

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
(IBBM)**



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

**Caracterización molecular de un virus
de la granulosis de *Epinotia aporema***

**Alejandro Daniel Parola
Tesis Doctoral
La Plata, 2003**

TEB
Nº 1072

DONACION CON C.B. CAP. 11
.....
.....
07-04-03
Inv. B. Inv. B. 57398

| |
|--|
| |
| |
| |

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



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

TESIS
Nº 1072

Lic. Alejandro Daniel Parola
Tesista

Dr. Víctor Romanowski
Director

ADONACION: CON C.B. CAP. 11
.....
Fecha 07.04.05
Inv. # Inv. # 57398

A mi abuelo José Yanulis por despertar mi curiosidad con sus preguntas, por incentivar mi afinidad para con la ciencia y por jugar "a los indios" tantas veces...

**"Caminante, son tus huellas
el camino, y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.
Caminante, no hay camino,
sino estelas en la mar."**

Antonio Machado

Agradecimientos

Reconocimientos

- *La Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por permitirme realizar el Doctorado.*
- *Al Consejo de Investigaciones Científica y Tecnológicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) por la beca de iniciación recibida.*
- *Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por las becas que permitieron la realización de esta tesis.*
- *A los integrantes del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) por permitirme desarrollar el presente trabajo en su ámbito.*
- *Además, quiero destacar el apoyo brindado por muchos de los miembros de la Universidad Nacional de Quilmes quienes han confiado en mi labor docente.*

En realidad prefiero reconocer a personas de carne y hueso puesto que las instituciones y los llamados "sistemas" no son mas que un conjunto de individuos que comparten un colectivo de ideas, anhelos y objetivos comunes. A ellos, gracias.

Agradecimientos

A mi director Víctor Romanowski, por la confianza depositada en mi labor, por dirigirme y por dejarme hacer solo muchas cosas, por criticarme en lo que estaba mal y por alegrarse cuando las cosas salieron bien. Por aguantar mis planteos, muchas veces tan intransigentes, menos mal que es una persona paciente y educada. Gracias por enseñarme tantísimas cosas, desde cuestiones experimentales hasta lo que he aprendido durante la discusión de los resultados. En fin, gracias por guiarme.

Al Dr. Daniel Ghiringhelli, porque le caí del cielo y aún así dedicó muchísimo tiempo y esfuerzo en la enseñanza de numerosas técnicas moleculares, gracias por la discusión de resultados, por las ideas, por los primers, etc, etc (y son varias etcéteras). Además, gracias porque a veces me dejaste solo con los experimentos (en especial con el ^{32}P), sin embargo eso me ayudo mucho a ganar confianza en mi labor.

A Mario, primero por enseñarme Bioquímica desde otro punto de vista y por brindarme una oportunidad en la asignatura Bioquímica II. Pero además gracias, por haberme co-dirigido en mi primera beca de CONICET, por la dedicación puesta en la discusión de resultados y en la escritura de trabajos científicos, entre muchas otras ayudas recibidas.

A Graciela Glikmann, por brindarme su experiencia respecto de las técnicas inmunoquímicas, en especial porque me enseñó a ir a pasos seguros y ordenados. Porque al final eso me ordenó un poquito. Pero por sobre todas las cosas, gracias por brindarme un lugar en su grupo de trabajo y hacer que la jornada sea tan agradable.

A Alicia Cap, por sus aportes intelectuales a este trabajo, por sus contribuciones a la discusión de resultados y a la escritura de trabajos científicos. Además, gracias por el material brindado, porque sin él esta tesis no hubiera sido posible.

Al Dr. Oscar Grau por sus consejos sobre estrategias para corroborar contigüidades y por sus charlas sobre ciencia y política científica...hubiera seguido hablando más...

Gracias, a los que desde "el viejo régimen" de la UNQ me discriminaron por ser becario de Víctor, porque con ellos entendí un poco más de la vida (de las cosas feas por supuesto). Gracias a los que me bancaron, aún en esta situación adversa que nos tocó sufrir por mucho tiempo, en especial a Mario Lozano.

Y ahora se viene la maratón del agradecimiento y muchos van doble o triple (de miga):

A Mariana Barboza y Lalala por prestarme sus casas para escribir parte de esta tesis. A Marcelo Argüelles, Cristina Mc Carthy, a las tías Mariana Barboza y Lucrecia Delfederico, a Alejandra Belizán, Gabriel Iglesias y Matilde Massinni (¿con cuantas s y n se escribe tu apellido?) por sus aportes a los diversos capítulos de la tesis.

A mis compañeros del la UNQ: Marcos Belaich, Mariano Bilen, !O No! otra vez les confundí el nombre, a Marcela P., Sandra G., Evelina M. y Vanina da Ros (cuanto hace que no nos vemos...) por la ideas, soluciones, protocolos, papers. A Juan Cruz Casabona (por las secuencias, y toda la información compartida sin cargo alguno), a mi amigo Jorge Trelles ...(alias el "Barman Show") por compartir la vida, por estar cuando hizo falta y cuando no...y gracias por los tragos de colores exóticos que bebimos.

A mis compañeritos/as del laboratorio del IBBM: Cesar Albariño y Diego Posik por sus innumerables aportes y su paciencia. A la "tana" Alejandra Tortorici por dejarse "afanar" las soluciones y no retarme tanto cuando me descubría y por las charlas sobre la ciencia, el país, la vida, la gente, y el maldito clonado que no sale... A Christina Macarthy por las correcciones, la onda, por la amistad. A Alejandra Manzán por muchas cosas (la library, los clones, las secuencias, etc) ¡Si! "ojo al piojo", vieron que le agradecí después de todo. A Alina por la secuencia de la región iap-3. A Eloísa Arana. Y a los que pasaron por el lab: Vero Mathet, Maria Julia (gracias por la buena onda) y Ramiro Mendez. También Juan Cap merece mucho reconocimiento por preparar las larvitas de E. aporema, al igual que todas las demás personas que desde el IMYZA aportaron material para esta tesis.

A mis compañeros Ibbmeanos (suena medio feo ¿no?) o mejor, a mis compañeros Ibbemeños:

A los "virus verdes", en especial a Selma (por las técnicas, las soluciones, las charlas, por dar sin pedir nada a cambio), a María Laura García, María Eugenia Sánchez de la Torre, Gonzalo Legarreta (¿cuantos vinos habremos descorchado?), Leandro Jones, Omar Riva, Gabriela Naum (gracias por tus aportes sobre el uso de la VAX, entre tantos otros), César Sommer, Germán Robledo y Verónica El Mujtar (gracias por las secuencias). A los Rizobieros y estudiosos de las interacciones planta del pie-patógeno (¿eso era lo que investigaban?) Tony Lagares, Daniela, Aníbal Lodeiro, Florencia del Papa, "El Picho", Mariano, Pity, Federico, Julieta, Tirso, Laura Balagué, Mario Aguilar, Cecilia, Juan Carlos y Katy, Verónica López, Pablito (master). A Daniel

Graso (el otro "Negro"), Mónica Collavino. A Rubencito (idolo), Charly (Carlitos) y Catalina, Silvia Moya y a Martin Sarachu. A Marcela Pagano y Pacho que están en Brasil (¡avanti el Mercosull!).

A la SAIBBM por sus tan agradables reuniones científicas.

Por el lado de la UNQ:

A mis compañeros del laboratorio de la de Graciela Glikmann: Marcelo Argüelles (un maestro total), Maty, Ale Belizán por sus correcciones, ayudas múltiples, en fin, por ser tan buenos compañeros y tan solidarios y a vos también Rosana aunque hace poco que somos co-workers gracias por los mates dulces. A Alejandro Castello por la predisposición a enseñarme sobre "los virus". A Mariana Orellana por sus aportes.

A la cátedra de Zootecnia de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata, por inyectar los conejos en contra de su voluntad...no se entristezcan que la menos no los sangré a blanco. Es mas, uno de ellos fue mascota de los hijos de Mónica y Germán.

A Andrea, por su amor, su temura, su confianza en mí y por apoyarme tanto, tanto y tanto, por soportar esta última etapa que se hizo tan larga, en fin... por ser mi sol.

A Chiarita por brindarme su sonrisa plena de alegría, por su amor, por mostrarme que en la vida está en las cosas simples..

A las dos por compartir la vida... las quiero.

A mis padres José y Elsa, a mis hermanos José Ignacio (Josi) y Verónica y a mi abuela "la Yeyi" por el apoyo y el cariño que me brindaron siempre, además por la atención que me prestaron cada vez que tenía que explicar en que trabajaba. Y a mis abuelos que no están, José "el gato Felix" y Anita.

A la familia de Andrea (Marta, Julio, Laura y Agustín) por su colaboración, en especial por la PC, el memory stick, y etcéteras varios y muy valiosos.

A mis amigos de Córdoba, Pancho y Cesar "Cebeca" Ferreira, por el aguante.

Y a la ciudad de La Plata, con sus diagonales, el museo, el bosque y sus enigmáticas estatuas frente a la catedral.

Ahhhhhh, y a todos los que me olvidé.....tanke iou verri mouch

El presente trabajo ha dado lugar a las siguientes publicaciones

Sciocco-Cap, A., Parola, A. D., Goldberg, A. V., Ghiringhelli, P. D. & Romanowski, V. (2001). Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 3702-3706.

Parola, A. D., Manzán, M. A., Lozano, M. E., Ghiringhelli, P. D., Sciocco-Cap, A. & Romanowski, V. (2002). Physical and genetic map of *Epinotia aporema* granulovirus genome. *Virus Genes* **25**, 327-339.

Parola, A. D., Glikmann, G., Sciocco-Cap, A. & Romanowski, V. (2003). An immunochemical method for quantitation of *Epinotia aporema* granulovirus (EpapGV). *Journal of Virological Methods* **112**, 13-21.

Índice

| | Pág. |
|---|------|
| Índice | 1 |
| Resumen | 3 |
| Abstract | 5 |
| Presentación de la información | 7 |
| | |
| Glosario | |
| Abreviaturas y siglas | 8 |
| Nombres y abreviaturas de los baculovirus nombrados en esta tesis | 10 |
| Lista de genes y sus abreviaturas | 11 |
| | |
| Objetivos | 12 |
| | |
| Capítulo 1: Introducción general | 13 |
| El cultivo de la soja en Argentina y el complejo de plagas | 14 |
| Biología molecular de los baculovirus, estado actual del conocimiento | 22 |
| Aspectos destacados de la biología molecular de los granulovirus | 41 |
| Evolución de la familia <i>Baculoviridae</i> , filogenia y contenido de genes | 42 |
| Adquisición y reordenamiento de genes | 49 |
| | |
| Capítulo 2: Materiales y métodos | 56 |
| Materiales | 57 |
| Soluciones | 58 |
| Métodos | 63 |
| | |
| Capítulo 3: Caracterización proteica y microscópica de EpapGV | 95 |
| Introducción | 96 |
| Objetivos | 99 |
| Resultados y discusión | 99 |
| Caracterización morfológica de los cuerpos de inclusión | 99 |
| Análisis de la proteína mayoritaria de EpapGV | 102 |
| Conclusiones | 112 |
| | |
| Capítulo 4: Desarrollo de un método inmunoquímico para la detección y cuantificación de virus ocluidos de EpapGV | 113 |
| Introducción | 114 |
| Objetivos | 115 |
| Resultados y discusión | 116 |
| Puesta a punto de la metodología de ELISA | 116 |
| Especificidad de los anticuerpos anti-granulina de EpapGV | 123 |
| Cinética de la acumulación de granulina en larvas infectadas | 125 |
| Formulados | 130 |
| Conclusiones | 137 |
| | |
| Capítulo 5: Determinación del mapa de restricción (mapa físico) del genoma de EpapGV | 138 |
| Introducción | 139 |
| Objetivos | 140 |
| Resultados y discusión | 142 |
| Análisis de la biblioteca de clones EcoRI, BamHI, HindIII y BglII | 145 |
| <i>Southern blot</i> | 173 |



| | |
|--|-----|
| Empleo de fragmentos BglII y BamHI como elementos alineatorios | 180 |
| Empleo de técnicas de PCR para determinar la contigüidad de fragmentos | 183 |
| Hipótesis final del mapa de restricción de EpapGV | 187 |
| Verificación de la hipótesis de mapa | 189 |
| Conclusiones | 194 |
| Capítulo 6: Gen de granulina: ubicación, clonado, secuencia, análisis filogenético | 195 |
| Introducción | 196 |
| Objetivos | 197 |
| Resultados y discusión | 198 |
| Ubicación del gen de granulina por <i>Southern blot</i> | 198 |
| Clonado del gen de granulina | 204 |
| Secuenciamiento del gen de granulina | 205 |
| Análisis de las regiones flanqueantes al gen de granulina | 210 |
| Análisis filogenético de los GVs | 212 |
| Conclusiones | 217 |
| Capítulo 7: Localización y análisis de secuencia de un gen inhibidor de la apoptosis en el genoma de EpapGV | 218 |
| Introducción | 219 |
| Objetivos | 221 |
| Resultados y discusión | 222 |
| Análisis por <i>Southern blot</i> | 222 |
| Análisis de la región secuenciada y caracterización de los ORFs encontrados | 227 |
| Caracterización de las secuencias de los ORFs ubicados en la región <i>iap-3</i> | 227 |
| Análisis filogenético del gen <i>iap-3</i> | 233 |
| Conclusiones | 236 |
| Capítulo 8: Análisis del genoma de EpapGV | 237 |
| Introducción | 238 |
| Objetivos | 239 |
| Caracterización parcial del genoma de EpapGV | 240 |
| Análisis de ORFs potenciales | 257 |
| Búsqueda y análisis de secuencias repetidas en el genoma de EpapGV | 259 |
| Organización genómica de EpapGV | 262 |
| Análisis filogenético de alineamientos proteicos concatenados | 271 |
| Mapeo del contenido de genes | 273 |
| Conclusiones | 278 |
| Capítulo 9: Discusión y conclusiones generales | 279 |
| Capítulo 10: Bibliografía | 284 |
| Capítulo 11: Apéndices | 300 |
| Parte A (versión impresa) | 301 |
| Parte B (versión electrónica) | 322 |
| Fe de erratas | 360 |

Resumen

El barrenador de los brotes de la soja, *Epinotia aporema* (Lep. Tortricidae) es una importante plaga de leguminosas en América del sur. En Argentina, este insecto ocasiona reducciones en los rindes de soja de hasta el 40%. Estudios preliminares identificaron a un *Granulovirus* (EpapGV) como un candidato potencial para el control biológico de *Epinotia aporema*. En esta tesis se aborda la caracterización molecular de EpapGV.

Los análisis de microscopía electrónica (ME) de los cuerpos de inclusión (OBs) de EpapGV indicaron que éstos son ovoides con tamaños de 469 (\pm 37) nm x 242 (\pm 22) nm y que contienen un virión con forma de bastón, con una única nucleocápside. El OB está formado mayoritariamente por una proteína de 28,5 \pm 0,5 kDa cuya secuencia amino-terminal es muy similar a otras granulinas de los *Granulovirus*.

El mapa de restricción del genoma de EpapGV se determinó a partir del análisis de una biblioteca de fragmentos del DNA de EpapGV mediante digestiones con enzimas de restricción, *Southern blot* y amplificaciones de PCR con *primers* que apuntaban hacia afuera de los fragmentos virales. Esta última técnica se empleó para asegurar la contigüidad de los fragmentos. El tamaño del genoma se estimó en 120 kbp y se posicionaron los sitios EcoRI, BamHI, HindIII y BgIII en el mapa físico.

El gen de granulina ubicado en el mapa físico por *Southern blot*, fue clonado y secuenciado. Este gen tiene 747 nucleótidos de largo y codifica para una proteína de 29 kDa. La secuencia amino terminal deducida de la secuencia nucleotídica coincidió con la secuencia proteica determinada por degradación de Edman, salvo por la ausencia del residuo de la metionina inicial. El análisis de la secuencia 5' permitió detectar una secuencia promotora tardía característica de este gen (ATAAG) ubicada 29 pb *upstream* al ATG; además, se describió un posible motivo transcripcional situada entre el promotor y el ATG (WCARNA).

El análisis de la presencia de genes inhibidores de apoptosis (*iap*) mediante *Southern blot*, identificó una región genómica que codifica para un *iap* con similitud a los *iap-3* de los baculovirus. Este gen codifica para un polipéptido de 256 aminoácidos y su secuencia presenta dos motivos BIR y un motivo RING-Finger característicos de estas proteínas. Por otra parte, un análisis filogenético agrupó a EpapGV IAP-3 con proteínas IAP-3 de baculovirus y de lepidópteros.

La caracterización de las secuencias parciales del genoma de EpapGV (aproximadamente un 30% del genoma), reveló la presencia de 36 ORFs con homólogos en otros organismos. Por otra parte, se localizaron seis secuencias repetidas del tipo palíndromes imperfectos, distribuidas en diferentes lugares del genoma y repeticiones pequeñas situadas en regiones 5' no codificantes de varios genes. La presencia de ORFs compartidos por pares de fragmentos se usó, entre otras cosas, para confirmar la contigüidad de fragmentos en el mapa físico.

El análisis filogenético de los baculovirus obtenido a partir de apilamientos de proteínas mayoritarias de cuerpo de inclusión coincidió con el árbol filogenético generado a partir del alineamiento de 20 proteínas conservadas en todos los baculovirus de lepidópteros totalmente secuenciados. Los resultados indicaron que EpapGV pertenece al grupo I del género *Granulovirus* y esta muy relacionado con CpGV, pero posee una organización génica diferente.

En otro orden de cosas, se ha puesto a punto un ensayo de ELISA de captura para la detección y cuantificación de rutina de EpapGV, basado en anticuerpos policlonales

específicos para granulina de EpapGV. Este ensayo posee una alta sensibilidad para EpapGV, detectando hasta 0,53 ng/ml de granulina, equivalentes 1.000 OBs por fosa. El ensayo de ELISA permitió cuantificar OBs de EpapGV en diluciones que contenían hasta 5×10^3 OB por μg de formulado bioinsecticida. Por otra parte, el ensayo se utilizó para determinar el progreso de la infección en larvas, estableciendo la presencia de granulina a partir de las 24 h p.i. Los resultados de esta metodología indicaron que la misma es una alternativa rápida y barata para la detección y cuantificación de rutina de EpapGV en mezclas complejas.

En conclusión, se ha provisto evidencia sustancial sobre el genoma de EpapGV y de su proteína mayoritaria del cuerpo de inclusión. Estos datos avalan la clasificación tentativa del virus aislado de *E. aporema* dentro del género *Granulovirus* de la familia *Baculoviridae*. Finalmente, estos estudios en conjunto con otros realizados por nuestro equipo de investigación, sientan las bases para el registro comercial de este virus que permitirán en el futuro, su uso en agricultura como agente de control biológico de *E. aporema*.

Abstract

The bean shoot borer, *Epinotia aporema* (Lep. Tortricidae), is an economically important pest of legume crops in *South America*. In Argentina, damages caused by this insect decrease soybean yields up to 40%. Recently, a potential candidate for the control of *Epinotia aporema* was isolated. Preliminary studies suggested that this insect pathogen was a *Granulovirus* (EpapGV). This study focuses on the molecular characterization of EpapGV.

The electron microscopy (EM) analyses revealed that EpapGV occlusion bodies (OBs) were ovoidal in shape, with a mean size $469 (\pm 37)$ nm x $242 (\pm 22)$ nm, and contained a single rod-shaped virion with only one nucleocapsid. EpapGV OBs are composed mainly by a $28,5 \pm 0,5$ kDa protein with an amino-terminal sequence remarkably similar to granulins of other *Granulovirus*.

The EpapGV restriction map was determined by analyzing of a library of genomic fragments, using combinations of restriction endonucleases, *Southern blot* and PCR amplifications with primers that pointed outwards of the cloned viral DNA, in order to assess the contiguity of fragments. The DNA genome size was estimated to be 120 kbp and EcoRI, BamHI, HindIII and BglII restriction sites were positioned on the physical map.

The granulin gene was located on the physical map, cloned and sequenced. Its 747-nucleotide-long ORF encodes a predicted 29 kDa protein. The amino terminal sequence was deduced from nucleotide sequences and resulted to be identical to that previously determined by Edman degradation, excluding the first methionine residue. The core sequence of the baculovirus very late promoter ATAAG was found 29 nucleotides upstream the initiation codon, and close to this we described a new putative transcriptional motif (WCARNA).

In addition, we analyzed the presence of genes coding for inhibitor of apoptosis (*iap*) by *Southern blot* hybridization. A genomic fragment detected in this assay was sequenced, and an ORF similar to baculovirus *iap-3* was located. This ORF codes for a 256 amino acid protein and possess two BIR and one RING-finger motifs, typical for these proteins. A phylogenetic analysis grouped EpapGV IAP-3 with other IAP-3 from lepidoptera and baculovirus.

The sequences generated during the mapping provided by this author and others coworkers allow for a preliminary characterization of the EpapGV genome. These sequences cover approximately 30% of the genome, and code for 36 ORFs homologous to those found in other organisms. In addition, six imperfect palindrome sequences interspersed in the genome were found, as well as different small repeated sequences located in 5' non coding regions of several genes. The ORFs spanning pairs of fragments were used to confirm the contiguity of those fragments in the physical map.

The evolution of baculoviruses studied by the phylogenetic analyses of the major OB protein was coincident with the results obtained from a tree generated by a concatenated alignment of 20 proteins present in all the lepidopteran baculovirus genomes fully sequenced. These results indicated that EpapGV belongs to group I of the *Granulovirus* genus, closely related to CpGV, but has a distinct gene organization.

In this thesis we also developed capture ELISA method for a routine detection and quantitation of EpapGV, based on polyclonal antibodies specific for EpapGV granulin. The performance of the ELISA was satisfactory in terms of sensitivity, detecting as little

as 0,53 ng/ml of EpapGV granulin, equivalent to 1000 OBs/well. The assay was able to detect and quantify granulin in complex and highly diluted bioinsecticidal formulations, up to 5×10^3 OB per μg of formulation. In time course experiments, the virus was detected as early as 24 h post infection. The technique developed here is a convenient, rapid and inexpensive alternative to detect and quantify EpapGV in complex mixtures.

In conclusion, we have provided substantial evidence for the description of EpapGV genome and its major occlusion protein. These data confirm a preliminary characterization of the virus isolated from *E. aporema* larvae into the *Granulovirus* genus of the *Baculoviridae* family. Finally, these and other studies conducted by our research team provided sufficient information for the registration of this virus as biological control agent of *E. aporema*.

Presentación de la información

La presente tesis ha sido dividida en capítulos, descriptos a continuación, a fin de facilitar la presentación y lectura de los datos.

En el primer capítulo se describe la importancia del cultivo de soja en Argentina, sus principales plagas, incluido el "barrenador de los brotes" de la soja *Epinotia aporema*. Se abordan también nociones de Manejo Integrado de Plagas y Control Biológico. En una segunda parte, se muestra una actualización sobre la Biología Molecular de los baculovirus. Los materiales empleados y las metodologías utilizadas en el desarrollo de este trabajo se describen en el segundo capítulo. El tercer capítulo presenta la caracterización de los cuerpos de inclusión de EpapGV por microscopía electrónica y sintetiza las principales características de la proteína mayoritaria (granulina) de EpapGV. El cuarto capítulo se refiere al desarrollo y puesta a punto de un ensayo de ELISA, a fin de detectar y cuantificar EpapGV en mezclas complejas tales como las formulaciones bioinsecticidas. En el quinto capítulo se describe como se construyó el mapa de restricción del genoma de EpapGV. El clonado del gen de granulina, el análisis de sus secuencias y la filogenia de EpapGV a partir de esta proteína se detallan en el capítulo sexto. El capítulo séptimo plantea la localización y análisis de secuencia de un gen inhibidor de la apoptosis en el genoma de EpapGV. En el capítulo octavo se describen los ORFs localizados en el genoma viral en base a las secuencias obtenidas a partir de la genoteca de EpapGV. Estos ORFs se estudiaron mediante herramientas bioinformáticas y se emplearon posteriormente para realizar un análisis de la evolución de EpapGV dentro de la familia *Baculoviridae*. En el capítulo noveno se analizan y discuten las conclusiones generales del presente trabajo. El capítulo décimo contiene la lista de las referencias bibliográficas de los trabajos citados. En el capítulo undécimo se incluye información accesoria para quienes deseen profundizar en los análisis de esta tesis. En la primera parte del apéndice se describen ensayos de cultivos e infección de células de insectos, se muestran árboles filogenéticos adicionales y la ubicación de las secuencias repetidas en la versión parcial del genoma de EpapGV. En la segunda parte se incluyen todas las secuencias disponibles de EpapGV en los que se muestran la posición de los *primers* y los marcos de lectura detectados. Además, se exhiben las comparaciones de secuencias efectuadas por BLAST. La segunda parte del apéndice no se ha impreso pero se adjunta en un CD anexo.

Glosario

Abreviaturas y siglas

| | |
|----------------------------|--|
| % p/v | porcentaje peso en volumen |
| % v/v | porcentaje volumen en volumen |
| μCi | microcurie |
| μg | microgramo (s) |
| μl | microlitro (s) |
| μM | micromolar |
| aa | aminoácidos |
| AcNa | acetato de sodio |
| ATP | adenosina 5'-trifosfato |
| Background | ruido de fondo, señal de fondo; conocimiento; bagaje |
| bd | bi destilada (agua) |
| Bisacrilamida | N,N'-metilenbisacrilamida |
| BLAST | "Basic local alignment search tool". Algoritmo basado en los algoritmos de Smith-Waterman cuyo objetivo es la búsqueda de similitudes entre secuencias |
| BSA | albúmina sérica bovina |
| Buffer | solución reguladora del pH |
| CAMPS | ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico |
| Cápside | cubierta proteica que protege los ácidos nucleicos de un virus |
| Clones espurios | clones originados en "digestiones estrella", digestiones parciales o en el clonado de productos no deseados como DNAs no pertenecientes al DNA de EpapGV |
| dATP | 2'-desoxiadenosina 5'-trifostato |
| Digestiones "estrella" | fenómenos que ocurre cuando una enzima de restricción digiere sitios parcialmente homólogos a la secuencia reconocida para su actividad. Este evento acontece en determinadas condiciones, entre otras, cuando la concentración de glicerol es superior al 10% |
| DNA | ácido 2' desoxirribonucleico |
| DNA pol | DNA polimerasa dependiente de DNA |
| DNAsa | desoxirribonucleasa |
| dNTPs | 2'-desoxirribonucleósidos 5-trifosfato |
| DO | densidad óptica |
| Doblete | bandas de DNA con doble intensidad que una simple |
| EDTA | ácido etilen diamino tetracético |
| Epítopes | porción de una proteína que reacciona con un anticuerpo |
| Epizootias | infecciones que acontecen sobre poblaciones de insectos |
| Expect (Expectation value) | Indica el número de diferentes alineamientos con scores (S) equivalentes, o mayores al valor S que se espera que aparezcan en la búsqueda en una base de datos por azar. Mientras más bajo es el Expect, más significativo es el score |
| g | gramo (s) |
| gap | brecha |
| genoteca | conjunto de clones de DNA genómico |
| gran | granulina |
| GV | Granulovirus |
| h | hora (s) |
| hr | regiones homólogas |
| kDa | kilo Daltons |
| l | litro |
| LB | Luria Beltrani (medio de cultivo) |
| M | molar |
| Match | concordancia |
| mbar | mili bar |
| ME | microscopía electrónica |
| Melting | "fusión", desnaturalización de ácidos nucleicos |
| mg | miligramo (s) |
| min | minuto (s) |
| ml | mililitro (s) |
| mM | milimolar |

| | |
|------------------------|---|
| MNPV | <i>multiple nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus</i> |
| MPM | marcador de peso molecular |
| mRNA | RNA mensajero |
| N x g | número multiplicado por la aceleración de la gravedad |
| Nal | ioduro de sodio |
| ng | nanogramo (s) |
| nm | nanómetro (s) |
| NPV | <i>Nucleopolyhedrovirus</i> |
| nt | nucleótido (s) |
| Nucleocápside | ver cápside |
| OB | <i>occlusion body</i> , cuerpo de inclusión u oclusión |
| p.i. | pos infección |
| pb | pares de bases |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa |
| pdN₆ | <i>primers</i> hexaméricos de secuencia al azar |
| PEG | polientilenglicol |
| PM | peso molecular |
| pmoles | pico moles |
| polylinker | región de un plásmido que contiene un alto número de sitios de restricción enzimáticos |
| primers | molécula de DNA que actúa como iniciador o cebador de la polimerización |
| PVDF | polivinil di fluoruro |
| pZErO-2™ | plásmido comercial (Invitrogen, CA, EE.UU.) |
| r.p.m. | revoluciones por minuto |
| Rojo Ponceau | colorante empleado para proteínas adsorbidas a membranas de PVP o nitrocelulosa |
| s | segundo (s) |
| Sample buffer | <i>buffer</i> empleado para sembrar muestras en geles de agarosa o poliacrilamida |
| Score | El <i>score</i> de un alineamiento se calcula como la suma de sustituciones y gaps. Los <i>scores</i> de sustituciones se calculan a partir de tablas (por ejemplo PAM o BLOSUM). Los <i>scores</i> de gaps son calculados como la suma de los valores G (la penalidad de apertura de gap) y L (la penalidad de extensión de gap). Para un gap de longitud n, el costo del gap será de G+Ln. En la elección de los valores de gap, G y L son empíricos, sin embargo, es común que se elijan valores de G altos (10-15) y valores de L bajos (1-2) |
| SDS | <i>sodium dodecil sulfate</i> (dodecil sulfato de sodio) |
| SDS-PAGE | electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS |
| Sensibilizar | acción que consiste en adherir a una placa de ELISA anticuerpos o antígenos |
| SNPV | <i>Single nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus</i> |
| Sp6 | secuencia de DNA que deriva del-promotor de las RNA polimerasa DNA dependientes del fago <i>Sp6</i> (<i>Salmonella typhimurium</i>) |
| T7 | secuencia de DNA que deriva del promotor de la RNA polimerasa DNA dependiente del fago <i>T7</i> (que infecta a <i>E. coli</i>) |
| TAE | Tris-acetato-EDTA |
| Taq pol | DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i> |
| TCA | ácido tricloroacético |
| TE | <i>buffer</i> Tris-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamina |
| Tris | tris-(hidroximetil)-aminometano |
| UV | ultravioleta |
| V | Volts |
| Virión | nucleocápside envuelta de una membrana lipoproteica |
| Virión ocluido | virión rodeado por una masa proteica |
| vs. | <i>versus</i> |
| Western blot | técnica que consiste en revelar con un anticuerpo una proteína adsorbida a una membrana |

Nombres y abreviaturas de los baculovirus nombrados en esta tesis

NPVs

| | |
|--|-------------------|
| <i>Agrotis segetum</i> Nucleopolyhedrovirus | AsNPV |
| <i>Amsacta albistriga</i> NPV | AmaINPV |
| <i>Anagrapha falcifera</i> MNPV | AnfaMNPV |
| <i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV | AgMNPV |
| <i>Archips cerasivoranus</i> NPV | ArceNPV |
| <i>Attacus ricini</i> NPV | AtriNPV |
| <i>Autographa californica</i> MNPV | AcMNPV |
| <i>Bombyx mori</i> MPV | BmNPV |
| <i>Buzura suppressaria</i> NPV | BusuNPV |
| <i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV | CfMNPV |
| <i>Culex nigripalpus</i> NPV | CuniNPV |
| <i>Ecotropis obliqua</i> Single Nucleopolyhedrovirus | EcobSNPV |
| <i>Epiphyas postvittana</i> NPV | EppoNPV |
| <i>Helicoverpa armigera</i> SNPV | HearSNPV o HaSNPV |
| <i>Helicoverpa zea</i> SNPV | HzSNPV |
| <i>Heliothis armigera</i> SNPV | HeliarSNPV |
| <i>Hyphantria cunea</i> NPV | HycuNPV |
| <i>Leucania separata</i> NPV | LeseNPV |
| <i>Lymantria dispar</i> LdMNPV | LdMNPV |
| <i>Malacosoma disstria</i> MNPV | MadiMNPV |
| <i>Malacosoma neustria</i> NPV | ManeNPV |
| <i>Mamestra brassicae</i> MNPV | MbMNPV |
| <i>Mamestra configurata</i> NPV | MacoNPV |
| <i>Neodiprion sertifer</i> NPV | NsNPV |
| <i>Orgyia pseudotsugata</i> MPNV | OpMNPV |
| <i>Orgyia pseudotsugata</i> SNPV | OpSNPV |
| <i>Panolis flammea</i> MNPV | PafilMNPV |
| <i>Perina nuda</i> NPV | PenuNPV |
| <i>Plusia orichalcea</i> NPV | PlorNPV |
| <i>Rachiplusia ou</i> MNPV | RouNPV |
| <i>Spodoptera exigua</i> MNPV | SeMNPV |
| <i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV | SfMNPV |
| <i>Spodoptera littoralis</i> NPV | SpliNPV |
| <i>Spodoptera littura</i> NPV | SpltNPV |
| <i>Thysanoplusia orichalcea</i> MNPV | ThorMNPV |
| <i>Trichoplusia ni</i> SNPV | TnSNPV |
| <i>Wiseana signata</i> NPV | WisiNPV |

GVs

| | |
|------------------------------------|----------------|
| <i>Adoxophyes orana</i> GV | AoGV |
| <i>Agrotis segetum</i> GV | AsGV |
| <i>Choristoneura fumiferana</i> GV | CfGV |
| <i>Cryptophlebia leucotreta</i> GV | ClGV o CreleGV |
| <i>Cydia pomonella</i> GV | CpGV |
| <i>Epinotia aporema</i> GV | EpapGV |
| <i>Harrisina brillians</i> GV | HbGV |
| <i>Lacanobia oleracea</i> GV | LoGV o LaolGV |
| <i>Phthorimaea operculella</i> GV | PhopGV |
| <i>Pieris brassicae</i> GV | PbGV |
| <i>Plutella xylostella</i> GV | PxGV |
| <i>Trichoplusia ni</i> GV | TnGV |
| <i>Xestia c-nigrum</i> GV | XcGV |

Lista de genes y sus abreviaturas

| Nombre | Abreviatura |
|--|---|
| Exonucleasa alcalina | <i>alk-exo</i> |
| Factor inductor de relocalización de actina | <i>arif-1</i> |
| Catepsina | <i>cath</i> o <i>v-cath</i> |
| Quitinasa | <i>chi</i> , <i>chiA</i> o <i>v-chiA</i> |
| Conotoxina | <i>ctf</i> |
| Desmoplakina | <i>desmoplakin</i> |
| DNA ligasa | <i>dna-lig</i> |
| DNA polimerasa | <i>dna-pol</i> |
| Desoxi UTPasa | <i>dUTPase</i> |
| Proteína de fusión (<i>envelope fusion protein</i>) | <i>efp</i> (Ld130) |
| Ecdisona glucosil transferasa | <i>egt</i> |
| Factor de crecimiento de fibroblastos | <i>fgf</i> |
| Spindilina (<i>spindlin</i>) | <i>gp37</i> |
| Glicoproteína <i>gp41</i> | <i>gp41</i> |
| Glicoproteína viral, proteína fusogénica <i>gp64</i> | <i>gp64</i> |
| Granulina | <i>gran</i> |
| Transactivador de transcripción general | <i>gta</i> |
| Helicasa | <i>hel-1</i> |
| Inhibidor de apoptosis | <i>iap</i> |
| Gen temprano inmediato 1 (<i>immediately early 1</i>) | <i>ie-1</i> |
| Factores de expresión tardíos (<i>late expression factors</i>) | <i>lef</i> |
| Metaloproteasa | <i>mpnase</i> |
| Proteínas derivadas de cuerpos de oclusión (<i>Occlusion derived virus proteins</i>) | <i>odv-e18</i> , <i>odv-e25</i> , <i>odv-e56</i> , <i>odv-e66</i> , <i>odv-ec27</i> |
| Proteínas del virión | <i>p12</i> , <i>p40</i> , <i>p45</i> , <i>p47</i> , <i>p6.9</i> , <i>p74</i> |
| Antígeno de proliferación nuclear (<i>proliferating cell nuclear antigen</i>) | <i>pcna</i> (<i>etl</i>) |
| <i>Per os</i> infection factor | <i>pif</i> (Ac22) |
| Proteína kinasa | <i>pk</i> |
| Polinucleótido kinasa | <i>pnk</i> |
| Polinucleótido ligasa | <i>pnl</i> |
| Poliedrina | <i>polh</i> |
| Proteína tirosina fosfatasa | <i>ptp</i> |
| Ribonucleótido reductasa, subunidades 1 y 2 | <i>rr1</i> , <i>rr2</i> |
| Superóxido dismutasa | <i>sod</i> |
| Ubiquitina | <i>ubi</i> |
| Viral enhancing factor | <i>vef</i> |
| Factor de expresión muy tardío (<i>Very late expression factor</i>) | <i>vlf-1</i> |
| Proteínas virales del virión (<i>Viral polyhedra protein</i>) | <i>vp1054</i> , <i>vp39</i> , <i>vp91/p95</i> |

Objetivos

Generales

- Caracterización molecular de EpapGV.
- Diseño de una metodología para detectar y cuantificar cuerpos de inclusión de EpapGV en mezclas completas.

Particulares

- Caracterización morfológica de los cuerpos de inclusión de EpapGV a partir de microscopía electrónica.
- Análisis de la proteína mayoritaria de EpapGV (granulina).
- Desarrollo de un ensayo de ELISA de captura para la detección y cuantificación de gránulos de EpapGV en mezclas complejas.
- Construcción de un mapa físico del genoma de EpapGV.
- Localización del gen de la granulina (proteína de inclusión) en el genoma viral, clonado y análisis de secuencia.
- Determinación de la presencia de genes inhibidores de apoptosis en el genoma de EpapGV y caracterización la secuencia de estos genes.
- Análisis de las secuencias parciales del genoma de EpapGV y caracterización de los marcos de lectura encontrados.
- Evaluación de la filogenia de los miembros del género *Granulovirus* y, en particular, de EpapGV.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Introducción

La introducción de esta tesis doctoral está dividida en dos partes, la primera tiene como propósito describir la importancia del cultivo de la soja en nuestro país y el complejo de plagas de dicho cultivo, en particular el "barrenador de los brotes" de la soja *Epinotia aporema* (*E. aporema*). Además, en esta parte, se presentan conceptos relacionados con el manejo integrado de plagas y las posibles alternativas de control de *E. aporema*. En la segunda parte se brinda un informe detallado de la Biología Molecular de los Baculovirus, comúnmente empleados como agentes de control biológico de plagas de lepidópteros.

El cultivo de la soja en Argentina y el complejo de plagas. Características de *E. aporema*

La soja (*Glycine max*)

Esta leguminosa de ciclo anual, posiblemente originaria del este de China, es ampliamente cultivada en el territorio de la República Argentina. Su altura puede variar de 0,6 a 1,5 m, posee grandes hojas trifoliadas, flores pequeñas de color blanco o violeta y sus vainas son cortas con una a cuatro semillas (Fig. 1.1 y 1.2). Estas son generalmente de color amarillo claro y casi esféricas (Fig. 1.3). Su madurez es alcanzada 100 a 150 días luego de su siembra, dependiendo de la variedad, de la ubicación geográfica y de las condiciones climáticas. En la etapa de madurez, las hojas se tornan amarillas, las vainas se secan y adquieren una coloración amarronada.

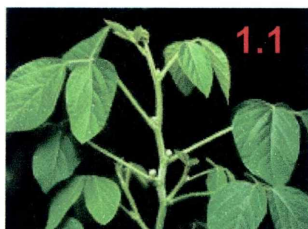


Figura 1.1. Planta de soja

Figura 1.2. Vainas de soja

Figura 1.3. Granos de soja.

Fuentes: Fig. 1.1 www.singenta.com,
Fig. 1.2 www.sdnottill.com y Fig. 1.3
<http://www.agroconnection.com.ar>.

La soja es utilizada como materia prima para elaborar alimentos ricos en proteínas y aceites. La proteína de soja es usada fundamentalmente para suplir alimentos balanceados destinados al ganado vacuno. Los subproductos obtenidos a partir del aceite son margarina y mayonesas, en tanto que el resto es usado en la elaboración de pinturas, barnices, linóleo y en fábricas de caucho.

Aspectos productivos de la soja

Durante los últimos 10 años el área sembrada con cultivo de soja se ha incrementado en un 100% (Tabla 1.1), mientras que la producción aumentó un 250% y continúa con expectativas de crecimiento. Casi el 90% de la producción de soja de Argentina se concentra en las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires (Fig. 1.4), que poseen los valores de rendimiento por hectárea más elevados a escala nacional.

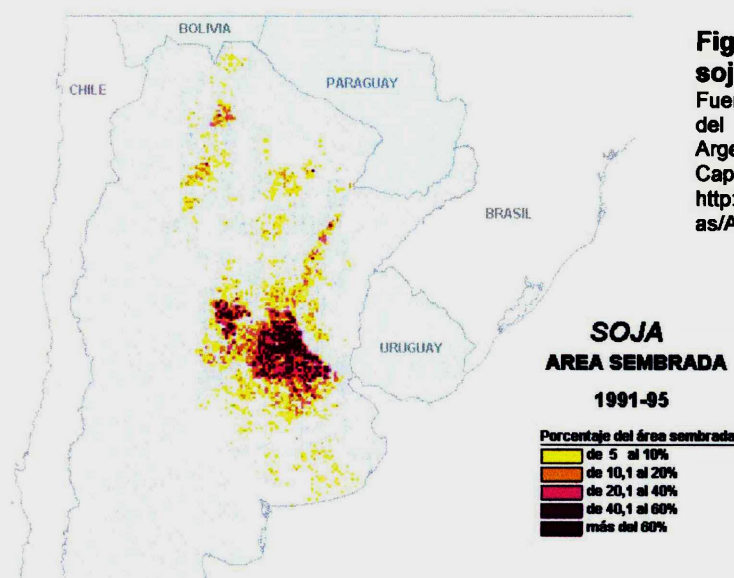


Figura 1.4. Área sembrada de soja en Argentina.

Fuente: Programa "Atlas Permanente del Desarrollo Territorial de la Argentina" Rivadavia 1823 9° (1033) Capital Federal. República Argentina. <http://www.conicet.gov.ar/webue/proatlas/ATLAS/agric/agricultura.htm>

Argentina es el tercer exportador mundial de soja, aunque el volumen exportado es mucho menor que el de EE.UU. y Brasil. La importancia de este cereal para la economía argentina es cada vez mayor. Nuestro país es, además, el mayor exportador de aceite y harina de soja a escala mundial. La soja es vendida principalmente a China, cuyo volumen de compra equivale al 68% de nuestras exportaciones, Tailandia junto con Indonesia absorben el 12% y el resto es vendido a otros mercados.

Del total de la producción sojera argentina, el 18% del grano se exporta sin procesar, el resto se industrializa para la producción de aceites (20%) y *pellets* (80%). Los aceites se exportan casi en su totalidad (96%), al igual que las harinas (85%).

El 47% del **aceite de soja**, es comprado por India, Irán y Bangla Desh, el resto es vendido a otros países del tercer mundo.

Con respecto a las ventas de **harina** a la UE, éstas representan el 60% de nuestra producción, y su destino principal es la elaboración de harinas para consumo animal. La exportación de **poroto de soja** se dirige a los países asiáticos (China, Tailandia, Taiwán y Japón) y a la Unión Europea, que constituye nuestro segundo comprador.

Tabla 1.1. Evolución de variables productivas del cultivo de soja en Argentina. Fuente: <http://www.elsitioagricola.com>.

| Períodos | Superficie sembrada (miles ha) | Rendimiento (kg/ha) | Producción (miles t) |
|----------------------|--------------------------------|---------------------|----------------------|
| 70/1-72/3 | 95,65 | 1.500 | 136,33 |
| 80/1-82/3 | 2.100,00 | 1.950 | 3.973,30 |
| 90/1-92/3 | 5.088,67 | 2.263 | 11.031,30 |
| 2000/01 | 10.300,00 | 2.530 | 25.500,00 |
| 2001/02 | 11.610,90 | 2.630 | 29.955,30 |
| 2002/03 ^a | 12.606,84 | 2.803 | 34.818,55 |

^a estimado según SAGPyA, Julio 2002.

Complejo de plagas de la soja

Un organismo se transforma en una plaga cuando su población se incrementa y a consecuencia de ello, provoca daños en los cultivos u ocasiona trastornos en la salud humana. El concepto de plaga es dinámico, y se define en función de factores tanto económicos como sociales. El concepto de plaga no necesariamente se limita a insectos, dado que se incluyen en él a roedores, nemátodos y a cualquier tipo de planta o animal que cumpla con el requisito mencionado anteriormente.

El incremento en la densidad de un organismo hasta niveles en los que se considera una plaga puede variar en el tiempo y de una región a otra. Para algunos insectos, los sistemas de monocultivo favorecen a los insectos plaga, debido al aumento de alimento disponible, a la baja proporción de enemigos naturales y al incremento en la humedad relativa ambiente (HRA), lo que provoca una mayor oviposición dando lugar, por lo tanto, a un incremento en la población de la plaga.

Las plagas principales de la soja pueden ser agrupadas en las categorías de orugas desfoliadoras, barrenadores de brotes y chinches. Entre las **orugas desfoliadoras** encontramos a la oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatalis*), la isoca medidora u oruga medidora (*Rachiplusia nu*) y la oruga militar tardía u oruga cogollera (*Spodoptera frugiperda*). Con respecto a los barrenadores, si bien la mayoría de los

daños son causados por el barrenador de los brotes (*Epinotia aporema*), el barrenador menor del maíz (*Elasmopalpus lignosellus*) ha ocasionado daños de relevancia en soja en las campañas 1988/89 y 1995/96 (Aragón *et al.*, 1998). Las **chinches** constituyen una de las plagas más importantes de la soja a escala mundial; entre ellas se destacan la chinche verde común (*Nezara viridula*) y la chinche de la alfalfa (*Piezodorus juildinii*), que presentan un alto potencial reproductivo. Otras especies de importancia, pero más localizadas o esporádicas, son el alquiche chico (*Edessa meditabunda*) y la chinche marrón (*Dichelops furcatus*) (Aragón *et al.*, 1998). Los **hongos** *Diaporthe phaseolorum* y *Sclerotinia sclerotiorum* también son plagas de la soja (COSAVE, comité sanitario del Cono Sur, <http://www.bdt.fat.org.br/biocontrol/cosave/std0403a>).

Descripción, reconocimiento y bioecología del barrenador de los brotes de la soja *Epinotia aporema* (*E. aporema*)

En nuestro país, *Epinotia aporema* Wals. (*Lepidoptera: Tortricidae*) ocasiona graves problemas a los productores de soja (Fig. 1.5). Las mermas de la producción en Argentina pueden llegar hasta el 50% o el 60%, dependiendo del grado de infestación (Iañone *et al.*, 1987). *E. aporema* está distribuido en todas las regiones argentinas en donde hay cultivos de soja, así como en Brasil y Uruguay. El barrenador de los brotes ataca no sólo a cultivos de soja, sino también a alfalfa, trébol, trébol rojo, poroto, haba, lenteja, garbanzo y maní.



Figura 1.5. *Epinotia aporema* en sus distintos estadios. 1: 1^{er} estadio larval, 2: 2^o estadio, 3: 3^{er} estadio, 4: 4^o estadio, 5: pupa, 6: adulto emergiendo, 7: adulto.
Fuente: Aragón *et al.* (1998).

