS
/product	= 6xHis affinity tag				
/translation	= HHHHHH 6 amino acids = 840,9 Da				
✓ OpIE-2 poly(A) signal	147 .. 276	130 bp			polyA_signal
/gene	= immediate-early gene 2 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= baculovirus polyadenylation signal				
✓ ori	404 .. 992	589 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
/note	= high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication				
✓ OpIE-1 promoter	1067 .. 1358	292 bp			promoter
/gene	= immediate-early gene 1 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= moderate constitutive baculovirus promoter for insect cell expression				
✓ EM7 promoter	1384 .. 1431	48 bp			promoter
/note	= synthetic bacterial promoter				
✓ PuroR	1456 .. 2055	600 bp			CDS
/gene	= <i>pac</i> from <i>Streptomyces alboniger</i>				
/product	= puromycin <i>N</i> -acetyltransferase				
/note	= confers resistance to puromycin				
/translation	= MTEYKPTVRLATRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRH TVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGVWVADDGA AVAVWTTPE SVEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQMKLLAPHR PKEPAWFLATVGVSPDHQKGLGSAVVLPGVEAAERAGVPAFLETSAPRNLPFYERLGFVTADVKVPEGPRTWC MTRKPGA* 199 amino acids = 21,5 kDa				
✓ AmpR	2149 .. 3009	861 bp			CDS
▶ 2 segments					
/gene	= <i>bla</i>				
/product	= β-lactamase				
/note	= confers resistance to ampicillin, carbenicillin, and related antibiotics				
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFLPVFA,HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEVSPVTEKHLTDGDMTVREL CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAF LHNMGDHTVRLDRWEPELNEAIPNDERDTTMPVAMATTLRKLTTGELLTLASRQQLIDWMEADK VAGPLLR SALPAGWFIADKSGAGER GSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW* 286 amino acids = 31,6 kDa				
✓ OpIE-2 promoter	3105 .. 3652	548 bp			promoter
/gene	= immediate-early gene 2 from the <i>Orgyia pseudotsugata</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus				
/note	= strong constitutive baculovirus promoter for insect cell expression				
✓ VSV-G	3699 .. 5234	1536 bp			CDS
▶ 2 segments					
/product	= vesicular stomatitis virus G glycoprotein				
/note	= Indiana strain				
/translation	= MKCLLYLAF LFIGVNC,KFTIVFPHNQGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTAIQVKMPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQG TWLNPGFPPQSCGYATVDAEAVIVQVTPHHVLVDEYTG EWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHS DYKVKGLCD SNLISM DITFSE DGE LSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACK MQYCKHWGVR LPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPV DLSYLAPKNPGTGP AFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSR MVG MISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLR TSSGYKFLPYMIGHGMLSDSLHLSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDES LFFGDTGLSKNPIELVEGWFSWKS SIASFFFIIGLIIGLF LVLRVGIHLCLKHKTKRQIYTDIEMNRLGK* 511 amino acids = 57,5 kDa				