Este lepidóptero en su estado larvario se distingue por su color blanco verdoso o cremoso y por su cabeza de color negro, características que se conservan hasta el tercer estadio (Fig. 1.5). Posteriormente, el color de la larva va mudando a rosado y la cabeza a color marrón caramelo hacia los últimos estadios, en los cuales alcanza su máximo desarrollo (10-12 mm), todo este proceso demora de 18 a 25 días. Posteriormente, la larva pasa al estadio pupa en el que permanece por 9 a 13 días. Ya

en estado adulto, *E. aporema* es una pequeña polilla de color marrón oscuro, con áreas plateadas a lo largo de la parte posterior de las alas anteriores.

El modo de ataque de *E. aporema* en la soja

En estado larvario, *E. aporema* teje hilos sedosos alrededor de los brotes (*folíolos*) impidiendo el normal desarrollo de los mismos. El conjunto de brotes unidos por los hilos no sólo le sirve de refugio a la larva, sino que facilita su alimentación. La parte atacada se va secando progresivamente. Si *E. aporema* infesta a una planta cuando las vainas son grandes, la larva las une y excava galerías entre las mismas para alimentarse, pudiendo salir de su refugio para atacar otros brotes. En condiciones de sequía el barrenador puede taladrar los tallos haciendo galerías (Fig. 1.6), en esta etapa la eficiencia del control químico es casi nula.

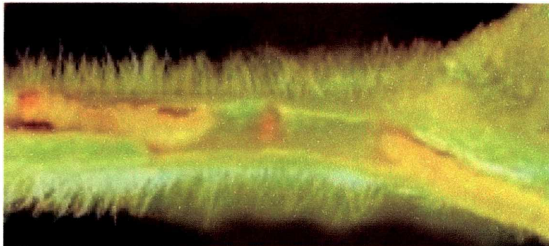


Figura 1.6. Tallo atacado por *E. aporema*. Fuente Clarín rural: <http://www.viarural.com.ar>. La fotografía original es de Agrevo SA.

En estadios posteriores el barrenador sale de los tallos para empupar, evento que se produce sobre las hojas. Las hembras adultas fértiles oviponen en los brotes tiernos en donde la infección comienza nuevamente. La planta infestada sufre severos daños dado que el ataque se produce en el brote, donde el crecimiento de la planta es más activo, y según el grado de ataque el crecimiento de la planta se detiene o enlentece.

Ciclo vital y época de ataque de *E. aporema*

En la zona sojera por excelencia, la pampa húmeda, las infestaciones de *E. aporema* pueden ocurrir durante todo el ciclo del cultivo de soja, entre mediados de diciembre hasta abril.

De acuerdo con la época de siembra los cultivos de soja pueden dividirse en dos tipos: **cultivos de primera época** (sembrados entre el 15 de octubre y el 15 de noviembre) y **de segunda época** (sembrados entre el inicio y mediados de diciembre). Además, de acuerdo con las características del crecimiento de la planta se distinguen dos **etapas**

en la soja, **estado vegetativo y estado reproductivo**. El segundo estado se distingue del primero por la presencia de flores y vainas.

Los ataques que se producen en **enero y febrero**, dañan los cultivos de primera época cuando las plantas están en **estado vegetativo**. En esta etapa la soja tiene un notable poder de recuperación frente al daño ocasionado por esta plaga. Sin embargo, cuando el ataque se produce en la época de floración (**estado reproductivo**), los tallos tienen escasa capacidad de ser sustituidas por otros nuevos y la producción de frutos se ve reducida agravando los problemas en los rindes.

Con respecto a los cultivos de **segunda época**, la mayor infestación se produce entre los meses de **marzo y abril**, y los daños ocasionados son mayores debido a que se trata de variedades de soja de **ciclo más corto**. Estas variedades se desarrollan más rápidamente; por eso en caso de un ataque, su capacidad de recuperación es menor dado que las plantas llegarán a la etapa de floración con un alto nivel de daño. En cambio, las plantas de **ciclo largo** se desarrollan lentamente y, en caso de ser atacadas, tienen más tiempo para recuperarse de los daños sufridos. En estos cultivos el aumento de la fotosíntesis de las hojas inferiores y la aparición de nuevas hojas permiten la tolerancia al daño sin reducción significativa de los rendimientos (Aragón *et al.*, 1998).

La última generación de la plaga se desarrolla en alfalfa durante los meses de mayo a junio, período en el que se registran altas tasas de mortalidad de *E. aporema*, cuya población se reduce hacia el final del invierno. Este hecho puede correlacionarse con el bajo nivel de daño (o ataque) presentado en los cultivos en primavera.

Manejo integrado de plagas

En 1966, un comité de expertos de la FAO definió al manejo integrado de plagas (MIP) como el sistema de manejo que, teniendo en cuenta el ambiente y la dinámica de la plaga, utiliza todos los medios apropiados disponibles (técnicas de cultivo, control biológico, genético, químico, etc.) en forma compatible entre sí, para mantener las poblaciones de las plagas por debajo de niveles tales que no ocasionen daños significativos (Aragón *et al.*, 1998). El **umbral de daño económico (UDE)**, una herramienta crítica dentro del MIP, indica el tiempo oportuno para decidir una acción de prevención. Así el umbral de daño económico se define como la densidad a la cual deben iniciarse las medidas de control, con el fin de evitar el incremento de población de la plaga que alcance el nivel de daño económico (Stern *et al.*, 1959). La estrategia

global del MIP consiste en maximizar la acción de los factores de mortalidad natural y minimizar el uso de biocidas de origen químico y parte de la base que los cultivos pueden ser dañados hasta ciertos niveles sin sufrir pérdidas significativas (Aragón *et al.*, 1998). Los elementos del MIP incluyen la prevención de plagas, el monitoreo de la presencia de plagas y de daños causados por ellas y el establecimiento del umbral de daño económico para ciertas plagas. El tratamiento de los problemas causados por las plagas para reducir sus poblaciones por debajo del umbral de daño puede utilizar estrategias de control biológicos o manejos agrícolas que impliquen un cambio en el ambiente haciéndolo desfavorable a la plaga. El MIP no ignora al control químico, sino que lo considera una herramienta más de carácter complementario. Las prácticas del MIP deben tener en cuenta la salud humana, el impacto ecológico, la factibilidad, la relación costo/beneficio y la evaluación de los métodos de control.

Control biológico

El control biológico, uno de los elementos clave del manejo integrado de plagas, se define como la acción de enemigos naturales sobre la población de una plaga, lo que provoca una posición general de equilibrio (PGE) más baja que la correspondiente en ausencia del enemigo natural, en una determinada región. Por PGE se entiende la densidad media de población de una plaga a lo largo del tiempo sin la intervención del hombre. Con respecto al nivel de daño económico, el mismo puede estar por debajo o por encima de la PGE.

Entre los agentes comúnmente utilizados para el control biológico de plagas podemos mencionar: parasitoides, predadores, patógenos (protozoos, nematodos, hongos, bacterias y virus).

En particular, para que un patógeno sea efectivo como agente de control microbiano de plagas debe reunir algunas características deseables:

- Alta virulencia.
- Inocuidad a otras formas de vida, incluidos insectos benéficos, vertebrados y plantas.
- Ausencia de residuos tóxicos.
- Acción rápida, causando la muerte del insecto o la interrupción de su alimentación.
- Larga permanencia a campo.
- Producción fácil y económica, sin pérdida de la viabilidad o virulencia durante el almacenado.

Ventajas y desventajas del control microbiano

Los agentes de control biológico de plagas en su conjunto, poseen numerosas ventajas con respecto a los agentes de control químico. Algunos tienen la capacidad de ser dispersados mediante una transmisión generacional (transmisión vertical madre-hijo). Otros agentes no sólo afectan a la plaga provocando su muerte sino que, además, antes de que ese fenómeno ocurra, pueden alterar el ciclo vital de la plaga (por ejemplo, inhibiendo la alimentación o inhibiendo la muda) y facilitar el ataque por predadores o por otros patógenos. Muchos agentes, entre ellos gran variedad de hongos entomopatógenos, colonizan el ambiente por un período prolongado, evitando la necesidad de aplicaciones reiteradas del agente de control. Además, la aplicación de ciertos organismos puede realizarse en forma combinada con otros agentes de control, por ejemplo hongos con virus, o agentes de control biológico con insecticidas químicos.

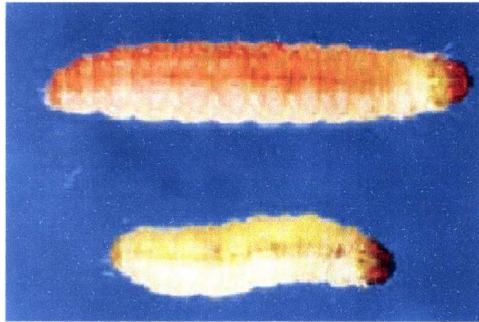
En general, los niveles de toxicidad de los agentes de control biológico para el ser humano, son nulos al igual que para los insectos que no son el blanco del insecticida. Los organismos utilizados en el control biológico normalmente no presentan grandes problemas de desarrollo de resistencia por parte de la plaga y su producción es altamente factible en países no desarrollados. En esa línea se ubica la producción del baculovirus de *Anticarsia gemmatalis* usado en el tratamiento de más de un millón de hectáreas de cultivo de soja en el sur del Brasil (Moscardi, 1999).

Entre las desventajas de los agentes de control biológico se encuentran su sensibilidad a las condiciones climáticas, la pérdida de patogenicidad con el tiempo y la imposibilidad de emplearlos efectivamente durante todo el ciclo de vida de la plaga.

Control biológico de *E. aporema*

E. aporema es una de las plagas más problemáticas de la soja y los niveles de los daños han sufrido un marcado incremento en los últimos años originado por varios factores. Uno de ellos, está relacionado con la dificultad de controlar la plaga a causa de sus hábitos barrenadores, dado que cuando ésta se encuentra en el tallo, la eficiencia de los insecticidas químicos es baja debido a la poca accesibilidad de estos. El segundo factor se relaciona con la importante variedad de cultivos alternativos, de los cuales este insecto se sirve de fuente de alimento (soja, poroto, lenteja, garbanzo, haba, maní, alfalfa y trébol rojo). Por último, y no menos importante, se destaca la ausencia casi total de parasitoides que contribuyan a su control.

El estudio de la dinámica de poblaciones de *E. aporema* y el análisis de la mortalidad causada por agentes naturales, permitió detectar un agente principal causante de epizootias esporádicas (Fig. 1.7). Caracterizaciones preliminares basadas en la sintomatología de larvas infectadas (Díaz & Díez, 1989) y en microscopías de contraste de fase de cuerpos de inclusión (Ripa, 1982) indican que este patógeno sería un granulovirus.



A **Figura 1.7. Infección por EpapGV sobre *E. aporema*.** Larva de *E. aporema* sana (A) e infectada con EpapGV (B). Extraído de Sciocco-Cap *et al.* (2001).

B

Recientemente, la identidad de este patógeno fue confirmada en base a estudios bioquímicos y morfológicos (Sciocco-Cap *et al.*, 2001). El mismo fue denominado **virus de la granulosis de *Epinotia aporema* (EpapGV)**, en función del nombre del organismo a partir del cual fue aislado. Este virus pertenece al género *Granulovirus* dentro de la familia *Baculoviridae*. Junto con el hongo *Entomophthora radicans*, EpapGV es un agente de control biológico potencial de *E. aporema* (COSAVE, <http://www.bdt.fat.org.br/biocontrol/cosave/td0403a>).

Biología molecular de los baculovirus, estado actual del conocimiento

Clasificación y descripción general

La descripción de patologías de insectos es sumamente antigua, en manuscritos chinos se detallan infecciones sufridas por los gusanos de seda, que podrían ser atribuidos a los baculovirus. Registros más recientes datan de un poema escrito por un obispo italiano, Marco Vida de Cremona, en el siglo XVI el siglo XVI y hacen referencia a las la enfermedad de los gusanos de seda "*wilting disease*" (Benz, 1986). En los

inicios del siglo veinte, esta enfermedad fue atribuida a infecciones virales y en 1947 se describieron viriones en forma de bastón, los cuales ahora son característicos de la familia *Baculoviridae* (Miller L. K., 1996). Hasta la actualidad fueron descritos, por lo menos, 1.100 virus que infectan a invertebrados en su mayoría insectos. Estos virus se han clasificado en 15 familias diferentes (Blissard *et al.*, 2000). En la mayoría de los casos, sólo se posee un conocimiento rudimentario sobre como estas enfermedades son transmitidas, el rol que estos virus cumplen en la dinámica de las poblaciones de insectos, los detalles moleculares de la infección viral o como estos virus se han originado y evolucionado.

Quizás la más estudiada de estas familias de virus, es *Baculoviridae* que comprende un gran número de miembros que infectan artrópodos, mayormente insectos del orden *Lepidoptera* (*Phylum*, Artropoda, Clase Insecta). Los viriones maduros, ensamblados en la fase tardía de la infección, están rodeados de una matriz proteica para-cristalina (Fig. 1.8). Esta estructura es conocida como cuerpos de oclusión (OB) y está compuesta mayoritariamente por una única proteína (poliedrina o granulina). Los OBs contienen en su interior nucleocápsides con forma de bastón de 40 x 200-400 nm (Tweeten *et al.*, 1980). Las nucleocápsides se encuentran envueltas, a su vez, por una membrana lipídica que contiene proteínas codificadas por el virus; esta estructura recibe el nombre de virión. El genoma viral, contenido en las nucleocápsides, es de DNA doble hebra circular y cerrado, con tamaños que varían entre los 81,7 kpb y los 179,0 kpb. La morfología y el tamaño de las inclusiones de los baculovirus han sido usados para dividir a la familia *Baculoviridae* en dos géneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) y *Granulovirus* (GV).

Los NPVs poseen OBs de gran tamaño (1 a 15 μm), su morfología exhibe cierta regularidad, siendo mayoritariamente poliédrica y la proteína que compone la matriz proteica se llama poliedrina. Los virus de este género infectan insectos del orden *Lepidoptera*, *Himenoptera* (por ejemplo abejas y avispas) y *Diptera* (mosquitos). Los *Nucleopolyhedrovirus* pueden presentar una o más nucleocápsides por virión y de acuerdo a esto pueden subdividirse en dos tipos: nucleocápside múltiple (MNPV) y nucleocápside simple (SNPV). De acuerdo con las evidencias actuales no existe un correlato filogenético para este carácter. Sin embargo, según análisis filogenéticos basados en alineamientos de proteínas, los NPVs han sido subdivididos en dos grupos. Más adelante, en este capítulo se aclara sobre esta división.

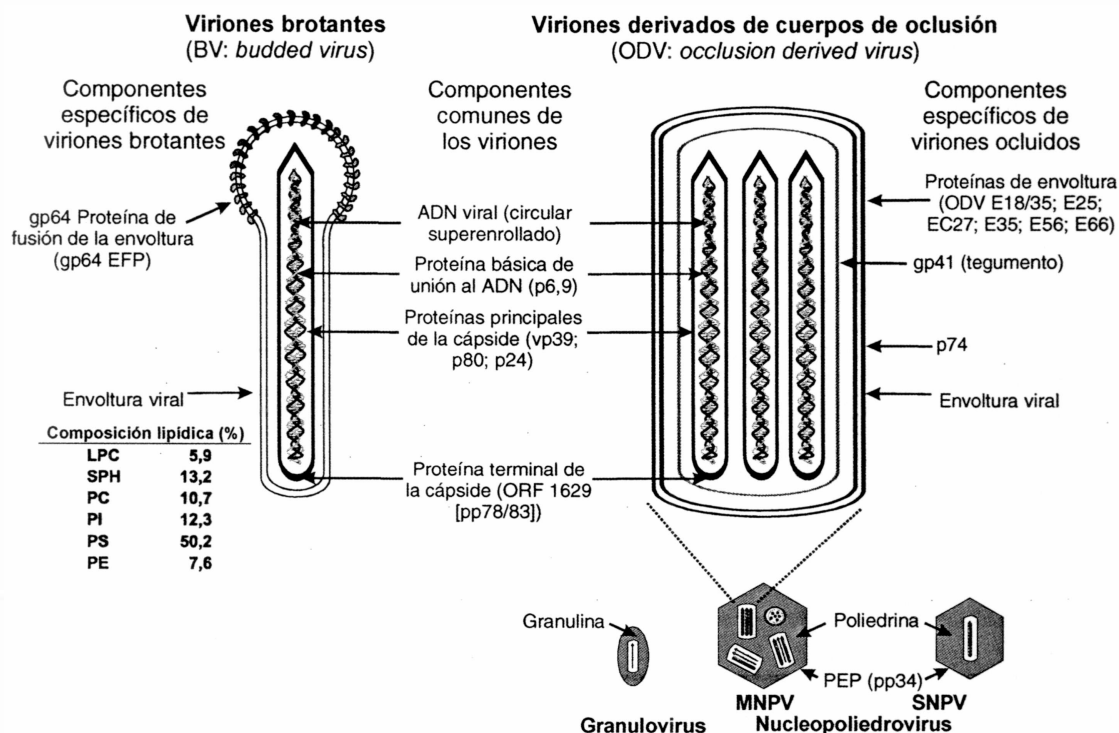


Figura 1.8. Componentes estructurales básicos de los dos fenotipos virales. Se representan en forma esquemática las estructuras de los viriones brotantes (BV: *budded virus*) y los viriones derivados de cuerpos de inclusión (ODV, *occlusion derived virus*). Figura cedida gentilmente por el Dr. Daniel Ghiringhelli.

Los OBs del género *Granulovirus*, son ovoides y de menor tamaño que los cuerpos de inclusión de los NPVs (0,15-0,30 μm x 0,30-0,50 μm), poseen sólo una única partícula viral por OB y la proteína que forma la matriz paracristalina es en un 95% granulina (Bergold, 1964). Además, su rango de huéspedes está restringido a lepidópteros y los OBs se detectan en las células infectadas que ya han perdido la integridad de la membrana nuclear (Federici, 1986).

En cuanto a sus usos y aplicaciones, los baculovirus son empleados como agentes de control biológico de plagas (Moscardi, 1999), como vectores de expresión de proteínas recombinantes en células de insectos (Kost & Condreay, 1999), en protocolos experimentales de terapia génica (Kost & Condreay, 2002) y como vectores de vacunas (Tami *et al.*, 2000).

Debido a que la mayor parte del conocimiento de los baculovirus proviene del análisis molecular de los NPVs, los ejemplos que se abordarán en este capítulo son mayoritariamente de este género. El estudio de los GVs se ha visto retrasado debido a que resulta muy dificultoso establecer líneas celulares que soporten la replicación de estos virus.

Características generales de los genomas de baculovirus

La determinación de la secuencia completa de 18 genomas de baculovirus, incluyendo un baculovirus que infecta a un díptero (CuniNPV), ha brindado un gran cúmulo de información de secuencia (Tabla 1.2). Los genomas de los baculovirus son grandes, sólo comparables a los genomas de los *Entomopoxvirus* y de los *Adenovirus*; sin embargo la mayoría de los mismos presentan valores en el rango de 118 kpb a 139 kpb. El número de marcos de lectura abiertos (ORFs) en estos genomas varía de 108 a 169 y, en general, la distancia que separa a los mismos es pequeña, entre uno a 200 nucleótidos. Los ORFs no están agrupados de acuerdo a su función ni a su patrón de expresión génica y las superposiciones entre ellos son poco frecuentes. Los genes de los baculovirus, en general, tienen secuencias promotoras y terminadoras de la transcripción con entornos ricos en AT. Aparentemente, los baculovirus usan la maquinaria celular de procesamiento 3', la cual generalmente requiere señales AAUAAA. Muchas veces, esta señal se encuentra solapada con uno de los codones de finalización (UAA). Los eventos de *splicing* parecen ser excepcionales en estos virus, habiéndose determinado sólo un producto génico por *splicing* del producto de transcripción del gen *ie-1* (*ie-0*) que posee 54 aminoácidos extras en el extremo aminoterminal (Chisholm & Henner, 1988; Kovacs *et al.*, 1991).

A pesar del alto número de genes de los baculovirus, sólo algunos de ellos se encuentran en más de una copia (Tabla 1.3), en algunos virus (AcMNPV y BmNPV) el porcentaje de genes repetidos representa el 4% y el 9% del genoma, mientras que para los genomas más grandes, como los de LdMNPV y XcGV llegan al 32% y 30%, respectivamente. Entre los genes repetidos se destacan los genes *bro*, quienes podrían estar involucrados en eventos de recombinación homóloga (López Ferber *et al.*, 2001). La mayoría de los genomas posee regiones repetidas dispersas en el genoma, llamadas regiones homólogas (*hrs*, *homologous regions*). Una secuencia *hr* de NPVs está formada por repeticiones de 60-80 pb, centradas alrededor de un palíndromo imperfecto de unos 28 pares de bases. El número de estas secuencias repetidas de 60-80 pb es variable en los distintos genomas y las mismas están separadas entre sí por secuencias espaciadoras de 50-115 pares de bases. Se cree que las secuencias *hrs* funcionan como orígenes de replicación (*ori*) y como *enhancers* de la transcripción temprana (Cochran & Faulkner, 1983; Guarino & Summers, 1986, Kool *et al.*, 1995; Theilmann & Stewart, 1992; Xie *et al.*, 1995).

Tabla 1.2. Genomas secuenciados y sus características principales.

| Virus | Genoma (pb) | % GC | ORFs | Nº de hrs | Referencias | Nº de genes bro | Número de acceso |
|--------------|-------------|------|------|--------------|----------------------------------|-----------------|------------------|
| XcGV | 178.733 | 41 | 181 | 9 | Hayakawa <i>et al.</i> , 1999 | 7 | AF162221 |
| LdMNPV | 161.046 | 58 | 166 | 13 | Kuzio <i>et al.</i> , 1999 | 16 | AF081810 |
| MacoNPV-90/2 | 155.060 | 41,7 | 169 | 4 | Li, Q. <i>et al.</i> , 2002 | 8 | AF467808 |
| MacoNPV-96B | 154.481 | 40 | 168 | 4 | Li, L. <i>et al.</i> , 2002 | 8 | NC_003529 |
| SplitMNPV | 139.342 | 42,7 | 141 | 17 | Pang <i>et al.</i> , 2001 | 2 | AF325155 |
| SeMNPV | 135.611 | 44 | 139 | 4 | IJkel <i>et al.</i> , 1999 | - | AF169823 |
| AcMNPV | 133.894 | 41 | 155 | 9 | Ayres <i>et al.</i> , 1994 | 1 | L22858 |
| OpMNPV | 131.990 | 55 | 152 | 5 | Ahrens <i>et al.</i> , 1997 | 3 | U75930 |
| RouNPV | 131.526 | 39 | 146 | 9 | Bonning & Harrison, 2002 | - | NC_004323 |
| HaSNPV G4 | 131.403 | 39 | 135 | 5 | Chen <i>et al.</i> , 2001 | 3 | AF271059 |
| HZSNPV | 130.869 | 39,1 | 139 | 5 | Chen <i>et al.</i> , 2002 | 3 | AF334030 |
| HaSNPV | 130.760 | 38,8 | 134 | 5 | Zhang, C. & Wu, J. | 1 | NC_003094 |
| BmNPV | 128.413 | 40 | 143 | 7 | Gomi <i>et al.</i> , 1999 | 5 | L33180 |
| CpGV | 123.500 | 45 | 143 | ^a | Luque <i>et al.</i> , 2001 | 1 | AF53466 |
| PhopGV | 119.217 | 130 | 130 | ^a | Croizier L. <i>et al.</i> , 2002 | 1 | AF499596 |
| EppoMNPV | 118.584 | 41 | 136 | 5 | Hyink <i>et al.</i> , 2002 | 1 (truncado) | AY043265 |
| CuniNPV | 108.252 | 50,9 | 108 | 4 | Afonso <i>et al.</i> , 2001 | 6 | AF403738 |
| PxGV | 100.999 | 40 | 120 | 4 | Hashimoto <i>et al.</i> , 2000 | - | AF270937 |

^a Los genomas de CpGV y PhopGV no contienen secuencias identificables como hrs.

Abreviaturas: NPVs grupo I: *Autographa californica* MNPV (AcMNPV), *Bombyx mori* MPV (BmNPV), *Choristoneura fumiferana* MNPV (CIMNPV), *Epiphyas postvittana* NPV (EppoNPV), *Orgyia pseudotsugata* MPNV (OpMNPV), *Rachiplusia ou* MNPV (RouNPV). NPVs grupo II: *Helicoverpa armigera* NPV (HearSNPV o HaSNPV), *Helicoverpa zea* SNP (HzSNPV), *Mamestra configurata* NPV (MacoNPV), *Spodoptera exigua* MNPV (SeNPV), *Spodoptera littoralis* NPV (SpliNPV), *Lymantria dispar* LdMNPV (LdMNPV). GV: *Adoxophyes orana* GV (AoGV), *Cydia pomonella* GV (CpGV), *Plutella xylostella* GV (PxGV), *Xestia c-nigrum* GV (XcGV), *Phthorimaea operculella* GV (PhopGV). Baculovirus de dípteros: *Culex Nigripalpus* NPV (CuniNPV).

Tabla 1.3. Genes repetidos de distintos baculovirus. Se indican las abreviaturas de los genes repetidos y entre paréntesis sus números para cada genoma. Las abreviaturas de los genes se indican en la sección de glosario.

| Virus | Genes repetidos |
|--------------|---|
| AcMNPV | Ac145/150 (145, 150) |
| BmNPV | Ac145/150 (121, 126) bro (22, 80, 81, 131, 132) |
| OpMNPV | Ac145/150 (68,96,134) bro (67, 68, 116) cfl (30, 136) ptp (9, 10) |
| SeMNPV | Ac145/150 (68, 96, 134) odv-e66 (54, 114) p26 (87, 129) |
| LdMNPV | Ac145/150 (17, 30) dbp (37, 47) vef (65, 160), bro (32, 33, 71, 72, 73, 74, 75, 112, 113, 114, 115, 146, 150, 153, 154, 161) cfl (66, 149) Ld151/162 (151, 162) Ld34/163 (34, 163) m (120, 147) |
| HaSNPV | bro (59, 60, 105) |
| HZNPV | bro (60, 61, 108) |
| SplitNPV | bro (120, 125) |
| MacoNPV-90/2 | bro (24,31, 75, 90,122, 123, 127) odv-e66 (78, 144) p26 (109, 158) |
| MacoNPV-96B | bro (20, 58, 74, 89, 121, 122, 126) odv-e66 (77, 143) p26 (108, 157) |
| PxGV | Ac145/150 (12, 59, 68) p10 (2, 21, 50) CpGV 16L (20, 23) fgf (56, 104) |
| XcGV | Ac145/150 (11, 20, 87, 105) p10 (5, 19, 83) vef (150, 152, 154, 166) bro (60, 62, 76, 109, 114, 130, 131, 159) xcrep1 (22, 61, 73, 155, 161) xcrep2 (59,138) CpGV 16L (17, 18) fgf (85, 144) |
| CpGV | 16l (20, 23) ptp (66, 98) fgf (76, 126) |
| PhopGV | 16l (20, 23) fgf (69, 116) |
| CuniNPV | bro (1, 4, 5, 95, 108, 109) |

Fenotipos virales

Una de las principales características de los baculovirus es la producción de dos fenotipos virales que se generan en momentos diferentes del ciclo de infección (Fig. 1.9), uno llamado virión brotante (BV, *budded virions*) y el otro virus ocluido u ocluded

virus (OV, u OB, cuerpo de inclusión). Cada uno de estos fenotipos desempeña una función diferente. En etapas tempranas de la infección se producen los viriones brotantes, estos consisten en nucleocápsides que emergen de la membrana plasmática de la célula y cuyo objetivo es propagar rápidamente la infección a las células circundantes. El segundo fenotipo OV, es producido en etapas tardías y muy tardías de la infección y está conformado por viriones recubiertos por una gran matriz cristalina. Al momento de la muerte del insecto los OVs u OBs son liberados al ambiente y, gracias a la matriz que los recubre, pueden permanecer por largo tiempo hasta ser ingeridos por otro insecto y así comenzar nuevamente otro ciclo de infección.

En las secciones siguientes describiremos aspectos destacados de la estructura y biología de los distintos fenotipos de los baculovirus. Se expondrán además características destacadas de las proteínas más estudiadas y de aquellas cuyas funciones adquieren relevancia en el entendimiento de la dinámica de infección.

Cuerpos de inclusión (*Occlusion bodies*, OBs)

Tal como se ha mencionado anteriormente, las poliedrinas/granulinas (*polh/gran*) son las proteínas mayoritarias de los OBs, sus pesos moleculares van desde los 25 kDa hasta los 31 kDa (Summers & Smith, 1978) y están entre las más conservadas de los baculovirus. Estas proteínas son expresadas en estadios muy tardíos de la infección, llegando a representar hasta el 50% de las proteínas totales de células en cultivo (Smith *et al.*, 1983). Los genes que codifican para *polh/gran* no son esenciales cuando los baculovirus se replican en cultivos celulares, pero poseen una importancia vital en infecciones naturales a campo. La cubierta de *polh/gran* asegura la persistencia del material genético, protegiendo al virión de la desecación y de los rayos UV. El OB está rodeado por una cubierta externa llamada *Calyx* o envoltura del poliedro (PE, *polyhedron envelope*), formada principalmente de carbohidratos (Minion *et al.*, 1979) asociados a una proteína de 34 kDa de peso, llamada *pp34/Calyx* (Whitt & Maning, 1988). Otra proteína presente en los OBs, la Enhancina o VEF, puede representar hasta el 5% de las proteínas del OB de *Trichoplusia ni* GV (TnGV) (Hashimoto *et al.*, 1991). Las enhancinas fueron primero identificadas en TnGV y son metaloproteasas que facilitan la infección en los baculovirus degradando la membrana peritrófica (MP) en el intestino medio de los insectos infectados (Hashimoto *et al.*, 1991; Derksen & Granados, 1988; Lepore *et al.*, 1996). La MP recubre el intestino de los insectos, protegiendo a las células del epitelio intestinal de la acción de puntas y/o púas que

contuviera el material en digestión. VFF facilita el proceso de infección, ya que degrada el componente mayoritario de la MP, una mucina generando huecos transitorios a través de los cuales los viriones llegan a las células del epitelio intestinal y se adhieren al mismo (Wang & Granados 1997). También se ha demostrado la presencia de una proteasa alcalina en el OB. Esta proteína se activa a pH altos y degrada a la proteína mayoritaria del OB, favoreciendo así la liberación de los viriones. Maruniak *et al.* (1979), demostraron que esta proteína es un contaminante que adquieren los OBs durante su formación en el interior de la larva, proviniendo probablemente del intestino de las mismas.

El proceso de infección comienza cuando una larva de un insecto ingiere OBs, una vez en el intestino la proteína mayoritaria se despliega principalmente por la acción del pH alcalino del intestino medio, liberando los llamados virus derivados de cuerpos de inclusión (ODV, *occlusion derived virions*) (Day *et al.*, 1953). Un ODV está formado por nucleocápsides (NCs) envueltas por una membrana lipoproteica (Fig. 1.8). La NC posee varias proteínas asociadas a ella, P6.9, VP39 (la proteína mayoritaria), VP1054 y VP91, P87, P24, ORF1629 (P78/83), PTP y PK (Fig. 1.8). Las NCs están formadas por un *core* nucleoproteico rodeado por una estructura proteica de forma baciliforme, llamada cápside. La cápside contiene unidades en forma de anillos apilados sobre el eje longitudinal. Dentro de la cápside, se encuentra un *core* nucleoproteico compuesto por DNA asociado a una proteína básica de 6,9 kDa (P6.9). La proteína P6.9 posee numerosos residuos de arginina y tirosina espaciados regularmente y se ha postulado que estos residuos se intercalarían entre los enlaces fosfodiéster del DNA estabilizándolos. A ambos extremos de la cápside se localiza una proteína de 78 kDa que en su forma fosforilada tiene un peso de 83 kDa (P78/83). Esta proteína ha sido involucrada en la interacción con el complejo del poro nuclear (Pham & Sivasubramanian, 1992; Posse *et al.*, 1991; Vialard & Richardson, 1993). Además, en las NCs se ha detectado la presencia de dos proteínas que podrían estar involucradas en el desenvolvimiento del virión, una proteína tirosina fosfatasa (PTP) y una proteína quinasa (PK).

En el ODV, las nucleocápsides se encuentran recubiertas por una membrana lipoproteica, también conocida como envoltura. Esta membrana posee una estructura típica de bicapa y media la entrada de los viriones a la célula por fusión de membranas. La envoltura presenta un elevado número de proteínas, las más relevantes son aquellas conservadas en todos los baculovirus: ODV-E18, ODV-E25, ODVP-6E (u ODV-E56), ODVE-66, ODV-EC27 y, posiblemente P74.

La proteína P74 está localizada sólo en los ODVs y su delección conduce a la pérdida de infectividad por vía oral. Faulkner *et al.* (1997) han demostrado que P74 tendría un rol esencial al iniciar la infección, probablemente al interactuar con la superficie del epitelio del intestino medio de los insectos. Entre la envoltura del virión y la cápside se ha observado por ME una región llamada tegumento, en donde parecería ubicarse la glicoproteína GP41, cuyo rol no ha sido determinado aún (Whitford & Faulkner, 1992).

Viriones brotantes (BV o VB)

Los BVs contienen una sola nucleocápside envuelta en una membrana, que proviene de la brotación de la membrana plasmática de la célula infectada. En uno de los extremos del virión brotante se encuentran estructuras en forma de protuberancias llamadas peplómeros (Fig. 1.8). En AcMNPV y en otros NPVs del grupo I estas estructuras están formadas por trímeros de proteína GP64, que está involucrada en la entrada de los viriones brotantes a través de la endocitosis mediada por receptor (Volkman & Goldsmith, 1985; Wickham *et al.*, 1990). Sin embargo, los NPVs del grupo II carecen de GP64, y en estos virus la proteína *efp* [*envelope fusion protein*, o proteína de fusión, homóloga al ORF de LDMNPV 130 (Ld130)] es capaz de disparar el proceso de fusión (Ijkel *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2000), cumpliendo un rol homólogo a GP64. En los granulovirus, recientemente se ha caracterizado una proteína homóloga a Ld130 que promueve la fusión a pH bajo (esta tesis, Goldberg *et al.*, 2002a)

Ciclo de infección

La multiplicación de los baculovirus en larvas de insectos se divide en dos etapas: infección primaria y secundaria. La infección primaria comprende la infección inicial de las células del intestino medio y la secundaria, la subsiguiente infección de otros tejidos (Fig. 1.9). En ambas etapas, la infección es iniciada por la unión del virus a la célula blanco. Cabe destacar que múltiples aspectos de ambas infecciones presentan diferentes características, las que serán descriptas a continuación.

Entrada de los ODV e infección primaria

Para los lepidópteros en general las infecciones con baculovirus se adquieren mediante la ingestión de material contaminado con cuerpos de inclusión. Estos son

transportados hasta el intestino medio, una vez ahí la proteína de inclusión se degradará (Day *et al.*, 1953), en parte, debido a la acción del pH y, en parte, debido a la acción de proteasas. Estos factores actuarán de forma cooperativa provocando la liberación de los ODVs. Los ODVs atraviesan la membrana peritónica y entran al interior de las células epiteliales por fusión de la membrana viral con la membrana plasmática (Granados, 1978; Horton & Burand, 1993). Una vez adentro de la célula las NCs son transportadas al núcleo, probablemente a través de la red de microfilamentos de actina, donde liberan el DNA. De acuerdo a un conjunto de evidencias experimentales Funk & Consigli (1993), han postulado que el desnudamiento del DNA se inicia cuando el Zn^{+2} (que se encuentra asociado a las nucleocápsides) es quelado. De esta manera, una quinasa presente en la nucleocápside se activaría, y la proteína P6.9 sería fosforilada, aumentando así su carga negativa. Este evento incrementaría la repulsión de la proteína por el DNA, favoreciendo la liberación del material génico por desenvolvimiento y extrusión del DNA de la nucleocápside. Con posterioridad se produce el fenotipo brotante que emerge de la célula. En muchos insectos la infección comienza cuando los ODVs penetran las células del epitelio intestinal e inician un ciclo de infección completo. En tanto que en otros, si bien las NCs penetran las células del epitelio, emergen nuevamente y son transportadas por el sistema traqueal hasta otras células blanco (Fig. 1.9).

Infección secundaria

A diferencia de los ODVs, los BVs entran a la célula huésped mayoritariamente por endocitosis mediada, probablemente, por interacción de GP64 con un receptor aún no identificado (Volkman & Goldsmith, 1985; Wickham *et al.*, 1990; Wickham *et al.*, 1992) (Fig. 1.9). La proteína GP64 presenta cierta homología con la glicoproteína de envoltura de los orthomyxovirus Thogoto y Dhori (Morse *et al.*, 1992). Pearson & Rohrmann (2002) han sugerido que este gen posiblemente fue adquirido a través de una coinfección con un thogotovirus o robado de un huésped. Los *Nucleopolyhedrovirus* del grupo II así como los *Granulovirus* no poseen un gen gp64, aparentemente en estos baculovirus la proteína *efp* desempeñaría una función similar. Ya en el citosol, el endosoma es acidificado provocando la liberación de las NCs al citosol por fusión de membranas. La nucleocápsides migran al núcleo, donde penetran por el poro y el DNA es liberado en él. Posteriormente, la transcripción comienza y el DNA es replicado y ensamblado en las nucleocápsides. En la fase tardía las NCs salen del núcleo y migran a la membrana plasmática donde brotan al igual que en la infección primaria.

En la fase muy tardía, las nucleocápsides adquieren su membrana en el núcleo y son recubiertas una matriz cristalina de poliedrina para formar cuerpos de inclusión maduros. Estos son liberados por lisis celular.

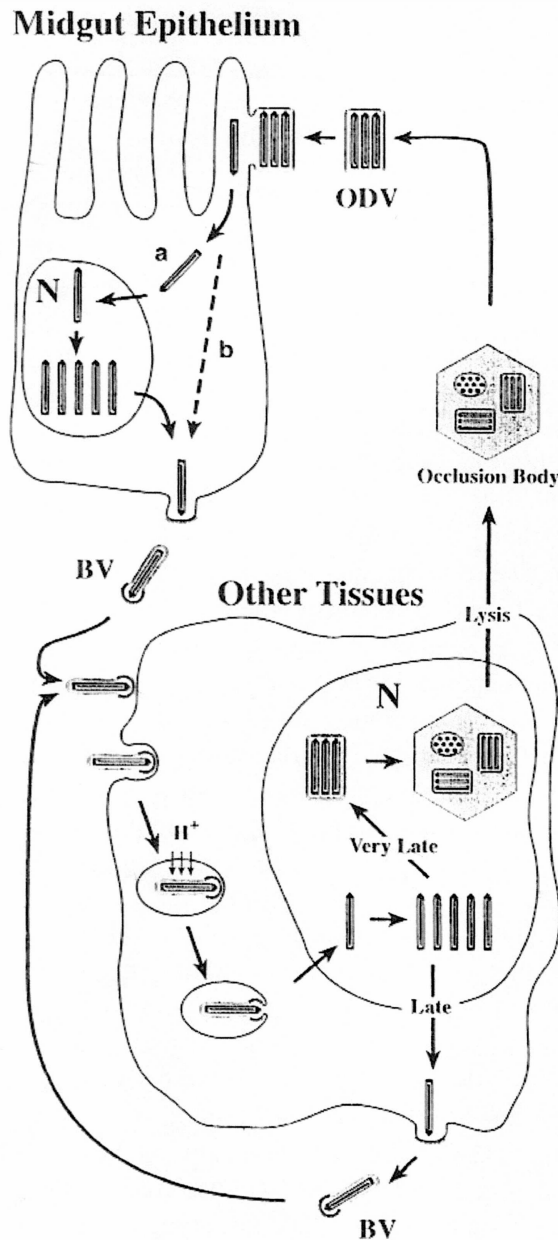


Figura 1.9. Ciclo de infección de un baculovirus (NPV) en células del epitelio intestinal medio y en otros tejidos de un lepidóptero.

Infección de células epiteliales del intestino medio por OB (fase primaria de la infección). La matriz de poliedrina de una partícula de un OB que ha sido ingerido se disuelve en el lumen del intestino medio, liberando un ODV) el cual atraviesa la membrana peritrófica y llega a las células columnares del epitelio intestinal. La membrana de los ODV se fusiona con las membranas del microvilli liberando nucleocápsides (NCs) en el citoplasma, donde ellas migran al núcleo (a) o alternatively emergen nuevamente (b). Infección secundaria y producción de OBs. Los viriones brotantes (BVs) emergen de las células epiteliales en la fase tardía de la infección, y migran a células vecinas en donde entran por endocitosis, probablemente mediada por la interacción de GP64 con un receptor de la superficie celular. Una vez que la vesícula endosomal es liberada en el citosol, el endosoma se acidifica, su membrana y la del BV se fusionan, liberando la nucleocápside en el citoplasma. La nucleocápside se dirige al núcleo, en donde interactúan con el poro nuclear. Tras entrar al núcleo, el DNA es liberado del virión, y comienza la transcripción. El DNA es replicado y empaquetado en las nucleocápsides en una región conocida como estroma virogénico. Durante la fase tardía de la infección, las nucleocápsides salen del núcleo, migrando a la membrana plasmática, y brotando como BV infecciosos. Durante la fase muy tardía, las nucleocápsides son retenidas en el núcleo, adquiriendo su membrana y son embebidas en una matriz cristalina de poliedrina para formar OB. Los OB maduros son liberados por lisis celular. Extraído de Blissard, G. W. (1996).

Fases de la infección

La expresión de genes virales parece estar regulada en forma de cascada y puede ser dividida en tres fases: fase temprana (*early*) o anterior a la replicación del DNA viral, fase tardía (*late*), y fase muy tardía (*very late*) (Lu *et al.*, 1995) (Figura 1.10).

Durante la fase temprana se transcriben genes necesarios para transactivar a los genes tempranos, que en general están relacionados con la replicación del DNA viral. Los activadores transcripcionales tempranos incluyen a *ie-0*, *ie-1*, y *me35*. En estadios posteriores la transcripción es controlada además por activadores transcripcionales tardíos o *lefs* (*late expression factors*). La replicación del DNA viral es un paso necesario para el comienzo de la expresión génica tardía y muy tardía. Una vez que ha comenzado la replicación del DNA, se transcriben los genes necesarios para empaquetar el material genético en nucleocápsides. En esta etapa (fase tardía) se liberarán los virus brotantes ocasionando una infección secundaria. Finalmente, durante la fase muy tardía se transcriben en niveles altos proteínas relacionadas con la morfogénesis del OB, entre ellos *poliedrina/granulina*.

inicio de la infección.
↓

| Fases | Temprana (<i>early</i>) | Tardía (<i>late</i>) | Muy tardía (<i>very late</i>) |
|---|---|---|--|
| Tiempo | 0 a 6-8 h | 6-8 a 18-24 h | 18-24 h a 76 h |
| Transcripción mediada por | RNA polimerasa II celular | RNA polimerasa viral | |
| Promotores utilizados | TATA | (A/G/T)TAAG | (A/G/T)TAAG |
| Secuencia de inicio de transcripción | CA(C/G/T)T | Primera A de la secuencia TAAG | Primera A de la secuencia TAAG |
| Motivos de unión a proteínas involucradas en la transcripción | (T/A)GATA(A/G) CACGTG | | |
| Replicación del DNA | | → | |
| Genes transcritos | <i>ie-0, ie-1, ie-2, pe38, me53, dna-pol, dna-hel, etf (pcna), p47, lefs (1, 3, 5, 6, 7, 8) iap1, iap-2, p35, gp64, egt, etc.</i> | <i>ie-0, ie-1, iap-1, iap-2, me53, dna-pol, dna-hel, lef-10, lef-1 (primasa), lef-2, lef-3 (SSB) lef-4, lef-8, lef-9, p47, vlf-1, p6.9, vp39, gp64, 39K, p74, ubi, pp78/83, etc</i> | <i>p10, polh/gran, vp39, v-chi, ubi, p74, gp41, odv-e66, odv-ec27, odv-e56, etc.</i> |
| Producción de BVs | | → | |
| Producción de cuerpos de inclusión | | | → |

Figura 1.10. Ciclo de infección de un baculovirus. La expresión de genes virales puede ser dividida en tres etapas, temprana, tardía y muy tardía.

Fase temprana

Una vez que el DNA ha arribado al núcleo, se transcriben genes cuyos promotores son reconocidos por la RNA polimerasa II celular. La transcripción comienza rápidamente y puede ser detectada dentro de los 15 minutos pos inoculación. Entre los genes transcritos en esta etapa, se encuentran aquellos que codifican para activadores transcripcionales, la RNA polimerasa viral, factores de replicación del DNA viral, supresores de apoptosis, entre otros. Estas proteínas preparan a la célula para el enorme esfuerzo impuesto por la síntesis del DNA viral y los componentes estructurales que formarán las partículas virales.

El nivel y la sincronización de la expresión de los genes tempranos y tardíos es orquestado para asegurar la formación de las partículas infecciosas BV y OV de forma apropiada. Los genes tempranos también bloquean la continuidad del ciclo celular, dejando a las células infectadas en fase S y G2/M (Braunagel *et al.*, 1998; Ikeda & Kobayashi, 1999).

Como consecuencia de la expresión de otros genes tempranos la estructura de citoesqueleto es reacomodado drásticamente. Los filamentos de actina y los microtúbulos son redistribuidos, ocasionando la hipertrofia del núcleo y el cambio de morfología celular haciéndola más redonda durante la infección (Charlton & Volkman, 1991; Charlton & Volkman, 1993; Roncarati & Knebel-Mörsdorf 1997).

Dos tipos de genes son transcritos de forma temprana, unos no requieren de ninguna proteína viral ni de elementos *enhancers* para su transcripción, por ejemplo *ie-1* y son llamados genes inmediatamente tempranos o *immediate early*. Otros requieren la síntesis de factores virales tales como IE-1 que, unidos a *enhancers*, llevan la transcripción al nivel necesario para el progreso de la infección. Estos genes se llaman *delayed-early* o tempranos retrasados (Guarino & Smith, 1992; Guarino & Dong, 1991; Hoopes & Rohrmann, 1991; Pullen & Friesen, 1995). Las proteínas IE-1 sintetizadas inicialmente, se dimerizan en el citosol y son transportadas al núcleo en donde se unen palíndromes de 28 pb presentes en las secuencias *hrs* (Olson *et al.*, 2002). La interacción del dímero de IE-1 con las *hrs* reclutaría factores de transcripción celulares actuando así como *enhancers* transcripcionales de genes tempranos en *cis*, entre los que se encuentra el mismo *ie-1*. Además de IE-1 se han encontrado otros tres productos génicos virales que regulan la transcripción por transactivación: IE0, IE-2 (IE-N) y PE38/P34.

Con respecto a los promotores de los genes tempranos, muchos de ellos poseen una caja TATA seguida a 20-40 nt *downstream* por un motivo CABT [CA(C/G/T)T] que corresponde al inicio de la transcripción. La secuencia TATA se uniría a la proteína TBP (TATA box binding protein) reclutando factores de transcripción. La secuencia CABT desempeña además un importante papel en la eficiencia de transcripción, probablemente influyendo sobre la afinidad por el factor de transcripción TFIID (Blissard, 1996). Empleando ensayos de unión DNA-proteínas (retardo de la movilidad electroforética) y de mutagénesis dirigida se han identificado dos secuencias adicionales capaces de interactuar con proteínas del huésped. Una exhibe el consenso (T/A)GATA(A/G) (elemento GATA) y la otra consiste en la secuencia CACGTG. Estos motivos son reconocidos por factores de transcripción eucarióticos, los factores GATA y las proteínas B-HLH-Zip, tanto en el contexto de promotores TATA como fuera de los mismos (Giacca *et al.*, 1992; Orkin *et al.*, 1992).

Respuesta celular a la infección

Luego de la infección viral, muchos tipos de células son capaces de inducir una cascada de eventos moleculares que conducen a la apoptosis como medida de defensa del organismo (Clem, 1997; Vaux & Strasser, 1996). La apoptosis es un proceso activo de suicidio celular caracterizado por cambios morfológicos y bioquímicos específicos, que llevan finalmente a la muerte celular. Los procesos en los cuales la apoptosis cobra vital importancia incluyen la remodelación tisular durante la embriogénesis (Ucker, 1991), el mantenimiento de la homeostasis, el funcionamiento del sistema inmune y durante la metamorfosis en los insectos (Jiang *et al.*, 1997; Steller & Grether, 1994). También interviene en la eliminación de células cuya supervivencia podría resultar deletérea para el organismo y constituye una estrategia de defensa contra las infecciones virales y el crecimiento tumoral (Blissard 1996; Vaux & Haecker, 1994; Walker *et al.*, 1988). Este proceso se caracteriza por la disminución del tamaño de las células, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear, la degradación del DNA cromosómico para dar fragmentos de longitud oligonucleosómica, por un profuso "blebbing" de la membrana plasmática y el desprendimiento de vesículas hacia el medio.

A pesar de la existencia de esta estrategia de defensa por parte de las células, los virus han desarrollado mecanismos para bloquear la apoptosis prematura de las células infectadas, facilitando así el establecimiento y la persistencia de la infección o

prolongando la supervivencia de las células infectadas con el fin de incrementar así la producción de la progenie viral (O'Brien, 1998). Los genomas de los baculovirus codifican para dos tipos de genes (*p35* e *iap*) cuyos productos de expresión actúan a distintos niveles inhibiendo apoptosis en estadios tempranos y tardíos de la infección.

Fase temprana hacia tardía

La transición entre estas dos etapas está caracterizada por la replicación viral, la activación de una nueva RNA pol y la inhibición de la transcripción en el huésped. La replicación del DNA parece ser un evento esencial para la transcripción de los genes tardíos. En paralelo con estos eventos, los niveles de mRNAs propios de la célula decrecen dramáticamente (Miller *et al.*, 1981; Rice & Miller, 1986).

Fase tardía

La aparición de la RNA pol viral y la transcripción de genes tardíos marca el inicio de esta fase del ciclo de infección viral. Esta fase transcurre entre las horas 6-12 pos infección (p.i.) hasta la hora 18 aproximadamente.

Para el baculovirus AcMNPV se han identificado diecinueve productos génicos (*lef-1*, -2, -3, -4, -5, -6, -8, -9, -10, -11, -12, *p47*, *39k/pp31*, *lef-7*, *ie-1*, *ie-2*, *p35*, *dna-pol*, *helicasa*) necesarios para la transcripción de genes tardíos (Rapp *et al.*, 1998). Estos genes fueron detectados por su habilidad para soportar la expresión en un alto nivel de un gen indicador (*reporter*) puesto bajo el control de un promotor tardío viral y asociado en *cis* a un elemento *hr* (Passarelli & Miller, 1993). A estos factores se los ha denominado genes *lef* (*late expression factors* o factores de expresión tardíos). Algunos *lefs* están involucrados en la replicación del DNA viral, mientras que otros afectan la transcripción de los genes tardíos de una manera más directa (Kool *et al.*, 1994b; Lu & Miller, 1995; Rapp *et al.*, 1998; Todd *et al.*, 1995). Cuatro de estos *lefs* codifican para una RNA pol viral, resistente a la alfa-amanitina (*lef-4*, *lef-8*, *lef-9* y *p47*) (Guarino *et al.*, 1998a; Guarino *et al.*, 1998b). Esta enzima es esencial para la transcripción de los genes tardíos y muy tardíos, y reconoce secuencias promotoras con el consenso (A/G/T)TAAG (Lu & Miller 1997). Generalmente, en estos casos la transcripción se inicia en la primera A de la secuencia consenso del promotor.

En los NPVs la replicación viral ocurre en el núcleo, en una región conocida como estroma virogénico y es detectable a partir de las 6-12 h p.i. (Tjia *et al.*, 1979). La

síntesis del DNA continúa hasta al menos la hora 18, tras lo cual decae significativamente. La síntesis del DNA viral es una condición necesaria para la expresión de los genes muy tardíos (Miller *et al.*, 1981; Rice & Miller, 1986).

Los factores esenciales para la replicación viral se han determinado en ensayos de transfección a células de insecto de porciones de genoma y la posterior evaluación de la replicación. En estos ensayos se transfectan cósmidos solapados que contienen la totalidad de genoma viral o, alternativamente, puede transfectarse un conjunto de genes conocidos. Junto con esos cósmidos, se co-transfecta un plásmido indicador que contiene un *ori* funcional. Las transfecciones alternativas se realizan hasta encontrar el menor conjunto de cósmidos o de genes que soportan la replicación. Usando este protocolo, se detectaron al menos 5 genes esenciales para la replicación de AcMNPV y OpMNPV: *ie-1* [proteína transactivadora, de unión al origen de replicación del DNA (*hr*)], *lef-1* (posiblemente una primasa), *lef-2* (una proteína asociada a la primasa), *lef-3* (una proteína de unión a DNA simple hebra, SSB) y *p143* (*helicasa*) (Mc Dougal & Guarino, 1999). AcMNPV y OpMNPV también poseen otros cinco genes que estimulan la replicación transitoria *dna-pol*, *p35*, *ie-2*, *lef-7* y *pe38* (Ahrens *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1997). De estos 10 genes, los cinco primeros junto con *dna-pol* están presentes en todos los baculovirus.

Un segundo grupo de genes, no conservado en todos los baculovirus, estaría relacionado con la replicación, entre otros representantes forman este grupo: el antígeno de proliferación nuclear (*pcna*), *dna-ligasa* y una segunda *helicasa* (*helicasa-2*) con similitud a una *helicasa* mitocondrial de levadura (*pif1*) (Kuzio *et al.*, 1999). Dado que estos genes no son estimulatorios (en ensayos de replicación transitorios) es probable que estén involucrados en funciones tales como la recombinación, el procesamiento y/o reparación de genomas maduros. En este grupo también encontramos a exonucleasa alcalina (*alk-exo*) y una proteína de la familia de las integrasas resolvasas (*vlf-1*) que están conservados en todos los baculovirus secuenciados (Hayakawa *et al.*, 2000).

Debido a que las infecciones virales pueden acontecer en fases celulares en las cuales las vías biosintéticas de dNTPs están inactivas (células que no se están dividiendo), muchas familias de virus a DNA codifican genes relacionados con la provisión de nucleótidos. Estas enzimas convierten rNTPs celulares en dNTPs para ser usados en la síntesis de DNA viral. Entre los genes típicos codificados por los genomas de los baculovirus, se encuentran la ribonucleótido reductasa (*rr*) y la *dUTPasa*. La *rr* cataliza la conversión de rNTPs (rATP, rCTP, rGTP y rUTP) en dNTPs

(dATP, dCTP, dGTP y dUTP). La dUTPasa convierte dUTP a dUMP el cual es un precursor de dTTP, al mismo tiempo que previene la incorporación errónea de dUTP en el DNA, el cual tendría efectos mutagénicos.

Si bien el mecanismo de replicación no está bien comprendido, existen resultados experimentales que sugieren la presencia de concatémeros de plásmidos indicadores en ensayos de replicación transitoria (Lee & Krell, 1992, 1994). Estas evidencias indicarían que el DNA de los baculovirus sería replicado por el mecanismo de círculo rodante.

Para determinar si las secuencias *hrs* son orígenes de replicación (*On*) funcionales se transfectan plásmidos con distintas porciones del genoma viral Kool *et al.* (1994a). Los plásmidos que se transfectan se encuentran metilados (sitio GATC sensible a DpnI) y en caso de ser replicados, las moléculas hijas quedan hemimetiladas y ya no son digeridas con DpnI (Peden *et al.*, 1980). De esta forma es posible diferenciar entre moléculas replicadas y no replicadas.

Aparentemente, el DNA viral se replicaría a partir de varios orígenes de replicación al mismo tiempo y las regiones homólogas (*hr*) actuarían como estos orígenes (Kool *et al.*, 1995; Leisy *et al.*, 1995; Pearson *et al.*, 1992). Un segundo tipo de *ori-no-hr* fue identificado en algunos NPVs, en forma de copia única. Este *ori* es una estructura compleja que comprende regiones ricas en AT, múltiples repeticiones directas e inversas y palíndromes no emparentados con los *hrs* (Habib & Hasnain, 2000; Heldens *et al.*, 1997; Kool *et al.*, 1994a; Lee & Krell, 1992; Wu & Carstens 1996). A pesar que los palíndromes de los *hrs* y de los *ori-no-hr* pueden formar estructuras cruciformes *in vitro*, no está demostrado que estas estructuras tengan un rol directo en la función de los *hrs*. En el caso de LdMNPV la presencia de regiones ricas en AT adyacentes a los posibles *oris* estimulan en 70 veces la replicación (Pearson & Rohmann, 1995). La interacción de una proteína, con los *hrs* podría favorecer la fusión o "melting" del DNA en esas regiones ricas en AT, facilitando la entrada del complejo de replicación. Las regiones *hrs* son altamente específicas para cada virus y rara vez soportan la replicación en sistemas heterólogos.

Fase muy tardía

La fase final de la infección se caracteriza por la hiperexpresión de genes que codifican para proteínas mayoritarias del OB (*polh/gran*), además cesa la transcripción de los genes tardíos y se forman los OBs sobre las nucleocápsides envueltas. Este

último evento transcurre entre las 18 y las 76 h pos infección (aproximadamente) o hasta la lisis celular.

Los genes muy tardíos son transcritos por la RNA pol viral, resistente a la alfa-amanitina. Los promotores de los genes muy tardíos (*polh* y *p10*) tienen como secuencia consenso al motivo TAAG; sin embargo, la secuencia que se encuentra entre el promotor y el ATG también afecta la expresión de genes muy tardíos.

Las notables características de los genes muy tardíos, tales como sus altos niveles de expresión y el carácter no esencial de los mismos ha permitido el desarrollo de vectores de expresión de proteínas en sistemas eucariotas. El sistema de expresión de proteínas en células de insecto infectadas con baculovirus está basado en el reemplazo del gen de poliedrina, dentro del genoma de un baculovirus, por un gen foráneo mediante recombinación homóloga. Este nuevo gen, queda bajo el control del promotor de poliedrina y, generalmente, se expresa a niveles comparables a la proteína de inclusión (Kost & Condeary, 2002).

En los NPVs el gen *p10* es también expresado en un alto nivel. Este gen codifica para una proteína pequeña (P10) con dominios *coiled coil* que se asocia con estructuras fibrilares. Estas estructuras se ensamblan en el núcleo de los NPVs en estadios tardíos de la infección. Si bien P10 no es esencial para la replicación o para la formación del OB, aparentemente contribuiría a la ruptura de la membrana nuclear (Vlak *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1989).

De acuerdo con evidencias de ME, el ensamble de las nucleocápsides de los NPVs y su posterior llenado con DNA se llevaría a cabo en el núcleo de la célula infectada en una región electrondensa conocida como "estroma virogénico" (Fraser, 1986; Young *et al.*, 1993). Posteriormente, la proteína de inclusión (*polh*) se asocia y cristaliza alrededor de los viriones envueltos en el núcleo para luego adquirir una proteína que le sirve de envoltorio (*Calyx*). Con respecto al origen de los lípidos que forman la envoltura de los viriones (tanto los BVs como de los ODV), su origen aún no ha sido elucidado.

Genes auxiliares o proteínas que interactúan con el huésped

Tal como hemos apreciado hasta aquí, los genomas de los baculovirus codifican para una gran variedad de proteínas con funciones diversas: estructurales, involucradas en la replicación, transcripción, metabolismo de nucleótidos, inhibidoras de apoptosis, etc.

Sin embargo, los baculovirus poseen otro grupo de genes llamados genes auxiliares. Los mismos no son esenciales, pero proveen a los virus de ventajas selectivas en términos de relaciones epizootológicas con los insectos huéspedes (O'Reilly, 1997) (Tabla 1.4). A continuación se detallan las funciones de algunos de estos genes.

Las conotoxinas (*ctf*), originariamente aisladas de encontradas en el veneno de caracoles marinos cazadores de peces (del género *Conus*), son péptidos pequeños conocidos por su acción antagonista de canales de sodio y calcio. A partir de análisis de asociación funcional, Herniou *et al.* (2003) han postulado que las *ctf* estarían involucrados en la expansión del rango de huéspedes. Estos análisis están basados en la ocurrencia simultánea de genes, algunos de ellos con funciones conocidas y otros cuya función se desconoce pero que podrían estar asociados a los anteriores.

La proteína ubiquitina es muy abundante en todos los eucariotas y es una de las proteínas más conservadas en los baculovirus. Su función principal en las células es dirigir la señalización de la degradación de proteínas por el proteosoma 26S (Hochstrasser, 1996). Sin embargo, su rol en los baculovirus no ha sido determinado.

Tabla 1.4. Genes auxiliares de los baculovirus, funciones y posibles roles.

| Gen auxiliar | Abreviatura | Función y posible rol en el ciclo de infección |
|---|----------------|--|
| Superóxido dismutasa | <i>sod</i> | Cataliza la conversión de anión superóxido (O_2^-) en peróxido (H_2O_2) y oxígeno gaseoso (O_2). Posiblemente actúe detoxificando a la célula infectada. |
| Proteína quinasa | <i>pk</i> | Quinasa, rol desconocido. |
| Proteína tirosina fosfatasa | <i>ptp</i> | Fosfatasa, rol desconocido. |
| Factor de proliferación de fibroblastos | <i>fgf</i> | Rol desconocido. |
| Antígeno de proliferación nuclear | <i>pcna</i> | Rol aún no atribuido. |
| Proteína Tirosina fosfatasa | <i>ptp</i> | Fosfatasa, rol desconocido. |
| Ubiquitina | <i>ubi</i> | En eucariotas está involucrado en vías de degradación de proteínas, en los baculovirus su rol no ha sido demostrado. |
| Péptido similar a conotoxina | <i>ctf</i> | En otros organismos tiene una acción antagonista de canales de sodio y calcio, en los baculovirus se ha postulado que estaría asociada al incremento del rango de huésped. |
| Catepsina | <i>v-cath</i> | Proteasa, degrada tejidos celulares facilitando la liberación de los OBs al ambiente. |
| Quitinasa | <i>v-quiA</i> | Degrada quitina, acelerando la liberación de los OBs. |
| Ecdisona glucosil transferasa | <i>egt</i> | Inactiva a la hormona ecdisona, inhibiendo la muda. |
| Factor inductor de relocalización de actina | <i>arif-1</i> | Promueve cambios en la localización de actina, su rol en los baculovirus no ha sido dilucidado. |
| Viral enhancing factor | <i>vef</i> | Metaloproteasa, facilita el pasaje de los ODV por la membrana peritrofica. |
| Exonucleasa alcalina | <i>exo-alk</i> | Hidroliza nucleótidos de una cadena de DNA, posiblemente involucrada en mecanismos de reparación de DNA y en recombinación homóloga. |
| <i>p10</i> | <i>p10</i> | Proteína estructural, forma grandes masas fibrilares involucradas en la maduración del OB. |

La proteína GP37 (también conocida como p34,8) es homóloga a las *spheroidin* de los entomopoxvirus (Yuen *et al.*, 1990) y en esta familia viral está involucrada en el

incremento de la infección *in vivo* (Phanis *et al.*, 1999), sin embargo su rol en los baculovirus no ha sido determinado.

El antígeno de proliferación nuclear (*pcna*) ha sido propuesto como involucrado en la replicación, transcripción y en la reparación del DNA viral, así como en el arresto del ciclo celular que sigue a la infección. Sin embargo, este gen no es esencial para la replicación y no aún hay análisis funcionales descriptos (O'Reilly, 1997).

Además de las interacciones que acontecen en el marco de los límites celulares, los baculovirus codifican para proteínas involucradas en interacciones bioquímicas a nivel del organismo infectado. Una de esas enzimas es la ecdisona glucosil transferasa (EGT) o Ecdisteroide-UDP-glucosiltransferasa, que se secreta a la hemolinfa durante casi todos los estadios de la infección. Esta enzima cataliza la transferencia de un residuo de glucosa o de galactosa (y quizás de otros monosacáridos) a los ecdisteroideas, inactivándolos (O'Riley & Miler, 1990). Los ecdisteroides son hormonas esteroides que regulan la muda de los insectos. Con esta inactivación, el virus inhibe la muda. De manera que la larva continúa alimentándose e incrementado su masa celular, que al estar disponible para ser infectada permitirá un aumento de la progenie viral.

Muerte del organismo y liberación de los OBs

En los estadios finales de la infección, las larvas se encuentran repletas de cuerpos de inclusión. Poco después de su muerte, las larvas se tornan de color amarronado, se vuelven flácidas y sus tegumentos se rompen fácilmente, liberando los virus ocluidos al medio ambiente (Volkman & Keddie, 1990). Este proceso llamado *melting* o licuefacción es facilitado por la acción de la catepsina (*v-cat*), una proteasa del tipo cisteína proteasa y la quitinasa (*v-chi*). Estas enzimas cooperan para degradar los tejidos y el exoesqueleto de los insectos muertos, facilitando así la liberación de los OBs. En los Granulovirus se ha descrito una metaloproteasa (*mpnasa*) exclusiva de este género, y se cree que la misma contribuiría a la proteólisis de los tejidos infectados (Ko *et al.*, 2000).

Aspectos destacados de la biología molecular de los granulovirus

Los granulovirus han sido aislados a partir de más de 100 especies de insectos, todas ellas pertenecientes al orden Lepidoptera (Blissard *et al.*, 2000). A diferencia de los cuerpos de inclusión de los NPVs, los OBs de los granulovirus presentan tamaños menores y contienen sólo una NC envuelta por OB. Además carecen de una estructura que envuelve al cuerpo de inclusión (*Calyx*) y de un gen homólogo al que en los NPVs codifica para la proteína del *Calyx* (*pp34*). Por otra parte, las nucleocápsides de los GVs no penetran en el núcleo, permanecen en el citoplasma con uno de sus extremos hacia el poro, liberando luego el DNA dentro del núcleo a través del mismo (Granados, 1978; Summers, 1971). El virus replica primero en el núcleo y la replicación continúa después de la ruptura de la membrana nuclear.

Con respecto a la patogenia causada por los GVs, si bien todos los granulovirus establecen una infección transitoria en el epitelio intestinal (Federici, 1997) se han reconocido tres tipos de patrones de infección. Los GVs del Tipo 1 infectan el epitelio intestinal y también el cuerpo graso (tejido adiposo). Los GVs del tipo 2 infectan además otros tejidos como la epidermis y la matriz traqueal, es decir son poliorganotrópicas. Los viriones producidos en el epitelio intestinal en estos virus no están ocluidos, pero invaden este y otros tejidos, donde posteriormente aparecerá el fenotipo ocluido. A diferencia de los anteriores tipos de infecciones, en *Harrisinia brillians* (HbGV) (el único exponente del tipo 3), la replicación e inclusión están restringidas al epitelio intestinal medio. Este tropismo único, causa diarreas con un alto contenido de OBs que servirán de vía de dispersión de la enfermedad en las poblaciones de larvas (Federici & Stern, 1990; Smith *et al.*, 1956). El comportamiento de la infección en HbGV es similar al de los NPVs de dípteros (mosquitos) e himenópteros (avispa y abejas) cuya replicación en general está restringida al epitelio intestinal. Las infecciones de tipo 1 conducen lentamente a la muerte del insecto a diferencia del tipo 2, en el cual el progreso de la infección es rápido.

La organización genómica de NPVs y GVs no presenta similitudes, excepto por la región "central" donde se encuentran entre otros el gen de helicasa (Heldens *et al.*, 1997; Ijkel *et al.*, 1999). Con respecto a las regiones *hrs*, si bien las mismas se han detectado en los NPVs, para los GVs la situación es menos clara. Mientras que en XcGV las repeticiones carecen de un *core* palindrómico, en PxGV las mismas se parecen más a los *hrs* de NPVs. Por otra parte, si bien los genomas de CpGV y

PhopGV carecen de *hrs*, poseen secuencias repetidas del tipo palíndrome imperfecto a lo largo del genoma, sin ningún arreglo espacial determinado (13 en CpGV y 10 en PhopGV). Las diferencias más significativas entre los genomas de los NPVs y GVs, se presentan en cuanto al contenido de sus genes y serán abordadas en el capítulo 8 "Análisis del genoma de EpapGV".

Evolución de la familia *Baculoviridae*, filogenia y contenido de genes

Tradicionalmente las filogenias de los baculovirus estuvieron basadas en la secuencia de genes individuales, entre ellos se ha empleado los genes de poliedrina/granulina, *dna-pol*, *egt*, *gp41*, *catepsina (cath)*, *lef-2* y *gp37*. Estos trabajos han coincidido en diferenciar a los NPVs de los GVs como grupos separados y en subdividir a los NPVs en dos subgrupos. Sin embargo, no necesariamente la filogenia de un gen se corresponde con la filogenia de un organismo. Por ejemplo, las filogenias generadas con genes tales como poliedrina/granulina fallan en agrupar correctamente a todos los miembros de los subgrupos I y II de NPVs. Esta falla, podría deberse a velocidades de evolución diferentes de éste gen en distintos organismos, o a la falta de señales filogenéticas robustas para el mismo. El término señales, está referido a aquellos aminoácidos o nucleótidos con variabilidad suficiente como para ser empleadas a la hora de trazar relaciones evolutivas. Para evitar las discrepancias en las filogenias generadas a partir de genes individuales, se han propuesto y probado varios análisis alternativos. A continuación, se discuten estas alternativas.

Filogenias por análisis de secuencias proteicas

Con la reciente publicación de numerosos genomas completos de diversos organismos se ha abierto una nueva vía para las inferencias filogenéticas, en especial para aquellas que emplean los genes comunes a un grupo de organismos. En el caso de los baculovirus se han utilizado dos estrategias que se basan en el análisis de las secuencias proteicas comunes a todos ellos. La primera consiste en efectuar un árbol filogenético con cada uno de los genes comunes a los baculovirus y luego generar un árbol consenso con todos los árboles obtenidos. La segunda alternativa, radica en

ordenar para cada genoma todas las secuencias proteicas comunes, una atrás de la otra concatenándolos en el mismo orden en todos los genomas, de modo que cada grupo de genes comunes ocupe la misma posición relativa en todos los genomas. Así por ejemplo en todos los genomas el gen uno es *dna-pol*, el dos es *helicasa*. Posteriormente se alinea cada grupo de genes por separado y se eliminan los gaps.

Mientras que la primera estrategia posee grandes limitaciones, la segunda ha sido probada con mayor eficacia. En el primer procedimiento, si los árboles de partida no han podido resolver la filogenia de manera apropiada, el árbol consenso tampoco podrá hacerlo de manera certera. Mientras tanto, en la segunda estrategia los árboles se ven robustecidos gracias a un efecto sinérgico producido por la combinación de señales. Ya se ha probado la efectividad de esta última metodología para analizar la filogenia de los metazoos, basándose en los genomas mitocondriales (Nikaido *et al.*, 2001) y de los herpesvirus (Alba *et al.*, 2001; McGeoch *et al.*, 2000) y de los baculovirus (Herniou *et al.*, 2001), a partir de los genomas completos disponibles. También ha dado buenos resultados con genomas mucho más grandes, como los de procariotas (Sicheritz-Ponten & Andersson, 2001).

Filogenias basadas en el orden de genes

Además de la información que reside en las secuencias proteicas, los genomas grandes poseen información estructural que puede ser utilizada para trazar su evolución. Esta información comprende la composición de los genes y la posición de los mismos en los diversos genomas (Kuzio *et al.*, 1999). El análisis de estos caracteres parte del supuesto que si dos genomas poseen la misma organización de sus genes (orden y orientaciones relativas), es muy probable que provengan de un ancestro común. Los primeros análisis basados en la posición de los genes han sido usado para establecer relaciones filogenéticas a partir de genomas mitocondriales (Boore *et al.*, 1995). Posteriormente, estos análisis se llevaron a cabo con genomas grandes y muy relacionados como con los herpesvirus, baculovirus y cloroplastos de plantas (Bourque & Pevzner, 2002; Hannehalli *et al.*, 1995; Herniou *et al.*, 2001)

Los métodos comúnmente usados para obtener señales filogenéticas a partir de datos del orden de genes son dos: **a) análisis de proximidad de pares** y **b) análisis de puntos de quiebre (*breakpoint*)**. El primero se basa en la presencia de pares de genes en dos genomas distintos. Para ello, se registra en una tabla la presencia (en los distintos genomas) de todas las posibles combinaciones de pares de genes,

asignando estados de ceros y unos. La matriz que surge de registrar estos caracteres es analizada luego por parsimonia. En el segundo método se examina el orden de genes entre dos genomas y se asigna un punto de quiebre por cada discontinuidad de genes de un genoma con respecto al otro (Fig. 1.11). Un punto de quiebre puede entenderse como el número de puntos abstractos en un genoma que deben ser dibujados para recrear el orden de genes del otro genoma. Luego estos puntos de quiebre son sumados y divididos por un número de genes comunes entre ambos genomas. Las distancias calculadas para todos los pares de genomas se emplean para reconstruir la filogenia por *Neighbor Joining*.

| Genes comunes | EpapGV | Cp |
|------------------|--------|----|
| <i>Granulina</i> | 1 | 1 |
| <i>rr1</i> | 2 | 17 |
| <i>iap-3</i> | 3 | 7 |
| <i>efp</i> | 4 | 11 |
| <i>Xc17</i> | 5 | 10 |
| <i>Ac29</i> | 6 | 9 |
| <i>odv-e56</i> | 7 | 8 |
| <i>odv-e18</i> | 8 | 6 |
| <i>gp37</i> | 9 | 5 |
| <i>cath</i> | 10 | 4 |
| <i>chi</i> | 11 | 3 |
| <i>Xc29</i> | 12 | 12 |
| <i>ie-1</i> | 13 | 2 |
| <i>odv-e66</i> | 14 | 13 |
| <i>lef-2</i> | 15 | 14 |
| <i>Ac22</i> | 16 | 15 |
| <i>Xc47</i> | 17 | 16 |

Figura 1.11. Análisis de puntos de quiebre. El orden relativo (parcial) de los genes comunes entre EpapGV y CpGV se analiza en una tabla, los puntos de quiebre se han marcado con líneas rojas y se sitúan en donde existe una discontinuidad en el orden de los genes de CpGV. Esta tabla ha sido compuesta por el autor, de acuerdo con los datos parciales de los ORFs compartidos por ambos genomas.

Filogenias por análisis del contenido de genes

Los análisis del contenido de genes están basados en el registro de la presencia o ausencia de genes en distintos genomas. Estos datos se vuelcan en una matriz de ceros y unos y la matriz se emplea para generar árboles filogenéticos por el criterio de máxima parsimonia. Dado que los genes presentes en todos los organismos no aportan información, los mismos son excluidos de éste registro.

Resultados, éxitos y limitaciones de estos análisis filogenéticos

A continuación, se analizarán los resultados del análisis de la filogenia de los baculovirus empleando los métodos descriptos anteriormente, estos análisis se informan en Herniou *et al.* (2003).

El análisis del árbol consenso a partir del alineamiento concatenado de genes comunes (Fig. 1.12A) es capaz de discriminar a *Culex nigripalpus* NPV (CuniNPV) del

resto de los baculovirus que infectan a los lepidópteros y diferenciar a los GVs de los NPVs. Asimismo, divide a los NPVs en los dos grupos previamente establecidos, pero carece de consistencia estadística al agrupar los distintos virus del grupo II de los NPVs.

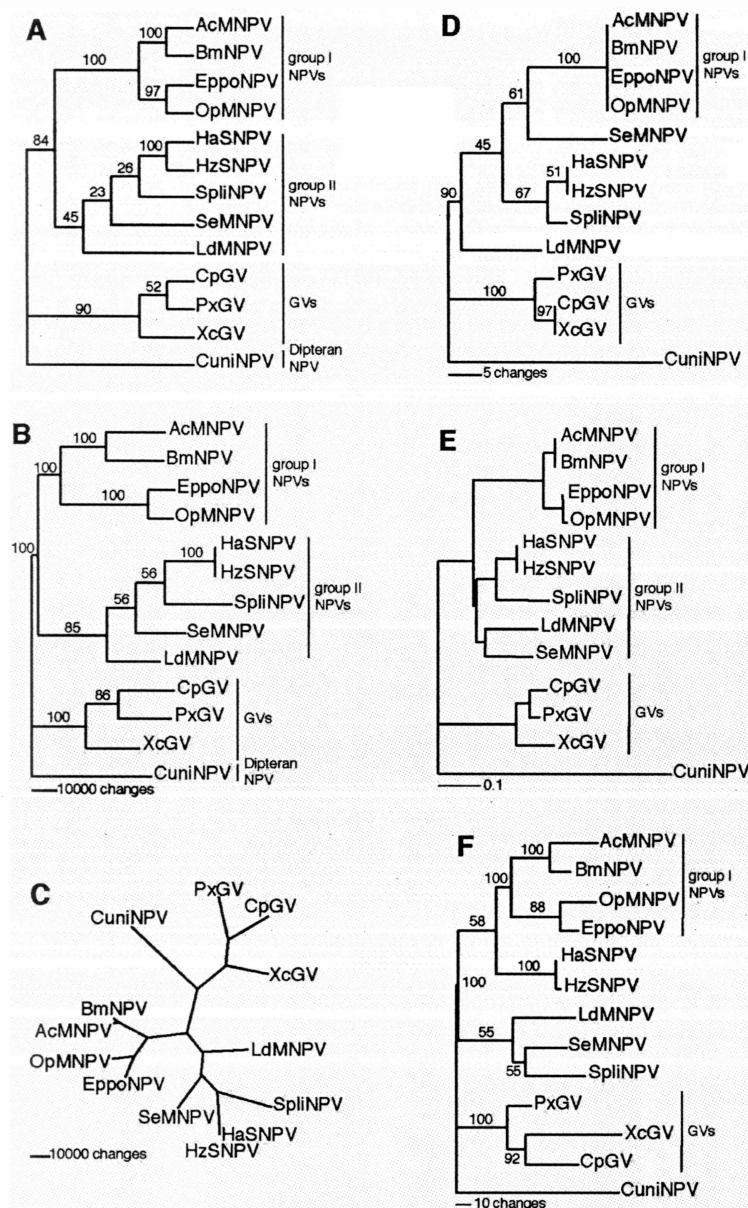


Figura 1.12. Filogenias de baculovirus basadas en datos de genomas completos. A: árbol por la regla de consenso de mayoría de los árboles más parsimoniosos obtenidos de análisis filogenéticos separados de cada uno de los 30 genes comunes; los números debajo de cada punto de ramificación, indican el porcentaje de genes individuales que posee esta rama. B: árbol más parsimonioso basado en el análisis de secuencias combinadas de los 30 genes comunes. C: versión no enraizada de B. D: uno de los dos árboles más parsimoniosos generados por análisis filogenético de pares vecinos. E: árbol de *Neighbor Joining* basado en la distancia relativa de puntos de quiebre (*breakpoints*). F: uno de los árboles más parsimoniosos generados por análisis filogenético del contenido de genes. Con la excepción de C, los árboles fueron enraizados usando CuniNPV. Con la excepción de A, los números adyacentes a cada nodo indican el porcentaje de soporte de *bootstrap* para cada nodo a partir de 1000 replicas. Abreviaturas: AcMNPV (*Autographa californica* MNPV), BmNPV (*Bombyx mori* NPV), CpGV (*Cydia pomonella* GV), CuniNPV (*Culex nigripalpus* NPV), EppoMNPV (*Epiphyas postvittana* MNPV), HaSNPV (*Helicoverpa armigera* SNPV), HzSNPV (*Helicoverpa zea* SNPV), LdMNPV (*Lymantria dispar* MNPV), OpMNPV (*Orgyia pseudotsugata* MNPV), PxGV (*Plutella xylostella* GV), SeMNPV (*Spodoptera exigua* MNPV), SpliMNPV (*S. litura* MNPV), XcGV (*Xestia c-nigrum* GV). Figura extraída de Herniou et al. (2003).

Los árboles “más robustos” han sido obtenidos con la filogenia mediante el **análisis de secuencias concatenadas** (Fig. 1.12B). Estos árboles agruparon (como era de esperar) a CuniNPV en un grupo separado del los baculovirus de lepidópteros y,

además, permitieron separar a los NPVs de los GVs y rescatar a los dos grupos de NPVs con altos valores de *bootstrap*.

Las filogenias basadas en el orden de genes por **análisis de proximidad de pares** (Fig. 1.12D) muestran una división entre CuniNPV y los NPVs y GVs; sin embargo, no puede establecer relaciones dentro del grupo I de los NPVs ni agrupar correctamente a los miembros del grupo II de NPVs. El **análisis de puntos de quiebre** (Fig. 1.12E) consigue agrupar correctamente los distintos grupos, pero a diferencia del anterior la robustez de los nodos no puede ser analizada estadísticamente, debido a que una matriz de datos no puede someterse a un análisis de *bootstrap*.

Los árboles generados **por contenido de genes** (Fig. 1.12F) no pueden resolver el grupo II de los NPVs debido al escaso número de genes propios de éste grupo. Por otra parte, estos árboles muestran artefactos del tipo atracción por brazo largo (*long branch attraction*). Este evento ocurre al comparar el contenido de genes comunes entre genomas grandes con genomas más pequeños. Indefectiblemente, los genomas grandes compartirán genes entre sí por una cuestión de azar, y tenderán a acercarse excluyendo a los más pequeños, independientemente de sus relaciones evolutivas.

En conclusión, solamente el análisis basado en la concatenación de secuencias comunes de baculovirus ha podido establecer relaciones filogenéticas valiosas entre los distintos miembros esta familia.

Evolución del contenido de genes

Herniou *et al.* (2003) han mapeado la evolución del contenido génico empleando los genes comunes a los baculovirus de lepidópteros y dípteros (Tabla 1.5) y a los genes comunes a los distintos géneros y grupos de baculovirus (Tabla 1.6). Estos autores ha graficando las adquisiciones y pérdidas de genes sobre el árbol generado a partir de la concatenación de 30 genes comunes a todos los baculovirus de lepidópteros y dípteros.

De éste análisis se aprecia que el antecesor de los baculovirus de lepidópteros habría ganado 45 genes, 32 de los cuales están actualmente presentes en los genomas totalmente secuenciados y 12 genes que fueron perdidos al menos en un linaje y uno (Ac 111) que parece haberse perdido en algunos linajes y luego readquirido en otros. Algunos de los 45 genes ganados habrían sido beneficiosos para colonizar a los lepidópteros; notoriamente, muchos de los 12 genes que se perdieron

subsiguientemente pertenecen al grupo de los llamados genes auxiliares, resaltando el concepto que son beneficiosos pero no esenciales.

Tabla 1.5. Genes presentes en los genomas de los baculovirus totalmente secuenciados

| Función génica | Genes presentes en todos los baculovirus ^a | Genes adicionales presentes en todos los baculovirus de lepidópteros |
|--------------------------------|---|---|
| Replicación | <i>lef-1</i> (Ac14), <i>lef-2</i> (Ac6), <i>dna-pol</i> (Ac65), <i>helicase-1</i> (Ac95) | <i>dbp1</i> (Ac25), <i>lef-3</i> (Ac67), <i>ie-1</i> (Ac147), <i>mø53</i> (Ac139) |
| Transcripción | <i>p47</i> (Ac40), <i>lef-8</i> (Ac50), <i>lef-9</i> (Ac62), <i>vif-1</i> (Ac77), <i>lef-4</i> (Ac90), <i>lef-5</i> (Ac99) | <i>pp31/39K</i> (Ac36), <i>lef-6</i> (Ac28), <i>lef-11</i> (Ac37) |
| Proteína estructurales | <i>efp</i> (Ac23), <i>gp41</i> (Ac80), <i>odv-ec27</i> (Ac144), <i>odv-e56</i> (Ac148), <i>p6.9</i> (Ac100), <i>p74</i> (Ac138), <i>vp91/p95</i> (Ac83), <i>vp39</i> (Ac89), <i>vp1054</i> (Ac54) | <i>fp25K</i> (Ac61), <i>odv-e18</i> (Ac143), <i>odv-e25</i> (Ac94), <i>odv-e66</i> (Ac46), <i>pk1</i> (Ac10), <i>polh/gran</i> (Ac8). |
| Auxiliares ^b | <i>alk-exo</i> (Ac133) | <i>fgf</i> (Ac32), <i>ubiquitin</i> (Ac35) |
| Desconocida | <i>38K</i> (Ac98), <i>Ac22</i> , <i>Ac68</i> , <i>Ac81</i> , <i>Ac92</i> , <i>Ac96</i> , <i>Ac109</i> , <i>Ac115</i> , <i>Ac119</i> , <i>efp</i> (Ac23) | <i>38.7K</i> (Ac13), <i>Ac29</i> , <i>Ac38</i> , <i>Ac53</i> , <i>desmoplakin</i> (Ac66), <i>Ac75</i> , <i>Ac76</i> , <i>Ac78</i> , <i>tlp20</i> (Ac82), <i>Ac93</i> , <i>Ac106</i> , <i>Ac110</i> , <i>Ac145</i> , <i>Ac146</i> , <i>p40</i> (Ac101), <i>p12</i> (Ac102), <i>p45</i> (Ac103) |

^a Se indican los nombres de los genes, de los que se conocen los productos y se agregan entre paréntesis la identificación en el genoma de AcMNPV (Ac seguido por un número). En los casos en que el producto génico no ha sido caracterizado, solamente se indica su designación en el genoma de AcMNPV.

^b Los genes auxiliares son aquellos que no están involucrados directamente en la expresión viral, la replicación ni en la formación de partículas virales.

Tabla 1.6. Genes exclusivos de NPVs, de sus grupos filogenéticos y exclusivos de los GVs. Se indican los nombres de los genes, de los que se conocen los productos y se agregan entre paréntesis la identificación en el genoma de AcMNPV (Ac seguido por un número). En los casos en que el producto génico no ha sido caracterizado, solamente se indica su designación en el genoma de AcMNPV.

| | Genes exclusivos de los NPVs de lepidópteros (14) ^a | Genes exclusivos de los NPVs del grupo I (14) | Genes exclusivos de los NPVs del grupo II (3) ^b | Genes exclusivos de los GVs (27) |
|--------------|--|---|---|--|
| Virus | NPVs grupo I y II | AcMNPV, BmNPV, OpMNPV y EppoNPV, RouNPV | LdMNPV, SeMNPV, HaSNPV, HzSNPV, MacoNPV-80/2, SplitMNPV y MacoNPV-96-B | Cp, Px, Xc y Phop |
| Genes | <i>arif1</i> (Ac21), <i>iap2</i> (Ac71), <i>orf1629</i> (Ac9), <i>pkip</i> (Ac24), <i>pp34</i> , <i>calyx/pep</i> (Ac131), <i>vp80</i> (Ac104), <i>Ac108</i> , <i>Ac17</i> , <i>Ac19</i> , <i>Ac26</i> , <i>Ac34</i> , <i>Ac55</i> , <i>Ac57</i> , <i>Ac59</i> | <i>vp80</i> (Ac104), <i>ptp-1</i> (Ac1), <i>lef-7</i> (Ac125), <i>iap-1</i> (Ac27), <i>gp64</i> (Ac128), <i>gta</i> (Ac42), <i>ie2</i> (Ac151), <i>p24</i> (Ac114), <i>Ac5</i> , <i>Ac16</i> , <i>Ac73</i> , <i>Ac108</i> , <i>Ac124</i> , <i>Ac132</i> , | Según Herniou <i>et al.</i> (2002) <i>Maco136</i> (Ld55/Se107) <i>Maco42</i> (Ld129/Se30) <i>Maco70</i> (Ld141/Se52) Según Li <i>et al.</i> (2002) <i>Maco136</i> (Ld55/Se107) <i>Maco34</i> (Ld124/Se15) <i>Maco135</i> Ld55a/Se106a) | <i>iap5</i> (Xc137), <i>mpnasa</i> (Xc40), <i>Xc2</i> , <i>Xc7-8</i> , <i>Xc17-19</i> , <i>Xc25-26</i> , <i>Xc29</i> , <i>Xc34</i> , <i>Xc39</i> , <i>Xc47</i> , <i>Xc54</i> , <i>Xc85-86</i> , <i>Xc90</i> , <i>Xc113</i> , <i>Xc116</i> , <i>Xc136</i> , <i>Xc142-143</i> , <i>Xc169</i> , <i>Xc172-173</i> , <i>Xc178</i> . |

^a Entre paréntesis se indica el número de genes correspondientes a cada género o grupo.

^b No hay coincidencia de acuerdo con los genes exclusivos de NPVs del grupo II, se indican aquí las dos propuestas publicadas.

Abreviaturas: AcMNPV (*Autographa californica* MNPV), BmNPV (*Bombyx mori* NPV), CpGV (*Cydia pomonella* GV), CuniNPV (*Culex nigripalpus* NPV), EppoMNPV (*Epiphyas postvittana* MNPV), HaSNPV (*Helicoverpa armigera* SNPV), HzSNPV (*Helicoverpa zea* SNPV), LdMNPV (*Lymantria dispar* MNPV), OpMNPV (*Orgyia pseudotsugata* MNPV), PxGV (*Plutella xylostella* GV), SeMNPV (*Spodoptera exigua* MNPV), SplitMNPV (*S. litura* MNPV), XcGV (*Xestia c-nigrum* GV).

El grupo que evolucionó como baculovirus de lepidóptero se habría diversificado en dos grandes géneros: NPVs y GVs; los NPVs habrían ganado 14 genes específicos y

los GVs, 27. Sólo se ha atribuido la función de seis de estos genes de NPVs y dos de los genes de GVs (Tabla 1.5). Tres genes específicos de los NPVs codifican para proteínas estructurales (*vp80*, *pp34/calyx* y ORF 1629). Otro gen, el *arif-1*, podría estar involucrado en las diferencias de las arquitecturas subcelulares que se observan durante las infecciones de los GVs y NPVs. Otra característica importante es que ambos géneros poseen genes específicos, tales como los inhibidores de apoptosis, *iap2* en los NPVs e *iap5* en los GVs. El restante gen, con función asignada en los GVs, es una metaloproteasa (*mpnasa*) y contribuiría a la degradación de la larva favoreciendo la liberación de los cuerpos de inclusión al medio ambiente.

Graficando la presencia de genes en cada virus en la filogenia por concatenación de genes (Fig. 1.13), Herniou *et al.* (2003) clarificaron los eventos de ganancia y pérdida de genes que habían acontecido en los distintos géneros y grupos de baculovirus.

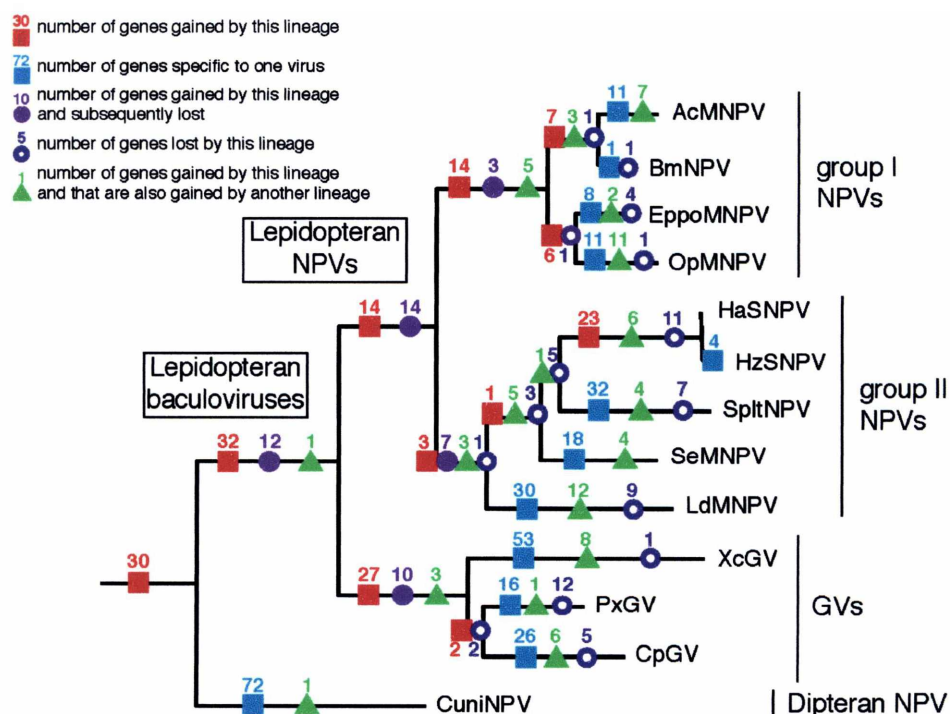


Figura 1.13. Mapeo del contenido de genes. Hipótesis más parsimoniosa de los cambios en el contenido de genes durante la evolución de los baculovirus. El contenido de genes se ha mapeado en el árbol derivado del análisis de secuencias combinadas de 30 genes comunes. Los genes han sido subdivididos en cinco grupos basándose en el patrón de adquisición y pérdida: 30 ■, número de genes ganados por este linaje; 72 ■, número de genes específicos para un virus; 10 ●, número de genes ganados por este linaje y perdidos posteriormente en alguno de los miembros del linaje; 5 ○, número de genes perdidos por este linaje; 1 ▲, número de genes ganados por este linaje y que también fueron ganados por otro linaje. Extraído de Herniou *et al.* (2003).

Estos análisis indicarían, que el grupo I de NPVs había adquirido al menos 17 genes, 14 de los cuales permanecen aún y se habrían perdido en 3 en algunos linajes (*ets*, *etm*, *vp80a*). De estos genes específicos, cuatro codificarían para proteínas estructurales (*gp64*, *odv-e26*, *ptp1*, *vp80a*). El más estudiado de ellos -*gp64*-, posiblemente fue adquirido a través de una recombinación ocurrida en una coinfección con un *Ortomyxovirus* o "robado" de un huésped (Pearson & Rohrmann, 2002). En los NPVs del grupo I, *gp64* habría reemplazado a la proteína *envelope fusión protein (efp)*, la cual es responsable de la fusión de las nucleocápsides en los NPVs del grupo II y en los GVs. La adquisición de *gp64* representa el mejor ejemplo de un desplazamiento de genes no ortólogo en los baculovirus. La incorporación de nuevos genes, en particular la ganancia de *gp64*, habría permitido la diversificación del grupo I de NPVs al ampliar su rango de huéspedes.