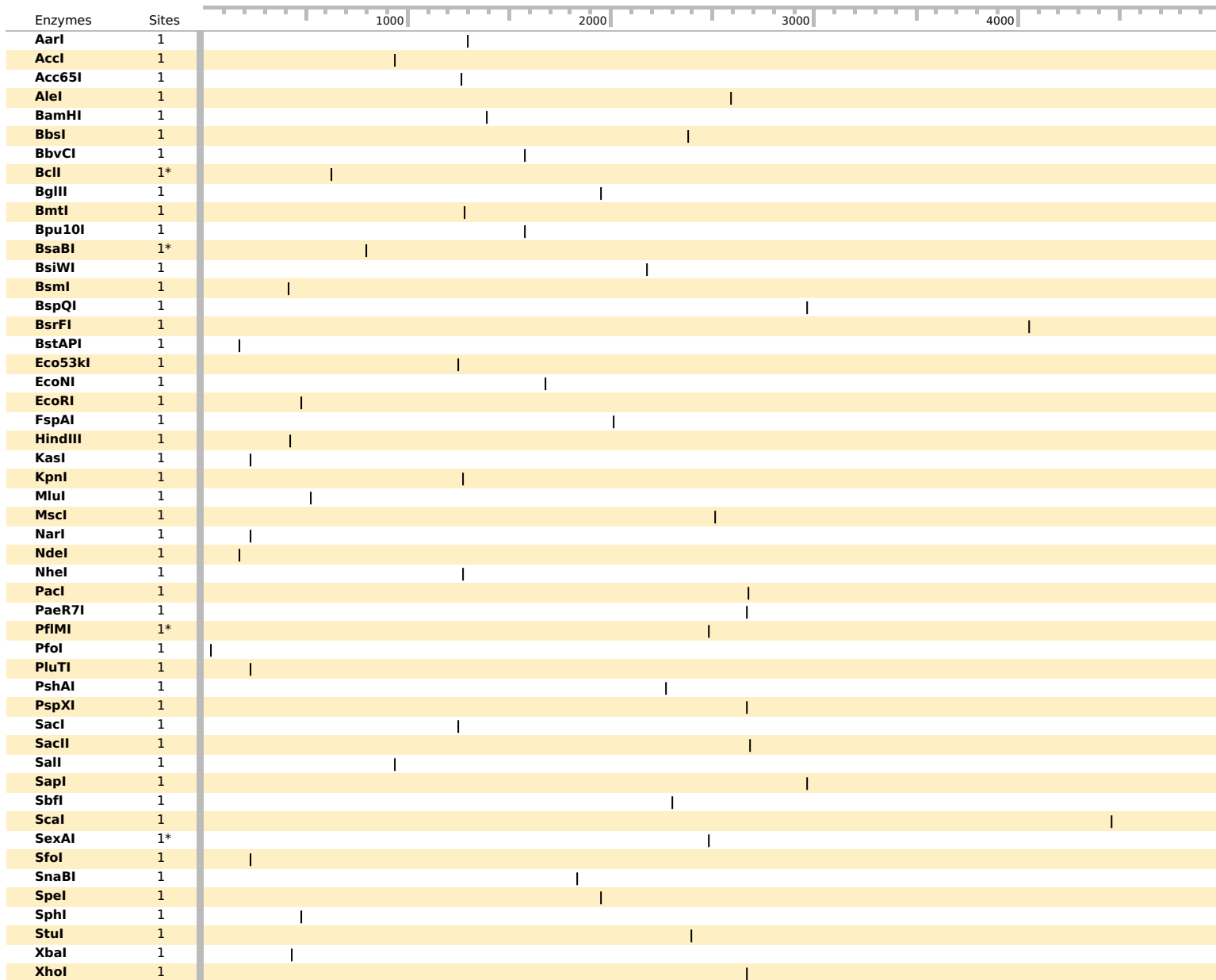
6 features are not displayed



















































```

... TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCA 90
GACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGCGGGTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC 180
ACCATATGCGGTGGAATACCGCACAGATGCGTAAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCCAGGCTGCGCAACTGTTGGG 270
AAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGT 360
TTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAATTGGAGATCGGTAATTCGCGAATGCGTCGAGATaagcttTCTAGAAAAatc 450
accatgggcgattacaaggatgacgacgataagGCATGCGAATTccatggAAGCCGACGAATAACGTTATGTTGACGACGCGTCCGTC 540
CTTTGGATCGACACGGACTACATTTATCAAAATTTAAAAATGCCTTTGCAAGCGTTCACAACTTTTGTTCACCATTTCAATCAACAT 630
AGAAAAATGATCAACGATGCGGGCGGATCGTGTACATAACACGGTCAAAATACATGGTGGACATTTACGGAGCGGCCGTTCTGGTTTTGCGA 720
ACGCTTGTCTGTTGCGCCGACAGTTGTTGAGCACATTTATTGCAAAACAAATTTTGTGCTACTTTTACCCTGCTGCGCGATCACGATCA 810
CGCTCAGGATCAGCTCGCGATCAGTCTCTCTCATTGACAGACCTCGTTCCGCTCTCTCATTGACAGACCTCGTTCCGCGATCTCGGTCC 900
CGGTCgAGATCGCGGTACGTTTCATCGTCTCCAGGCGAGGGCGTGCACAAATATTGACGCGCTGGAAAAAGATTGCTCATCAAAACGAC 990
ATGTTGATGAGCAACGTCAACCAATAAATCTCAACCAACTAATCAATTTTTAGAATTGTCCAACATGATGACGGGCGTGCGCAATCAA 1080
AAGCTGACACTCTCGCGCGTGGAAACCGCTAAAGATGTTATTTGACCAGATTAACACATTTGCTTGGCGAGATTACAGACTCGTTA 1170
CCGACTTGACGTCATGTAGATAAAATTAGTCAACAATTTGTTGACGCCATCAACACGCTGCAGCAAACCTGCGCAACGAGTgAGCTC 1260
GGCGGAGGCGGAAGCGGTACCCTAGCagccccacctgcatccccagcGGCCAGCCCTGCCCTACAACGAGAACTGCTGCAAGCCAGAGC 1350
TGCACCTTCAAGGAGAACGAGAACGGcaacaccggtgaagcgtgcatCaGGATCCGCCGCTGCGGCCGctgacaatatTTTgtactcc 1440
ggtgagactctctctacaggggaatttctcaactacggaagtttctgttttatcatgcaagaggactgcaatctggctctgtacgacgtg 1530
gacaagcacaactctgggcaacaacacaggtggtctctcccgtagctgctctctcagcctgcagactgatgggaacctcgtggtgtacaac 1620
ccatcgaaacaaactgatttgggcaagcaactggaggcgaataatgggaattacgctgtgcatctacagaagataggaattgttggatc 1710
tacggaactgatcgttgggctactggaGCGGCCGCaTatccttacgacgtgcctgactacgctaaacctggcttactgtaacagaaaa 1800
aagagtaaaaggcgacagctcgttgcgaattgtcctgttacgtactctgtggtttcacgaggttgcatcaccaaaggtaacctttttt 1890
tttgcctcgcgcacaaaacgacatcttaataaccaagcaacgcttcgataaagaaaaaaactcgtcAGATCTACTAGTatggtgagcaag 1980
ggcggagggtcatcaaagagtcatgagcttcaaggttgcgcatggaggctccatgaacggccacgagttcgagatcgaggcgaggggc 2070