Muchos de los genes de los baculovirus parecen haber sido adquiridos varias veces a lo largo de la evolución. Según Herniou *et al.* (2003), 33 genes parecen haber sido adquiridos al menos dos veces y 9 de ellos, tres veces (*Ac63*, *ctl1*, *ctl2*, *He65*, *hel-2*, *p35*, *ptp2*, *rr1*, *rr2a*). Estos datos señalarían la alta plasticidad de los genomas de los baculovirus para incorporar genes beneficiosos a sus genomas. Con respecto a los GVs, hasta el momento, los genes exclusivos de los genomas totalmente secuenciados no han permitido establecer asociaciones entre fenotipo y genotipo. Es posible se obtengan datos de este tipo a medida que se secuencien nuevos genomas.

Adquisición y reordenamiento de genes

Tal como se ha expresado anteriormente, los baculovirus tienen la capacidad de incorporar genes en sus genomas. Algunos de ellos, otorgarán ventajas evolutivas y por ende serán mantenidos gracias a la presión de selección del medio ambiente. Muchos de sus genes reconocen homólogos en otros organismos; sin embargo, los mecanismos que han hecho posible la adquisición de estos genes aún no han sido descritos en detalle. Por otra parte, se ha documentado que los genomas de los baculovirus efectúan reordenamientos en sus genomas y por este mecanismo algunos genes se perderían, otros se duplicarían y otros presentan ventajas respecto a las nuevas posiciones que ocupan. La adquisición de genes y el reordenamiento de los

mismos contribuirían en la generación de la diversidad genómica que presentan los baculovirus.

A continuación, se describen los posibles mecanismos de incorporación de nuevos genes y de recombinación en estos genomas.

Adquisición de genes nuevos, orígenes

El análisis de la similitud de los marcos de lectura abiertos (ORFs) de los baculovirus indica que los mismos poseen genes homólogos en otros organismos, tales como eucariotas, procariotas y otras familias de virus (Tabla 1.7).

La incorporación de elementos transponibles procedentes del huésped podría ser la vía de adquisición de nuevos genes (Jehle *et al.*, 1998). Mediante esta vía se habrían adquirido genes de insectos tales como *egt*, *sod*, *iaps*, *vif-1*, entre muchos otros. La adquisición de genes bacterianos (*quitinasa*) o procariotas (*pnk/pn*), podrían tener su origen en la bacterias simbiotes intracelulares, presentes en muchas especies de insectos (Werren, 1997). Sin embargo, los mecanismos que mediaron la transferencia de genes desde las bacterias hacia los baculovirus aún permanecen sin dilucidarse.

Tabla 1.7. Algunos ejemplos de genes de baculovirus con posibles orígenes en genes homólogos de otros virus, eucariotas y procariotas. Esta tabla ha sido compuesta de acuerdo con datos obtenidos de Posee & Rohrmann (1997).

| Gen | Nombre | Localización del homólogo conocido |
|------------------|---|---|
| <i>Ac145/150</i> | | Similar a proteína con motivos de unión a quitina de entomopoxvirus |
| <i>alk-exo</i> | Exonucleasa alcalina | Eucariotas y procariotas |
| <i>cath</i> | Catepsina | Eucariotas |
| <i>ctf</i> | Conotoxina | Eucariotas (caracoles marinos, del género <i>conus</i>) |
| <i>dna-liq</i> | DNA ligasa | Poxvirus |
| <i>dna-pol</i> | DNA polimerasa | Eucariotas, procariotas y otras familias virales |
| <i>dUTPase</i> | Desoxi UTPasa | Eucariotas, procariotas, otras familias virales. |
| <i>egt</i> | Ecdisona glucosil transferasa | Insectos |
| <i>fgf</i> | Factor de crecimiento de fibroblastos | Mamíferos e Insectos |
| <i>gp37</i> | Spindilina | Similar a la proteína <i>Spindilin</i> de los entomopoxvirus (<i>Poxviridae</i>). |
| <i>gp64</i> | Glicoproteína viral, proteína fusogénica | Glicoproteína del virus Thogoto (<i>Orthomyxoviridae</i>) |
| <i>gta</i> | Transactivador de transcripción general | |
| <i>hel-2</i> | Helicasa | Helicasa mitocondrial de levaduras |
| <i>iaps</i> | Inhibidor de apoptosis | Eucariotas |
| <i>pcna</i> | Antígeno de proliferación nuclear | Eucariotas |
| <i>pk2</i> | Proteína quinasa, similar a F2 alfa | Eucariotas |
| <i>pnk/pni</i> | Polinucleótido quinasa y ligasa | Fagos, levaduras, plantas |
| <i>ptp</i> | Proteína tirosina fosfatasa | Eucariotas, procariotas y poxvirus |
| <i>rr1, rr2</i> | Ribonucleótido reductasa, subunidades 1 y 2 | Eucariotas, procariotas y otras familias de virus |
| <i>sod</i> | Superóxido dismutasa | Eucariotas, procariotas y otras familias de virus |
| <i>ubi</i> | Ubiquitina | Eucariotas y procariotas |
| <i>chi</i> | Quitinasa | Eucariotas y procariotas |
| <i>vif-1</i> | Integrasa/resolvasa | Levaduras y procariotas |

No sólo se han documentado posibles adquisiciones de genes hacia los baculovirus, sino que también se ha propuesto que al menos un gen de éstos ha sido transferido a otros genomas. Recientemente, Malik *et al.* (2000) y Rohrmann & Karplus (2001) han suministrado evidencias de la transferencia del gen *efp* desde los baculovirus al retrotransposón de insectos *gypsy-like*; este evento resultó en la conversión de éste retrotransposón en un retrovirus endógeno de insectos llamado *Errantivirus* perteneciente a la familia *Metaviridae*.

Transposones

La presencia de transposones en los genomas de los baculovirus ha sido ampliamente documentada, hasta el momento se han detectado tres transposones distintos: TED, TCI4.7 y TCp3.2.

El primer transposón detectado en un baculovirus, el elemento TED, fue encontrado en el genoma de AcMNPV (Miller, D. W. & Miller, L. K. 1982; Friesen & Nissen, 1990). TED es propio de lepidópteros, posee 7,5 kpb de largo y contiene tres ORFs superpuestos, flanqueados por repeticiones terminales largas (LTRs) en los extremos 5' y 3'. Dos de los genes codificados por TED, se parecen a las proteínas GAG y POL de retrovirus.

En CpGV se ha detectado un transposón TCI4.7 originario del genoma de *Cryptophlebia leucotreta* (*C. leucotreta*). Este transposón se detectó a partir de infecciones mixtas con los virus CpGV y *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus (CIGV) sobre larvas de *C. leucotreta* (Jehle *et al.*, 1995). Este transposón de 4,7 kpb de largo, posee un marco de lectura de una proteína muy similar a una transposasa del tipo Tc-1, flanqueado por repeticiones invertidas de 29 nt a ambos flancos.

En CpGV también se ha encontrado otro elemento móvil TCp3.2 (Jehle *et al.*, 1997). Tc3.2 es originario del genoma de *Cydia pomonella* y posee 3,2 kpb de largo con repeticiones inversas terminales (ITR) de 756 pb y un gen de transposasa con un marco de lectura discontinuo. Recientemente, se ha informado que este elemento se ha invertido en el genoma del granulovirus de *Cydia pomonella* mediante una recombinación homóloga durante la infección de una larva (Arends & Jehle, 2002).

Varios autores han sugerido que los transposones podrían haber sido vehículos de información génica entre distintos virus, entre virus y huéspedes o entre estos últimos a través de los baculovirus (Friesen, 1993; Jehle *et al.*, 1998).

Secuencias repetidas

Las regiones homólogas (*hrs*) se han detectado en la mayoría de los genomas secuenciados de NPVs de lepidópteros. Para los GVs la situación es menos clara Hayakawa *et al.* (1999) identificaron nueve *hrs* posibles dentro del genoma del granulovirus *Xestia c-nigrum* (XcGV). Estos comprenden de tres a seis repeticiones directas de 120 pb en los cuales el core palindrómico está ausente. Para el caso del granulovirus de *Plutella xylostella* (PxGV) sus *hrs* se parecen más a los *hrs* de los NPVs en cuanto la unidad repetida está centrada alrededor del un palíndromo, pero este es más corto que los respectivos de NPVs, y posee sólo 30 pb. La unidad repetida de aproximadamente 105 pb es más larga que las de NPVs. Cuatro *hrs* largos se han descrito en PxGV, cada uno contiene de 10 a 26 copias de la unidad repetida.

La situación es un tanto diferente para los granulovirus CpGV y PhopGV, estos carecen de regiones *hrs* típicas, sin embargo análisis de *dot plot* de sus genomas han revelado la presencia de secuencias repetidas del tipo palíndromo imperfecto a lo largo del genoma, sin ningún arreglo espacial determinado (13 en CpGV y 10 en PhopGV). El tamaño de las repeticiones en CpGV es en general homogéneo (75 pb) en tanto que en PhopGV los tamaños varían de 365 pb a 56 pb. Seis de las repeticiones de CpGV están dentro de ORFs predichos, en tanto que en PhopGV sólo tres de ellas interrumpen genes. Además, en los genomas de CpGV, PhopGV y CIGV (Luque *et al.*, 2001; Croizier *et al.*, 2002; Lange & Jehle, 2002) se han encontrado regiones con similitudes a regiones *ori-no-hrs*. En CpGV esta región incluye distintas clases de repeticiones. Una región rica en AT que muestra 6 repeticiones imperfectas, seguido por tres repeticiones imperfectas largas. Más recientemente Jehle (2002) ha demostrado que esta región se amplifica *in vivo*. Este último autor ha postulado que la expansión de esta región, o la concatenación de secuencias repetidas podría dar inicio a la traslocación de estas secuencias a otras regiones genómicas generando *oris* adicionales en el genoma viral.

Recombinaciones en herpesvirus, poxvirus y baculovirus

Heldens *et al.* (1998) fueron los primeros en notar la presencia, en diversos genomas de baculovirus, de una región cuyo contenido y ordenamiento de genes permanecía constante, pese a severas reorganizaciones en otros sectores de estos genomas. Esta región contenía entre otros genes a la *helicasa*. Lamentablemente, aún no se han determinado los parámetros funcionales que mantienen constante la organización génica en los baculovirus en determinadas regiones, mientras que en paralelo permiten una divergencia de secuencia. Es posible que las regiones intergénicas limiten el movimiento de genes. En particular, la pérdida de algunas de ellas podría inactivar genes o cambiar el patrón génico de expresión temporal. De esta forma los reordenamientos posibles estarían restringidos por la ubicación de un gen dentro de una región promotora "correcta".

La presencia de regiones conservadas y divergentes en los genomas de los baculovirus con respecto al orden de genes es reminiscente de la situación en otros grandes virus a DNA, como los herpes y poxvirus, en los que las regiones centrales conservadas y regiones terminales divergentes son características comunes (Gompels 1995; Senkevich *et al.*, 1996). Estos patrones de organización comunes posiblemente sean un reflejo de un modo común de replicación y evolución entre estos virus a DNA (Heldens *et al.*, 1998).

Los mecanismos fundamentales que gobiernan las reorganizaciones en los herpesvirus podrían ser similares a las de los genomas de los baculovirus (Davison & Mc-Geoch, 1995). El mecanismo θ (theta) de replicación del DNA, podría permitir mecanismos de reordenamientos durante las primeras rondas de amplificación genómica (bidireccional usando múltiples orígenes al mismo tiempo) tal como lo postuló Kool *et al.* (1995). Este tipo de replicación permitiría reordenamientos en los cuales genes o bloques de genes serían fácilmente invertidos bajo el enrollamiento de la progenie de DNA producida. Mientras el mecanismo theta de replicación proceda más lejos, más chance hay que ocurran reordenamientos.

Reordenamientos intragenómicos e intergenómicos

A continuación, se describen varios casos de reorganizaciones intragenómicas, tanto en NPVs como en GVs.

Si bien en los baculovirus no se han determinado los mecanismos que median las recombinaciones, se sabe que algunas secuencias invertidas están flanqueadas por secuencias repetidas. Generalmente los eventos de recombinaciones suelen ocurrir entre genomas maduros y tienen por función reparar daños ocurridos durante la replicación (Crouch & Passarelli, 2002). La secuencia completa de varios baculovirus ha provisto evidencia sobre la posible contribución a la generación de diversidad genómica de la recombinación entre regiones homólogas *hrs* y entre genes homólogos. Los genomas de los baculovirus se caracterizan por poseer ORFs repetidos (por ejemplo, los genes *bro*) y secuencias *hrs*. Se ha sugerido que los *hrs* podrían ser sitios de recombinación dentro o entre genomas de baculovirus (Hayakawa *et al.*, 2000). Por otra parte, López-Ferber *et al.* (2001) han demostrado que las recombinaciones intraespecíficas en el genoma de BmNPV están involucrados en el intercambio de genes *bro* en este genoma.

En el caso de las secuencias *hrs*, los análisis comparativos entre genomas estrechamente relacionados de los NPVs del grupo I (AcMNPV, BmNPV y OpMNPV) demostraron que la organización de los ORFs y *hrs* está generalmente conservada. Sin embargo, las pocas diferencias que se observan se deben a inversiones de regiones genómicas, que están acompañadas por secuencias *hrs* en sus adyacencias. Por ejemplo: la región OpMNPV ORF1-10 tiene una orientación invertida con respecto a BmNPV (ORF130-135 y 1-3) y AcMNPV (ORF1, 2, 4-6 y 8-10). También, BmNPV ORF24 (*fgf*) tiene una orientación inversa comparada con sus homólogos en AcMNPV (ORF32) y en OpMNPV (ORF27). Ambas inversiones están flanqueadas por *hrs*; AcMNPV ORF1-10 está flanqueada por *hr1* y *hr1a* y el ORF 24 de BmNPV está flanqueado por *hr2-L* y *hr2-R* (Ayres *et al.*, 1994; Ahrens *et al.*, 1997, Gomi *et al.*, 1999).

Con respecto a los genes *bro*, en el genoma de MacoNPV los mismos flanquean diversas regiones: a) en aquellas que presentan nuevos genes, b) otras en las cuales el orden génico muestra inversiones e inserciones o c) en donde las direcciones transcripcionales están invertidos en comparación a otros baculovirus. Por ejemplo, los genes *bro* de MacoNPV a, b, y c se localizan en regiones que incluyen una gran inversión en la orientación de ORFs (ORFs 16–36) con respecto al genoma del baculovirus SeMNPV (ORFs 21 a 13). Además, recientemente Li, L. (2002) encontró que los genes *bro* se presentaron en tres regiones diferentes, en donde existen diferencias entre las variantes virales MacoNPV 90/2 y MacoNPV-96B. En LdMNPV, a diferencia de MacoNPV, los genes *bro* se presentan en bloques cercanos a los *hrs* y

uno de los bloques de genes *bro* está asociado a un área de recombinación frecuente (Kuzio *et al.*, 1999).

Con respecto a los GVs, a pesar PxGV y XcGV presentan *hrs*, CpGV y PhopGV carecen de los mismos. Sin embargo, CpGV y PhopGV poseen regiones repetidas de tipo palíndrome imperfecto a lo largo de sus genomas. En la secuencia de PhopGV se han observado dos regiones invertidas con respecto al genoma del CpGV, ambas inversiones poseen tamaños similares (5,6 y 4,7 kpb respectivamente). Una de ellas abarca los ORFs PhopGV 56-60, contiene tres genes propios de PhopGV (ORFs 57, 58 y 59), y está invertida respecto a los ORFs 62-64 de CpGV. Notoriamente, en CpGV esta región está cercana a un *bro* (ORF Cp63), mientras que PhopGV presenta dos secuencias repetidas, una (la N° 5) 2 kpb *upstream* al ORF 56 y otra (la N° 6) dentro de la inversión de PhopGV. Una segunda inversión en el genoma de PhopGV con respecto a CpGV se ha localizado en la región contenida por los genes PhopGV 118-113 correspondiente a CpGV 121-126. En CpGV se ha detectado una secuencia repetida en las cercanías del ORF 121, en tanto que en PhopGV no se han detectado secuencias repetidas en las cercanías

En los párrafos anteriores se han descrito reorganizaciones (inversiones) intragenómicas, ahora se describirán alguna recombinaciones entre dos genomas distintos. Recientemente, Li, L. *et al.* (2002), han descrito que algunos genes de MacoNPV son altamente similares a genes de XcGV. Estos datos indicarían que estos genomas habrían intercambiado genes por recombinación intergenómica entre dos especies, a partir de una coinfección del mismo huésped. Estas reorganizaciones parecen haberse producido en adyacencia de genes *bro* y/o por regiones *hrs* o estar flanqueadas por las mismas.

En suma, la adquisición y pérdida de genes y el reordenamiento de los mismos han contribuido a generar variabilidad en la familia *Baculoviridae*.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Reactivos comerciales

Productos Químicos, enzimas, medios de cultivo de células y bacterias material plástico

Las diversas reactivos y enzimas empleados en el trabajo de tesis fueron adquiridos de distintas fuentes. En el caso de los solventes, los mismos provinieron de las siguientes compañías: Carlo Erba (Milano, Italia), Fluka (Suiza), Mallinkrodt (EE.UU.), Merck (Alemania), Sigma (St. Louis, EE.UU.). Todos los solventes empleados fueron de calidad analítica.

Las enzimas y reactivos utilizados durante esta tesis procedieron de las siguientes fuentes: Sigma (St. Louis, EE.UU.), Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania), Stratagene (La Jolla, EE.UU.), Promega (Madison, EE.UU.), New England Biolabs (Beverly, EE.UU.), Gibco BRL (Gaithersburg, EE.UU.), DAKO (Glostrup, Denmark), (BIO-RAD, Hercules, CA, EE.UU.) e Invitrogene (EE.UU.). Todos estos reactivos y enzimas poseían grado de Biología Molecular.

El medio de cultivo de células eucariotas TC-100 fue provisto por Gibco-BRL (Grand Island, EE.UU.) y el medio TNMF-H por Sigma Aldrich (EE.UU.). Ambos medios se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (Bioser, Argentina), gentamicina 0,1 mg/ml y anfotericina 25 µg/ml (TC-100-completo y TNMF-H completo).

Los componentes de los medios de cultivo para bacterias se adquirieron en Difco (Detroit, EE.UU.). Las cajas de Petri y los frascos de poliestireno, utilizados en el cultivo de células fueron provistos por Nunc (Nunc, Roskilde, Dinamarca) y Corning (EE.UU.). Las placas de ELISA "Maxisorb" se adquirieron de Nunc (Nunc, Roskilde, Dinamarca).

Soluciones

Todas las soluciones preparadas se esterilizaron por tratamiento de calor en autoclave a 121 °C durante 20 min. a 1 atmósfera (Atm.) de sobre presión, con la excepción de la solución de Dodecil sulfato de sodio (SDS). Las soluciones de antibióticos y antifúngicos, medios de cultivo, albúmina sérica bovina (BSA), suero fetal bovino, fueron esterilizadas por filtración (poro: 0,22 µm). Para la preparación de las soluciones se empleó agua bidestilada la cual además fue filtrada por columna de intercambio iónico y esterilizada en autoclave.

Medios de cultivo para bacterias

Medio *Luria Bertrami* (LB): Extracto de levadura 5 g, Triptona 10 g, NaCl 10 g, agua hasta 1.000 ml.

Medio *Terrific broth*: se disolvieron 12 g de bactotriptona, 24 g de extracto de levadura en 800 ml de agua bidestilada. Posteriormente, se añadió 4 ml de glicerol (aproximadamente 5 g) y se llevó el volumen a 900 ml con agua bidestilada. La solución se esterilizó por autoclave y se añadió 100 ml de solución estéril de KH_2PO_4 (0,17 M) y K_2HPO_4 (0,72 M).

Medio LB sólido: medio LB líquido más agar-agar 1,5% (p/p).

Medios para desarrollo de competencia

Medio LB con bajo sodio para crecimiento de bacterias: extracto de levadura 5 g, Triptona 20 g, NaCl 0,5 g, agua hasta 1.000 ml.

Solución de stock para bacterias competentes químicas: CaCl_2 100 mM, MgCl_2 100 mM, glicerol 30%.

Soluciones para la preparación de plásmidos según el protocolo de lisis por álcali

Alcoholes: Etanol 96% y 70%.

Solución I: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM.

Solución II: NaOH 0,2 N; SDS 1%.

Solución III: AcK 5 M (Ac^- 5 M, K^+ 3 M) pH 4,8.

Buffer TE 1 X: Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) EDTA 1 mM.

SDS 10%: 10 g de Dodecil sulfato de sodio (SDS) en 100 ml de agua destilada.

NAasa libre de DNAasa: se disolvió RNasa-pancreática (RNasa A), 10 mg/ml en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5); NaCl 15 mM. Esta suspensión se calentó 15 min. a 100 °C, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se alicuotó y se guardó a -20 °C.

NaAc 3 M: se pesaron 246,1 g de AcNa y se disolvió en agua bidestilada, luego se llevó a pH a 5,2 con ácido acético glacial (aproximadamente 106 ml) y se añadió agua en cantidad suficiente para (csp) 1.000 ml.

Fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1): 25 partes de fenol (pH 7,6); 24 partes de Cl₃CH y 1 parte de alcohol isoamílico.

Soluciones de antibióticos 1.000 X: los antibióticos ampicilina o kanamicina se disolvieron en agua bidestilada estéril a una concentración de 100 mg/ml y se esterilizó por filtración (poro: 0,22 µm).

Soluciones para el análisis de ácidos nucleicos mediante electroforesis

Solución de resuspensión de DNA TE 0,1 X: EDTA 0,1 mM, Tris-HCl 1 mM (pH 7,6).

Buffer de corrida TAE (Tris-HCl, ácido acético, EDTA) 1 X: Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM.

TAE 50 X: 242 g Tris base; 57,1 ml ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0,5 M (pH 8,0), H₂O csp 1.000 ml

Solución stock de bromuro de etidio (BrEt) (2,7-diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridinium bromide): BrEt 10 mg/ml ó 50 mg/ml en agua, se guardó en botella color caramelo.

Geles de agarosa: agarosa 0,3% - 1,5% en *buffer* TAE 1 X, bromuro de etidio (BrEt) 0,5 µg/ml.

Solución para siembra de muestras de DNA: TAE 1 X, glicerol 50%, colorantes: xilen cianol FF y azul de bromofenol.

Solución de fijado de DNA a geles: ácido tricloroacético (TCA) al 10%.

Hibridaciones de ácidos nucleicos (Southern blot)

SSC 20 X: 175,3 g de NaCl (3 M); 88,2 g de citrato de sodio trisódico (0,3 M). El pH se ajustó a 7 con HCl y luego se llevó el volumen a un litro. Se esterilizó en autoclave.

Solución Denhardt 50 X: Ficoll 1% p/v (5 g), polivinilpirrolidona 1% p/v (5 g), BSA 1% p/v (5 g), agua bidestilada 500 ml, según Denhardt (1966). La solución se esterilizó por filtración (poro: 0,45 µm).

Buffer de hibridación: Denhardt 5 X; SSC 6 X; SDS 0,1%; Tris-HCl 0,5 M (pH 7,4-7,5); RNA de levadura 200 µg/ml.

Solución de depurinación: HCl 0,2 N.

Solución de desnaturalización: NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M. Para un litro se pesaron 20 g de NaOH y 87,66 g de NaCl.

Solución de neutralización: Tris-HCl 1,0 M (pH 7,5); NaCl 1,5 M. Se pesó 121,1 g de Tris base, 87,66 g, se añadió 55 ml de HCl fumante y se llevó a pH.

Composición de los buffers de lavado del kit AlkPhos DIRECT (Amersham Pharmacia)

Buffer de lavado primario: [Urea 2 M; SDS 0,1%; fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0); NaCl 150 mM, reactivo de boqueo 0,2%; MgCl₂ 1 mM]

Buffer de lavado secundario solución stock 20 X: Tris base 1 M, NaCl 2 M, pH 10.

Buffer de lavado secundario solución de trabajo: Tris base 50 mM, NaCl 100 mM, 2 mM Mg⁺².

Buffers utilizados en reacciones enzimáticas

Buffer de ligación 10 X: Tris-HCl 300 mM (pH 7,8), MgCl₂ 100 mM, ditioneitol 100 mM, ATP 5 mM.

Buffer de Klenow 10 X: Tris-HCl 500 mM (pH 7,2), MgCl₂ 100 mM, ditioneitol 1 mM.

Buffer NEB II: Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM, ditioneitol 1 mM (pH 7,9).

Buffer de Taq polimerasa, 10 X: Tris-HCl 100 mM (pH 9,0), KCl 500 mM Tritón X-100 1%.

Buffer de Pfu DNA polimerasa 10 X: Tris-HCl 200 mM (pH 8,8), KCl 100 mM, MgCl₂ 20 mM, NH₄2(SO₄) 100 mM; MgSO₄ 20 mM, BSA 1 mg/ml; Tritón X-100 1%.

Soluciones de purificación de gránulos

Solución de homogeneización de larvas (TE, SDS 1%): Tris-HCl 0,01 M; EDTA 0,001 M; SDS 1% (pH 7,8).

Soluciones de gradiente de sacarosa: 40-65% (p/p) sacarosa en TE o agua bidestilada estéril.

Buffer de disolución de gránulos o buffer alcalino: Na₂CO₃ 0,1 M; NaCl 0,17 M; EDTA 0,01M.

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

Soluciones comunes a los geles Tris-Glicina y Tris-Tricina

Solución para siembra de muestras de SDS-PAGE 4 X (loading buffer o sample buffer): Tris-HCl 200 mM (pH 6,8), glicerol 40%, SDS 8%, 2-mercaptoetanol 400 mM (20%), azul de bromofenol 0,1%.

Solución de tinción: Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% (p/v); metanol 50% (v/v); ácido acético 10% (v/v).

Solución de desteñido: etanol 30% (v/v), ácido acético 10% (v/v).

Soluciones para geles de SDS-PAGE (Tris Glicina)

El gel de poliacrilamida se preparó de acuerdo con las cantidades indicadas en la tabla 2.1.

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

Tabla 2.1. Reactivos necesarios para preparar geles de SDS-PAGE 15%.

| Soluciones | Gel separador (<i>runing</i>) 15% | Gel concentrador (<i>stacking</i>) 5% |
|---|--|--|
| Agua bidestilada | 2,88 ml | 6,8 |
| Tris-HCl | 3,0 ml (pH 8,8) | 1,25 (pH 6,8) |
| SDS 10% | 120 μ l | 100 μ l |
| Acrilamida:Bisacrilamida (30:0,8)% | 6 ml | 1,7 ml |
| Persulfato de amonio (PSA) | 60 μ l | 50 μ l |
| TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletlen-diamina) | 6 μ l | 5 μ l |
| Volumen final | 12 ml | 10 ml |

Geles de poliacrilamida-tricina-SDS

Solución T 49,5%, C 3%: Acrilamida (p/v) 48 g, Bisacrilamida (p/v) 1,5.

Buffer del gel: Tris-HCl 3,0 M (pH 8,45); SDS 0,3%.

Buffers de corrida: Buffer anódico 1 X: Tris-HCl 0,2 M (pH 8,9); SDS 0,1%.

Buffer catódico 1 X: Tris base 0,1 M (pH 8,25); Tricina 0,1 M; SDS 0,1%.

Buffer de transferencia de proteínas a membranas (CAMPS): metanol (10%), ácido 3-(cyclohexilamino)-1-propanosulfónico (CAMPS) 10 mM (pH 11).

Los geles de separación y de concentración se prepararon de acuerdo con la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Reactivos necesarios para preparar geles de poliacrilamida-tricina-SDS

| Soluciones | Gel separador T 10%, C 3% | Gel concentrador T 4%, C 3% |
|----------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 49,5% T, 3% C | 1,22 ml | 0,32 ml |
| Buffer del gel | 2,00 ml | 0,99 ml |
| Glicerol | 1,00 ml | - |
| Persulfato de amonio | 30 μ l | 20 μ l |
| TEMED | 3 μ l | 2 μ l |
| Agua bidestilada | 1,78 ml | 2,69 ml |
| Volumen final | 6,00 | 4,0 ml |

Soluciones para Western blot

Buffer fosfato salino PBS 10 X (por litro): KCl 2 g, KH_2PO_4 2 g, NaCl 80 g, Na_2HPO_4 11,5 g.

Solución de bloqueo de membranas: PBS 1 X; NaCl 0,5 M; Tween-20 0,2%; leche descremada 5%.

Solución de dilución de antisueros: PBS 1 X; NaCl 0,5 M; Tween-20 0,2%; BSA. 1%.

en solución de dilución de ELISA.

Solución de revelado: 4-chloro- α -naphthol 4,5 mg; metanol 1,5 ml; PBS 9 ml; H₂O₂ 10 μ l. Vf: 1,5 ml.

Buffer de transferencia a membrana: "buffer de corrida" más 20% (v/v) de metanol.

Soluciones para la purificación de IgG

Buffer citrato-fosfato 0,15 M (pH 5,0): Se mezcló aproximadamente 49 ml de solución de ácido cítrico 21 g/l con 51 ml de Na₂HPO₄ 35,6 g/l hasta llegar a pH 5,0. Se fraccionó y se conservó a -20 °C hasta su uso.

Buffer de inicio, fosfato 20 mM (pH 7,0): Se mezclaron 4 vol de Na₂HPO₄ 0,5 M más 1 vol de NaH₂PO₄ 0,5 M, y se llevó el pH a 7,0. Finalmente, se diluyó 25 veces con agua bidestilada.

Buffer borato de sodio: H₃BO₃/Na₄B₄O₇ 0,1 M (pH 8,8).

Solución de siembra de IgG para columnas Sephadex: Buffer fosfato (20 mM; pH 7,0).

Solución de elución (buffer glicina): Glicina 0,2 M (pH 2,7).

Solución de neutralización: Tris 0,2 M (pH 9,0).

Solución de biotilación (éster de biotina): 10 mg/ml de biotina N-hidroxisuccinimida en dimetil sulfóxido (Sigma Chemicals, Co).

Soluciones para ELISA

Solución de lavado de placas: PBS 1 X (pH 7,2); NaCl 0,5 M; Tween-20 0,2% (v/v).

Solución de fijado de placas (Bicarbonato): CO₃NaH 0,1 M (pH 9,6).

Buffer fosfato salino 0,15 M; pH 7,2 (PBS 1 X): para un litro se pesaron 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl; 1,15 g de Na₂HPO₄; 0,2 g de NaH₂PO₄ y se llevó a pH 7,2.

Reactivo de revelado: orto fenilen diamina (OPD) 30 mg; buffer citrato 30 ml (pH 5,0); 30 μ l H₂O₂; en un volumen final de 30 ml.

Solución de STOP de ELISA: H₂SO₄ 2 M.

Medición de proteínas por Bradford

Reactivo de Bradford: 10 mg de Azul Brillante de Coomassie G-250 en 5 ml de etanol 96% más 10 ml de ácido orto-fosfórico 85%, con agua bidestilada hasta 100 ml de volumen final.

Solución salina: 0,877 g de NaCl (0,15 M) en 100 ml agua bidestilada.

Stock de proteína albúmina sérica bovina (BSA): 300 μ g/ml en solución salina 0,15 M.

Métodos

Multiplicación de virus en huéspedes naturales

El virus empleado en esta tesis se aisló de una única larva infectada de *E. aporema* colectada en Oliveros provincia de Santa Fe, Argentina. Los virus de *Anticarsia gemmatalis* MNPV (AgMNPV), *Spodoptera frugiperda* MNPV (SfMNPV), *Rachiplusia nu* MNPV (RouMNPV), *Cydia pomonella* GV (CpGV) y EpapGV se propagaron sus insectos huéspedes.

Se emplearon larvas de *Epinotia aporema* (*E. Aporema*) y *Spodoptera frugiperda* (*S. frugiperda*) provistas por el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) dependiente del INTA. Las mismas se criaron en condiciones controladas de temperatura (26 °C) y humedad relativa (50-70%), y se alimentaron con dieta modificada en recipientes individuales.

Para la multiplicación del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) se infectaron larvas de *S. frugiperda* de segundo estadio, por suministro de dieta libre de formalina, contaminada superficialmente con SfMNPV (Green *et al.*, 1976). La amplificación del EpapGV se realizó utilizando la misma metodología de infección pero con dosis de 1×10^7 gránulos/mm² de dieta, en larvas de *Epinotia aporema* de segundo y cuarto estadio. También se amplificaron virus de AgMNPV, RouMNPV, CpGV. Aproximadamente 1.500 y 4.000 OBs por mm² de dieta se usaron para las amplificaciones de NPVs y GVs, respectivamente.

Extracción de virus brotantes (BV) de SfMNPV y EpapGV

Se infectaron larvas de *S. frugiperda* de cuarto estadio por ingestión de dieta contaminada con virus *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) y se les extrajo viriones brotantes. La extracción de BV se efectuó al tercer día pos infección, momento en el cual el título de viriones brotantes era máximo en la hemolinfa y coincidiría con la aparición de los primeros poliedros. Las larvas fueron lavadas con alcohol 70% (v/v), enjuagadas con agua destilada y colocadas en un recipiente a 4 °C para retardar sus movimientos. Posteriormente se tomaron las larvas y se les efectuó una incisión en la zona abdominal a la altura del primer espuripedio y se recogió la hemolinfa en tubos tipo *Eppendorf*. La hemolinfa colectada se diluyó 20 veces en medio TC-100 sin suero, y se centrifugó a 15.000 x g durante 5 minutos a 4 °C, el

sobrenadante se filtró a través de membranas de poros de 0,45 μm con el objeto de eliminar microorganismos contaminantes.

En el caso de EpapGV, las larvas infectadas de *E aporema* se maceraron en un homogeneizador y se centrifugó a 1.500 x g durante 5 minutos, diluyendo el sobrenadante 20 veces en medio TC-100 sin suero. Posteriormente, se filtró el sobrenadante diluido a través de filtros de poros de 0,45 μm .

Purificación de OBs

Alternativamente, se emplearon diferentes protocolos de purificación de acuerdo con el uso posterior de los cuerpos de inclusión y de acuerdo con la cantidad de material a purificar. Sin embargo, todos los homogeneizados de larvas infectadas se efectuaron en agua destilada y/o en TE, en un homogeneizador tipo *potter* y el homogeneizado se filtró a través de lana de vidrio. Los recuentos virales se efectuaron en una cámara de 0,02 mm de profundidad (Petroff-Hauser) bajo iluminación de campo oscuro.

Purificación de OBs mediante gradiente de sacarosa

Los poliedros y gránulos del homogeneizado de larvas infectadas filtrado a través de lana de vidrio, se purificaron por dos ciclos de centrifugación en gradientes continuos de sacarosa a 100.000 x g durante 60 min, a 4 °C en tubos plásticos. Las centrifugaciones se llevaron a cabo en Ultracentrífuga, Beckmam L8-70. Se extrajo una banda opalescente que se encontraba por encima de la fase de 55% (p/p) de sacarosa, cuya densidad es de aproximadamente 1,24 g/cm³. El material extraído se diluyó tres veces con TE y se centrifugó la suspensión a 7.700 x g durante 20-30 minutos, este procedimiento se repitió dos veces para concentrar el virus y remover la sacarosa. El sedimento obtenido se resuspendió en agua bi-distilada o en TE.

Purificación de OBs en gran escala ("a granel") mediante centrifugaciones diferenciales

Para este caso, las larvas se homogeneizaron en solución TE 1 X SDS 1% y el homogeneizado de larvas infectadas se filtró a través de lana de vidrio. La suspensión se purificó por sucesivas centrifugaciones diferenciales a 480, 755, 3.200 y 12.100 x g en una centrífuga refrigerada Sorvall RC 5B. Los sedimentos de cada una de las

centrifugaciones se descartaron, mientras que los sobrenadantes se sometieron al siguiente ciclo de centrifugación. El sedimento de gránulos se resuspendió en TE para futuros usos.

Purificación de OBs en pequeña escala por centrifugación diferencial

El homogeneizado de larvas en TE 1 X SDS 1% se filtró tal como se describió previamente y se purificó por centrifugaciones diferenciales en microcentrifugas. Los homogeneizados se centrifugaron a 14-18.000 x g durante 30 segundos y luego se descartó el sedimento (en su mayoría compuesto por bacterias, restos de tejidos y restos quitinosos). El sobrenadante se sometió a otros dos ciclos de centrifugaciones. La suspensión así obtenida se centrifugó a 14-18.000 x g durante 10 min. y el sedimento se resuspendió en SDS 1% (p/v) durante 30 min. a temperatura ambiente (TA) en agitación. Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 14-18.000 x g 10 min. y se resuspendió el sedimento en NaCl 0,5 M durante 30 min. a TA, también en agitación. Posteriormente, se eliminó el NaCl centrifugando la suspensión a 14-18.000 x g y lavando el sedimento con TE, repitiendo la última centrifugación.

Cultivos de células e infecciones virales

Preparación de medios TC-100

En una cámara de flujo laminar de bioseguridad clase II A, Baker, Steril Gard SG 600 se colocaron frascos de cultivo, filtros de 0,22 micrones, agua bidestilada, botellón de 5 l previamente esterilizados por autoclave y se irradiaron con luz UV durante 20 minutos. El botellón se llenó con agua bidestilada estéril hasta un 80-90% del volumen final. A continuación, se añadió el medio TC-100 en polvo (Gibco-BRL, Grand Island, EE.UU.) al agua y se mezcló hasta disolverlo. Posteriormente, se añadió el agua bidestilada en el botellón y se agregó 0,35 g/l de NaHCO_3 , se ajustó a pH 6,2 con NaOH 2,5 N y se llevó a 1,5 g/l de NaCl con NaCl (la solución ya tenía 0,5 g/l de NaCl). La solución de medio de cultivo se esterilizó filtrándola por filtros de 0,22 micrones. Al medio TC-100 se lo suplementó con suero fetal bovino (Bioser, Argentina) hasta 10% (v/v) y gentamicina hasta 100 $\mu\text{g/ml}$ y anfotericina a 25 $\mu\text{g/ml}$ (TC-100-completo) y se guardó a 4°C.

Cultivos de Células

La línea IPLB-Sf21 (Sf-21, Vaughn, 1977) proveniente de ovarios de oruga militar tardía, *Spodoptera frugiperda* se empleó para propagar virus de AcMNPV. Nuestro laboratorio se aprovisionó de otras líneas celulares, Tn 3.68 (*Trichoplusia ni*), BM-5 (*Bombyx mori*), CF 124 T (*Choristoneura fumiferana*), UFLAG 2.86 (*Anticarsia gemmatalis*). Estas líneas celulares fueron provistas por el CENARGEN (Centro Nacional de recursos Genéticos) de Brasilia en el marco de un proyecto de colaboración entre el CENAGEN, el IBBM y el Instituto de Microbiología y Zoología Animal (IMYZA).

Todas las células se cultivaron a 27 °C en estufas de cultivo, New Brunswick y Telco en los medios apropiados. Las líneas celulares Sf-21, Tn 3.68 y UFLAG 2.86 se cultivaron en medio TC-100 completo, en tanto que las células BM-5 y CF 124 T se cultivaron en medio TNMF-H. Las líneas celulares fueron amplificadas por pasajes sucesivos en diluciones 1/3 y se guardaron con criopreservantes. El estado de los cultivos fue seguido por observación en microscopio invertido, Olympus CK.

Congelado de células eucariotas

Se desprendieron células en fase logarítmica de sus frascos de cultivo con *cell scrapers* y se resuspendieron en el medio de cultivo correspondiente. Los frascos contenían células que no cubrían más de un 80% de la superficie. Las células se centrifugaron a 600-800 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 5 minutos en microcentrífuga y se resuspendieron en medio de cultivo stock (11 partes de medio correspondiente, 5 partes de suero, 4 partes de DMSO) a una concentración aproximada de 20×10^6 células por ml, en agitación continua. La suspensión se alicuotó en viales de 2 ml previamente rotulados a razón de 0,5 ml de suspensión de células por cada tubo. Los viales se incubaron durante unos minutos a 0 °C, tras lo cual se traspasaron al *freezer* de -70 °C por 1½ - 2 h y posteriormente al *freezer* de -135 °C.

Descongelado de células eucariotas

Las células eucariotas se descongelaron colocando los viales que las contenían en un baño de agua a 37 °C. Posteriormente, estas células se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm² con 8 ml de medio TC-100 completo y se cultivaron a 27 °C.

Infección de células Sf-21

Se sedimentaron células Sf-21 en frascos de cultivo de 25 cm² (Nunc, Dinamarca) a razón de $1,2 \times 10^5$ cel./cm². Posteriormente se incubaron los frascos con inóculos procedentes de insectos infectados (*S. frugiperda* y *E. aporema*) y no infectados por AcMNPV y EpapGV respectivamente. Las células se mantuvieron con los inóculos durante una hora, posteriormente se les retiró el inóculo, se lavó tres veces con medio de cultivo sin suero y finalmente se les añadió medio TC-100 completo. Paralelamente, se efectuaron distintos ensayos con diluciones de las formas infectivas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-1} , y se experimentaron distintos tiempos de infección: 20, 30, 40 y 60 minutos. Las células se mantuvieron en medio de cultivo TC-100 completo, a 27 °C y se observaron por microscopía óptica.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS y transferencias de proteínas a membranas y Western blot

Geles de SDS-PAGE

Diversas muestras (poliedros, gránulos, homogeneizados de larvas infectadas y no infectadas, etc.) se calentaron a 100 °C durante 5 min. en *buffer* de muestra para proteínas 4 X [Tris-HCl 200 mM (pH 6,8), glicerol 40%, SDS 8%, 2-mercaptoetanol 400 mM (20%), azul de bromofenol 0,1%] en una relación muestra:*buffer* de 3:1. Luego, las muestras se "sembraron" en geles de poliacrilamida-SDS 10-15% y se resolvieron por electroforesis (Laemmli, 1970) en una cuba Mini-PROTEAN II (BIO-RAD, Hercules, CA, EE.UU.). El gel separador contenía acrilamida-bisacrilamida (30:0,8) en concentraciones variables (15; 12,5 ó 10%) dependiendo del experimento, en *buffer* de separación 1 X. El gel concentrador contenía acrilamida-bisacrilamida (30:0,8) 5% en *buffer* concentrador 1 X. Los detalles de la preparación de estos geles se indican en la tabla 2.1. Las muestras se resolvieron aplicando 70 volts (V) durante 30-45 min, hasta que las muestras arribaran al gel separador. Posteriormente, se incrementó el voltaje hasta 100-150 V hasta que el azul de bromofenol arribara al final del gel. Los geles se tiñeron con la solución de tinción durante 30 min. a 65 °C. La tinción no específica se eliminó con una solución de destañido.

Condiciones de corrida de geles y transferencia de proteínas de poliacrilamida a membranas de *Western blot*

Las proteínas resueltas se transfirieron a una membrana de nitrato de celulosa (Sigma Chemicals, Co; o Millipore) de 0,45 μm . Se usó un aparato de transferencia Mini-PROTEAN II (BIO-RAD, Hercules, CA, EE.UU.) a 200 V. Durante la transferencia se aplicó un amperaje constante [250 mili Amperes (mA)] durante 30 min. y luego 350 mA durante 30 minutos adicionales en "buffer de corrida" que contenía 20% (v/v) de metanol. El sistema se refrigeró colocando el aparato de transferencia en hielo.

Cálculo de peso proteínas en geles de poliacrilamida

Los tamaños de las proteínas fueron calculados en base a curvas de calibración obtenidas con marcadores de peso molecular de proteínas "Sigma Gel Low Range" (Sigma; St. Louis, MO, EE.UU.; N° de catálogo M-3913) y Bio Rad Broad Range (BIO RAD; Hercules, CA, EE.UU.; N° de catálogo 161-0317).

Western blot

Proteínas de cuerpos de inclusión de distintos baculovirus (AgMNPV, SfMNPV, RouMNPV, CpGV y EpapGV) así como de larvas de *E. aporema* infectadas con EpapGV y larvas no infectadas, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida 12%. Las proteínas resueltas se transfirieron a una membrana de nitrato de celulosa (Sigma Chemicals, Co) tal como se describió anteriormente. Las proteínas transferidas se visualizaron por tinción con rojo Ponceau y la membrana fue bloqueada por incubación toda la noche a 4 °C con una suspensión de leche descremada 5%, en buffer de lavado de ELISA. En cada calle se sembró 2 μg de proteína soluble. Las membranas fueron incubadas luego a 37 °C por 1 h con anticuerpos anti-granulina unidos a biotina, diluidos 1:300 (stock: 2 mg/ml) en solución de dilución de ELISA. Luego de los lavados, la membrana fue incubada con 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de peroxidasa conjugada a avidina (dilución 1/2.000) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (DAKO), en el mismo buffer a 37 °C durante 30 min. Finalmente, la membrana se lavó tres veces con solución de lavado de ELISA y una vez con PBS. Los anticuerpos unidos se detectaron con 4-chloro- α -naphthol (Sigma; St. Louis, MO, EE.UU.) empleando el protocolo estándar.

Purificación de granulina de geles de tricina-SDS y microsecuenciación de la proteína

Se disociaron gránulos y poliedros purificados por calentamiento en *buffer* de muestra (100 °C, 5 min) y las muestras se resolvieron por electroforesis en un gel preparativo. Se utilizó el sistema de geles de poliacrilamida discontinuos, en el que se reemplazó la glicina por la tricina con el fin de evitar interferencias durante la microsecuenciación (Schägger & Von Jagow, 1987).

El gel fue lavado con *buffer* de transferencia por 5 min. La membrana de polivinil di fluoruro (PVDF) fue pre equilibrada secuencialmente con metanol y *buffer* de transferencia. Las proteínas fueron transferidas durante 2 h a amperaje constante (250 mA). Posteriormente, la membrana de PVDF se lavó con agua bidestilada y las proteínas se revelaron por tinción con Rojo Ponceau. Se cortó el trozo de membrana que contenía la proteína de interés (20 µg ó 670 pmol.), se secó al aire y se lo envió para su microsecuenciamiento al LANAIS de Péptidos y Proteínas (LANAIS-PRO, CONICET - Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA). La secuenciación se realizó por el método de degradación de Edman modificado (Matsudaira, 1987). El resultado quedó registrado según el análisis N° 929, Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas, LANAIS-PRO, CONICET-Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Microscopía

Microscopía óptica

Los preparaciones de gránulos fueron observadas en un microscopio óptico marca Zeiss Winkel. Los cultivos con células se observaron en un microscopio invertido marca Olympus (Tokyo).

Microscopía electrónica (ME)

Los gránulos de EpapGV se secaron por centrifugación en microcentrífuga de vacío Speed-Vac (Savant, Holbrook, NY, EE.UU.) y se trataron en glutaraldehído diluido 1% en *buffer* cacodilato 0,1 M (pH 7,3). Luego, se fijaron con tetróxido de osmio 1% preparado en el mismo *buffer*. El material fue sometido a una serie creciente de deshidrataciones en acetona y se lo incluyó en una resina epóxica (Araldita) durante

24 h a 60 °C. Esta resina fue cortada en un ultramicrotomo (MT-1). Los cortes se montaron en grillas de cobre y se colorearon con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las fotos de los cuerpos de inclusión de EpapGV se obtuvieron en un microscopio electrónico Siemens 101 del Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas, UNC. Para obtener la longitud del eje mayor de los cuerpos de inclusión, éstos fueron medidos siempre y cuando hubieran sido cortados por el eje mayor mostrando el virión completo. Además, se consideraron válidas las posiciones en las cuales el diámetro de las nucleocápsides coincidiera con el obtenido cuando el cuerpo de inclusión se cortó a través del diámetro menor. En todos los casos los valores se informan con el valor de la desviación estándar.

Cuantificación de proteínas

Determinación de proteínas por densitometría óptica

Para las cuantificaciones de la proteína granulina, las muestras de larvas homogeneizadas infectadas y colectadas a distintos tiempos pos infección se diluyeron convenientemente y se sembraron en un gel de poliacrilamida. Además, se incluyeron en el gel distintas alícuotas de proteína BSA en distintas concentraciones. El gel se resolvió y tiñó de manera estándar; se fotografió con cámara digital Kodak DC120 (Kodak) y la imagen se digitalizó con el programa Kodak digital science 1D (Kodak). A partir de las imágenes en soporte digital se calculó un densitograma para cada banda empleando los programas Gel Compare (Applied Math) e Image-Pro™ (Media Cybernetics, LP, EE.UU.) y se extrapola la concentración de proteína de las muestras problemas.

Medición de proteínas por la técnica de Bradford

Se preparó una curva de calibración de acuerdo con la tabla 2.3. Las soluciones se prepararon en un tubo *Eppendorf* y se mezclaron por agitación en *vortex*, posteriormente se añadió 15 µl de cada de las distintas alícuotas de proteínas de la curva de dilución y de las muestras problemas más 235 µl de reactivo de Bradford.

Tabla 2.3. Curva de calibración de Bradford.

| Concentración de proteína (µg/ml) | Stock (BSA) ^a | Solución salina, NaCl 0,15 M |
|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| 200 | 80 | 40 |
| 175 | 70 | 50 |
| 150 | 60 | 60 |
| 125 | 50 | 70 |
| 100 | 40 | 80 |
| 75 | 30 | 90 |
| 50 | 20 | 100 |
| 25 | 10 | 110 |

^a Todos los volúmenes se indican en µl.

La reacción se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm. en un lector de placas Max Line™ ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Con las lecturas provenientes de las alícuotas de BSA se elaboró una curva patrón y se extrapola la concentración de la muestra problema.

Metodologías empleadas en el desarrollo de una técnica de ELISA

SDS-PAGE preparativos y purificación del antígeno viral (granulina)

Las proteínas mayoritarias de los gránulos purificados de EpapGV se resolvieron por electroforesis en geles preparativos de poliacrilamida al 15%, de acuerdo con Laemmli (1970). Las suspensiones de OBs se mezclaron con *buffer* de muestra y se calentaron a 100 °C durante 5 min. Las muestras se resolvieron durante 120 min. a 70 V.

La posición de la proteína granulina se ubicó por tinción con *Coomassie Brilliant Blue* R250 de secciones laterales del gel y de los marcadores de peso molecular (Sigma; St. Louis, MO, EE.UU.). La banda del gel correspondiente a granulina se extrajo y se eluyó la proteína del gel por difusión, incubando la poliacrilamida en *buffer* PBS durante toda la noche. La concentración de granulina presente en el material eluido se cuantificó por ensayo de Bradford.

Inoculación

Se inocularon (subcutáneamente) conejos albinos de Nueva Zelanda con una suspensión de 50 µg de granulina en adyuvante de Freund completo. A los 27 y 62 días se repitieron las inoculaciones con igual cantidad de antígeno en presencia de

adyuvante de Freund incompleto. Las inoculaciones, extracciones y cuidado de los conejos se llevó a cabo en la cátedra de Zootecnia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Procesamiento del suero de conejo

Antes de cada inoculación se extrajeron 10 ml de sangre por punción cardíaca. La sangre de conejo se dejó coagular y el coágulo se extrajo con un palillo estéril, la fracción del suero se centrifugó a 4.000 x g durante 10 minutos, el sobrenadante se separó del sedimento y se almacenó a -20 °C.

Determinación del título de sueros de conejos (ELISA indirecto)

Las distintas extracciones de sueros de conejos fueron analizadas por ELISA indirecto. Para ello, se tomaron gránulos de EpaGV previamente purificados y se los calentó a 75°C durante 1 h (para inactivar a la proteasa alcalina presente en los OBs). Estos cuerpos de inclusión fueron luego disueltos en *buffer* de disolución de gránulos a 37 °C ó a 4 °C, durante 45 min. El material no disuelto fue removido por centrifugación a baja velocidad (3 min. a 14.000 r.p.m. en microcentrífuga). Los sobrenadantes se diluyeron en solución de fijado de placas (NaHCO₃ 0,1 M; pH 9,6) a una concentración final de 10 µg/ml y se adhirieron a placas de ELISA Nunc-Maxisorb (Nunc, Roskilde, Dinamarca) incubando los gránulos disueltos durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó el excedente de antígeno con solución de lavado. Posteriormente, se incubaron diluciones de cada uno de los sueros en solución de dilución y bloqueo durante 1 h a 37 °C y los pozos fueron lavados tres veces con solución de lavado. La IgG específicamente unida a la granulina se detectó utilizando anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa (DAKO), incubando la misma durante 30 min. a 37 °C. La placa se lavó nuevamente con solución de lavado y se reveló con una solución reveladora de orto fenilen diamina (OPD) en *buffer* citrato, durante 15 min. en oscuridad. La reacción fue detenida añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 2 M a cada fosa (*well*). Los resultados se leyeron en un lector de placas de ELISA a 490 nm. Los títulos se calcularon como la recíproca de la máxima dilución de suero que presentó una señal positiva por encima del valor de corte (*cut-off*), el cual fue estimado como el valor promedio de DO_{490 nm} de sueros no inmunes más dos desviaciones estándar.

Purificación de anticuerpos IgG

La fracción IgG se separó del resto de las proteínas séricas en columnas de afinidad de Proteína G-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Sweden) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. En total 1,5 ml de suero de conejo correspondiente al suero extraído el 24/09/98 del conejo N° 4 fueron sembrados en la columna de afinidad. El suero se sembró en *buffer* fosfato (20 mM; pH 7,0) y se lavó con esta solución hasta la eliminación de las proteínas no pegadas a la proteína G. Posteriormente, se eluyó la fracción de IgG con *buffer* glicina (glicina-HCl 0,1 M; pH 2,7). Las fracciones fueron neutralizadas con Tris 0,2 M pH 9,0. Se monitoreó la presencia de proteínas por Bradford y se determinó el título de anticuerpos por ELISA indirecto, tal como se detalló anteriormente.

Las fracciones de IgG de alto título y elevada concentración proteica (fracciones 22 a 24) fueron agrupadas y concentradas por diálisis sobre lecho de polietilenglicol (PEG) 6.000; en total se obtuvo 3,1 mg de IgG. El material concentrado se dializó contra *buffer* borato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,1 M; pH 8,8) concentrándose a 3,4 mg/ml y se evaluó su título por ELISA indirecto, siendo el mismo 4×10^5 .

Biotinilación del antisuero

Un mililitro de IgG purificado (2 mg/ml de proteína en *buffer* borato de sodio) se hizo reaccionar a temperatura ambiente con una solución 10 mg/ml de biotina-N-hidroxisuccinimida (Sigma Chemical Co., St. Louis. Mo.) en dimetil sulfóxido. Se empleó una relación de 200 μg de éster de biotina por un miligramo de IgG. A las 4 h de reacción, se añadió 20 μl de NH_4Cl 1 M por cada 200 μg de éster de biotina y se incubó 10 min. a temperatura ambiente. Se purificó por diálisis contra *buffer* PBS.

Optimización de la detección de granulina (ELISA de captura)

La detección de granulina se efectuó de acuerdo con un ensayo de ELISA de doble sándwich (o de captura) empleando IgG de conejo anti-granulina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como anticuerpo de captura y el mismo reactivo pero biotinilado en combinación con avidina conjugada a peroxidasa (DAKO A/S, Gloustrup, Denmark) como anticuerpo de detección. La IgG anti-granulina se fijó a placas de ELISA (0,5 μg por pozo) en 50 μl de solución de *buffer* de bicarbonato (pH 9,6), durante una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Después de esto y en los siguientes pasos, las

placas se lavaron tres veces con solución de lavado. Gránulos disueltos de EpaGV y homogeneizados de larvas no infectadas, preparados como se describe anteriormente, se diluyeron desde 277,9 $\mu\text{g/ml}$ en solución de dilución de ELISA. Cincuenta microlitros de estas preparaciones diluidas al doble en forma seriada fueron añadidos a cada well (pozo). Las muestras se incubaron con los anticuerpos fijados a la placa utilizando tres condiciones diferentes: 18 h a 4 °C, 2 h a 37 °C y 1 hora a 37 °C. La placa de ELISA fue incubada luego con 50 $\mu\text{l/well}$ del mismo anticuerpo biotinilado, anticuerpo detector (dilución 1/1.000, equivalente a 2 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se lavó la placa y se la incubó cada well con 50 μl de una dilución 1/5.000 de avidina unida a peroxidasa (DAKO, 1 mg/ml stock) durante 30 min. a 37 °C. La reacción se reveló con OPD en *buffer* citrato durante 15 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico tal como se detalló previamente. La DO fue medida en un lector de ELISA a 490 nm. El valor de corte fue determinado como el valor de DO correspondiente a dos veces la desviación estándar por encima de la DO promedio obtenida con el control negativo (larvas no infectadas).

Cinética de la acumulación de granulina en larvas infectadas

Se infectaron larvas de *E. aporèma* de 4° estadio mediante alimentación con dieta contaminada con EpaGV. Luego de 6 h de contacto con la dieta infectada, las larvas fueron transferidas a recipientes con dieta no infectada. Diez larvas fueron colectadas a intervalos de 12 h cada uno durante 5 días. Cada lote de larvas fue pesado y homogeneizado en PBS. Posteriormente, fracciones de cada lote fueron calentadas a 1 h a 75 °C, y sus OBs disueltos tal como se especificó anteriormente. La concentración de proteínas en cada homogeneizado para cada punto, se estableció por ensayo de Bradford y se ajustó a 2,67 mg/ml. Estos lotes normalizados se diluyeron a 6,69 $\mu\text{g/ml}$ (1:400) y diluciones seriadas al doble se analizaron en ensayos de ELISA de captura. Para ello se emplearon diluciones desde 1:400 a 1:409.600 correspondientes a 6,69 $\mu\text{g/ml}$ a 6,53 ng/ml de proteína soluble. Para cada intervalo de tiempo, se determinó la cantidad de granulina a partir del valor de $\text{DO}_{490 \text{ nm}}$ del ensayo de ELISA de captura usando diferentes diluciones y extrapolando la cantidad de granulina de la porción lineal de la curva de $\text{DO}_{490 \text{ nm}}$ vs. granulina. En estos ensayos, diferentes diluciones de homogeneizados de larvas control (hasta 3 $\mu\text{g/ml}$) arrojaron valores similares de $\text{DO}_{490 \text{ nm}}$.

Las mismas preparaciones se analizaron en SDS-PAGE 12,5%, usando 13,4 µg de proteína soluble por calle. Como control se empleó un homogeneizado de larvas no infectadas de igual concentración que los lotes de larvas infectadas. La cantidad de granulina se calculó para los tres intervalos finales (96, 108 y 120 h p.i.) mediante dilución de estas muestras y extrapolación de la cantidad de granulina de controles de distintas concentraciones de BSA en geles de SDS-PAGE de las mismas características, tal como se detalla anteriormente.

Detección específica de EpapGV mediante ELISA

Detección en larvas infectadas

La especificidad del ensayo de ELISA de captura fue evaluada analizando preparaciones de diferentes baculovirus (AgMPV, SfMNPV, RouNPV, CpGV y EpapGV) y homogeneizados de larvas no infectadas de *E. aporema*. Los homogeneizados de cuerpos de inclusión disueltos de estos virus se incubaron en iguales concentraciones y se analizaron en ELISA de captura de acuerdo con los descripto previamente, utilizando una hora de incubación con el antígeno viral.

Detección de EpapGV en formulados infectados

Para evaluar la especificidad del ensayo de ELISA de captura en diferentes formulados, se prepararon formulados insecticidas a partir de larvas de *Cydia pomonella* y *E. aporema* infectadas con CpGV y EpapGV respectivamente. Los formulados no infectados, usados como controles negativos, contenían larvas no infectadas. En particular, los formulados de EpapGV se prepararon a partir de un homogeneizado de 5.000 larvas de *E. aporema* infectadas, el cual se mezcló con 100 g de componentes inertes de la formulación. Previo a la mezcla de estos componentes, se determinó la cantidad de granulina presente en el homogeneizado por SDS-PAGE, el cual fue de 5×10^9 OB/g de polvo formulado. Estas preparaciones fueron pesadas y resuspendidas en agua a una concentración de 32 mg/ml. Cada suspensión fue calentada a 75 °C por 1 h para inactivar la proteasa alcalina. Luego de este paso, alícuotas de 10 µl de material calentado fueron incubadas con 90 µl de *buffer* de disolución de gránulos. Las muestras de formulados fueron diluidas luego a 320 µg/ml y empleadas como antígenos en ELISA convenientemente diluidas al doble.

Análisis del coeficiente de variación inter-ensayo e intra-ensayo

La reproducibilidad de la técnica de ELISA se estimó incluyendo un control positivo de granulina de EpapGV y un control negativo correspondiente (larvas no infectadas), en nueve ensayos independientes llevados a cabo en días diferentes (variación inter-ensayo) y en 96 determinaciones analizadas en el mismo ensayo (variación intra ensayo). Los coeficientes de variación (CV) se calcularon en base a la fórmula $(\sigma/x) \times 100$, siendo σ la desviación estándar y x el promedio de las medidas.

Técnicas que involucran DNA

Bacterias y vectores empleados

En la propagación del vector pZErO-2TM se empleó la cepa *E. coli* XL1 Blue y en el clonado la cepa *E. coli* TOP 10 (Invitrogen, CA). Los clones generados en plásmidos pBluescript fueron propagados en bacterias *E. coli* DH-5 α .

Preparación de DNA plasmídico

La purificación de DNA plasmídico se efectuó por columnas de intercambio iónico QIAPrep (QIAGEN, Germany) o por el método de lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979). Los ácidos nucleicos se purificaron de geles de agarosa mediante columnas QIAquick (QIAGEN, Germany), sólo en caso de ser enviados para la determinación de su secuencia.

Método de lisis alcalina

Se crecieron bacterias *E. coli* (DH5 α o TOP10) en medio LB o TB con su correspondientes antibióticos hasta saturación. Se centrifugó 1 ml de estos cultivos a 14.000-18.000 x g durante 1 minuto en un tubo *Eppendorf* y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces sobre el mismo *Eppendorf*. Se añadió 100 μ l de solución I al sedimento obtenido y se lo resuspendió con *vortex*, se centrifugó nuevamente a 14.000-18.000 x g durante 1 min. y se retiró el sobrenadante. El sedimento lavado así, se resuspendió en 200 μ l de solución I, se agregó 150 ml de solución II (recientemente preparada). 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 150 ml de solución III (a 4 °C) y se incubó

durante 10 minutos en agua-hielo. El tubo *Eppendorf* se centrifugó 5 min. a 14.000-18.000 x g a 4 °C y se extrajo el sobrenadante (DNA plasmídico) tratando de no tomar el sedimento de DNA cromosómico, restos celulares y proteínas acomplejadas con el SDS. Los RNAs celulares de esta solución se degradaron por incubación con RNAsa A (20 µg/ml) durante 30 min. a 37 °C. EL DNA plasmídico se aisló de las proteínas por extracción con un volumen de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) y se concentró por precipitación etanólica o con isopropanol.

Extracción fenólica

Este método se empleó para separar proteínas de soluciones de ácidos nucleicos de preparaciones de plásmidos o de preparaciones de viriones de EpapGV tratados con proteinasa K. Para ambos casos el DNA se extrajo con un volumen de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) para eliminar proteínas. Una vez añadida la solución orgánica al tubo, se mezcló suavemente y se centrifugo 3-5 min. a 14-18.000 x g y se tomó la fase acuosa tratando de no extraer material de la interfase. El procedimiento se repitió hasta no observar proteínas en la interfase y finalmente se lavó la fase acuosa con un volumen de cloroformo para extraer los restos de fenol.

Precipitación de ácidos nucleicos

Los DNAs plasmídicos o 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 DNAs por adición de 0,3 vol de AcNa 3 M más 0,6-0,9 volúmenes de alcohol isopropílico. En cualquiera de los dos protocolos, las soluciones fueron incubadas a -20 °C durante 2 h y centrifugadas a 14.000 x g durante 10 minutos. Las sales fueron lavadas con solución de etanol 70%, preparado con agua bidestilada estéril. El sedimento se seco en microcentrífuga de vacío *Speed-Vac*. El DNA se resuspendió en agua bidestilada estéril o en TE 0,01 X.

Purificación del DNA viral de cuerpos de inclusión virales

Los gránulos de EpapGV purificados previamente, fueron tratados durante 30 min. a 37 °C con solución de carbonato (Na₂CO₃ 0,1 M; NaCl 0,17 M; EDTA 0,01 M; pH 10,5). Luego la solución se centrifugó en microcentrífuga durante 3 min. para eliminar los gránulos no disueltos y el sobrenadante fue sometido a una centrifugación de 100.000

x g durante 1 hora. El precipitado de viriones fue tratado con una solución de SDS al 0,5% y proteinasa K (50-400 µg/ml) en *buffer* TE, durante 120-180 minutos a 37 °C. El DNA se purificó mediante extracciones con solución fenol/cloroformo/isoamílico y se concentró por precipitación con etanol (Sambrook *et al.*, 1989). El DNA obtenido fue resuspendido en una solución de TE 0,1 X y se lo guardó a 4 °C. La masa de DNA obtenida se cuantificó en geles de agarosa mediante comparación con testigos de masa conocida.

Digestión de DNAs con enzimas de restricción

El DNA plasmídico o de EpapGV, previamente purificado, se digirió con una o varias enzimas restricción (EcoRI, BamHI, HindIII y BglII) en *buffer* NEB II (New England Biolabs) durante 2 h, o toda la noche.

Marcación de fragmentos de DNA por *Fill in*

Esta técnica se basa en la digestión de DNA con enzimas de restricción que generan extremos 5' extendidos y en el posterior "llenado" de los nucleótidos faltantes con nucleótidos marcados radiactivamente ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP) o marcados por métodos químicos. Este "llenado" o "*fill in*" se lleva a cabo por medio de la acción del fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa (Sambrook *et al.*, 1989). En las reacciones de marcación se emplearon las siguientes condiciones: 100 ng de DNA molde; dNTPs sin dATP (50 µM de cada uno); 0,2 unidades (U) del fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa; 0,2 µCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP en *buffer* NEB II 1 X (New England Biolabs). La mezcla se homogeneizó por agitación y se incubó a 37 °C durante 15 min.

Material Radiactivo-Síntesis de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP

Los nucleótidos radiactivos empleados en las reacciones de marcación de ácidos nucleicos y $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP, fueron sintetizados a partir del precursor $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (New England Nuclear; NEN, EE.UU.) de acuerdo con (Albariño, 1997). Los pasos de la síntesis se controlaron por cromatografía en placa fina (TLC) de alícuotas de cada una de las reacciones. Las placas de TLC se expusieron a placas autorradiográficas (película X-OmatTM K de Kodak) y se reveló con revelador manual para placas radiográficas. La radiactividad del $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP sintetizado cuantificación en un

contador de centelleo líquido por efecto Cerenkov (LKB 1214 Rack Beta) controlado por computadora Olivetti PC M24. La radiación en geles secos y/o en membranas hibridadas fue medida con un contador *Geiger*.

Electroforesis en geles de agarosa

Se pesó agarosa en un frasco de vidrio, se añadió *buffer* TAE y se calentó en horno microondas hasta disolución de la agarosa en el *buffer*. Posteriormente, se añadió bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Una vez que la agarosa se enfriada, pero aún 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 de 1:4 y se depositaron dentro de las calles del gel. Los DNAs se resolvieron en geles de agarosa aplicando alto voltaje (80-120 V) en caso que los tamaños de los fragmentos fueran pequeños ó a 50-70 V para fragmentos grandes y porcentajes de geles bajos (0,3-0,5%). Los geles de agarosa se resolvieron en aparatos BIO-RAD y en aparatos de fabricación casera. Los DNAs se visualizaron por iluminación con transiluminadores de luz ultravioleta de 310 nm (Fotodyne, EE.UU. o Stratagen, EE.UU.) y se fotografiaron con equipo para fotografía de geles de electroforesis Polaroid MP4 (Fotodyne, EE.UU.) con película Polaroid 667. Alternativamente, las imágenes se capturaron con un aparato de documentación de geles Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak Digital Science).

Con respecto a los fragmentos marcados con ^{32}P , estos se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa 0,3-0,7% a 70 V durante 3 h con *buffer* TAE. Los ácidos nucleicos se fijaron al gel por tratamiento con ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 20-40 min. Posteriormente, el gel se lavó con la misma solución varias veces, se secó con papel adsorbente, se envolvió con film plástico y se lo expuso a película radiográfica X-OmatTM K de Kodak (Rochester, EE.UU.) con pantalla intensificadora a -70 °C, el tiempo necesario. Se controló la radiactividad emitida con contador *Geiger*. Las autorradiografías se revelaron empleando soluciones reveladoras y fijadoras estándar. Las placas autorradiográficas y las fotografías en papel se digitalizaron con un *scanner* VistaScan 240.

Cálculo de peso de fragmentos de DNA

Los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos a partir del DNA de EpapGV y de las digestiones de clones se calcularon utilizando el programa Excel, en base a patrones de peso molecular (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Patrones de peso molecular (en pb). Se muestran en esta tabla los pesos de los fragmentos de los marcadores de peso molecular.

| λ Hind III | λ Hind III + BamH I + BglII | λ BamHI | λ Kpn I | λ Xho I | λ Hind III + EcoR I | pcDNA II Hind III + Hinf I | 1 kb ladder | 100 pb ladder |
|------------|-----------------------------|---------|---------|---------|---------------------|----------------------------|--------------------|---------------|
| 23.130 | 16.841 | 16.841 | 29.942 | 33.498 | 21.227 | 1.129 | 10.000 | 1.000 |
| 9.416 | 6.527 | 7.233 | 17.057 | 15.004 | 5148 | 517 | 8.000 | 900 |
| 6.557 | 5.089 | 6.770 | 1.503 | | 4.973 | 453 | 6.000 | 800 |
| 4.361 | 4.360 | 6.527 | | | 4.268 | 396 | 5.000 | 700 |
| 2.322 | 2.917 | 5.626 | | | 3.530 | 236 | 4.000 | 600 |
| 2.027 | 2.410 | 5.505 | | | 2.027 | 120 | 3.500 ^a | 500 |
| 564 | 2.322 | | | | 1.904 | 75 | 3.000 | 300 |
| 125 | 2.028 | | | | 1.584 | 65 | 2500 | 200 |
| | 1.213 | | | | 1.375 | 20 | 2.000 | 100 |
| | 1.184 | | | | 947 | | 1.500 | 80 |
| | 704 | | | | 831 | | 1.000 | |
| | 651 | | | | 564 | | 500 | |
| | 564 | | | | 125 | | | |
| | 519 | | | | | | | |
| | 492 | | | | | | | |
| | 416 | | | | | | | |
| | 125 | | | | | | | |
| | 80 | | | | | | | |
| | 60 | | | | | | | |

^a Esta banda posee una intensidad mayor a todas las de este marcador.

Southern blot

Crecimiento de bacterias, digestiones de DNA plasmídico

Sonda de granulina

La sonda del gen de granulina se preparó a partir del plásmido pGEM T (Promega, EE.UU.) que contenía al gen de granulina de *Trichoplusia ni* GV (Ghiringhelli *et al.*, 1996). Este plásmido fue digerido con las enzimas de restricción Nco I y Pst I (New England Biolabs), durante 3 h a 37 °C. El producto de la digestión fue resuelto por electroforesis en un gel de agarosa 0,7% y el DNA de la banda correspondiente al gen de granulina fue purificado por adsorción a polvo de sílice (Gene Clean, Bio 101, Inc.).

Sondas de DNA de EpapGV clonado en plásmidos

Los plásmidos pZErO-2 (Invitrogen TM) que contenían fragmentos de interés se digirieron con las enzimas de clonado. Los insertos de las sondas EcoRI B (18,7 kpb) clon EcoRI 49; EcoRI C (14,6 kpb) clon EcoRI 28 y EcoRI F (13,4 kpb) clon EcoRI 46 se liberaron por digestión con la enzima EcoRI. En tanto que para la sonda BglII N (0,747 kpb) clon BglII 60, el fragmento se liberó con las enzimas HindIII y EcoRI. Los productos de digestión se resolvieron en geles de agarosa al 0,5%. Los fragmentos de interés fueron identificados por su peso molecular (PM), eluidos por filtración a través de lana de vidrio y precipitados con acetato de sodio y etanol.

Sondas *iaps*

Las sondas de genes CpGV *iap-3* (ORF 16), *iap-5* (ORF 116) y *iap-4* (ORF 94) fueron preparadas a partir de la amplificación de plásmidos Bluescript (Stratagene, EE.UU.) que los contenían. Estos plásmidos fueron empleados para transformar bacterias *E. coli* DH-5 α (para el caso de *iap-3*) y *E. coli* TOP 10 (*iap-5* e *iap-4*) por electroporación. Las bacterias fueron cultivadas en medio LB con ampicilina y los plásmidos se purificaron por lisis alcalina (*iap-3*) o por columna de intercambio iónico QIAGEN (*iap-5* e *iap-4*).

Para el caso de CpGV *iap-3* una fracción del gen (los 500 nucleótidos iniciales) fue liberada por digestión con las enzimas KpnI y Xho I. En tanto que para *iap-5* e *iap-4* el gen completo fue escindido con enzimas flanqueantes HindIII y Kpn I. Los productos de digestión fueron resueltos en gel de agarosa 0,7% y la banda de DNA correspondiente al gen *iap* de CpGV se purificó por adsorción a polvo de sílice (para *iap-3*) (Gene Clean, Bio 101 Inc), o por columna de intercambio iónico QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) en el caso de los genes *iap-5* e *iap-4*.

Purificación de DNAs sondas

Purificación de fragmentos de DNA por adsorción de DNA a polvo de sílice

Los fragmentos de DNA se purificaron a partir de geles de agarosa por adsorción a polvo de sílice (Geneclean Bio 101 Inc.). La banda correspondiente al fragmento de DNA a purificar se extrajo del gel y se incubó en 500 μ l de NaI saturado durante 5

minutos a 60 °C. Posteriormente, se agregó 5 µl de polvo de sílice y se incubó con agitación constante durante 15 minutos en hielo. La solución fue centrifugada durante 10 segundos a 14-18.000 X g, el sobrenadante se descartó y el sedimento fue lavado 3 veces con 400 µl de solución New Wash (NaCl, etanol y agua). Este sedimento fue resuspendido en 20 µl de agua bidestilada y se incubó 20 minutos a 60 °C. Finalmente, la mezcla se centrifugó 4 minutos 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.

Purificación de fragmentos de DNA por filtrado a través de lana de vidrio

El fragmento identificado por su peso molecular (PM), fue eluído por filtración a través de lana de vidrio. La lana de vidrio se colocó sobre un tubo *Eppendorf* de 500 µl al cual se le había perforado el fondo, este *Eppendorf* se colocó sobre otro de 1.500 µl. El taco de agarosa se colocó sobre la lana de vidrio del *Eppendorf* más pequeño. Se centrifugó a 14.000 x g durante 1-3 minutos y se lavó la lana de vidrio con 500 µl de *buffer* TE. El DNA se precipitó con acetato de sodio y etanol y se resuspendió en agua.

Purificación de DNA por columnas de intercambio iónico

Alternativamente, se purificaron DNAs a partir de bandas de DNA de geles de agarosa. Las bandas de interés fueron iluminadas con luz UV (310 nm), identificadas y escindidas con bisturí. El DNA se eluyó de la agarosa por una columna de intercambio iónico QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

Adsorción de ácidos nucleicos a membranas de nylon

El DNA de EpapGV (genómico o clonado en plásmidos), digerido con las enzimas de restricción correspondientes fue resuelto por electroforesis en geles de agarosa 0,5-0,7% a voltaje constante no mayor a 3 V/cm, teñido con bromuro de etidio (Br-Et) y fotografiado con cámara Polaroid. Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue sumergido en solución de depuración (HCl 0,2 M) durante 10 minutos, lavado con agua bidestilada, tratado 30 min. con solución de desnaturalización (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M), otros 30 minutos en solución de neutralización (Tris-HCl 1,0 M; pH 7,5; NaCl 1,5 M) y finalmente 30 minutos en solución de transferencia (SSC 10 X). El gel

fue transferido a una membrana *Zeta-Probe* (Bio Rad) empleando un aparato de transferencia por vacío (Pharmacia, Uppsala, Suecia) durante 30 min. aplicando una presión de 40 a 60 milibar (mbar). Algunos geles se transfirieron por capilaridad durante 18 h, usando *buffer* de transferencia (SSC 10 X) según Sambrook *et al.* (1989). Después de la transferencia las membranas se secaron y los ácidos nucleicos se fijaron por exposición a luz UV (310 nm) durante 5 min. en transiluminador o por calentamiento en horno a 80 °C durante 2 h.

Hibridaciones con sondas radiactivas

Generación de sondas de DNA marcadas por extensión de oligonucleótidos o *multipriming* o *random-priming*

La técnica de *random priming* o *multipriming* (Feinberg & Vogelstein, 1983) se basa en el pegado de exámeros de DNA de secuencias azarasas (de 6 u 8 bases) sobre un molde de DNA. Estas moléculas actuarán como *primers* permitiendo a la enzima DNA polimerasa iniciar la polimerización de una cadena que se formará con nucleótidos modificados (radiactivamente o químicamente).

Preparación de sondas radiactivas

A partir de la metodología descrita a continuación se marcaron las sondas del gen de granulina de TniGV y las diversas sondas de DNA del genoma de EpapGV, clonado en plásmidos y digerido con enzimas de restricción. Los fragmentos de DNA eluidos del gel, fueron empleados para generar sondas marcadas con [α 32 P] dATP, de acuerdo con Sambrook *et al.* (1989). Para estas reacciones se usaron entre 50 y 100 ng de DNA molde, una mezcla de dNTPs sin dATP (50 μ M), *primers* pdN6 (5 ng ó 100 μ M), *buffer* de Klenow (1 X), fragmento Klenow de la DNA polimerasa (0,5 a 1,0 U) y 20 μ Ci de [5' α 32 P] dATP. En la tabla 2.5 se muestra en detalle los volúmenes empleados. La mezcla se incubó a 37 °C durante 2 horas y media. Una vez concluida la reacción, el DNA marcado se separó del nucleótido radiactivo libre, mediante filtración en gel usando una columna de Sephadex G-50 (Nick columnsTM, Pharmacia, Upsala, Suecia) equilibrada con *buffer* TE 1 X. La radiactividad incorporada se midió por emisión Cerenkov en contador de centelleo líquido.

Tabla 2.5. Reactivos necesarios para una reacción de marcación de una sonda por multipriming.

| Reactivos | Stocks | Volumen en la mezcla de reacción (μ l) |
|----------------------------------|------------------------|---|
| pdN ₆ | 10 ng/ml | 0,5 |
| Buffer Klenow | 10 X | 5,0 |
| Klenow | 5 u/ μ l | 0,2 |
| dGTP, dCTP, dTTP (10 X) | 500 μ M | 5,0 |
| [α ³² P] dATP | 5-20 μ Ci/ μ l | variable según la actividad del stock |
| DNA molde | variable | 50 - 100 ng |
| Agua bidestilada | | csp 50 μ l |
| Volumen final | | 50 μ l |

Purificación de sondas de DNA marcadas radiactivamente

El DNA marcado con [α ³²P] dATP o con biotina se purificó por cromatografía de exclusión molecular en columna de Sephadex G-50. Esta columna permite eluir diferencialmente la sonda de *primers* y nucleótidos no incorporados (la columna retiene fragmentos de DNA menores de 20 pb). Una vez terminada la reacción de marcación del DNA se añadieron al tubo de reacción 50 μ l de *buffer* TE y 10 μ l de azul de bromofenol 4 X y se mezcló con la micropipeta. El líquido se "sembró" lentamente en la columna de Sephadex G-50 y luego se añadió 100 μ l de TE para lavar las paredes. Una vez que la solución penetró en la columna (se siguió la posición de la "cola" por el color azul del bromofenol) se añadió 1 ml de TE y se recogieron fracciones de a dos gotas (aproximadamente 80-100 μ l) en *ependorfs* numerados. Para sondas marcadas con [α ³²P] dATP se midió la radioactividad incorporada en cada una de las fracciones por emisión Cerenkov en un contador de centelleo líquido. Mediante repetidos experimentos se determinó que las sondas se elúan en las fracciones mayores a 100 μ l y menores a 600 μ l. Las fracciones con alta marca radiactiva se juntaron en un sólo tubo *Eppendorf* y el mismo se guardó a -20 °C. Los nucleótidos no incorporados se eluyeron por adición de *buffer* TE y la columna se guardó en TE a 4 °C para usos posteriores.

Prehibridación, hibridación y lavados (para sondas marcadas con [α ³²P] dATP)

Las membranas fueron incubadas en una solución de prehibridación [*Denhardt* 5 X; SSC 6 X; SDS 0,1%; Tris-HCl (pH 7,4-7,5) 0,5 M; RNA de levadura 200 μ g/ml] durante 2 h. a 65 °C en tubos de vidrio con rotación suave. Posteriormente, se añadieron las sondas previamente calentadas a 100 °C durante 5 min. y luego enfriadas en hielo. En

general, las hibridaciones con sondas homólogas se efectuaron a 65 °C y para sondas heterólogas a 45 °C. Finalizada la hibridación se extrajo la solución de hibridación y las membranas se lavaron con soluciones de SSC. Las membranas fueron lavadas 3 veces con una solución de 6 X SSC, SDS 0,1% durante 5 minutos. Las membranas lavadas se secaron parcialmente con toallas adsorbentes, se envolvieron en film plástico, se adosaron a películas X-Omat™ K (Kodak) y se guardaron en contenedores con placas intensificadoras de luz a -80 °C ó -135 °C. Las autorradiografías se revelaron con revelador manual para placas radiográficas. Para el caso de las membranas hibridadas con material radiactivo, la radiactividad de las secciones de membrana de los controles positivos y de muestras problemas se midió con contador *Geiger*. La membrana hibridada se expuso en función de la marca detectada en las regiones de DNA genómico. En caso que el contador *Geiger* detectara actividad hasta 10 X se expuso 4 h, si la marca era de 1 X se expuso 24 h y si la marca detectada era de 0,1 X se expuso la membrana a placa autorradiográfica durante de 2 a 5 días.

Hibridación con sondas no radiactivas

Hibridación con sonda unidas a biotina (kit inmunoenzimático)

Con el fragmentos eluído del gel de al sonda CpGV *iap-3* se generó una sonda marcada con biotina por reacción con la enzima *klenow* y nucleótidos biotinilados. La sonda CpGV *iap* se hibridó contra el DNA de cada uno de los clones de *EpapGV*, resueltos en gel de agarosa 0,7% y transferido a una membrana de nitrocelulosa. La hibridación se llevó durante a cabo durante 18 hs, a 45°C. La membrana se lavó con solución SSC 5X, SDS 0,5% cinco minutos a temperatura ambiente e igual tiempo con SSC 5X y SDS 0,1%. Se reveló con streptavidina-fosfatasa alcalina y por reacción enzimática sobre NBT-BCIP.

Hibridación con sondas quimioluminiscentes

Marcación de sondas CpGV *iap-5* e *iap-4*

Las sondas de los genes CpGV *iap-4* e *iap-5* se marcaron con el kit AlkPhos DIRECT (Amersham Pharmacia Biotech; Buckinghamshire, England). Para ello se tomó 10 µl de DNA a 10 ng/µl (100 ng) de los genes correspondientes y se lo desnaturalizó por calentamiento a 100 °C en baño de agua, inmediatamente después se enfrió la

solución en hielo durante 5 min. Luego se añadió 5 µl de *buffer* de reacción, 1 µl de reactivo de marcación y 5 µl de solución *cross-linker*. La solución se mezcló y el tubo se incubó durante 30 minutos a 37 °C.

Hibridación, lavado y revelado con las sondas CpGV *iap-4* e *iap-5*

Las sondas *iap-5* e *iap-4* se colocaron en la *buffer* de hibridación [NaCl 0,5 M; reactivo de bloqueo 4% (p/v)] y se incubaron toda la noche a 50 ó a 45 °C, según el experimento. Posteriormente, se lavó la membrana tres veces con solución de lavado primario [Urea 2 M; SDS 0,1%; fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0); NaCl 150 mM, reactivo de boqueo 0,2%; MgCl₂ 1 mM] durante 10 min. Cada membrana fue lavada a igual temperatura que la empleada en la hibridación. Luego se lavó 3 veces durante 7 min. c/u a TA con solución de lavado secundario (Tris base 50 mM, NaCl 100 mM, 2 mM Mg⁺²). La membrana se secó parcialmente y se añadió el reactivo ECL y se lo dejó 5 minutos y luego se lavó el reactivo con agua bidestilada estéril. Las membranas se envolvieron en un film plástico y se expusieron a películas fotosensibles o placas autorradiográficas por períodos de tiempo de 4 h hasta 24 h. Las placas se revelaron con revelador manual AGFA y fijador G334.

Reacciones de amplificación de ácidos nucleicos (PCR)

Condiciones de PCR para la evaluación de contigüidades

Las reacciones de amplificación de los ácidos nucleicos se realizaron en un ciclador Idaho (1605 *Air ThermoCycler*, IF Idaho Technology, ID, EE.UU.) utilizando *buffer* de *Taq* Polimerasa 1 X; 1,5 mM MgCl₂; 1 mg/ml ó de BSA; 0,2 mM de cada dNTP; 1 µM de *primers* correspondientes (Tabla 2.6); 0,25 unidades de la enzima *Taq* Polimerasa y 0,1 a 0,3 ng de DNA molde (DNA genómico de *EpapGV* y DNA de *EpapGV* clonado en plásmidos), en un volumen en un volumen final de 10 µl. La reacción de amplificación consistió en 35 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a 94 °C, 10 segundos de hibridación a 42 °C y 1 minuto 15 segundos de síntesis de DNA a 68 °C. El perfil de ciclado se completó con una extensión final de 3 minutos a 68 °C.

Perfil de ciclado para amplificar gen de granulina

Las reacciones de amplificación se realizaron en un ciclador Idaho (1605 *Air Thermo Cycler*) utilizando *buffer* de *Taq* Polimerasa 1 X; 1,5 mM MgCl₂; 1 mg/ml BSA; 0,2 mM

de cada dNTP; 1 μ M de cada uno de los *primers* correspondientes (Gr-dw y Gr-up) (Tabla 2.6); 0,25 unidades de la enzima *Taq* Polimerasa; 0,25 unidades de la enzima *pfu* DNA polimerasa y 0,1 a 0,3 ng de DNA molde (DNA del plásmido BglII F, clon 57; BglII clon 68). La enzima *pfu*, extraída de *Pyrococcus furiosus*, a diferencia de la enzima *Taq* DNA pol, posee la capacidad de lectura de prueba (actividad exonucleasa 3' -> 5') que le confiere una menor frecuencia de errores a sus productos. La reacción de amplificación consistió en 35 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a 94 °C, 10 segundos de hibridación a 44 °C y 1 minuto 15 segundos de síntesis de DNA a 72 °C. El perfil de ciclado se completó con una extensión final de 3 minutos a 72 °C.

Tabla 2.6. Secuencias de *primers* empleados para amplificar DNAs y para secuenciar.

| Nombre del <i>primer</i> | Secuencia (5'→3') |
|------------------------------|------------------------|
| Bam d <i>Sp6</i> | TAGCCTCTGAGCAGCTG |
| Bam d <i>T7</i> | CGGCAAAGAACACGTTG |
| Bam g <i>Sp6</i> | GACACCGATCGTGTGGT |
| Bam g <i>T7</i> | ACGGAATCGAACCGCTG |
| Bam h <i>Sp6</i> | TCCGACGGTGTATCGCT |
| Bam h <i>T7</i> | GGTCGCCGAAATCGTAC |
| Bam i <i>Sp6</i> | TCTACAAGCAGCAGCCG |
| Bam i <i>T7</i> | GGGCATAGAACGTCGT |
| Eco 3 old <i>Sp6</i> | GCGCTAATCGACGCTAG |
| Eco 3 old <i>T7</i> | AGGTCCGCGCTGTAGAT |
| Eco 46 <i>Sp6</i> | CCACAGCTTGATTGTTG |
| Eco 46 <i>T7</i> | GTGTTGCACCAACCGTG |
| Eco 49 <i>Sp6</i> | GTCGGTTACGACACGTG |
| Eco 49 <i>T7</i> | AGCTGTACGGTGCACGT |
| Eco 5G <i>Sp6</i> | AGAGCGTACTGCATCGT |
| Eco 5G <i>T7</i> | CCAGTCTGACATAGCGT |
| Eco 5N <i>Sp6</i> | TCGGTGTCTCAACGATGT |
| Eco 5N <i>T7</i> | CGTTAGGTTGGACACGT |
| Eco 5NN <i>Sp6</i> | GTCGTCCGAGTAAGCGT |
| Eco 5NN <i>T7</i> | CTACGAACCTAGGCGTG |
| EcoRI 27k <i>T7</i> | TGATATTATGATCGTCAC |
| Gr-dw | CGCTTGACTCAGTAGAT |
| Gr-up | TTACAACAGCGACGTGT |
| BglII H d -5 ó BglII 20 d -5 | CGATAGATCCTAACGTCACGT |
| BglII H d -3 ó BglII 20 d -3 | CGACAGTGTATGTGTCGTCGAT |
| BglII H r -5 ó BglII 20 r -5 | TCCGTGTCCAACGAAACCGT |
| BglII H r -3 ó BglII 20 r -3 | AACAACCGAGGATCTGTTGAT |
| BglII I d -5 ó BglII 17 d -5 | TCTTCGAACCTCACGCAGAG |
| BglII I d -3 ó BglII 17 d -3 | CCTCTGAACCTATAAGGGT |
| BglII I r -5 ó BglII 17 r -5 | TTGTGGATGTTACAGCCCCAG |
| BglII I r -3 ó BglII 17 r -3 | CACGCGCCGGATCAGTATAT |

Clonado del gen de granulina

Preparación de bacterias *E. coli* electrocompetentes

Se crecieron bacterias *E. coli* TOP 10 o la cepa *E. coli* DH 5 α hasta saturación. Ese cultivo de diluyó 1/100 en medio LB sin NaCl (1.000 ml) y se cultivó a 37 °C con

agitación de 180-220 r.p.m. 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 3.000 x g durante 10-15 min. a 4 °C y el sedimento de bacterias se resuspendió en 1.000 ml 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, empleando 200 y 50 ml de glicerol 10% (v/v) en los lavados siguientes. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10%, se separaron en alícuotas y se congelaron rápidamente a -80 °C ó a -135 °C hasta el momento de su uso.

Clonado de productos de PCR (gen de granulina)

El producto de la amplificación del gen de granulina fue purificado por precipitación con PEG 6.000 y se ligó al vector pZerO previamente linealizado por digestión con EcoRV. Las reacciones de ligación se realizaron utilizando *buffer* de la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 1 X; 1,5 unidades de la enzima T4 DNA ligasa (Promega) y una relación molar de inserto:vector 10:1. La mezcla se incubó a 16 °C una hora y se utilizó para electrotransformar bacterias competentes TOP 10 (Invitrogen). Las bacterias transformadas fueron plaqueadas en medio LB sólido conteniendo 100 µg/ml de kanamicina para la selección de recombinantes. Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C.

Transformación de *E. coli* por electroporación

La transformación de bacterias electrocompetentes se realizó en un electroporador Gene Pulser TM (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Se mezclaron 80-100 µl de bacterias electrocompetentes con 1 µl de la reacción de ligación y se incubó 2 min. en hielo. 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. Posteriormente, se añadió 900 µl de medio LB sin antibiótico a las bacterias y se las incubó 1 h en baño de agua a 37°C con agitación. Se sembró 100 µl de cultivo en placas de LB con el agregado de antibiótico de selección (Ampicilina 100 µg/ml o Kanamicina 100 µg/ml). Las placas se incubaron 18-24 h a 37 °C.

El sistema de clonado en pZErO-2TM/*E. coli* TOP 10, posee la ventaja de minimizar la obtención de colonias no recombinantes debido a la presencia de un gen letal para *E. coli*. El vector de clonado pZErO-2TM contiene el gen letal *ccdB* fusionado al C-terminal de la proteína LacZ. La inserción de DNA foráneo impide la expresión del gen de fusión *lacZa-ccdB*, permitiendo el crecimiento de las bacterias recombinantes.

Selección de clones recombinantes por PCR

Con palillos estériles se tomaron las colonias resultantes de la transformación y cada una se depositó en un tubo *ependorf*. El material remanente en el palillo se utilizó para realizar una estría en medio selectivo LB-agar con Kanamicina (100 µg/ml). Las bacterias depositadas en el tubo se resuspendieron en 100 ml de agua bidestilada y se hirvieron durante tres minutos. Posteriormente, cada tubo se centrifugó a 14-18.000 X g durante 3 minutos. La reacción de amplificación se realizó en las condiciones descritas anteriormente, utilizando 1 µl del sobrenadante como molde en 10 µl de volumen final y empleando los *primers* internos Eco 5N *Sp6* y Eco 5G *Sp6*. Las colonias que presentaron una señal positiva por PCR fueron cultivadas en medio líquido a partir de la estría correspondiente. Posteriormente se purificaron sus plásmidos y se los analizó por digestión con endonucleasas de restricción.

Secuencias y bioinformática

Secuenciamiento

El secuenciamiento nucleotídico se realizó mediante el método dideoxi, utilizando, un secuenciador automático ABI 373A (Applied Biosystems) del servicio de secuencias del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Alternativamente, algunos productos se secuenciaron en servicios externos con secuenciadores 377 (Applied Biosystems). Para estas secuencias se utilizaron *primers* T7, *Sp6*, M13 reverso, M13 directo; además algunas regiones del genomas viral fueron secuenciadas empleando *primers* de diseño específico (Tabla 2.6). Los cromatogramas se visualizaron con el programa Chromas 1.51 (Technelysium, Pty. Ltd., Queensland, Australia).

Construcción de contigs

Cada una de las secuencias provenientes de extremos de clones fue comparada con las secuencias del GenBank utilizando los algoritmos BLASTX, BLASTN, PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1990, 1997). Las secuencias correspondientes a un mismo gen (provenientes de los extremos de dos clones) se unieron de manera de generar una secuencia continua (contig). También se alinearon de manera continua las secuencias de extremos de otros clones que no presentaban similitud con ningún ORF conocido. Estas secuencias se alinearon gracias a la confirmación del mapa de restricción por técnicas de PCR.

El programa SeaView (Galtier *et al.*, 1996), se usó para modificar secuencias introduciendo y borrando caracteres desde el teclado. El paquete de programas "The Sequence Manipulation Suite" (Stothard, 2000) se empleó, entre otros, para transformar una secuencia en su reversa complementaria, para traducir secuencias y para mostrar secuencias en formatos gráficos.