gagggcgccccctacgagggcaccagaccgcaagctgaaggtgaccagggcgccccctgcccctcgccctgggacatctctgcccc 2160
cagttcatgtacgctccaagggctacgtgaagcaccgcccagacatccccgattacaagaagctgtccttccccgagggttcaagttg 2250
gagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggtctggtgaccgtgaccaggaactcctcccctgcaggacggcagcgtgatctacaaggtgaag 2340
atgcgggcaaccaacttccccccgacggccccgtaatgcagaagaagcagatgggctgggagggctccaccgagcgccttacccccc 2430
gacggcgtgctgaagggcgagatccaccagggcctgaagctgaaggacggcgccactacctggtggagtccaagaccatctacatggcc 2520
aagaacccgtgcaactgcccggctactactacgtggacaccaagctggacatcactcccacaacgaggactacaccatcgtggaacag 2610
tacgagcgtccgagggccgcccaccctgtcctgtacggcatggacgactgtacaagtaactCGAGTTAATTAACCGGGATCGGAT 2700
GCCGGGACCGAGTGCAGAGGCGTGCAAGCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCAATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACA 2790
ATTCCACACAACATAGCAGGCCGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCA 2880
CTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGGTTGCGTATTGGGGC 2970
TCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTCGTTGCGCTGCGGCGAGCGGATCAGCTCAAAAGCGGTAATACGGTTA 3060
TCCACGAATCAGGGGATAACCGAGGAAAGAACATGTAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCG 3150
TTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAC 3240
CAGGCGTTTTCCCGCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCAGGATACCTGTCCGCCCTTCTCCCTTCGGGA 3330
AGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGACGCTGATAGGTATCAGTTCGGTGTAGGTGCTGCTCCTCAAGCTGGGCTGTGTGCAGGAACCC 3420
GTTACGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGCGAGCAGCCACT 3510
GGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAAGAACAGTA 3600
TTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCCTGGTAGCGGT 3690
GGTTTTTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAgaagatcctttgatcttttctacggggtcagcgtcag 3780
TGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTT 3870
AAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACTATCTCAGCGATCTGTCTATTT 3960
CGTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCG 4050
CGAGACCCAGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCC 4140
GCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCCGCAAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACA 4230
GGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTATTAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTG 4320
TGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCCGTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTG 4410
CATAATCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCACTTGTGAGAATAGTGTATGCGG 4500
CGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACCTTAAAGTGCTCATCATTGGA AAAACGTTCT 4590
TCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTCGTGACCCAACCTGATCTTACGATCTTTT 4680
ACTTTACACAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTC 4770
ATACTCTTCTTTTTCAATATTTAAGCATTTATCAGGGTTATTGCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTTAGAAAAATAAA 4860
CAAATAGGGGTTCCCGGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACTGACGCTAAGAAACCATTATTTATCATGACATTAACCTATAAAAATAG 4950
CGTATCAGAGGCCCTTTCGTC ... 4972

```



Feature	Location	Size			Type
✓ lacZα	146 .. 431	286 bp			CDS
/codon_start	= 1				
/translation	= SRRRIREVPIISLAVLQRRDWDENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDRPSQQLRSLNGEWRLMRYFLLLTHLCGISHRIWCTLSTICSDAA*				94 amino acids = 10,9 kDa
✓ M13 fwd	379 .. 395	17 bp			primer_bind
✓ kozak consensus BmNPV	444 .. 451	8 bp			misc_feature
/note	= paper Effect of ATG initiation codon context motifs on the efficiency of translation of mRNA derived from exogenous genes in the transgenic silkworm, Bombyx mori Ken-ichiro Tatematsu*, Keiro Uchino, Hideki Sezutsu and Toshiki Tamura				
✓ Flag tag	460 .. 483	24 bp			misc_feature
✓ PEP Ac	502 .. 1254	753 bp			misc_feature
✓ rep 1	838 .. 863	26 bp			misc_feature
✓ rep 2	865 .. 890	26 bp			misc_feature
✓ rep 4	982 .. 992	11 bp			misc_feature
✓ LINKER	1261 .. 1275	15 bp			misc_feature
✓ HTOX	1288 .. 1401	114 bp			misc_feature
✓ LINKER	1408 .. 1413	6 bp			misc_feature
✓ GNA	1423 .. 1737	315 bp			misc_feature
✓ HA tag	1747 .. 1773	27 bp			misc_feature
✓ IRES	1777 .. 1956	180 bp			misc_feature
✓ rep 3	1905 .. 1915	11 bp			misc_feature
✓ dTomato	1969 .. 2670	702 bp			CDS
/translation	= MYSKGEEVIKEFMRFKVRMEGSMNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKLSFPEGFKWERVMNFEDGGLVTVTQDSSLQDGLTLYYKVKMRGTNFPDPGPMQKKTMGWEASTERLYPRDGLVKGELHQALKKDGHHYLVFVKTIYMAKPKVQLPGYVVYVDTKLDITSHNEDYTIQEYERSEGRHHLFLYGMDELYK				234 amino acids = 27,0 kDa
✓ lacZα	2694 .. 2755	62 bp			CDS
/translation	= MTMITPSSLARLCTRRSRHP				20 amino acids = 2,3 kDa
✓ M13 rev	2751 .. 2767	17 bp			primer_bind
✓ lac operator	2775 .. 2791	17 bp			protein_bind
✓ lac promoter	2799 .. 2829	31 bp			promoter
▶ 3 segments					
✓ ori	3153 .. 3741	589 bp			rep_origin
/direction	= LEFT				
✓ AmpR	3912 .. 4772	861 bp			CDS
▶ 2 segments					
/translation	= MSIQHFRVALIPFFAAFLPVFA,HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLHNMGDHVTRLDRWEPELNEAIPNDERDTTTPVAMATTLRKLTTGELLTLASRQQLIDWMEADKLVAGPLLRSALPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW*				286 amino acids = 31,6 kDa
✓ AmpR promoter	4773 .. 4877	105 bp			promoter