Análisis de secuencias

Las secuencias se ensamblaron en *contigs* de acuerdo a su posición y cada uno de ellos fue analizado por BLASTX contra GenBank. En caso de encontrarse similitudes significativas con algún marco de lectura de la secuencia de EpapGV, el marco se tradujo con el programa ORF finder. Posteriormente, los marcos de lectura seleccionados fueron comparados con las secuencias del GenBank por BLASTP. Los ORFs de EpapGV fueron asignados a genes homólogos teniendo en cuenta el valor de *expect* (E) del programa BLAST y el porcentaje de similitud. Aquellas secuencias que no mostraron similitud respecto a genes conocidos, fueron traducidas para detectar marcos de lectura continuos mayores a 50 aa. Estos marcos de lectura se compararon con secuencias de la base de datos GenBank empleando BLASTP, restringiendo la búsqueda a genes presentes en los baculovirus y los granulovirus. Adicionalmente se usó el algoritmo BLASTN para analizar secuencias nucleotídicas de EpapGV sin homólogos conocidos. La caracterización de los ORFs con homólogos conocidos o sin ellos, se amplió analizando el contenido GC, la presencia de promotores, de sitios de poliadenilación y de motivos comunes a otras secuencias conocidas, tal como se detalla continuación.

La presencia de secuencias repetidas se analizaron con los programas BLAST2 seq (Altschul *et al.*, 1997), OLIGOS-9 (Rychlik & Rhoads, 1989; Rychlik *et al.*, 1990), DNA

for windows-2.2 (Dixon, D. 1999) (<http://www.the-dixons.fsnet.co.uk/#gen>), DOT-PLOT (<http://helix.biology.mcmaster.ca /721/outline2/node38.html>), Tandem Repeats Finder Program Version 2.02 (<http://tandem.biomath.mssm.edu/ trf/trf.basic.submit.html>) (Benson, 1999) y DOTlet (<http://www.isrec.isb-sib.ch/ java/dotlet/Dotlet.html>). El porcentaje GC de secuencias codificantes y no codificantes se calculó con el programa OLIGOS-9. La presencia de motivos estructurales proteicos fue analizada mediante los siguientes programas: *conserved domain search* (CDD) (Altschul *et al.*, 1997); BLOCKS (Henikoff S. & Henikoff, J. G., 1994) (www.blocks.fhcrc.org) y SMART (Simple Modular Architecture Resources) (Letunic *et al.*, 2002; Schultz *et al.*, 1998) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Las secuencias proteicas fueron analizadas también en el banco de datos PROSITE (Sigrist *et al.*, 2002) (<http://www.expasy.org/prosite>) con diversos programas en búsqueda de motivos comunes. En particular, se buscaron patrones de unión al DNA, sitios activos de enzimas, motivos de fosforilación, regiones transmembranas, regiones de baja complejidad, péptidos señales, etc.

Programas utilizados en los análisis filogenéticos

Alineamientos de secuencias

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se alinearon con el programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1994) empleando la tabla de cambios conservativos BLOSUM62 y/o la matriz estándar Gonnet. En algunos casos los parámetros de penalidades para la apertura y alargue de gaps fueron modificados (Tabla 2.7). El alineamiento de los genes *iaps* fue editado manualmente empleando el editor SeaView a fin de seleccionar para esta comparación sólo los motivos BIR y RING-Finger. Las secuencias analizadas, nombres y números de acceso se indican en las tablas 2.8, 2.9 y 2.10.

Tabla 2.7. Parámetros empleados en los alineamientos y en los análisis filogenéticos.

| Gen analizado | <i>granullna</i> | <i>iap</i> | 20 genes comunes entre todos los baculovirus secuenciados y EpapGV concatenados |
|-------------------------------|--|---------------------|---|
| Alineamientos | | | |
| Matriz | Blosum 62 | Gonnet | Blosum 62 |
| Penalidad de apertura de gap | 11 | 10 | 11 |
| Penalidad de extensión de gap | 1 | 0,2 | 1 |
| Análisis filogenéticos | | | |
| Programas empleados | PAUP y PHYLIP | PHYLIP | PAUP |
| Criterio | Parsimonia y distancia (<i>Neighbour Joining</i> y Fitch) | Parsimonia | Parsimonia |
| Outgroup | <i>poliedrina</i> de NsSNPV | OpMNPV <i>iap-4</i> | sin outgroup |
| Replicas | 1.000 | 100 | 1.000 |

Tabla 2.8. Números de acceso de secuencias empleadas en la filogenia del gen de granulina. Se indican además la procedencia de genes no descritos a GenBank. La secuencia de poledrina de *Neodiprion sertifer* NPV (NsNPV) fue obtenido de Zanotto *et al.* (1993); las secuencias de PhopGV y SpliGV fueron gentilmente provistas por el Dr. López-Ferber. El Dr. Ian Smith aportó la secuencia de granulina de *Lacanobia oleracea* GV (LoGV).

| GVs | | NPVs Grupo I | |
|---|----------|---|----------|
| EpapGV | AF473703 | <i>Autographa californica</i> MNPV (AcMNPV) | AAA46719 |
| <i>Adoxophyes orana</i> GV (AoGV) | AAL02082 | <i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV (AgMNPV) | JQ1607 |
| <i>Agrotis segetum</i> GV (AsGV) | P31035 | <i>Anagrapha falcifera</i> MNPV (AnfaMNPV) | AAB53352 |
| <i>Choristoneura fumiferana</i> GV (CfGV) | AAC69544 | <i>Amsacta albistriga</i> NPV (AmaNPV) | AAD24463 |
| <i>Cydia pomonella</i> GV (CpGV) | AAK70668 | <i>Archips cerasivoranus</i> NPV (ArceNPV) | AAA93290 |
| <i>Cryptophlebia leucotreta</i> GV (CfGV) | CAA56107 | <i>Attacus ricini</i> NPV (AtriNPV) | S68462 |
| <i>Harrisina brillians</i> GV (HbGV) | AAF66610 | <i>Bombyx mori</i> MPV (BmNPV) | AAA46734 |
| <i>Pieris brassicae</i> GV (PbGV) | P06502 | <i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV (CfMNPV) | AAA93291 |
| <i>Plutella xylostella</i> GV (PxGV) | AAG27302 | <i>Epiphyas postvittana</i> NPV (EppoNPV) | AAC72189 |
| <i>Trichoplusia ni</i> GV (TrnGV) | AAA43834 | <i>Hyphantria cunea</i> NPV (HycuNPV) | AG10795 |
| <i>Xestia c-nigrum</i> GV (XcGV) | AAB42059 | <i>Orgyia pseudotsugata</i> MPNV (OpMNPV) | AAA64926 |
| | | <i>Perina nuda</i> NPV (PenuNPV) | AAA64782 |
| NPVs no agrupados | | <i>Thysanoplusia orichalcea</i> MNPV (ThorMNPV) | AAD51629 |
| <i>Wiseana signata</i> NPV (WisNPV) | AAB97154 | | |
| <i>Spodoptera littoralis</i> NPV (SpliNPV) | BAA00824 | | |
| <i>Lymantria dispar</i> LdMNPV (LdMNPV) | AAA4672 | | |
| | | | |
| NPVs Grupo II | | NPVs Grupo II | |
| <i>Buzura suppressaria</i> NPV (BusuNPV) | CAA50194 | <i>Mamestra brassicae</i> MNPV (MbMNPV) | AAA69768 |
| <i>Ecotropis obliqua</i> SNPV (EcobSNPV) | AAB53632 | <i>Orgyia pseudotsugata</i> SNPV (OpSNPV) | AAA46739 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> NPV (HearSNPV) | CAA05090 | <i>Panolis flammea</i> MNPV (PafMNPV) | BAA00338 |
| <i>Heliothis armigera</i> SNPV NPV (HeliarSNPV) | AAB82410 | <i>Plusia orichalcea</i> NPV (PlorNPV) | AAC64234 |
| <i>Helicoverpa zea</i> SNPV (HzSNPV) | AAB54089 | <i>Spodoptera exigua</i> MNPV (SeMNPV) | AAF33532 |
| <i>Leucania separata</i> NPV (LeseNPV) | AAA99736 | <i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV (SfMNPV) | P14670 |
| <i>Mamestra configurata</i> NPV (MacoNPV) | AAB51031 | <i>Spodoptera littura</i> NPV (SpliNPV) | CAA64211 |
| <i>Malacosoma neustria</i> NPV (ManeNPV) | CAA39191 | <i>Trichoplusia ni</i> SNPV (TnSNPV) | AAC64160 |
| <i>Malacosoma disstria</i> MNPV (MadiMNPV) | AAD00095 | | |

Tabla 2.9. Genes *iaps* empleados en los análisis filogenéticos y números de acceso de genomas completos y de genes *iaps* en genomas no secuenciados completamente.

| Genes analizados |
|---|
| Op IAP1, Eppo IAP1, Bm IAP1, AcMNPV IAP1, Ac IAP2, Bm IAP2, Op IAP2, Eppo IAP2, SeNPV IAP2, Har IAP2, Hz IAP2, LdNPV IAP2, Maco IAP2, <i>Trichoplusia ni</i> IAP3, <i>Bombyx mori</i> IAP3, <i>Spodoptera frugiperda</i> IAP3, Se IAP3, Op IAP3, Cf IAP3, Eppo IAP3, Buz IAP3, Maco IAP3, EpapGV IAP, CpGV IAP3, Hz IAP3, Ha IAP3, Eppo IAP4, Op IAP4, Ld IAP3, Spli IAP, CpGV ORF 94, PhopGV ORF86, CpGV IAP5, PxGV IAP5, XcGV IAP5, TniGV IAP5, PhopGV IAP5. |
| Números de accesos |
| Baculovirus totalmente secuenciados: <i>Epiphyas postvittana</i> NPV (EppoNPV) AY043265, <i>Orgyia pseudotsugata</i> MPNV (OpMNPV) U75930, <i>Autographa californica</i> MNPV (AcMNPV) L22858, <i>Bombyx mori</i> MPV (BmNPV) L33180, <i>Helicoverpa armigera</i> NPV G4 (HearSNPV o HaSNPV) AF271059, HaSNPV NC_003094, <i>Helicoverpa zea</i> SNPV (HzSNPV) AF334030, <i>Spodoptera exigua</i> MNPV (SeMNPV) AF169823, <i>Lymantria dispar</i> LdMNPV (LdMNPV) AF081810, <i>Mamestra configurata</i> NPV (MacoNPV)-90/2 AF467808, MacoNPV-96B NC_003529, <i>Spodoptera littoralis</i> NPV (SpliNPV) AF325155, <i>Xestia c-nigrum</i> GV (XcGV) AF162221, <i>Plutella xylostella</i> GV (PxGV) AF270937, <i>Cydia pomonella</i> GV (CpGV) AF53466, PhopGV AF499596, <i>Culex nigripalpus</i> NPV (CuniNPV) AF403738, <i>Spodoptera exigua</i> MNPV (SeNPV) AF169823. En tanto que las secuencias de IAPs de baculovirus no totalmente secuenciados se corresponden con: <i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV (CfMNPV) AAD00537; TniGV IAP5 AF079223_2.. Secuencias de IAPs de insectos: <i>Trichoplusia ni</i> IAP3 AF195528_1; <i>Bombyx mori</i> IAP3 AF281073_1; <i>Spodoptera frugiperda</i> AF186378_1. |

Tabla 2.10. Genes empleados en el análisis de la filogenia de los baculovirus por genes concatenados y genomas a los cuales pertenecen estos genes.

| Genes |
|---|
| <i>lef-2</i> , <i>pol/gran</i> , <i>lef-1</i> , <i>ac22</i> , <i>efp</i> , <i>ac29</i> , <i>fgf</i> , <i>me53</i> , <i>odv-e66</i> , <i>vp1054</i> , <i>dna-pol</i> , <i>ac76</i> , <i>vlf-1</i> , <i>gp41</i> , <i>vp39</i> , <i>odv-e25</i> , <i>exo-alk</i> , <i>odv-e18</i> , <i>ie-1</i> , <i>odv-e56</i> . |
| Genomas |
| <i>Autographa californica</i> MNPV (AcMNPV), <i>Bombyx mori</i> NPV (BmNPV), <i>Cydia pomonella</i> GV (CpGV), <i>Culex nigripalpus</i> NPV (CuniNPV), <i>Epiphyas postvittana</i> MNPV (EppoMNPV), <i>Helicoverpa armigera</i> SNPV (HaSNPV), <i>Helicoverpa zea</i> SNPV (HzSNPV), <i>Lymantria dispar</i> MNPV (LdMNPV), <i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV (OpMNPV), <i>Plutella xylostella</i> GV (PxGV), <i>Rachiplusia nu</i> MNPV (RouMNPV), <i>Spodoptera exigua</i> MNPV (SeMNPV), <i>Spodoptera littura</i> MNPV (SpliMNPV), <i>Xestia c-nigrum</i> GV (XcGV). |

Para el análisis de la filogenia de baculovirus a partir de la concatenación de genes, se seleccionaron 20 genes comunes a los baculovirus totalmente secuenciados y a EpapGV (LEF-2, POLH/GRAN, LEF-1, AC22, EFP, AC29, FGF, ME53, ODV-E66, VP1054, DNA-POL, AC76, VLF-1, GP41, VP39, ODV-E25, ALK-EXO, ODV-E18, IE-1, ODV-E56) (Tabla 2.8). Posteriormente, se organizaron las aminoácidas de los productos génicos concatenándolas en el mismo orden en todos los genomas. El producto de esto fue una matriz que contenía los 17 genomas con 20 genes cada uno. Este apilamiento se alineó en CLUSTALX, empleando los parámetros estándar y la matriz BLOSUM. Dada la imposibilidad del programa CLUSTAL de alinear una matriz con más de 10.000 caracteres de una única vez, se escogió otra estrategia alternativa. Se procedió por partes, seleccionando el primer grupo de secuencias y alineándolas entre sí; posteriormente, se alineó el grupo 2 y así sucesivamente hasta llegar al último grupo. Los alineamientos se refinaron manualmente con el programa SeaView alineando regiones de baja calidad y suprimiendo regiones no comunes entre los baculovirus totalmente secuenciados.

Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos fueron llevados a cabo con el programa PAUP *4.0b8 (Swofford, 2000) empleando los criterios de máxima parsimonia (para *granulina* y genes concatenados) y de distancia por *Neighbour Joining* (NJ) (para *granulinas*). Además, se empleó el paquete de programas PHYLIP (Felsenstein, J.; 1995) para el análisis de las filogenias de los genes de *granulina* e *iaps*. Con este programa se analizaron las filogenias empleando los criterios de máxima parsimonia y distancia (*Neighbour Joining* y Fitch). La consistencia de la filogenia fue estimada por análisis de *bootstrap* generando 100 ó 1.000 réplicas, según el caso (Tabla 2.7). Los árboles fueron construidos empleando las rutinas PROTPARS, PROTDIST o FITCH, según el caso. Los árboles se editaron con los programas Drawtree o TreeView 1.6.1 (Page, 1996) y Corel Draw-9. En los análisis del gen de *granulina*, al igual que Zanotto *et al.* (1993) la secuencia del gen de poliedrina del baculovirus *Neodiprion sertifer* SNPV (NsSNPV) fue usada como *outgroup* (grupo externo u *outgroup*) para estimar la posición de la raíz del árbol. En tanto que para el análisis de los genes *iaps*, la proteína *iap-4* de OpMNPV fue usada como *outgroup*. El árbol filogenético analizado a partir de genes concatenados tiene 26201 pasos, un índice de consistencia (CI) de 0,7909 y un índice de Homoplasía (HI) de 0,2091 luego de remover los sitios no informativos. El índice reescalado de consistencia (RC) fue de 0.5976. La estrategia de

búsqueda del mejor árbol involucró un algoritmo heurístico con 1000. Se empleó TBR y la matriz Protpars. Los gaps fueron considerados como datos faltantes.

Gráficos de paridades de genes

El gráfico de paridad de posición de genes se construyó según lo descrito por Hu *et al.* (1998). Inicialmente se compuso una tabla en donde se registró la posición de los ORFs de EpapGV y de sus homólogos en los granulovirus totalmente secuenciados. Posteriormente, se generó una nueva posición relativa sólo con los genes presentes en cada genoma. Con estos datos se efectuó un gráfico en el cual la ordenada corresponde al orden relativo de los ORFs en EpapGV y la abscisa la posición relativa de sus ORFs homólogos en distintos baculovirus. Se asignaron números negativos a los genes ausentes en otros GVs, a fin visualizarlos mejor en el gráfico. Los esquemas de paridades de genes se construyeron con el programa Excel del paquete Office. El gen *p49* no se ha incluido en este gráfico por no haberse obtenido su secuencia recientemente, sin embargo de su inclusión no genera variaciones en el perfil de paridad dado que se encuentra en una región colineal.

Mapeo del contenido de genes de los granulovirus sobre el árbol filogenético más parsimonioso calculado a partir de veinte genes comunes a los baculovirus

Se graficó la hipótesis más parsimoniosa de adquisición de genes para el género *Granulovirus* partiendo de del árbol filogenético calculado a partir del análisis de secuencias concatenadas. Para ello se partió del trabajo de Herniou *et al.* (2003) y se incorporaron los genes de PhopGV y EpapGV. Según este trabajo los genes han sido divididos en distintas categorías. La tarea consistió en describir los genes comunes a cada rama de los baculovirus y seguir la aparición o desaparición de genes a lo largo de las ramas de los GVs. Para este análisis se han excluido los genes *bro* debido a la dificultad de establecer su ancestro común. Los ORFs exclusivos de EpapGV son sólo provisionarios y han sido localizados en la fracción secuenciada del genoma.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN Y ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA MAYORITARIA DE EpapGV

Introducción

La característica principal de los baculovirus, tanto del género *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) como del género *Granulovirus* (GV), reside en la presencia de cuerpos de oclusión proteica (*occluded bodies*, OB) de 0,5 a 15 μm que recubren a las nucleocápsides envueltas (*enveloped nucleocapsids*, ENCs). El cuerpo de oclusión (también llamado de inclusión) está formado por una proteína mayoritaria, poliedrina en los NPVs y granulina en los GVs y representa hasta el 95% de las proteínas del OB (Bergold, 1964). Una de las características prominentes de las poliedrinas y granulinas es su solubilidad a pHs altos. Esta propiedad es aprovechada para purificar las nucleocápsides. Así, el tratamiento de cuerpos de inclusión en medio alcalino provoca la desorganización de los OBs liberando las ENCs (Maruniak, 1986).

A partir de estudios de dinámica de poblaciones de *E. aporema* que tenían como objetivo analizar la relevancia de la mortalidad causada por agentes naturales, se ha detectado (entre otros) un agente principal causante de epizootias esporádicas. Caracterizaciones preliminares basadas en la sintomatología de la larva infectada (Díaz & Díez, 1989) y en microscopía de contraste de fase de cuerpos de inclusión (Ripa, 1982), sugirieron que este patógeno se trataba de un granulovirus. Recientemente, en el 2001 se documentaron las evidencias de microscopía electrónica y bioquímicas que confirmaron esa identidad (Sciocco-Cap *et al.*, 2001). El mismo fue denominado virus de la granulosis de *Epinotia aporema* (EpapGV), en función del nombre del organismo en donde se aisló el virus.

En este capítulo se presenta evidencia de microscopía electrónica y datos bioquímicos que confirman esta identidad genérica. En capítulos posteriores se presentarán datos moleculares que respaldarán esta caracterización previa y que permitirán afirmar que EpapGV debe ser considerado como un nuevo miembro del género *Granulovirus*.

Si bien en este capítulo se describen de forma general las proteínas mayoritarias de EpapGV, la caracterización de otras proteínas del virión, así como el estudio detallado por microscopía electrónica de la infección por EpapGV, integran la tesis de la Dra. Alina Goldberg, parcialmente publicada en revistas internacionales (Goldberg *et al.*, 2002b; Goldberg *et al.*, 2003; Sciocco-Cap *et al.*, 2001).

Descripción de los baculovirus, evolución histórica

Descripción general

Si bien desde la antigüedad se conocen informes de enfermedades de insectos posiblemente ocasionados por baculovirus, con el advenimiento de la microscopía óptica se determinó que la enfermedad de los gusanos de seda era caracterizada por la acumulación de inclusiones en forma de poliedros y fue recién en la década de 1920 que esta enfermedad fue atribuida a “virus filtrables” (Benz, 1986). Finalmente, en 1947, Gernot Bergold (Bergold, 1947) reveló que la matriz proteica de los poliedros contenía viriones en forma de bastón, característicos de los baculovirus.

Los estudios en las décadas de 1940 y 1950 avanzaron en la determinación de numerosos virus candidatos a ser usados en programas de control biológico de plagas (Steinhaus, 1947). En los años 60 se establecieron las primeras líneas celulares de insectos y en 1973, ya estaba disponible un ensayo de placas para baculovirus (Grace 1962; Hink 1970; Hink & Vail, 1973). Estos avances hicieron posibles los estudios de biología molecular y de genética de la replicación viral bajo condiciones controladas. En la misma época (1975), se registró en los Estados Unidos de América el primer baculovirus como bioinsecticida para ser usado en el combate del gusano del algodón (*Helicoverpa Zea*) (Moscardi, 1999).

A mediados de los 70s se inició el comienzo de la investigación moderna sobre la biología molecular de los virus de insectos. Estudios pioneros durante este período impulsaron un gran interés en las diversas aplicaciones de los virus de invertebrados; estos incluían su uso como vectores de expresión de genes foráneos y la posibilidad de producción de bioinsecticidas mejorados genéticamente.

Con respecto al análisis de las proteínas y de los ácidos nucleicos de los baculovirus, entre la década de 1960 y principios de la década de 1980 una buena parte de los esfuerzos se apuntaron a: la búsqueda de métodos de purificación de distintas fracciones de gránulos, viriones y cápsides así como de DNA; el estudio y caracterización de una proteasa alcalina asociada a poliedros y gránulos; la comparación de perfiles proteicos entre distintos virus y entre diversos aislamientos de un mismo virus; la tipificación de genomas mediante perfiles de restricción; el desarrollo de métodos inmunoquímicos que permitieran la identificación de distintos virus.

Progresos en la descripción de las proteínas de los cuerpos de inclusión.

En la búsqueda de métodos de purificación de nucleocápsides (NC) Day *et al.* (1953) encontraron que los cuerpos de inclusión de los GVs y NPVs se solubilizaban a pH alcalino. Sin embargo, más adelante, Kawanishi *et al.* (1972) demostraron que los OBs podían solubilizarse en un amplio rango de pH (ácido, neutro, básico) con el solvente y las condiciones apropiadas y no sólo a pH básico. Rohrmann (1986) ha postulado que la disolución de las poliedrinas es producto de la ruptura de atracciones electrostáticas entre aminoácidos básicos (argininas y lisinas) y ácidos (aspartato y glutamato) a pHs extremos. Analizando el fenómeno de la solubilización de proteínas de inclusión, Yamafuji *et al.* (1958, 1960) y demostraron por primera vez la presencia de una actividad proteasa asociada a los OBs y establecieron su máxima actividad entre los pHs 10,5 y 11.

Esta proteasa actuaba en paralelo a la solubilización de la poliedrina a pH básico. Eppstein & Thoma (1975) establecieron que esta enzima presentaba características de serin-proteasa y podía ser inhibida con Hg^{+2} y con Cu^{+2} ; sin embargo Summers & Smith (1975) han mostrado que la actividad podría estar relacionada con enzimas de tipo quimotripsina. Para facilitar el proceso de purificación de proteínas virales, la proteasa alcalina puede inactivarse por calentamiento a 70-80 °C durante 20 a 60 minutos (Summers & Smith, 1978). Aparentemente, la proteasa alcalina era producto de una contaminación con enzimas digestivas del intestino medio de los insectos infectados, que eran co-ocuidas con los cuerpos de inclusión. En apoyo a la hipótesis de la contaminación, se encontró que al tratar preparaciones de poliedros que provenían de cultivos celulares en medio alcalino, la actividad enzimática era nula (Maruniak *et al.*, 1979).

En la década del 70 se publicaron numerosos artículos que procuraban caracterizar especies y aislamientos virales mediante el análisis de perfiles proteicos de viriones y de degradaciones trípticas de la proteína mayoritaria. Estos perfiles se analizaban por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Sin embargo, en la actualidad estos métodos sólo tienen validez a modo de presentación preliminar. En el presente se han puesto a punto otros métodos moleculares para ayudar a la identificación de proteínas, tales como la secuencia de extremos amino-terminales por la técnica de Edman o la determinación del peso molecular aproximado a partir de espectroscopía de masa de fragmentos escindidos del gel (espectroscopía MALDI-TOF). Por otra parte, las

caracterizaciones de especies y/o de aislamientos virales se basan principalmente en la información provista por el análisis de secuencias de los ácidos nucleicos.

A esta fecha, los estudios moleculares referidos a la replicación, ensamble, e interacciones entre los virus de insectos y sus huéspedes han contribuido en gran manera al campo de la biología molecular, celular, y a la biología a nivel de organismos.

Objetivos

- Evaluar protocolos de purificación.
- Verificar la presencia de una proteasa alcalina asociada al virión.
- Describir el perfil proteico de los cuerpos de inclusión de EpapGV.
- Determinar la secuencia amino-terminal de la proteína mayoritaria.
- Obtener imágenes de microscopía electrónica que aporten datos sobre la estructura microscópica del gránulo.

Resultados y Discusión

Caracterización morfológica de los cuerpos de inclusión

Introducción

En general, los cuerpos de inclusión de otros granulovirus poseen anchos que van de 160 a 300 nm y largos de 300 a 500 nm (Tweeten *et al.*, 1981). Los OBs de los GVs contienen sólo un virión, el cual consiste en una nucleocápside envuelta por una membrana lipídica.

Microscopía electrónica

Como una primera aproximación a la forma del gránulo se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica que permitieron determinar, de forma preliminar, la morfología y el tamaño de los cuerpos de inclusión y viriones de EpapGV. Los resultados de microscopía electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de gránulos de EpapGV mostraron que los cuerpos de inclusión presentan una morfología elipsoidal cuyo tamaño promedio es de $469 (\pm 37)$ nm x $242 (\pm 22)$ nm. Si bien se ha calculado el tamaño promedio de los gránulos, es necesario resaltar la gran heterogeneidad de sus tamaños (Fig. 3.1). Cortados en diferentes secciones, los gránulos poseen como característica común la presencia de un sólo virión, el cual posee una forma cilíndrica, presentando en algunos casos una leve curvatura. El tamaño de los viriones se determinó en $259 (\pm 9)$ nm x $22 (\pm 3)$ nm. Los viriones se presentan rodeados por una estructura que se identificaría con una membrana lipídica clásica de las nucleocápsides envueltas (Fig. 3.2).

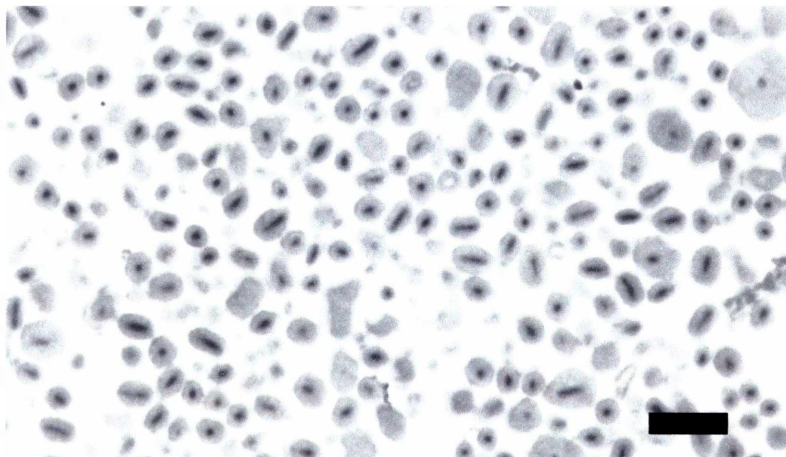


Figura 3.1. Microscopía electrónica de cortes ultrafinos del virus de la granulosis de EpapGV (la barra representa 1 μ m).

Algunos gránulos aparentan tener un espacio vacío en lugar del virión, que se debería a un artefacto provocado por la cuchilla utilizada al cortar el material incluido en la resina. Los datos obtenidos por el autor de esta tesis deben ser tomados como una aproximación inicial debido a la no disponibilidad de microfotografías electrónicas con mayores aumentos.

Con posterioridad y empleando aumentos mucho mayores, Alicia Cap y Alina Goldberg llevaron a cabo un trabajo minucioso analizando cortes de tejidos de *E. aporema* infectados con EpapGV y obtuvieron datos más ajustados que fueron publicados (Sciocco-Cap *et al.*, 2001). En esa publicación, se precisaron las

dimensiones del cuerpo de inclusión [466 (\pm 8.9) nm de largo por 296 (\pm 6.0) nm de ancho], de los viriones [290 (\pm 10,9) nm de largo x 61,2 (\pm 1,8) nm de ancho] y de la nucleocápside en 226 (\pm 8,9) nm x 41,7 (\pm 4,1) nm. Por otra parte, estos tamaños se correlacionan con los descriptos en bibliografía para los GV's (Tweeten *et al.*, 1981).

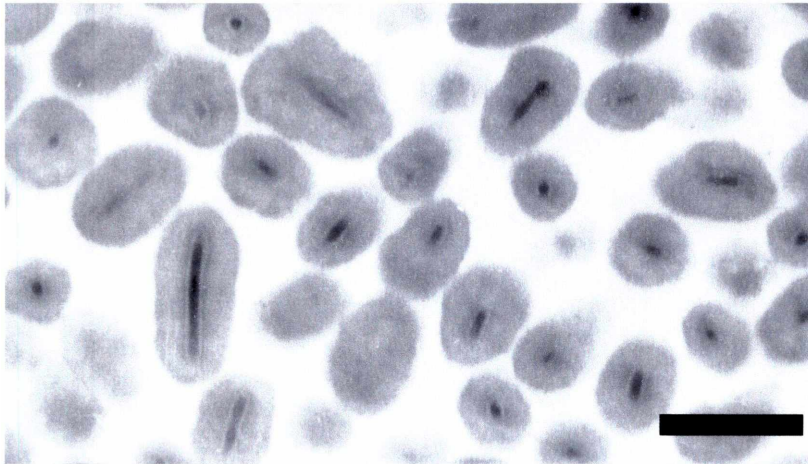


Figura 3.2. Microscopía electrónica de cortes ultrafinos del virus de la granulosis de *Epinotia aporema*. (La barra representa 500 nm).

Determinación de la cantidad de proteínas en el cuerpo de inclusión de EpapGV

Para obtener la cantidad de granulina que se encuentra, en promedio, en un cuerpo de inclusión de EpapGV se ha recurrido a consideraciones geométricas y a los valores de densidad de flotación de gránulo.

Los cuerpos de inclusión de EpapGV poseen una estructura similar a un elipsoide. El elipsoide es la figura geométrica que se forma al girar una elipse sobre uno de sus ejes. El volumen de esta figura es igual a $\frac{4}{3} \pi a.b.c$, siendo a, b y c los radios de cada uno de los ejes. De acuerdo con las estimaciones del tamaño del OB de EpapGV, largo: 466 (\pm 8,9) nm y ancho 296 (\pm 6,0) mm (Siocco-Cap *et al.*, 2001), se calculó el volumen de un gránulo de EpapGV, el cual sería equivalente a $2,14 \times 10^{-14} \text{ cm}^3$. A partir de este valor y de la densidad de flotación del cuerpo de inclusión se calculó la masa de un gránulo. Específicamente, los gránulos se purificaron de un gradiente de sacarosa, extrayéndose los mismos de la banda correspondiente a una densidad de $1,24 \text{ g/cm}^3$. De acuerdo con la fórmula $\delta = m/v$, la masa de un gránulo es de $2,65 \times 10^{-14} \text{ g}$ ó $2,65 \times 10^{-8} \mu\text{g}$. De esta masa, el 95% corresponde a granulina (Bergold, 1964) lo que implica que cada gránulo tiene $2,52 \times 10^{-8} \mu\text{g}$ de granulina. Además, de estos datos se obtiene que $1 \mu\text{g}$ de proteína total equivale a $3,77 \times 10^7$ OB y $1 \mu\text{g}$ de granulina equivale a $3,97 \times 10^7$ OB.



Por otra parte, si tenemos en cuenta que el peso molecular de la granulina es de 29,1 kDa (conforme a su secuencia aminoacídica completa) el peso de una molécula de granulina es $4,83 \times 10^{-20}$ g. Según estos datos, cada gránulo contiene alrededor de $5,2 \times 10^5$ moléculas de granulina.

Análisis de la proteína mayoritaria de EpapGV

Purificación de gránulos de EpapGV

Métodos de purificación

Los gránulos de EpapGV fueron purificados por diversos métodos según su uso posterior: (A), a partir de gradiente de sacarosa; (B), en gran escala mediante centrifugaciones diferenciales y (C), por medio de centrifugaciones diferenciales de pequeñas cantidades de gránulos (minipreparación o minipurificación) (Fig. 3.3).

El primer método está basado en la separación de gránulos en base al coeficiente de sedimentación en gradiente. Este método permite separar bacterias contaminantes y obtener preparaciones de OBs de alta pureza. Si los OBs se purifican sin emplear *buffers* con SDS, los cuerpos de inclusión pueden ser utilizados para ensayos de tiempo letal 50 (TL₅₀) y dosis letal 50 (DL₅₀). El empleo de detergentes iónicos aparentemente elimina moléculas necesarias para la infección *in vivo*. El segundo y tercer método están basados en centrifugaciones diferenciales de grandes y pequeñas cantidades de homogeneizados de larvas infectadas. Estas centrifugaciones precipitan diferencialmente a los contaminantes (restos de tejidos, quitina, bacterias). En el caso del protocolo B, en lugar del gradiente se emplearon centrifugaciones diferenciales. La solución de NaCl 0,5 M empleada en B y C, se empleó para despegar interacciones iónicas entre proteínas contaminantes y el OB. Esta solución, contribuiría además para limpiar la pared de lipopolisacáridos (LPS) de posibles bacterias contaminantes, haciendo las mismas más sensibles a cambios en la presión osmótica.

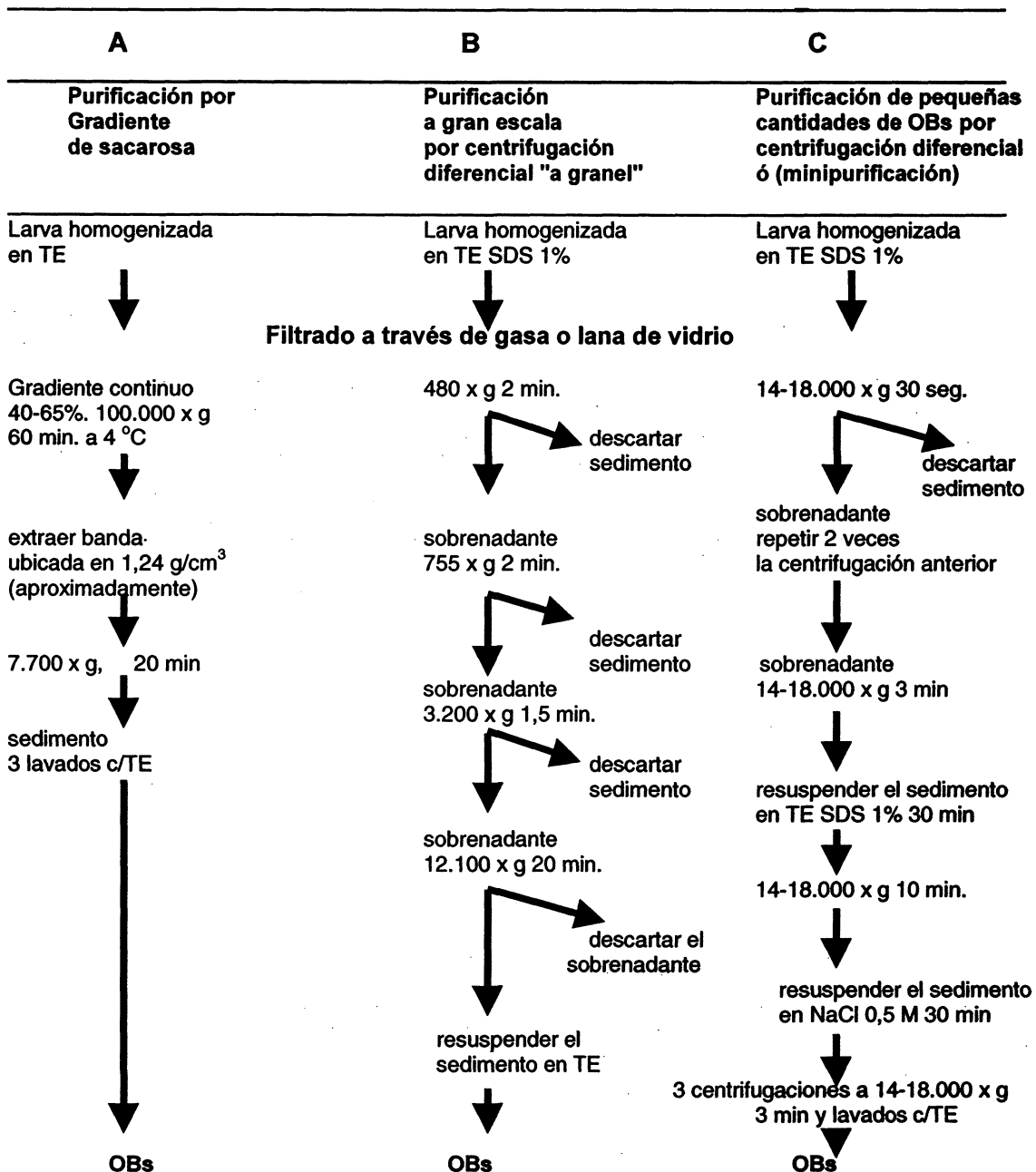


Figura 3.3. Métodos de purificación de gránulos de EpapGV. Nota: El método B ha sido puesto a punto por otro de los miembros del grupo de trabajo.

Control del proceso de purificación de gránulos de EpapGV

Los ensayos de SDS-PAGE han mostrado eficacia para establecer criterios de pureza e integridad de las preparaciones de polipéptidos. En igual sentido, es posible emplear la microscopía óptica para el seguimiento de la purificación, en particular para detectar la presencia de restos de tejidos de insecto y de bacterias en la preparación (Maruniak, 1986).

Si bien se emplearon protocolos de purificación convencionales, se consideró apropiado contar con evidencias experimentales que aseguraran la validez de los mismos para EpapGV. Se controlaron las siguientes variables: A, velocidades y tiempos de centrifugación; B, actividad proteasa alcalina y C, inactivación de la proteasa alcalina por tratamiento térmico.

Control de las velocidades y tiempos de centrifugación de la minipurificación

Para la puesta a punto de la minipurificación, se buscó el menor tiempo de centrifugación que precipitara la mayoría de los cuerpos de inclusión de un homogeneizado de larvas infectadas con EpapGV. Como control, se centrifugaron nuevamente los distintos sobrenadantes (SN) verificando que sus sedimentos no contuvieran una cantidad significativa de gránulos. En particular, se analizaron por SDS-PAGE alícuotas equivalentes de homogeneizado de larvas infectadas y no infectadas, así como sobrenadantes y precipitados de centrifugación. Como criterio de detección de la presencia de los gránulos de EpapGV se siguió la aparición de la proteína viral mayoritaria (granulina) de aproximadamente 30 kDa en SDS-PAGE (Fig. 3.4, calle 9).

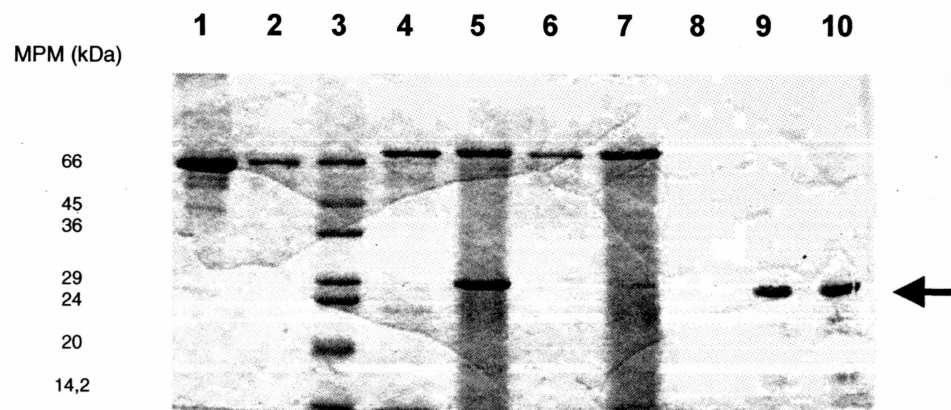


Figura 3.4. SDS-PAGE 15% de homogeneizados de larvas sanas e infectadas con EpapGV. Calle 1 y 2, Albúmina Sérica Bovina, (BSA); calle 3, marcador de peso molecular (MPM) "Sigma Gel Low Range"; calle 4, homogeneizado total de larvas no infectadas; calle 5, homogeneizado total de larvas infectadas; calle 6, sobrenadante del homogeneizado de larvas no infectadas; calle 7, sobrenadante del homogeneizado de larvas infectadas; calle 8, sedimento de homogeneizado de larvas no infectadas; calle 9, sedimento de homogeneizado de larvas infectadas; calle 10, control positivo: gránulos de EpapGV purificados por centrifugación en gradiente de sacarosa. A la izquierda se aprecian los tamaños del MPM "Sigma Gel Low Range" y a la derecha se ha señalado con una flecha, la banda de granulina.

En este gel, en la calle 5 puede apreciarse la gran proporción de esta proteína sobre las proteínas totales del homogeneizado y la presencia casi exclusiva de proteínas virales en el precipitado de centrifugación (Fig. 3.4, calle 9). Las diferencias en la

tinción entre la banda de granulina de la calle 5 y la calle 9, se deberían a la compresión de la banda de granulina en esta última calle. Se observó también la ausencia de granulina tanto en el homogeneizado de larvas (Fig. 3.4, calle 4), como en el sobrenadante de centrifugación del homogeneizado de larvas no infectadas (Fig. 3.4, calle 6) y en el sedimento de la misma muestra (Fig. 3.4, calle 8). Los resultados de figura 3.4, indicaron que las velocidades y tiempos de centrifugación (3 min. a 14-18.000 x g en microcentrífuga) del protocolo C, fueron efectivos para precipitar la totalidad de los gránulos presentes en un homogeneizado de larvas infectadas.

Determinación de la presencia de actividad proteasa alcalina

Se evaluó la disolución de cuerpos de inclusión de EpapGV con el objeto de verificar la presencia de actividad proteasa alcalina en los OBs y para controlar si el tiempo de disolución del gránulo en medio básico era apropiado. Para ello, se trataron distintas preparaciones de gránulos con solución alcalina. A distintos tiempos de tratamiento (1, 15 y 30 minutos) la suspensión fue neutralizada con HCl 0,1 N y centrifugada durante 3 min. a 14-18.000 x g en microcentrífuga. Tanto el sobrenadante como el sedimento fueron calentados 5 min. con *buffer* de muestra y se resolvieron en SDS-PAGE (Fig. 3.5).

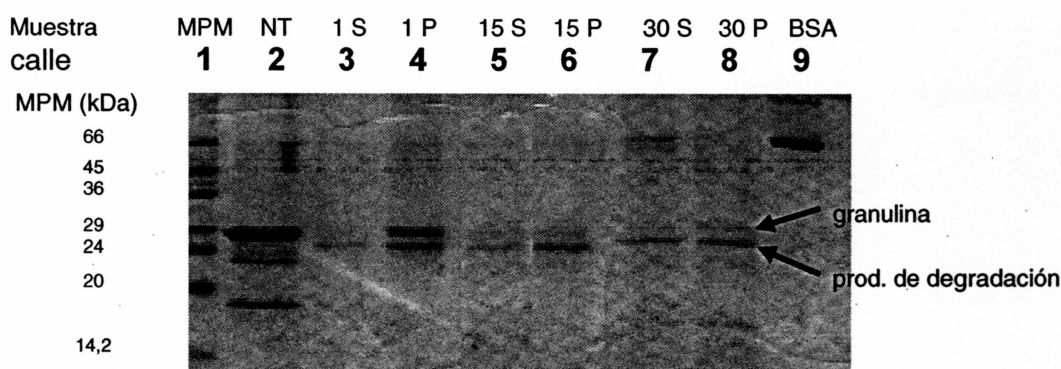


Figura 3.5. SDS-PAGE 15% con muestras de gránulos tratados con solución alcalina.

Se trataron OBs de EpapGV con solución alcalina y a distintos tiempos de tratamiento (1, 15 y 30 minutos) la suspensión fue neutralizada con HCl 0,1 N y centrifugada durante 3 min. a 14-18.000 x g en microcentrífuga. Tanto el sobrenadante como el sedimento fueron calentados 5 min. con *buffer* de muestra y resueltos en gels de SDS-PAGE. Calle 1, MPM "Sigma Gel Low Range", calle 2, gránulos de EpapGV sin tratar (NT). Sobrenadantes después de 1, 15 y 30 minutos: 1S, 15S, 30S en calles 3, 5 y 7. Sedimentos ("pellets") después de 1, 15 y 30 minutos: 1P, 15P, 30P en calles 4, 6 y 8. Calle 9, BSA. A la izquierda se aprecian los tamaños del MPM. Con flechas se indican la posición de granulina y del producto de degradación mayoritario de 25 kDa.

En la figura 3.5 puede observarse los OB de EpapGV son solubilizados y/o degradados rápidamente al ser tratados con solución alcalina, dado que a un minuto post tratamiento la cantidad de granulina en el sedimento de centrifugación era varias veces menor que la original. Además se observó una banda de 25 kDa producto de la

degradación de granulina por la proteasa alcalina. La cantidad de este producto de degradación se incrementó en los sedimentos ("pellets") correspondientes a 15 y 30 minutos de tratamiento con solución alcalina. La banda de degradación de 25 kDa se detectó, mayoritariamente, en el sedimento de gránulos y una pequeña porción de la misma se localizó en los sobrenadantes, sugiriendo que esta proteína permanecía asociada al OB. La presencia de bandas asociadas a la degradación de proteínas mayoritarias está de acuerdo con lo descrito por Yamafuji *et al.* (1958). Este tratamiento en medio alcalino provoca la desorganización de los OBs liberando las ENC. Con respecto a la granulina (30 kDa), esta proteína fue detectada casi exclusivamente en los sedimentos de centrifugación y su nivel fue decreciendo con a medida que se incrementó el tiempo de tratamiento.

En conclusión, en las condiciones experimentales ensayadas la proteólisis de la mayor parte de la granulina de los OBs se produjo antes de los 30 minutos de tratamiento con medio alcalino.

Inactivación de la proteasa alcalina

Para usos posteriores, era necesario disolver los gránulos sin degradar las proteínas virales de la matriz de oclusión y del virión. Por esto, se decidió verificar un protocolo de inactivación de la proteasa alcalina por calentamiento a 75 °C durante 45 a 60 min. (Summers & Smith, 1975). Posteriormente, los OBs se incubaron en solución alcalina, y al cabo 30 minutos se neutralizaron las muestras con HCl 0,1 N y se sembraron alícuotas equivalentes en gel de poliacrilamida.

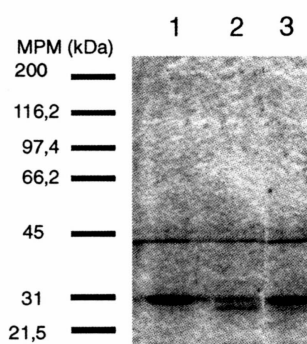


Figura 3.6. Control de inactivación de la actividad proteasa alcalina en SDS-PAGE 12%. Calle 1, gránulos de EpapGV sin tratamiento inactivante y sin tratamiento alcalino; calle 2, gránulos de EpapGV no inactivados y con tratamiento alcalino; calle 3, gránulos de EpapGV inactivados por calor y tratados con carbonato. A la izquierda se aprecian los tamaños del MPM "Bio Rad Broad Range".
Nota: en este gel a la altura de 45 kDa se encuentra una banda de proteína contaminante.

Los resultados indicaron que los OBs de EpapGV tratados con calor e incubados en *buffer* alcalino no sufrieron proteólisis (Fig. 3.6, calle 3), por el contrario el lote no tratado con calor (Fig. 3.6, calle 2) mostró un producto característico de degradación de 25 kDa. Las diferencias en la cantidad de granulina degradada en función del

control no tratado entre este experimento y el de la figura 3.5, podrían deberse a que las muestras provienen de dos preparaciones diferentes de gránulos.

Conclusiones parciales respecto a protocolos de purificación

El análisis de los resultados de los experimentos de control de las variables de purificación, indicó que los protocolos empleados poseen las características deseadas para la correcta purificación de gránulos de EpapGV. En particular, el tiempo óptimo de disolución de gránulos fue menor a 30 min. Además, el tratamiento por calentamiento a 75 °C durante 45 min. inactivó satisfactoriamente la actividad proteasa alcalina.

Identificación de proteínas estructurales

Perfil de proteínas del cuerpo de inclusión por análisis de SDS-PAGE

A fin de caracterizar de manera preliminar las proteínas totales de cuerpo de inclusión de EpapGV se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes en gel de poliacrilamida con muestras de gránulos de EpapGV (Fig. 3.7). En este gel se resolvieron en paralelo OBs de EpapGV y de *Cydia pomonella* GV (CpGV). Ambas muestras presentaron perfiles similares y proteínas mayoritarias de alrededor de 30 kDa. El peso de estas proteínas mayoritarias está en el rango descrito para las proteínas de inclusión de NPVs y GVs entre 25,2 kDa y 31,4 kDa (Summers & Smith, 1978). De acuerdo con el peso molecular y con el nivel de expresión, esta proteína sería la granulina de EpapGV.

Además, en EpapGV se observan otras proteínas minoritarias cuyos pesos moleculares son similares a las proteínas de CpGV (64,7 kDa; 59,9 kDa; 24,9 kDa y 19,4 kDa). Con respecto a las bandas de 64,7 kDa y de 59,9 kDa, las mismas podrían ser dímeros de granulina. Summers & Smith (1978) encontraron que al someter a SDS-PAGE a granulina purificada, aparecían bandas del doble de peso molecular de esta proteína (60-66 kDa). Posteriormente, otros autores informaron que si se extraían estas bandas y se las trataba con agentes reductores y la muestra era sometida a una electroforesis de SDS-PAGE, encontraban una proteína de 30 kDa que reacciona con antisueros anti-granulina/poliedrina. Datos no mostrados aquí, indicaron que antisueros preparados contra granulina de *Harrisinia brillians* (HbGV) reaccionaron con

la banda de granulina y con estas dos bandas (64,7 kDa y 59,9 kDa) apoyando las hipótesis del dímero de granulina.

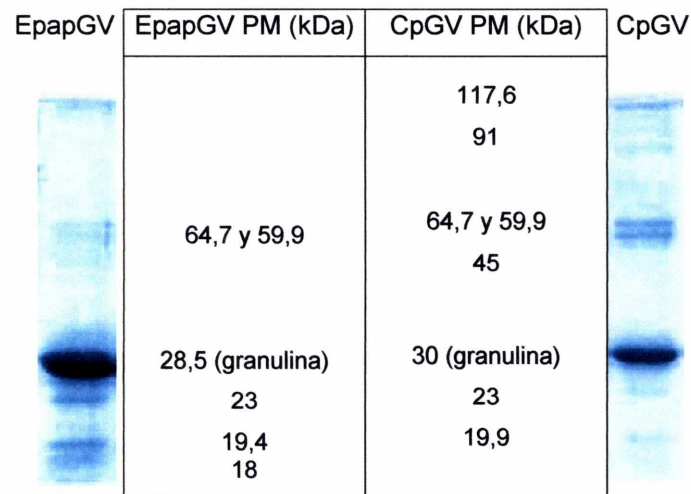


Figura 3.7. Gel de poliacrilamida 12% con OBs de EpapGV y CpGV. A ambos lados de la figura se muestran los perfiles de proteínas de los gránulos purificados de EpapGV y CpGV (gel de poliacrilamida teñido con *Coomassie blue*). En la parte central se indican los pesos de las proteínas mayoritarias. Sólo se indican las proteínas más representativas. En este gel, la banda de 45 kDa de CpGV se encuentra poco teñida.

Determinación aproximada del peso molecular de la proteína mayoritaria de EpapGV

Con el objeto de conocer de forma más precisa el peso molecular de la proteína mayoritaria de EpapGV, se diluyó convenientemente una preparación de gránulos y la misma se resolvió en SDS-PAGE (Fig. 3.8). En paralelo, se resolvieron muestras de cuerpos de inclusión de otros NPVs y GVs.

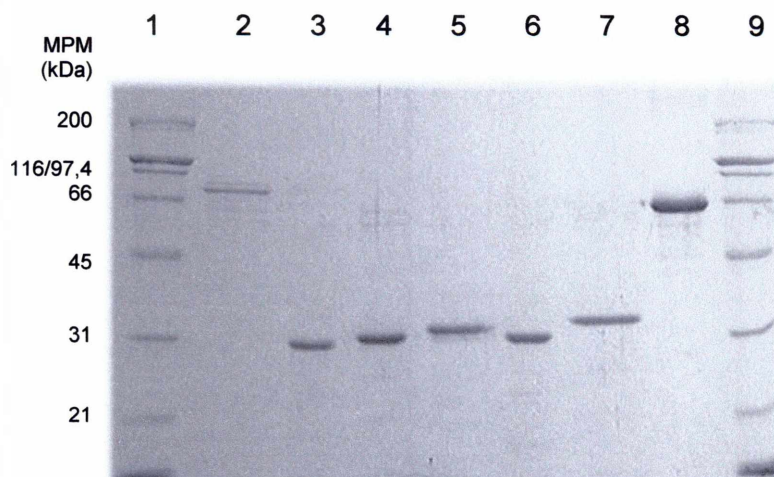


Figura 3.8. Perfil de proteínas de GVs y NPVs en SDS-PAGE 12%. Calle 1 y 9 marcadores de PM, "Bio Rad Broad Range"; calle 2, larvas de EpapGV no infectadas; calles 3-7, gránulos de GVs y NPVs: calle 3, EpapGV; calle 4, CpGV; calle 5, AgMNPV; calle 6, SfMNPV; calle 7, RouSNPV; calle 8, BSA. A la izquierda se aprecian los tamaños del MPM "Bio Rad Broad Range".

Exceptuando CpGV, las muestras correspondieron a virus cuyos insectos blanco atacan a cultivos de soja. El peso molecular aparente de la granulina de EpapGV, extrapolado de los marcadores de peso molecular, resultó en $28,5 \pm 0,5$ kDa y coincide con el rango de 25,2 a 31,4 kDa informado por Summers & Smith (1978) para estas proteínas de inclusión.

Secuenciamiento parcial de la proteína mayoritaria del cuerpo de inclusión

Secuencia amino terminal

A partir del análisis de perfiles de SDS-PAGE de gránulos de EpapGV y en base al nivel de expresión y el peso molecular de la proteína mayoritaria, es posible asumir que la misma corresponde a granulina. Para verificar esto último, se secuenció el extremo amino-terminal de la banda de gel de poliacrilamida. Con ese objeto, se calentaron en *buffer* de muestra gránulos purificados de EpapGV y se resolvieron por electroforesis de geles preparativos de Tricina-SDS-PAGE (Fig. 3.9) (Schägger & Von Jagow, 1987).

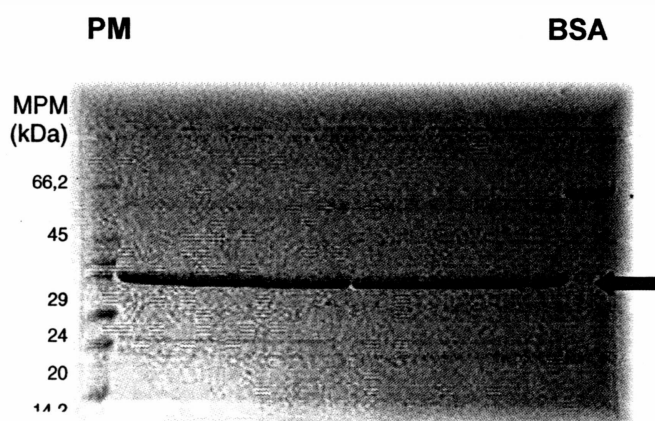


Figura 3.9. Gel preparativo de gránulos de EpapGV. Calle 1, marcador de peso molecular "Sigma Gel Low Range"; calle 2 y 3 (calle central preparativa), proteínas de gránulos de EpapGV; calle 4, Albúmina Sérica Bovina (BSA). A la izquierda se aprecian los tamaños del MPM y a la derecha se ha señalado con una flecha la banda de granulina de EpapGV.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (polivinil-difluoruro) durante 120 min. a 0,25 A. La banda de la proteína mayoritaria se ubicó por tinción de los laterales de la membrana con solución 1% Rojo Ponceau, y se extrajo la sección correspondiente a la banda de la proteína de interés por corte de la membrana (aproximadamente 20 μ g ó 670 pmoles). La secuencia amino terminal se determinó por el método de Edman modificado (Matsudaria, 1987) hasta el aminoácido número 15. Pese a que en las condiciones de trabajo no fue posible descartar que la banda de

granulina no estuviera superpuesta con otra de igual tamaño, el alto nivel de expresión de la granulina habría contribuido para que el ruido de fondo en la determinación de la secuencia proteica no fuese significativo. La secuencia de la granulina de EpapGV correspondió a GYNKSLRYSRHEGTT.

Comparación de la secuencia amino terminal

Cuando se comparó la secuencia amino terminal de la proteína mayoritaria de EpapGV con sus homólogas, ésta mostró un alto grado de similitud (80-100%) con respecto a las secuencias de los extremos amino terminales de otras granulinas (Tabla 3.1). Este dato, confirmó de la identidad de la proteína de inclusión y apoyó la asignación del virus aislado de larvas de *E. aporema* al género *Granulovirus*.

Tabla 3.1. Secuencias amino terminales de granulinas.

| Baculovirus ^a | Secuencia aminoacídica ^b | Determinación | Número de acceso |
|---|-------------------------------------|----------------|------------------|
| EpapGV | -GYNKSLRYSRHEGTT | sec. peptídica | - |
| EpapGV | MGYNKSLRYSRHEGTT | DNA | AF473703 |
| EeGV | MGYNKSLRYSRHEGTT | DNA | - |
| AoGV | MGYNKSLRYSRHEGTT | DNA | AAL02082 |
| PhopGV | MGYNKTLRYSRHDGTT | DNA | - |
| CpGV | MGYNKSLRYSRHDGTS | DNA | AAK70668 |
| CIGV | MGYNKSLRYSRHDGTT | DNA | CAA56107 |
| CfGV | MGYNKALRYSRHDGTS | DNA | AAC69544 |
| HbGV | MGYNKSLRYSRHEGTT | DNA | AAF66610 |
| SpliGV | MGYNRSLRYSRHNGTT | DNA | - |
| PxGV | MGYNKSLRYSRHDGST | DNA | AAG27302 |
| TnGV | MGYNKSLRYSRHNGTT | DNA | AAA43834 |
| XcGV | MGYNKSLRYSRHNGTT | DNA | AAB42059 |
| AsGV | -GYNKSLRYSRHAGTS | sec. peptídica | P31035 |
| LoGV | MGYNKSLRYSRHDGTT | DNA | - |
| PbGV | MGYNRALRYSRKHGTT | DNA | P06502 |
| Consenso de granulinas | MGYNKSLRYSRH.GTT | DNA | - |
| Consenso de poliedrinas GI ^c | MYTRYSL--YNPSLGRTYVY | DNA | - |
| GII | MPDYS--YRPTIGRTVYVY | DNA | - |

^a *Adoxophyes orana* GV (AoGV), *Agrotis segetum* GV (AsGV), *Choristoneura fumiferana* GV (CfGV), *Cydia pomonella* GV (CpGV), *Cryptophlebia leucotreta* GV (CIGV), *Harrisina brillians* GV (HbGV), *Pieris brassicae* GV (PbGV), *Plutella xylostella* GV (PxGV), *Trichoplusia ni* GV (TnGV), *Xestia c-nigrum* GV (XcGV). Las secuencias de granulina de PhopGV y SpliGV fueron gentilmente provistas por el Dr. López-Ferber, el Dr. Ian Smith nos aportó la secuencia de la granulina de *Lacanobia oleracea* GV (LoGV). Las secuencias de *Trichoplusia ni* 2 (Tni2) y *Erinnyis ello* (EeGV) han sido informadas (Ghiringhelli *et al.*, 1996) pero no publicadas aún en GenBank.

^b Las diferencias con la secuencia consenso se indican en negrita. El consenso resultó de la aplicación de la regla de la mayoría, por ejemplo: el residuo más abundante en cada posición fue tomado como el aminoácido consenso.

^c GI: NPVs grupo I, GII: NPVs grupo II.

Con posterioridad a la determinación de esta secuencia aminoacídica, otras tres secuencias de granulinas publicadas (*Adoxophyes orana* GV, AoGV; *Harrisina brillians* GV, HbGV y *Erinnyis ello*, EeGV) resultaron idénticas para 14 aminoácidos N-terminales (exceptuando la metionina terminal). Cuando la secuencia completa del gen

de granulina de EpaGV estuvo disponible a partir de la información del DNA clonado y su marco traducido se comparó con los marcos respectivos de EeGV, HbGV y AoGV, se comprobó que la secuencia de EpaGV difería de las demás más allá de los 14 aminoácidos mencionados. Los extremos amino-terminales de las poliedrinas son claramente distintos de la secuencias consenso de las granulinas (Fig. 3.10). La falta del residuo metionina en el extremo de la secuencia aminoacídica probablemente refleje un procesamiento postraduccional. Este hecho es consistente con la secuencia de otro gen de granulina (AsGV) obtenido también por secuencia peptídica directa (Kozlov *et al.*, 1992) y no deducida de la secuencia nucleotídica del DNA genómico.

| | |
|-------------------------|----------------------|
| EpaGV | MGYNKSLRYSRHEGTT |
| Consenso de Gran. | MGYNKSLRYSRH.GTT |
| Consenso de Polh GII | MYTRYs--YNPSLGRTYVY |
| Consenso de Polh GI | MPDYS--YRPTIGRTYVY |
| NPVs, grupo I | |
| AcMNPV | MPDYS--YRPTIGRTYVY |
| AgMNPV | MPDYS--YRPTIGRTYVY |
| AmalNPV | MPDYSYAYRPTIGRTYVY |
| AnfaMNPV | MPDYS--YRPTIGRTYVY |
| ArceNPV | MPDYS--YRPTIGRTYVY |
| AtriNPV | MPDYS--YRPTIGRTYVY |
| BmNPV | MPNYS--YNPTIGRTYVY |
| CfmNPV | MPDYS--YRPTIGRTYVY |
| CfMNPV | MPNYS--YRPTIGRTYVY |
| EppoNPV | MPDYS--YRPTIGRTYVY |
| HycuNPV | MPDFS--YRPTIGRTYVY |
| OpMNPV | MPDYS--YRPTIGRTYVY |
| PenuNPV | MPDYS--YRPTIGRTYVY |
| ThorMNPV | MPDYS--YRPTIGRTYVY |
| Consenso NPVs G I | MPDYS--YRPTIGRTYVY |
| NPVs, grupo II | |
| BusuNPV | MYTRYs---YKPSLGRTYVY |
| EcobSNPV | MYTRYs---YNPSLGRTYVY |
| HearSNPV | MYTRYs---YSPTLGKTYVY |
| HeliarSNPV | MYTRYs---YSPTLGKTYVY |
| HzSNPV | MYTRYs---YSPTLGKTYVY |
| LdMNPV | MHNfYn---YSPALGKTYVY |
| LeseNPV | MYTRYs---YNPSLGRTYVY |
| MacoNPV | MYTRYs---YNPSLGRTYVY |
| MadiMNPV | MYTRYs---YSPTLGRTYVY |
| ManeNPV | MYTRYs---YNPTLGRTYVY |
| MbmNPV | MYTRYs---YNPSLGRTYVY |
| OpSNPV | MYTRYs---YNPSLGRTYVY |
| PafIMNPV | MYTRYs---YNPSLGRTYVY |
| FlorNPV | MYTRYs---YSPSLGRTYVY |
| SeMNPV | MYTRYs---YNPALGRTYVY |
| SfNPV | MYTRYs---YNPSLGRTYVY |
| SpliNPV | MYSRYSAYNYSPhLGKTYVY |
| SpltNPV | MYTPYS---YNPSLGRTYVY |
| TnSNPV | MYTRYs---YNPSLGRTYVY |
| WisiNPV | MYTAyP---Y.PK-GKTYVY |
| Consenso NPVs G II | MYTRYs---YNPSLGRTYVY |
| No agrupados aún | |
| AsNPV | MNRFYS--YNPTIGRT |

Figura 3.10. Alineamiento de secuencias amino-terminales de genes de poliedrinas y granulinas.

Las abreviaturas y los números de acceso al GenBank y son las siguientes: NPVs, Grupo I: *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) AAA46719, *Anticarsia gemmatalis* MNPV (AgMNPV) JQ1607, *Anagrapha falcifera* MNPV (AnfaMNPV) AAB53352, *Amsacta albistriga* NPV (AmalNPV) AAD24463, *Archips cerasivoranus* NPV (ArceNPV) AAA93290, *Attacus ricini* NPV (AtriNPV) S68462, *Bombyx mori* MPV (BmNPV) AAA46734, *Choristoneura fumiferana* MNPV (CfmNPV) AAA93291, *Epiphyas postvittana* NPV (EppoNPV) AAC72189, *Hyphantria cunea* NPV (HycuNPV) AAG10795, *Orgyia pseudotsugata* MPNV (OpMNPV) AAA64926, *Perina nuda* NPV (PenuNPV) AAA64782, *Thysanoplusia orichalcea* MNPV (ThorMNPV) AAD51629. NPVs, Grupo II: *Buzura suppressaria* NPV (BusuNPV) CAA50194, *Ecotropis obliqua* SNPV (EcobSNPV) AAB53632, *Helicoverpa armigera* NPV (HearSNPV) CAA05090, *Heliothis armigera* SNPV NPV (HeliarSNPV) AAB82410, *Helicoverpa zea* SNPV (HzSNPV) AAB54089, *Leucania separata* NPV (LeseNPV) AAA99736, *Mamestra configurata* NPV (MacoNPV) AAB51031, *Malacosoma neustria* NPV (ManeNPV) CAA39191, *Malacosoma disstria* MNPV (MadiMNPV) AAD00095, *Mamestra brassicae* MNPV (MbmNPV) AAA69768, *Orgyia pseudotsugata* SNPV (OpSNPV) AAA46739, *Panolis flammea* MNPV (PafIMNPV) BAA00338, *Plusia orichalcea* NPV (PlorNPV) AAC64234, *Spodoptera exigua* MNPV (SeMNPV) AAF33532, *Spodoptera frugiperda* MNPV (SfmNPV) P14670, *Spodoptera littura* NPV (SpltNPV) CAA64211, *Trichoplusia ni* SNPV (TnSNPV) AAC64160. *Wiseana signata* NPV (WisiNPV) AAB97154, *Spodoptera littoralis* NPV (SpliNPV), BAA00824, *Lymantria dispar* LdMNPV (LdMNPV) AAA4672. No agrupados aún: *Agrotis segetum* NPV (AsNPV). Los NPVs han sido divididos según análisis filogenéticos previos que se abordan con más profundidad en el capítulo 6.

Conclusiones

- Se obtuvieron imágenes preliminares de la estructura microscópica del gránulo, a partir de las cuales se calcularon los tamaños del gránulo y del virión. La morfología de los mismos es de tipo elipsoidal con tamaños de 469 (\pm 37) nm x 242 (\pm 22) nm. Estos gránulos contenían a un solo virión con una única nucleocápside.
- Los protocolos de purificación puestos a punto se validaron siguiendo la presencia de OBs en las distintas etapas, todos ellos permitieron una óptima purificación de cuerpos de inclusión.
- La presencia de una proteasa alcalina asociada a los viriones ocluidos fue verificada analizando la degradación de la proteína mayoritaria en geles de poliacrilamida.
- El perfil proteico total de los cuerpos de inclusión de EpapGV, presentó una alta similitud con el perfil de proteínas de CpGV y, al igual que éste, presentó también una proteína mayoritaria de $28,5 \pm 0,5$ kDa.
- La secuencia amino-terminal de la proteína mayoritaria (GYNKSLRYSRHEGTT) se obtuvo por Degradación de Edman. Esta mostró alta homología con otros extremos amino-terminales de granulinas, apoyando con una evidencia bioquímica la clasificación tentativa del virus aislado de *E. aporema*.

CAPÍTULO 4

DESARROLLO DE UN MÉTODO INMUNOQUÍMICO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VIRUS OCLUIDOS DE EpapGV

Introducción

Un nuevo bioinsecticida basado en el baculovirus EpapGV, está siendo desarrollado para controlar y/o prevenir el daño causado por *Epinotia aporema*, principalmente, sobre cultivos de soja.

Este bioinsecticida se prepara a modo de polvo mojable para facilitar su aplicación por pulverización y consiste en una mezcla de virus con otros componentes sólidos con el fin de suministrar adherencia a hojas y tallos, protección contra rayos UV y atracción de los insectos. En infestaciones experimentales de plantas de soja realizadas en invernáculos el bioinsecticida formulado demostró una protección significativa contra larvas de *E. aporema* (datos no publicados). La producción del bioinsecticida requiere de un método de cuantificación rápido para la estandarización y el control de calidad. Este método podría también ser usado en estudios de dinámica de infecciones de EpapGV en epizootias naturales y para detectar infecciones iniciales en larvas tratadas con el virus en condiciones de campo. En este contexto, se han descrito varios métodos para la detección de baculovirus en cultivos celulares, tejidos, larvas infectadas o muestras de suelo. Sin embargo, en ningún caso se ha informado sobre su aplicabilidad en la cuantificación directa de estos virus en muestras complejas tales como formulaciones bioinsecticidas. Entre ellos, se encuentran aquellos basados en la amplificación de genes por PCR (Lupiani *et al.*, 1999; Moraes *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000) o por análisis de RFLP-PCR (Christian *et al.*, 2001); otros se basan en la detección inmunológica de antígenos virales por enzimo-inmuno-ensayos en formato (ELISA) (Crook & Payne, 1980; Kitts & Green, 1999; Langridge *et al.*, 1981; Longworth & Carey, 1980; Roberts & Naser, 1982; Sharim *et al.*, 1994; Stark *et al.*, 1999; Zeddani *et al.*, 1999), o sobre cintas de papel (Nataraju *et al.*, 1994). Por otra parte, Richards & Christian (1999) han logrado detectar partículas virales en muestras de tierra usando las mismas como inóculo para infectar larvas en bioensayos.

La cuantificación de cuerpos de inclusión en suspensiones de NPVs purificados puede efectuarse fácilmente por microscopía óptica usando un hemocitómetro convencional. Sin embargo, debido a su pequeño tamaño, el recuento de granulovirus puros requiere de considerable experiencia y una cámara de recuento especial. Como alternativa puede emplearse la microscopía electrónica, pero esta técnica demanda mucho tiempo y es muy costosa (Hunter-Fujita *et al.*, 1998). Además, el recuento de cuerpos de inclusión en las formulaciones bioinsecticidas es problemático, debido al tamaño similar de otras partículas presentes en las preparaciones.

Los bioinsecticidas basados en baculovirus se producen normalmente *in vivo*, por infección de larvas de insectos bajo condiciones controladas en invernáculos o en lugares alternativos (Moscardi, 1999). En este contexto, la variabilidad en el rendimiento de cuerpos de inclusión (OB) entre preparaciones es frecuente y el control de calidad de cada preparación está basado en el establecimiento de la concentración de OBs y en la determinación de la actividad biológica de las preparaciones. Para el control del proceso de producción se necesitan ensayos rápidos y confiables para el recuento de virus, tradicionalmente efectuados por el recuento de los OBs por microscopía óptica o por microscopía electrónica a partir de preparaciones purificadas. No obstante, estas determinaciones no son posibles en muestras complejas como los homogeneizados de larvas y de formulados bioinsecticidas. Teniendo en cuenta que la PCR es un método más costoso para *screening* y cuantificaciones de muestras a gran escala, el ELISA aparece como el método de elección para cuantificaciones de rutina de OBs de EpapGV, especialmente en formulados, los cuales son muestras complejas de partículas sólidas.

En este capítulo se describe la producción de anticuerpos específicos para granulina y el desarrollo de una técnica de ELISA para la cuantificación de cuerpos de inclusión de EpapGV:

Objetivos

- Producción de anticuerpos policlonales específicos para granulina de EpapGV.
- Desarrollo de un ELISA de captura para la detección de gránulos de EpapGV.
- Evaluación de la especificidad de los anticuerpos tanto en ELISA como en *Western blot*.
- Aplicación del ELISA para el seguimiento de la cinética de infección y la producción de cuerpos de inclusión en larvas de *E. aporema* infectadas con EpapGV.
- Cuantificación cuerpos de inclusión de EpapGV en formulados bioinsecticidas, mediante ELISA de captura.

Resultados y discusión

Puesta a punto de la metodología de ELISA

Estrategia general

En el capítulo anterior se ha mostrado el alto nivel de expresión de la proteína mayoritaria del cuerpo de inclusión (granulina) de EpapGV respecto de las demás proteínas virales. En este capítulo se aprovechará la abundancia relativa de esta proteína para diseñar un ensayo específico con el formato de ELISA de captura.

Para esto, se generaron sueros hiperinmunes por inoculación de preparaciones de granulina eluida de geles de SDS-PAGE a conejos albinos de Nueva Zelanda. La respuesta inmune a la inoculación fue evaluada por ELISA indirecto y se seleccionaron las fracciones de suero que mostraron el mayor título. A partir de los sueros se purificó IgG, parte de la cual se biotiniló. El ensayo se basa en la adhesión del antisuero anti-granulina a una policubeta de poliestireno, su incubación posterior con gránulos de EpapGV solubilizados en solución alcalina y la detección de la granulina con anticuerpo anti-granulina biotinilado. La unión de éste anticuerpo se detecta por incubación con el conjugado avidina-peroxidasa y reacción enzimática, leyendo la densidad óptica (DO) a 490 nm.

Además, se analizó la especificidad de los antisueros en *Western blot* y en ELISA y se llevaron a cabo varios experimentos tendientes a optimizar la sensibilidad de la técnica. Finalmente, el ensayo puesto a punto fue empleado para evaluar formulados insecticidas.

Dado que la granulina representa cerca del 95% de las proteínas presentes en el OB (Bergold, 1964), en este capítulo se referirá a la concentración de granulina como sinónimo de la concentración de proteínas totales del OB.

Purificación del antígeno viral e inoculación

Los gránulos de EpapGV se aislaron a partir de larvas infectadas y se resolvieron por electroforesis preparativa en poliacrilamida al 12%. La granulina se ubicó por tinción con azul brillante de *Coomassie* de franjas laterales del gel, en la región de aproximadamente 28,5 kDa. Esta sección se extrajo del gel, se disgregó en mortero y se eluyó la proteína por incubación con PBS durante toda la noche; la masa de

proteína eluída se cuantificó por el método de Bradford. Se inoculó un conejo con granulina eluída en presencia de adyuvante de Freund completo (Tabla 4.1). Posteriormente el conejo fue reinoculado, a los 27 y 62 días en presencia de adyuvante de Freund incompleto. Cada inoculación consistió en 50 μg de granulina eluída, por conejo y por inoculación. Un gel preparativo similar al efectuado para extraer la banda de granulina y ser inoculada a un conejo puede apreciarse en la figura 3.9 del capítulo 3.

Tabla 4.1. Esquema de inoculación.

| Fecha | μg de granulina inoculada | Días pos inoculación | Inoculación de granulina con adyuvante de Freund |
|----------|--------------------------------------|----------------------|--|
| 17/06/98 | 50 | 0 | Completo |
| 13/07/98 | 50 | 26 | Incompleto |
| 18/8/98 | 50 | 62 | Incompleto |

^a La banda de proteína fue eluída del gel con PBS.

Control del título de antisueros por ELISA indirecto

Previo a cada inoculación se tomaron muestras de sangre de conejo y se analizaron a fin de determinar el título del antisuero correspondiente. Se recubrieron policubetas de poliestireno con granulina solubilizada en *buffer* carbonato y las mismas se incubaron con los sueros a analizar. Posteriormente, se incubó con IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa, se reveló con la solución de orto fenilen diamina (OPD) en *buffer* citrato, durante 15 min. en oscuridad y se cuantificó en un lector de ELISA. El título se definió como la inversa de la máxima dilución de antisuero que presentó una reacción positiva en ELISA por encima del valor de corte (*cut-off*), el cual fue estimado como el valor promedio de $\text{DO}_{490 \text{ nm}}$ de sueros no inmunes más dos desviaciones estándar. Los resultados se muestran en la figura 4.1 indicaron que el conejo mostró una reacción inmunológica de alto título.

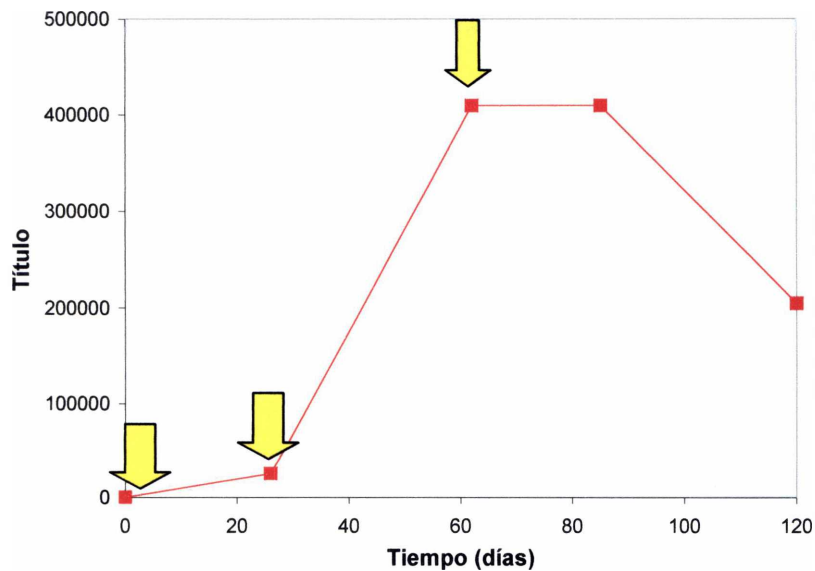


Figura 4.1. Análisis de la respuesta de antisueros a la inoculación con granulina a un conejo. A distintos intervalos de tiempo, se inoculó granulina eluída del gel con PBS y se midió el título del antisuero (As). En la ordenada se grafica el título del As y en la abscisa el tiempo en días. Con flechas amarillas se indican las inoculaciones efectuadas.

Purificación de anticuerpos IgG

Para aislar la fracción IgG del suero de conejo, se seleccionó la fracción del suero correspondiente a 61 días pos inoculación, cuyo título era de 400.000 ó 4×10^5 . Los anticuerpos IgG se purificaron mediante cromatografía de afinidad (proteína G, Sepharose-fast flow; Pharmacia, Uppsala, Sweden). Se monitoreó la presencia de proteínas por Bradford y se determinó el título de anticuerpos por ELISA indirecto (Fig. 4.2).

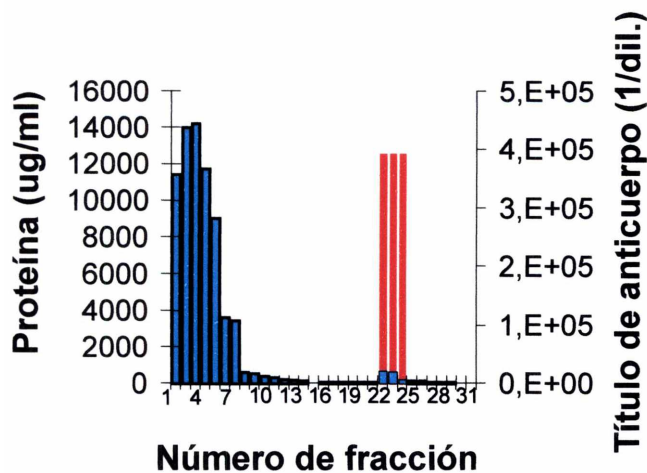


Figura 4.2. Purificación de IgG anti-granulina de EpapGV. En la abscisa se muestra el perfil de elución de la columna cromatográfica de afinidad, y en la ordenada se indica la concentración de proteínas, sobre la izquierda (ensayo de Bradford) y el título de anticuerpos con la escala hacia la derecha (inversa de la máxima dilución con señal positiva en ELISA). 1,E+05=100.000. (■) proteína ($\mu\text{g/ml}$), (■) título anticuerpo anti-granulina.

Las fracciones de alto título, eluidas de la columna fueron agrupadas y concentradas por diálisis sobre lecho de polietilenglicol (PEG) 6.000. Posteriormente, se sometieron a diálisis contra *buffer* borato de sodio ($H_3BO_3/Na_4B_4O_7$ 0,1 M; pH 8,8). Parte de las IgG fueron biotiniladas, tal como se describe en materiales y métodos.

Ensayo de ELISA de captura utilizando antígeno solubilizado y antígeno particulado (OB). Análisis de la respuesta

Se evaluó la reactividad de los anticuerpos purificados contra antígenos particulados (OBs) y contra gránulos disueltos en medio alcalino. Los anticuerpos anti-granulina se pegaron a una placa de ELISA a una concentración estándar de 10 $\mu\text{g/ml}$, durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se incubaron distintas concentraciones de antígenos (proteína de OB solubilizada en carbonato o su equivalente en OBs no solubilizados) durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se aplicaron distintas diluciones de anticuerpo secundario biotinilado (diluciones: 1/500, 1/1.000, 1/1.500 y 1/2.000) y se reveló por reacción de avidina-peroxidasa.

Los resultados correspondientes a la figura 4.3, indicaron que la DO obtenida con gránulos solubilizados fue varias veces más elevada que la obtenida con antígenos particulados (gránulos no solubilizados). Solamente cuando se ensayaron las muestras de los gránulos no disueltos con el anticuerpo secundario más concentrado (dilución 1/500), se obtuvieron valores de DO superiores a los controles negativos (larvas no infectadas). El resto de las muestras particuladas presentó valores similares a los controles negativos. Por otra parte, las reacciones con antígenos disueltos fueron menos intensas a medida que la dilución de anticuerpo biotinilado aumentaba, tal como era esperado.

Dado que se había observado que la granulina solubilizada en álcali precipitaba gradualmente durante el almacenamiento, se descartó el empleo de OBs de EpapGV solubilizados en álcali como control positivo. De acuerdo con esta observación y con los resultados de la figura 4.3, se decidió emplear como control positivo a una suspensión de gránulos de EpapGV de concentración proteica conocida y solubilizar la misma en medio alcalino, antes de cada ensayo.

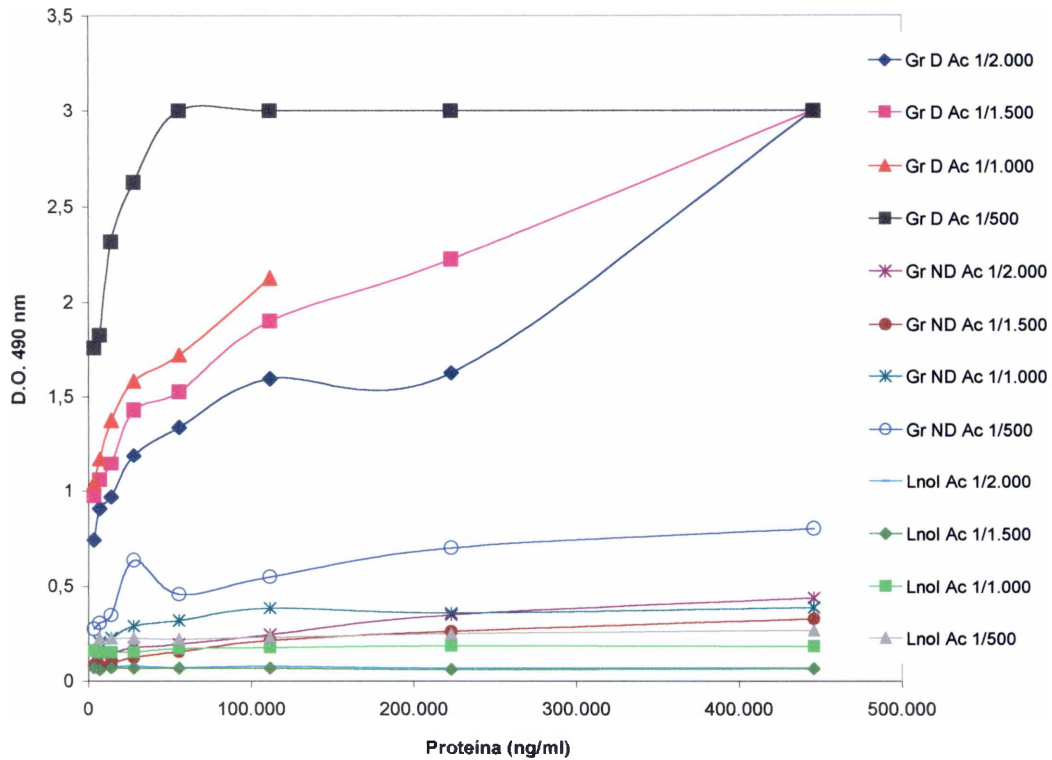


Figura 4.3. Comparación del nivel de sensibilidad de ELISA con antígenos solubles y particulados. Se hizo reaccionar cuerpos de inclusión (OB) de EpapGV solubilizados (Gr D, gránulos disueltos) así como no solubilizados (Gr ND, gránulos no disueltos) con distintas diluciones de anticuerpo secundario biotinilado (Ac) mediante el ensayo de ELISA de captura. Para cada dilución de anticuerpos se analizó la DO de las larvas no infectadas (Lnoi). En la ordenada se indican los valores de densidad óptica a 490 nm (DO) mientras que en la abscisa se muestra la concentración de proteína en ng/ml.

Cálculo de la masa proteica por gránulo de EpapGV

Para preparaciones puras de GVs existe una buena correlación entre el número de OBs y la concentración de proteína. En trabajos de rutina, es común determinar la concentración de proteína de una suspensión viral y estimar el número de gránulos en referencia a un patrón de concentración de proteína conocida vs. número de gránulos (Hunter-Fujita *et al.*, 1998).

Dadas las dimensiones de los gránulos de EpapGV, y teniendo en cuenta su densidad de flotación en gradientes de sacarosa, se calculó la masa de cada gránulo (para más detalles ver el capítulo 3, dentro de la sección microscopía electrónica). Los resultados indicaron que 1 μg de proteína total de EpapGV equivale a $3,77 \times 10^7$ OB o que 1 μg de granulina de EpapGV corresponde a $3,97 \times 10^7$ OB. Estos datos son congruentes

con observaciones de otros autores para los casos de CpGV ($4,0 \times 10^7$ OBs/ μ g; Glen & Payne, 1984) y *Plodia interpunctella* GV ($5,05 \times 10^7$ OBs/ μ g; Hunter-Fujita *et al.*, 1998).

Optimización de la detección de granulina

Para determinar la sensibilidad de la técnica de ELISA de captura, se efectuó un ensayo con concentraciones decrecientes de proteína de inclusión. La combinación de tiempos y temperaturas de incubación, mostró que una incubación a baja temperatura (4 °C) durante 18 h permitió la detección de 0,53 ng/ml de granulina, equivalente a 26,5 pg/pozo (Fig. 4.4, tabla 4.2). De acuerdo a la cantidad de proteínas presentes en un gránulo (Tabla 4.2) la sensibilidad para esta condición sería de 2×10^4 OBs/ml ó 1.000 OBs/pozo. Según la figura 4.4, una reducción en el tiempo de incubación o un aumento en la temperatura de incubación produce una baja en la sensibilidad del ensayo al menos en un factor de dos.

Los valores de sensibilidad obtenidos en este estudio son significativamente mejores que los conseguidos por otros autores (Crook & Payne 1980; Nataraju *et al.*, 1984; Stark *et al.*, 1999) quienes describen niveles mínimos de sensibilidad en el rango de 2,2 a 100 ng/ml para ensayos similares (ELISA doble sándwich). Los datos indican que el ensayo puesto a punto aquí, mejora la sensibilidad de la detección de la proteína mayoritaria del OB en un factor de 4 a 400 veces, cuando es comparado con métodos similares. La mejora en la sensibilidad puede ser atribuida a la amplificación de señal que se obtiene cuando se usan anticuerpos biotinilados en combinación con avidina-peroxidasa.

Las curvas de DO de los distintos tratamientos presentaron una relación lineal entre la cantidad de granulina y los valores de DO_{490nm} en el rango de 2,1 a 40 ng/ml cuando se emplearon tiempos de incubación de 1 h para la unión de los antígenos (Fig. 4.6). Por consiguiente, las estimaciones de concentraciones de granulina deben ser hechas en este rango. A concentraciones mayores que 1,5 μ g/ml, los datos de absorbancia indican la presencia de un *plateau*. Por consideraciones prácticas las reacciones antígeno anticuerpo se llevaron a cabo durante 1 hora a 37 °C, sin una disminución importante de la sensibilidad. Para este ensayo, el valor de corte (*cut-off*) se determinó como correspondiente a la DO promedio de las fosas ensayadas con homogeneizados de larvas de *E. aporema* no infectadas más el valor de DO correspondiente a dos desviaciones estándar (2 SD).

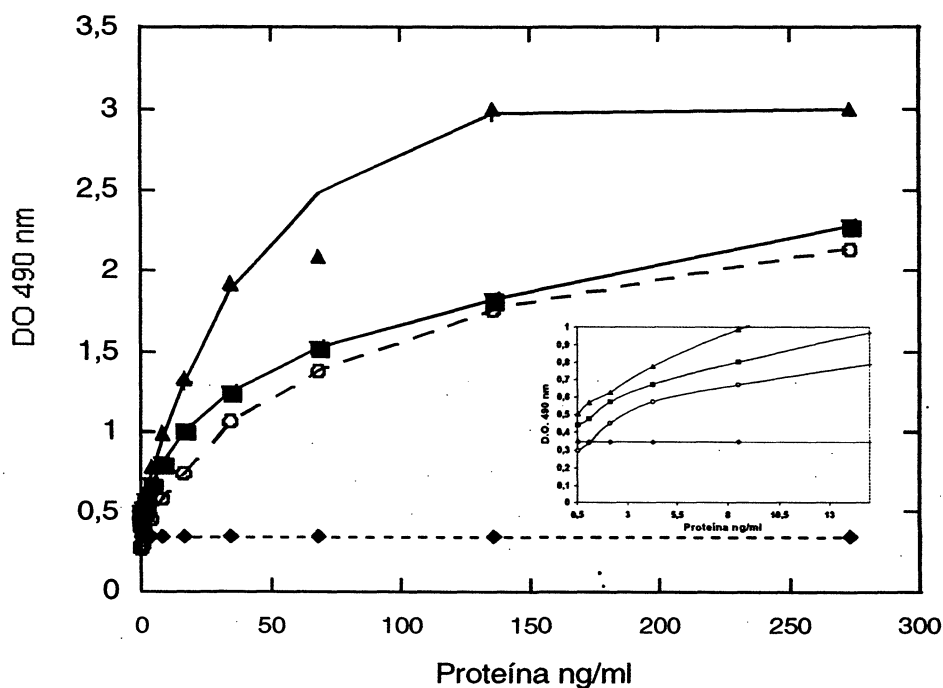


Figura 4.4. Optimización de la detección de granulina (dentro del gráfico se incluye una imagen ampliada de la región de menor sensibilidad). Proteínas de EpapGV disueltas e incubadas, tal como se describe en materiales y métodos, fueron analizadas por ELISA empleando distintos procedimientos de incubación del antígeno disuelto: \blacktriangle , 18 h a 4 °C; \blacksquare , 2 h a 37 °C; \circ 1 h a 37 °C. Con los valores del ELISA se construyeron curvas ajustadas para los distintos tratamientos. El nivel de cut-off se indica con \blacklozenge (larvas no infectadas homogenizadas incubadas 18 h a 4 °C). En la ordenada se indican los valores de densidad óptica a 490 nm (DO) mientras que en la abscisa se muestra la concentración de granulina purificada en ng/ml. Para la menor cantidad de granulina detectada (0,53 ng/ml, 18 h a 4 °C), se obtuvo una relación señal/ruido de 1,44. Para este punto, la diferencia entre los valores de DO_{490nm} de la señal y el nivel de *cut-off* es equivalente a 7,38 SD. Estos resultados indicaron una clara separación entre el *cut-off* y el valor específico para la granulina. Resultados similares se obtuvieron con otros procedimientos de incubación. Datos anexos: $OD_{490nm} = 0,503$ para 0,53 ng/ml; OD_{490nm} promedio para larvas no infectadas = 0,307; SD para larvas no infectadas = 0,021; valor del *cut-off* = 0,348.

Tabla 4.2. Sensibilidad de la detección de gránulos de EpapGV.

| Tiempo de incubación | Mínima cantidad detectada de granulina (ng/ml) | Mínima cantidad detectada de granulina (pg). | Mínima cantidad de OBs detectado ^a | OBs/ml |
|----------------------|--|--|---|-------------------|
| 18 h a 4 °C | 0,53 | 26,5 | 1.000 | $2,0 \times 10^4$ |
| 2 h a 37 °C | 1,06 | 53 | 2.000 | $4,0 \times 10^4$ |
| 1 h a 37 °C | 2,12 | 106 | 4.000 | $8,0 \times 10^4$ |

^a 1 μ g de proteína total de EpapGV equivale a $3,77 \times 10^7$ OB.

Determinación del coeficiente de variación del método de ELISA

La reproducibilidad del ELISA fue estimada por la inclusión de un control positivo (granulina de EpapGV) y el control negativo correspondiente (larvas de *E. aporema* no infectadas), en nueve ensayos independientes llevados a cabo en diferentes días (coeficiente de variación inter-ensayo) y 96 determinaciones analizadas en el mismo

ensayo (coeficiente de variación intra ensayo) con la misma cantidad de antígeno (granulina de EpapGV). El ELISA fue leído a 490 nm de DO y se calcularon los coeficientes de variación correspondientes. El coeficiente de variación (CV) definido como $(\sigma/x) 100$ (en donde σ es la desviación estándar y x el promedio de las medidas), fue de 14% para la variación inter-ensayo y 5% para la variación intra-ensayo. Por lo tanto puede concluirse que los coeficientes de variación para el rango lineal, asociado al método de ELISA aquí descrito, son razonablemente bajos.

Determinación de la especificidad de los anticuerpos anti-granulina de EpapGV

Ensayo de *Western blot*

Con el objeto de determinar la especificidad de los anticuerpos anti-granulina, se evaluó su reactividad por dos métodos distintos: *Western blot* y ELISA.

En el ensayo de *Western blot* distintos cuerpos de ocusión de NPVs y GVs fueron resueltos por SDS-PAGE y ensayados con anticuerpos anti-granulina biotinilados. Los anticuerpos de conejo reaccionaron fuertemente contra una banda de una proteína de 28,5 kDa correspondiente a la granulina de EpapGV (Fig. 4.5 B). Una reacción similar fue observada para la proteína mayoritaria de CpGV, mientras que el anticuerpo no mostró reacción positiva con ninguna otra proteína viral de EpapGV o de CpGV, como tampoco de las larvas no infectadas ni de los NPVs ensayados. La reactividad cruzada del anticuerpo anti-granulina de EpapGV con la granulina de CpGV se comentara en la sección siguiente.

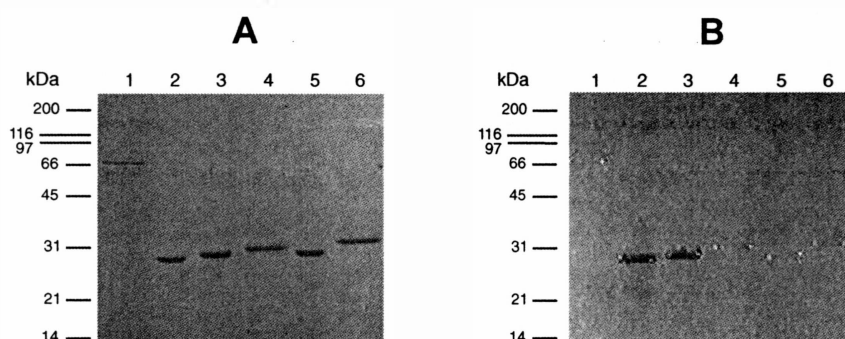


Figura 4.5. *Western blot* de gránulos y poliedros. (A), perfil de tinción con azul brillante de Coomassie de proteínas de larvas de *E. aporema* no infectadas, gránulos y poliedros después de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Calle 1, larvas no infectadas; calle 2, EpapGV; calle 3, CpGV; calle 4, AgMNPV; calle 5, SfMNPV; calle 6, RouMNPV. Se empleó 2 μ g de proteína por calle. Las flechas indican los marcadores de peso molecular en kDa. (B), las proteínas resueltas fueron transferidas luego a una membrana de nitrocelulosa y ensayadas con anticuerpos biotinilados anti-granulina, como se detalla en el capítulo Materiales y métodos.

Ensayo de ELISA

Con el objeto de determinar la especificidad del anticuerpo producido, se incubaron cantidades iguales de proteínas de inclusión de diferentes baculovirus: *Anticarsia gemmatalis* MNPV (AgMNPV), *Spodoptera frugiperda* NPV (SfMNPV), *Rachiplusia nu* MNPV (RouMNPV), *Cydia pomonella* GV (CpGV) y EpapGV y se analizaron por ELISA de captura.

Los resultados de la evaluación de la especificidad de ELISA empleando estos virus, mostraron una buena relación señal/ruido sólo con la granulina de EpapGV. Para este virus, se observó una relación lineal entre los valores de DO y valores crecientes de granulina de EpapGV hasta una concentración de 40 ng/ml (Fig. 4.6), valores mayores de granulina resultaron en un *plateau* de la curva (Fig. 4.7). No se observó reacción con ninguno de los NPVs ensayados y una pequeña reacción cruzada fue observada con un virus estrechamente relacionado (CpGV), empleando altas concentraciones de granulina del mismo (>200 ng/ml). En contraste todos los poliedrovirus dieron valores de DO semejantes al valor de corte (larvas no infectadas). Los valores de DO para CpGV superaron 1,0 recién cuando la concentración de granulina fue superior a 1.100 ng/ml; es decir que fue necesario emplear 25 veces más proteína de CpGV para obtener la misma señal que con EpapGV (DO = 1,0).

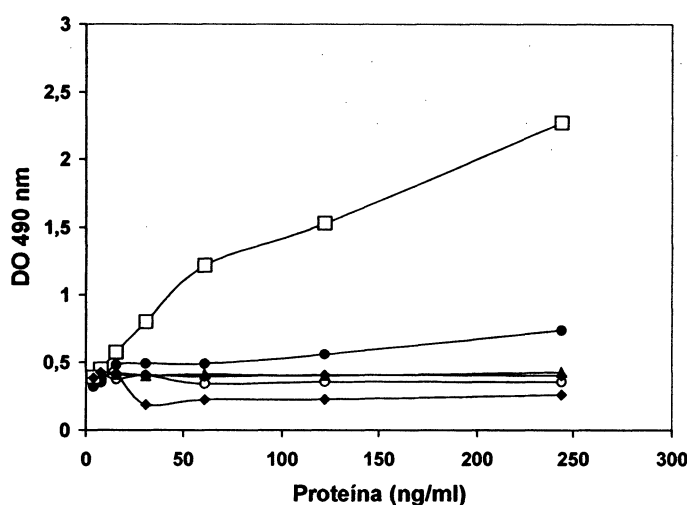


Figura 4.6. Determinación de la especificidad del ELISA de captura (rango acotado). Diferentes preparaciones de proteínas de inclusión (granulinas y poliedrinas) tratadas como se indicó anteriormente, se analizaron en ELISA de captura. □, EpapGV; ●, CpGV; Δ, AgMNPV; ○, SfMNPV; ▲, RouMNPV; ◆, larvas no infectadas. En la ordenada se indican los valores de densidad óptica (DO) a 490 nm mientras que en la abscisa se muestra la concentración de proteína purificada en ng/ml.

La reacción cruzada del anticuerpo anti-granulina de EpapGV con la granulina de CpGV sugiere que EpapGV y CpGV comparten algunos epitopes. Estos resultados son congruentes con el análisis de los genes de granulina de ambos virus, el cual mostró una identidad del 92% a nivel de secuencia aminoacídica (Parola *et al.*, 2002). Resultados similares fueron obtenidos por otros autores con altas concentraciones

(>10³ ng/ml) de granulinas de *Harrisinia brillians* GV (HbGV) y de CpGV (Stark *et al.*, 1999). En este contexto, parece sorprendente que ambas granulinas muestren señales similares en *Western blot* a diferencia del ELISA (Fig. 4.6 y 4.7). Sin embargo, debido a la gran cantidad de antígenos y las concentraciones más altas de anticuerpos empleados en el *Western blot*, el grado de reactividad de CpGV y EpapGV no puede ser discriminado. De acuerdo con las evidencias del ELISA, es claro que la reactividad cruzada entre las granulinas de CpGV y EpapGV decrece a medida que se analizan muestras más diluidas. Por ende es posible concluir que este ensayo de ELISA permite una determinación más precisa del grado de reactividad cruzada de antígenos relacionados, confirmando que este método es un mejor indicador de especificidad.

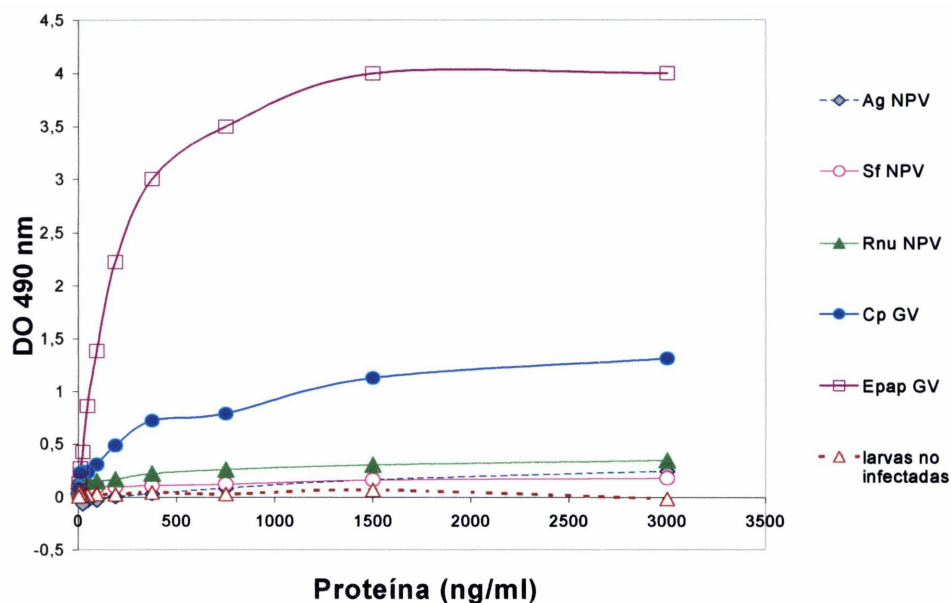


Figura 4.7. Determinación de la especificidad del ELISA de captura (rango extendido). Diferentes preparaciones de proteínas de inclusión (granulinas y poliedrinas), tratadas como se indicó anteriormente, se analizaron en ELISA de captura. En la ordenada se indican los valores de densidad óptica (DO) a 490 nm, mientras que en la abscisa se muestra la concentración de proteína purificada en ng/ml.

Cinética de la acumulación de granulina en larvas infectadas

Se analizó la producción de granulina en larvas infectadas empleando las técnicas de SDS-PAGE y ELISA.

A partir de una población de larvas infectadas con EpapGV de cuarto estadio, se colectaron muestras de 10 larvas a intervalos regulares de tiempo. Las mismas se homogeneizaron en PBS y se determinó la concentración de proteína soluble por

ensayo de Bradford. Posteriormente, se inactivó la proteasa alcalina y la muestra se trató con solución alcalina tal como se describió anteriormente.

Este homogeneizado se empleó para analizar el perfil de expresión de granulina en SDS-PAGE y ELISA y para estimar la concentración de la misma a distintos tiempos pos infección, a partir de la extrapolación de testigos de masa conocida (Fig. 4.9 A y B). Las cantidades de granulina estimadas de la porción lineal de la curva calibración de ELISA (Fig. 4.6) se graficaron como $\mu\text{g/larva}$ para cada intervalo de tiempo pos infección (Fig. 4.8 B).

Las larvas homogeneizadas en PBS fueron analizadas en SDS-PAGE empleando 13,4 μg de proteína soluble por calle. Los homogeneizados de larvas no infectadas fueron usados como controles negativos.

Los estudios del curso de infección empleando ELISA, revelaron que la granulina fue detectada inicialmente a las 24 h pos infección (p.i.) cuando era ensayada a la dilución 1/800 correspondiente a 3,47 $\mu\text{g/ml}$ de proteína soluble. Luego de este intervalo de tiempo, se observó un marcado incremento en la producción de granulina hasta después de las 60 h p.i., empleando el mismo material diluido (1/800). Sin embargo, analizando diluciones mayores de los homogeneizados de larvas se advirtió que la acumulación de granulina continuaba incrementándose hasta el final del ensayo (120 h. p.i.). En este ensayo, diferentes diluciones de homogeneizados de larvas controles (mayores a 3 $\mu\text{g/ml}$) produjeron valores similares de DO.

La extrapolación de la cantidad de granulina a partir de la porción lineal de la curva de la figura 4.6, para granulina de EpapGV mostró una cinética de acumulación de granulina de tipo exponencial (Fig. 4.8 B). En esta curva la granulina continuó acumulándose desde la hora 24 p.i., hasta el final del experimento (120 h p.i.) en donde alcanzó los 130 $\mu\text{g/larva}$.

La detección de granulina por ELISA de captura, desde las 24 h p.i. es consistente con lo esperado debido a la expresión muy tardía de este gen, la cual comienza generalmente después de 12-18 h p.i (Parola *et al.*, 2003). Pero cuando estas preparaciones fueron analizadas SDS-PAGE y tinción de *Coomassie*, la banda de granulina (Fig. 4.8 A) recién pudo ser detectada a las 48 h p.i., debido a que la misma no resaltaba por sobre la tinción de fondo para la hora 24. p.i. Una situación similar hubiera acontecido de haberse empleado una técnica más sensible, tal como la tinción por NO_3Ag . La detección de granulina a las 24 h p.i concuerda con estudios de microscopía electrónica de larvas infectadas con EpapGV (Goldberg *et al.*, 2002b). En

ese estudio se detectaron viriones ocluidos en secciones de tejido alrededor de las 36 h p.i., esta observación indicaría una síntesis previa de la granulina. Datos de publicaciones anteriores indicaron que era posible detectar proteínas virales de GVs a las 9 h p.i. en células infectadas (Tn-368 y Cp-169) y a las 12 h p.i. en homogeneizados de larvas infectadas, *Trichoplusia ni* (Tni) (Langridge *et al.*, 1981). Sin embargo, estos resultados se habían obtenido empleando anticuerpos preparados contra las proteínas totales del OB y, seguramente, esos ensayos permitieron la detección temprana de productos génicos expresados con anterioridad al gen de granulina.

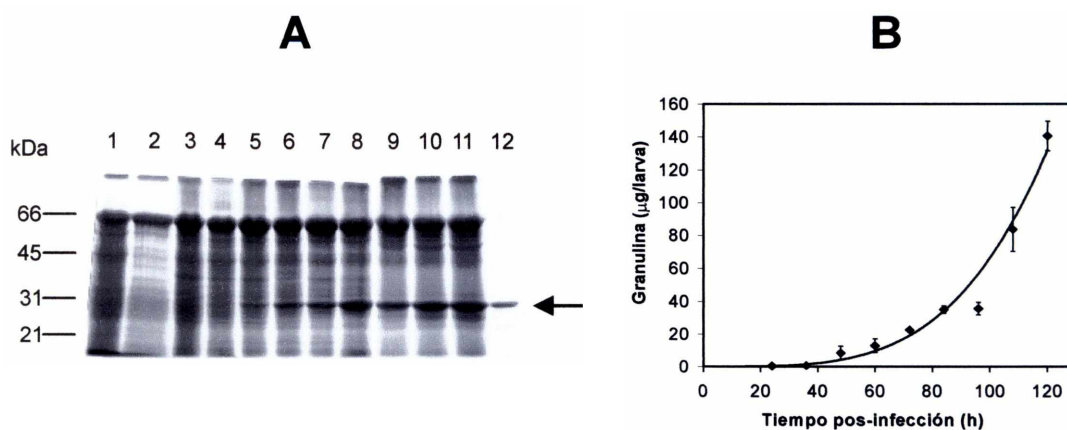


Figura 4.8. Cinética de acumulación de granulina de EpapGV. (A) Se monitoreó la producción de granulina en larvas infectadas en SDS-PAGE, a partir de muestras tomadas a diferentes tiempos pos infección usando 13,4 µg de proteína por calle. Los números a la izquierda indican las posiciones de los marcadores de PM "Sigma Gel Low Range", la flecha indica la posición de la granulina. Calles: 1, larvas no infectadas; 2, 12 h pos infección (pi); 3, 24 h p.i.; 4, 36 h p.i.; 5, 48 h p.i.; 6, 60 h p.i.; 7, 72 h p.i.; 8, 84 h p.i.; 9, 96 h p.i.; 10, 108 h p.i.; 11, 120 h p.i. Calle 12, gránulos purificados de EpapGV. (B) Concentración de granulina por larva a distintos tiempos p.i. Las muestras analizadas en el panel A fueron ensayadas en ELISA y se extrapoló la cantidad de granulina por larvas (♦) a partir de las distintas diluciones de homogeneizados de larvas ensayados en el ELISA de acuerdo con Materiales y métodos. Se muestran los datos para el primer tiempo en detectar granulina (24 h p.i.), (900 pg en el well para una dilución de homogeneizado de 1/400). Para ese punta la DO_{490nm} fue de 0,626, y este valor se encuentra a 10,64 SD por encima de nivel *cut-off* para este experimento (Promedio de DO_{490nm} para larvas no infectadas = 0,272; SD = 0,028; *cut-off* = 0,328).

Análisis del nivel de expresión de la granulina

A fin de relacionar el grado de expresión de granulina con respecto al nivel de proteínas totales en larvas infectadas de *E. aporema*, se analizó primero la cantidad de proteínas solubles de EpapGV y luego se cuantificó la cantidad de granulina en los últimos estadios de la infección. La proteína soluble se cuantificó para los distintos tiempos pos infección por ensayo de Bradford tal como se describe en el apartado anterior.

Los resultados de la figura 4.9 mostraron un comportamiento similar en las curvas de peso promedio de las larvas infectadas y en las curvas de la cantidad de proteínas totales en ellas. Tanto las proteínas solubles como el peso total de las larvas se incrementan hasta las 50-70 h p.i. para luego descender hasta el final del experimento, manteniéndose constante la relación entre ellas. El perfil del peso de las larvas está de acuerdo con lo publicado recientemente por Goldberg *et al.* (2002b).

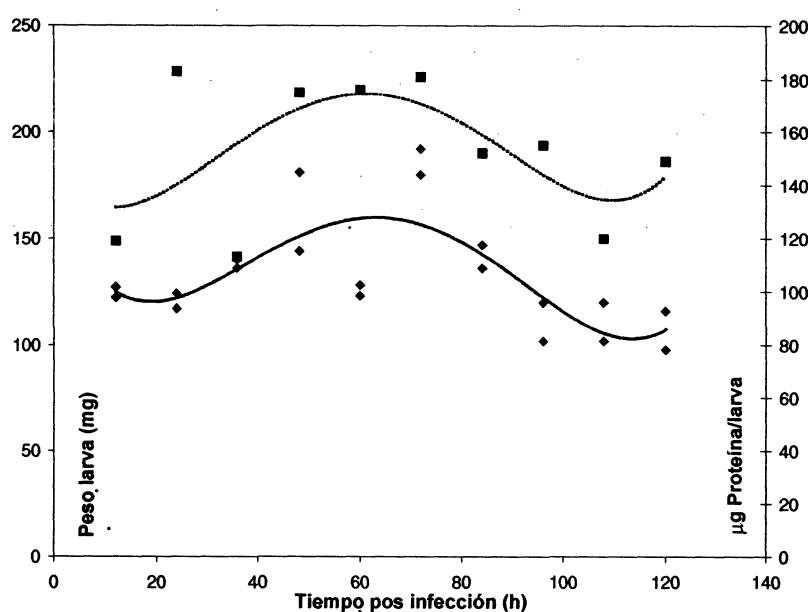


Figura 4.9. Medida de las proteínas totales y del peso promedio de larvas infectadas a distintos tiempos pos infección. Referencias: ■, peso promedio de las larvas expresado en mg x 10; ◆, µg de proteínas por larva x10.

Posteriormente, se cuantificó la concentración de granulina en homogeneizados de lavas infectadas a distintos tiempos p.i. La determinación de la cantidad de granulina se efectuó en SDS-PAGE a partir de alícuotas de larvas infectadas, que se valoraron contra una curva construida con testigos de masa conocida de BSA (Fig. 4.10). Si bien se determinó la cantidad granulina en las alícuotas 96 h, 108 h y 120 h p.i., sólo se muestra el gel que corresponde al análisis del último intervalo de tiempo. Los resultados de la cuantificación de granulina en los últimos tres intervalos indicaron que las larvas infectadas mostraron 54, 114 y 136 µg de granulina/larva, para las 96, 108 y 120 h (p.i) respectivamente (Tabla 4.3). Estas cantidades son equivalentes a $2,0 \times 10^9$, $4,3 \times 10^9$ y $5,13 \times 10^9$ OBs/larva para los intervalos de tiempo antes mencionadas.

Al analizar la cantidad de granulina por ELISA (Fig. 4.8), los valores obtenidos fueron similares a los obtenidos partir de SDS-PAGE pero mostraron una cierta dispersión (Tabla 4.3). La dispersión observada puede relacionarse con las variaciones propias de las técnicas de cuantificación empleadas y con la naturaleza de la muestra

analizada (suspensión de gránulos). Los resultados de cuantificación de granulina por las dos técnicas mostraron que esta proteína representaría alrededor del 56% de la proteína total a las 120 h p.i. Estos valores se encuentran en relación con lo calculado por Smith *et al.* (1983), que establecieron que en cultivos celulares entre el 20 y el 50% de la proteína total de la célula corresponde a la proteína de inclusión.

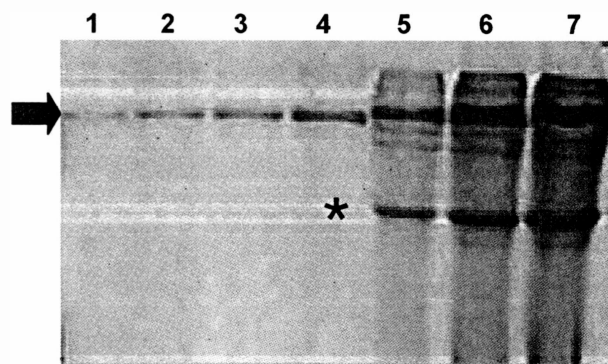


Figura 4.10. Cuantificación de la cantidad de granulina producida en larvas de *E. aporema* infectadas a 120 h pos infección (p.i.). Los homogeneizados de larvas infectadas fueron calentados en *buffer* de muestra a 100 °C y luego centrifugados 3 min. a 14.000 x g para sedimentar los gránulos no disueltos, posteriormente se sembraron en el gel 12,5%. Calles 1-4, estándares de masa conocida de BSA; calle 1, 1 µg; calle 2, 2 µg; calle 3, 3 µg; calle 4, 6 µg. Calles 5-7, diluciones del homogeneizado de larvas infectadas a 120 h p.i.; calle 5, 1/400 del homogeneizado; calle 6 2/400 del homogeneizado; calle 7, 3/400 del homogeneizado. La flecha negra indica la posición de la BSA y el asterisco la posición de la granulina.

Tabla 4.3. Datos de las medidas de proteínas en larvas de *E. aporema* infectadas con EpapGV.

| h p.i. | Proteína soluble (µg) | Cálculo de granulina por SDS-PAGE | | | | Cálculo de granulina por ELISA | | | |
|--------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------|
| | | Granulina (µg) | OBs x 10 ⁹ /larva | Proteína total ^a (µg) | Granulina (%) | Granulina (µg) | OBs x 10 ⁹ /larva | Proteína total ^a (µg) | Granulina (%) |
| 96 | 120 | 54 | 2,0 | 174 | 31 | 36 | 1,36 | 156 | 23 |
| 108 | 111 | 114 | 4,3 | 228 | 50 | 84 | 3,17 | 195 | 43 |
| 120 | 107 | 136 | 5,13 | 243 | 56 | 141 | 5,3 | 248 | 57 |

^a La proteína soluble se midió por la técnica de Bradford sobre la proteína soluble del homogeneizado de larvas infectadas.

^b La proteína total se obtuvo de sumar la proteína soluble, medida por ensayo de Bradford más la cantidad de granulina extrapolada del ELISA o calculada a partir de SDS-PAGE.

En conclusión, el nivel de expresión de la proteína granulina de EpapGV en estadios tardíos, es tan elevado como el de las proteínas de inclusión de los NPVs. Estos hallazgos indicarían que el promotor de la granulina podría ser empleado en la construcción de vectores de expresión de proteínas recombinantes.

Formulados

La especificidad del ELISA de captura fue ensayada también para diferentes preparaciones bioinsecticidas. Formulados de CpGV, EpapGV y formulados sin el agregado de OBs fueron pesados y una suspensión de los mismos se calentó a 75 °C para inactivar la proteasa alcalina. Posteriormente, fracciones de los formulados fueron incubadas con *buffer* alcalino para solubilizar los gránulos y se los diluyó convenientemente en placas de ELISA, en donde se los empleó como antígenos en ensayos de captura. De acuerdo con los datos previos, calculados a partir de la cantidad de OB añadidos al formulado base, el formulado de EpapGV contendría 5×10^9 OBs/g y la concentración de cuerpos de inclusión de las diluciones sería equivalente a 1×10^5 OBs/ml ó 5×10^3 OBs por pozo en la dilución que correspondía con 20 µg de formulado por mililitro. (Tabla 4.4)

El ensayo de ELISA (Fig. 4.11) mostró una reacción positiva para la granulina de EpapGV en formulados diluidos hasta 20 µg/ml, correspondientes a $1,0 \times 10^5$ OBs/ml ó 5×10^3 OB por µg de formulado bioinsecticida. Mientras tanto, cantidades iguales del formulado de CpGV mostraron valores de DO similares a los valores de *cut-off* (formulado no infectado) en un amplio rango de diluciones. Para obtener un valor significativo de DO con formulado de CpGV, fue necesario incrementar la concentración 100 veces respecto al formulado de EpapGV (dato no mostrado).

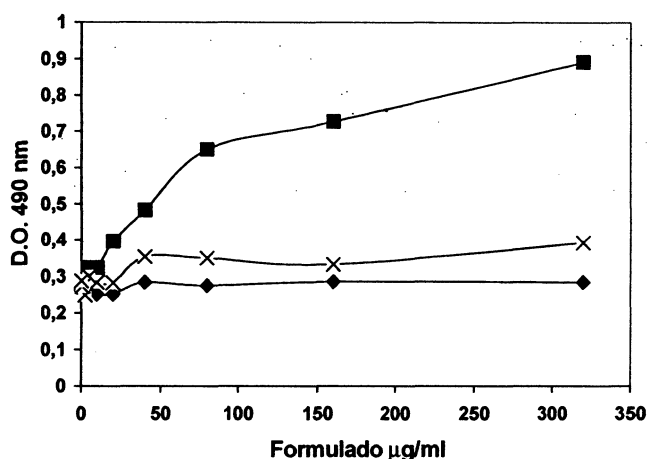


Figura 4.11. Detección de granulina en formulados bioinsecticidas. Formulados de tipo polvo mojable preparados a partir de larvas infectadas con EpapGV (■), CpGV (×) y el correspondiente material no infectado (▲), fueron resuspendidos en agua, ajustados a concentraciones similares y ensayados por ELISA. En la ordenada se indican los valores de densidad óptica a 490 nm (DO) mientras que en la abscisa se muestra la concentración de formulado en µg/ml. Para la menor cantidad de formulado de EpapGV que presentó una señal positiva en ELISA (20 µg/ml), se obtuvo una relación señal/ruido de 1,34. Para ese punto, la diferencia entre los valores de DO_{490nm} de la señal y el ruido (*cut-off*) corresponde a 7,21 SD por encima del nivel del *cut-off*. Datos: DO_{490nm} = 0,397 para 20 µg/ml de formulado bioinsecticida de EpapGV; DO_{490nm} para 20 µg/ml de formulado no infectado = 0,252; SD para el formulado no infectado = 0,014; *cut-off* = 0,296.

A partir de los datos de la figura 4.6 (especificidad del ELISA de captura) se ha construido una recta, con la porción lineal de la curva de DO vs. concentración de granulina de EpapGV (Fig. 4.12). De este gráfico se ha extrapolado la concentración

de granulina de cada una de las diluciones de formulados de EpapGV que presentaron reacción positiva en ELISA y que se encuentran dentro del rango lineal de datos. Los resultados indicaron que el formulado de EpapGV contaba con un número de OBs en el rango de $3,9-6,6 \times 10^9$ OBs/g (Tabla 4.4). Estos valores son muy cercanos al valor teórico (5×10^9 OBs/g) obtenido de acuerdo con los cuerpos de inclusión añadidos al formulado. Dado que el CV inter-ensayo es del 14%, los resultados de este ensayo resultaron satisfactorios. Por otra parte, también existió correspondencia entre el nivel de sensibilidad del ELISA (2,12 ng/ml de granulina) y la menor dilución de formulado que presentó reacción positiva (20 μ g/ml) que contenía 2,65 ng/ml de granulina según extrapolación respecto del número de OBs/g inicial en el formulado.

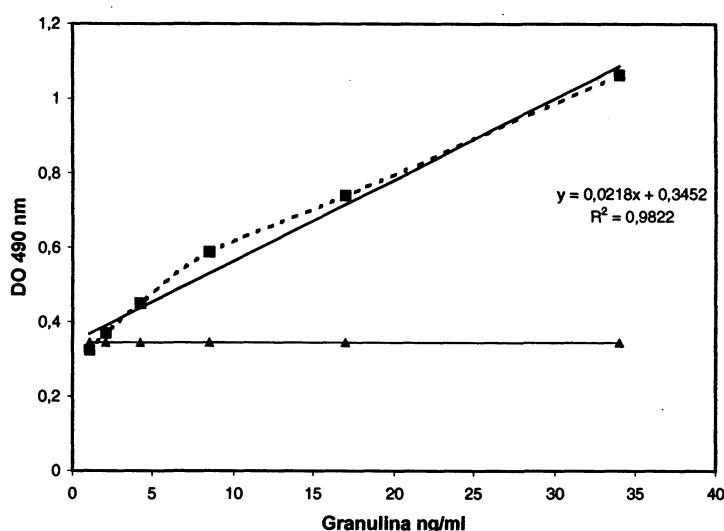


Figura 4.12. Relación entre la DO y la concentración de granulina (ng/ml). Se han tomado los valores de DO y concentración de proteína (granulina) de la figura 4.6, para el rango lineal (concentraciones < 35 ng/ml) y se ha calculado la ecuación de la recta para esos valores, la que se muestra a la derecha de la curva.

Tabla 4.4. Cuantificación de EpapGV en un formulado bioinsecticida.

| Form. μ g/ml | OBs/ml (teórico) en la dilución de formulado ^a | Granulina (ng/ml) teórico | DO | ELISA ^b | Granulina (ng/ml) extrapolado ^c | OBs/ml (extrapolado) en la dilución de formulado ^d | OBs/g de formulado stock (extrapolado) ^e |
|------------------|---|---------------------------|------|--------------------|--|---|---|
| 320 | $1,6 \times 10^6$ | 42,44 | 0,89 | + | R no L | - | - |
| 160 | $8,0 \times 10^5$ | 21,22 | 0,72 | + | R no L | - | - |
| 80 | $4,0 \times 10^5$ | 10,61 | 0,65 | + | 13,98 | $5,3 \times 10^5$ | $6,6 \times 10^9$ |
| 40 | $2,0 \times 10^5$ | 5,30 | 0,48 | + | 6,18 | $2,3 \times 10^5$ | $5,8 \times 10^9$ |
| 20 | $1,0 \times 10^5$ | 2,65 | 0,39 | + | 2,06 | $0,78 \times 10^5$ | $3,9 \times 10^9$ |
| 10 | $5,0 \times 10^4$ | 1,33 | 0,32 | - | - | - | - |
| 5 | $2,5 \times 10^4$ | 0,66 | 0,32 | - | - | - | - |

^a Tanto los OBs/g como la cantidad granulina (ng/ml) se calcularon a partir de la cantidad teórica de OBs/g añadida del formulado base (5×10^9 OBs/g ó 5000 OBs/ μ g).

^b (+) detección positiva, (-) detección negativa.

^c Los ng/ml de granulina han sido calculados a partir de la ecuación recta de la figura 4.12. R no L (Rango no lineal), la curva de la figura 4.11 no presenta relación lineal con la concentración de formulado para estos valores de DO (valores de formulado mayor a 75 μ g/ml).

^d Estos valores se han calculado con los datos de la columna anterior. El límite de detección es ~4.000 OBs en 50 μ l.

^e El número de OBs por gramo de formulado stock se ha calculado en base a la cantidad de granulina determinada en ELISA para cada dilución de formulado.

La aplicación de la técnica de ELISA sobre el formulado bioinsecticida demostró que este método permitió de detectar y cuantificar granulina de EpapGV en muestras complejas (formulados) altamente diluidas, con una sensibilidad satisfactoria, y con una alta especificidad.

Ensayos adicionales

Durante la puesta a punto del ensayo de ELISA se realizaron otros experimentos, cuyos fines fueron accesorios. Algunos procuraron verificar la validez de las mediciones de proteínas en *buffer* alcalino por la técnica de Bradford, otros en cambio buscaron alternativas para solubilizar la proteína granulina o para incrementar el nivel de sensibilidad de la técnica.

Puesta a punto del ensayo de Bradford para la medición de granulina de EpapGV solubilizada en solución de carbonato

En apartados anteriores hemos dado por sentado que la cuantificación de proteínas de OB solubilizados en medio alcalino se han efectuado por el ensayo de Bradford ¹. Sin embargo, para lograr ese objetivo, la técnica ha tenido que ser adaptada.

Previamente se había comprobado que al neutralizar soluciones de gránulos disueltos en *buffer* alcalino se generaban flóculos y que las medidas de proteínas por Bradford presentaban una disminución del 50% respecto de muestras no neutralizadas (dato no mostrado). Por otra parte, se desconocía el comportamiento del ensayo de Bradford empleando proteínas disueltas en medio básico. En este contexto, es necesario recordar que el reactivo de Bradford (Coomassie Brilliant blue R-250) se encuentra disuelto en ácido fosfórico y que el agregado de bases modificaría el pH de la solución <1.

¹ Previamente se había determinado la imposibilidad de establecer la cantidad de proteína total de gránulos no disueltos, por la técnica de Bradford, debido a que los valores de $DO_{625\text{ nm}}$ obtenidos al tratar los OBs de EpapGV con solución de Bradford eran despreciables respecto a las medidas obtenidas a partir de gránulos disueltos en medio alcalino. Esta situación se debería a que los gránulos de EpapGV no se disolvían en la solución de Bradford.

Para evaluar la validez del ensayo de Bradford en medio alcalino, se analizó el comportamiento de la proteína BSA disuelta en *buffer* alcalino respecto del testigo estándar (BSA disuelta en agua). Los resultados indicaron que las distintas diluciones de BSA presentaron un comportamiento lineal en medio alcalino (Fig. 4.13). Con estos valores se construyó una nueva curva de correlación y de ella se extrapolaron los valores de proteína en soluciones alcalinas.

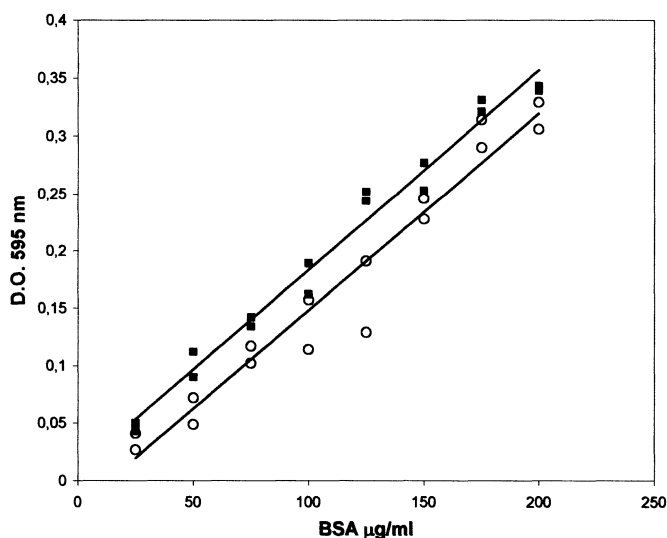


Figura 4.13. Medidas de Bradford con patrón de medición disuelto en *buffer* alcalino. ○, BSA disuelta en H₂O; ■, BSA disuelta en solución de carbonato.

Análisis de la solubilidad de la granulina

Debido a la necesidad de contar con una alícuota de granulina de concentración determinada para ser empleada como patrón en los ensayos de ELISA, se postuló la conveniencia que este patrón consistiera en granulina solubilizada en medio alcalino. Desafortunadamente, se observó que la solución de granulina (previamente solubilizada en medio alcalino y congelada) presentaba un sedimento blanquecino cuando era descongelada. También se comprobó que la misma muestra presentaba un precipitado blanquecino, luego de permanecer incubada 18 h a 4 °C. El sedimento fue atribuido a granulina precipitada (Tabla 4.5) y podría deberse a la asociación de multímeros de gran tamaño que precipitan en solución.

Con el fin de mantener a la granulina en solución, se ensayaron varios protocolos. En todos los casos se tomaron OBs de EpapGV y se los disolvió en solución alcalina, luego se las calentó 10 min. a 100 °C y se centrifugó para eliminar los OBs no disueltos. Algunas alícuotas fueron neutralizadas y se les añadió SDS o Tween-20 hasta llevar la concentración a 0,5%. Las muestras se colocaron en tubos plásticos de 0,5 ml y se dejaron durante 18 h a 4 °C o bien a -20 °C. Al día siguiente se descongelaron las muestras y los tubos se centrifugaron durante 3 minutos a 18.000 x

g en microcentrífuga, analizando la presencia de una sedimento blanquecino (granulina precipitada). A modo de control se centrifugó el sobrenadante de disolución de gránulos disueltos ese mismo día. El SDS, a diferencia del Tween-20, disolvió el flóculo producido durante la neutralización; sin embargo, ninguno de los detergentes logró impedir la precipitación de la granulina tras una permanencia de 18 h a 4 °C ó luego de ser congelados a -20 °C y descongelados posteriormente (Tabla 4.5). Dada la imposibilidad de mantener un patrón de gránulos solubles se decidió emplear como estándar alternativo, alícuotas de gránulos purificados sin SDS, disueltos en medio alcalino antes de cada ensayo.

Tabla 4.5. Solubilidad de granulina ante distintos tratamientos.

| Solución de solubilización de gránulos de EpapGV ⇒ | Solución alcalina | Solución alcalina | Solución alcalina | Solución alcalina | Solución alcalina | Solución alcalina | Solución alcalina |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Almacenamiento | - | -20°C, 18 h | 4 °C, 18 h | -20 °C, 18 h | 4 °C, 18 h | -20 °C, 18 h | 4 °C, 18 h |
| Sedimento luego de centrifugación 3 min. a 18.000 x g | - | + | + | + | + | + | + |
| Neutralización | - | - | - | + | + | + | + |
| Flóculo | - | - | - | + | + | + | + |
| Detergente añadido a la solución neutralizada | - | - | - | Tween 0,5% final | Tween 0,5% final | SDS 0,5% final | SDS 0,5% final |
| Solubilización del flóculo | NC ^b | NC | NC | - | - | + | + |
| Presencia de sedimento de granulina luego de tratamiento con detergente | NC | NC | NC | + | + | + | + |

^b no corresponde.

Ensayo de ELISA con gránulos de EpapGV solubilizados en presencia de Tween-20 ó NaCl 0,5 M

A fin de evaluar el efecto de sustancias caotrópicas en la solubilización de granulina, se disolvieron cuerpos de inclusión de EpapGV en *buffer* alcalino con el añadido de Tween-20 (0,2%) ó NaCl (0,5 M). Estos homogeneizados se ensayaron por ELISA de captura (Fig. 4.14).

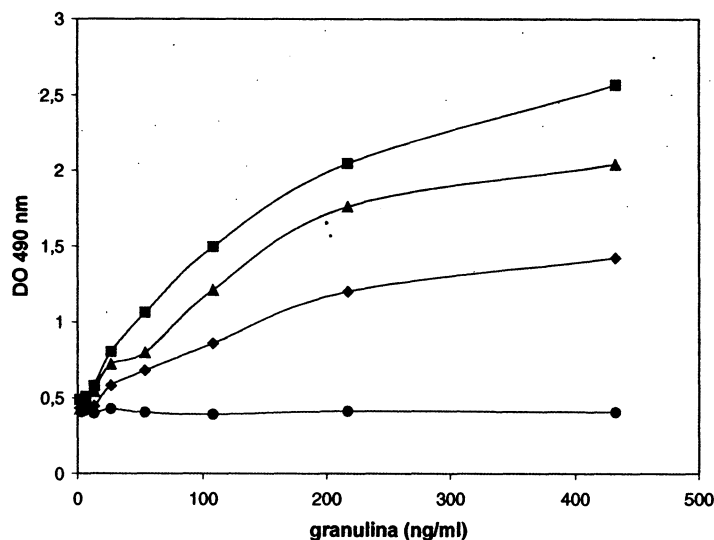


Figura 4.14. ELISA de captura de una suspensión de gránulos de EpapGV en Tween-20.

◆, OBs disueltos en sol de carbonato; ■, OBs disueltos en solución de carbonato más Tween-20 0,2%; ▲, OBs disueltos en solución de carbonato más NaCl 0,5 M; ●, larvas no infectadas.

Ambos tratamientos provocaron un incremento en los valores de densidad óptica del ensayo de ELISA. Los incrementos son del orden de 25-70% para el tratamiento con NaCl (0,5 M) y de 50-100% al emplear Tween-20 (0,2%) para el rango analizado, se debería la disociación de interacciones de tipo hidrofóbicas que ocasionarían la separación de multímeros de granulina. En tanto, el incremento de la DO por el NaCl podría estar relacionado también con la disolución de multímeros, debido al apantallamiento de cargas, productos del incremento de la fuerza iónica. La disociación de acúmulos proteicos expondría epitopes relevantes a la interacción con los anticuerpos específicos, provocando así un incremento en la señal.

Comentarios generales

Los resultados descritos en este capítulo indican que el ELISA de captura puede ser usado como una herramienta conveniente para cuantificar granulina en el formulado bioinsecticida (y, por ende, los OBs), con una mejor sensibilidad que los métodos convencionales. Para este propósito, es muy conveniente preparar una gran cantidad de preparación de referencia de virus para ser usado como calibrante en ensayos futuros.

Este ensayo es aplicable a un vasto rango de muestras obtenidas en diferentes etapas del proceso de producción, por ejemplo larvas infectadas, larvas muertas, homogeneizados y suspensiones, formulados líquidos y en polvo, cuerpos de oclusión semi purificados, etc.

A pesar que el ELISA es un método objetivo para cuantificar cuerpos de inclusión en diferentes tipos de muestras, la infectividad debe ser determinada por bioensayos como parte del control de calidad del bioinsecticida. Ambos tipos de datos se combinan para estimar la potencia (expresada como la actividad biológica/OB). El análisis de la variación de la potencia en muestras tomadas en diferentes estadios de la producción y en diferentes preparaciones, puede ser empleada para mejorar la consistencia de la producción comercial.

Este método, representa también una alternativa conveniente para detectar infecciones adquiridas naturalmente por poblaciones de *E. aporema*. El conocimiento de las infecciones naturales permitirá comprender la dinámica de las epizootias de este virus. Además, la metodología puesta a punto ofrece una alternativa potencial para evaluar las infecciones adquiridas de *E. aporema* en ensayos de campo, y para controlar de esta forma la proporción de larvas infectadas y la eficacia del bioinsecticida. Pese a que el ensayo no ha sido puesto a punto, los anticuerpos anti-granulina de EpapGV podrían adaptarse para ensayo de ELISA capaz de detectar OBs de CpGV en formulados o en larvas infectadas, aunque para este propósito es más conveniente contar con anticuerpos específicos para la granulina de CpGV.

En conclusión, la alta sensibilidad de este método hace que esta técnica sea una herramienta de valor para la cuantificación de OBs en insectos infectados o formulados.

Conclusiones

- Se generaron anticuerpos anti-granulina de EpapGV en conejo de alto título (4×10^5).
- Se determinó la especificidad del anticuerpo producido respecto de diferentes baculovirus por ensayos de ELISA y *Western blot*. El ensayo de *Western blot* determinó que el anticuerpo generado es específico para la granulina de EpapGV, pese a que se obtuvo una reacción cruzada con la granulina de CpGV. Cuando las mismas muestras se analizaron por ELISA, el ensayo logró discriminar la granulina de EpapGV de la granulina de CpGV en un amplio rango de diluciones, indicando que el anticuerpo producido era altamente específico para granulina de EpapGV en el rango analizado.
- Se puso a punto un ensayo de ELISA de captura con alta sensibilidad para EpapGV, detectando hasta 26,5 pg de granulina, equivalentes a 1.000 OBs por fosa.
- Se utilizó el ensayo de ELISA para determinar el progreso de la infección en larvas, estableciendo la presencia de granulina a partir de las 24 h p.i.
- Se adaptó el ensayo de ELISA para cuantificar OBs en el formulado bioinsecticida. Esta técnica detectó cuerpos de inclusión de EpapGV en diluciones que contenían $1,0 \times 10^5$ OBs/ml ó 5×10^3 OB por μg de formulado bioinsecticida
- Se analizó el efecto de SDS y Tween-20 sobre la solubilidad de OBs disueltos en medio alcalino. Ninguno de estos detergentes impidió la precipitación de la proteína mayoritaria luego de ser solubilizada en solución alcalina.
- La disolución de gránulos de EpapGV en presencia de NaCl (0,5 M) produjo un incremento en la sensibilidad de la técnica ELISA de entre el 25 al 70%. Para el caso de la disolución de gránulos en presencia de Tween-20 (0,2%), el incremento fue mayor, siendo este de 50 al 100% para todos los puntos analizados.

CAPÍTULO 5

DETERMINACIÓN DEL MAPA DE RESTRICCIÓN (MAPA FÍSICO) DEL GENOMA DE EpapGV

Introducción

Mapeo de genomas de baculovirus

En la década del 70 los mapas de restricción de los baculovirus eran determinados por doble digestión recíproca de fragmentos de restricción simples, aislados de geles de agarosa (AcMNPV; & Summers, 1979). La estrategia consistía en la digestión del DNA viral con una enzima de restricción, la resolución por electroforesis y el aislamiento de los fragmentos a partir de gel, seguido por la marcación radiactiva de sus extremos (*fill in* con [α 32 P] dATP). La redigestión de estos fragmentos con otras enzimas y el análisis por electroforesis de los productos permitía reconstruir el mapa de restricción en base a la superposición de productos de digestiones recíprocas. Con posterioridad los fragmentos eluidos de geles comenzaron a emplearse como sondas para experimentos de hibridaciones (*Southern blot*) con el genoma viral digerido con las diferentes enzimas de mapeo. En la década del 80 las nuevas herramientas de clonado de fragmentos genómicos permitieron contar con cantidades abundantes de DNA, que facilitaron el mapeo. Estos últimos procedimientos (mapeo de clones individuales, mapeo por superposiciones y *Southern blot*) se han mantenido invariables en el tiempo. Recientemente, Hyink *et al.* (1998) han introducido variantes más prácticas a este método, empleando una estrategia rápida para unir todos los fragmentos de restricción generados con una misma enzima. Los fragmentos son secuenciados parcialmente desde sus extremos y estas secuencias son comparadas en GenBank con genes conocidos. De acuerdo con los resultados de la comparación, dos fragmentos se alinearán en forma contigua cuando compartan porciones de un mismo gen. Este método presenta como limitación, la necesidad que el ORF cuente con un homólogo en otro organismo, que el grado de similitud entre las secuencias sea suficientemente alto, y que este ORF esté compartido por ambos fragmentos en una fracción suficientemente grande como para que la comparación brinde resultados inequívocos. Sin embargo, es necesario utilizar esta estrategia con precaución cuando se planea obtener un mapa de restricción de un virus que pertenezca a un género no explorado, debido a la imposibilidad de encontrar ORFs homólogos. En caso de que algunas contigüidades no presenten similitud con ningún ORF conocido, otros autores (Hyink *et al.*, 1998; y Sadler *et al.*, 2000) también han sugerido el empleo de un método complementario para confirmar contigüidades. Este método se basa en el diseño y empleo de *primers* dirigidos hacia los extremos de los fragmentos, destinado

a amplificar la secuencia que atraviesa el sitio de restricción que separa dos fragmentos contiguos.

Actualmente, la caracterización inicial de genomas de baculovirus mediante el uso del mapeo de restricción de genoma está siendo suplantada por la secuencia completa de estos genomas. En particular, este desplazamiento se debe a la disminución en el costo de los métodos de secuenciación y a la gran cantidad de información que provee la secuencia completa de estos genomas.

Objetivos

- Determinar con precisión el tamaño del genoma de EpapGV.
- Analizar y mapear los clones de las bibliotecas de fragmentos genómicos obtenidos por digestión con EcoRI, BamHI, BglII y HindIII.
- Ubicar fragmentos pequeños en el mapa.
- Presentar una hipótesis de mapa de restricción.
- Corroborar la hipótesis presentada.

Estrategia experimental

Mapa de restricción del genoma de EpapGV: estrategia general

Con el objeto de escoger un grupo de enzimas de restricción para determinar el mapa físico del genoma de EpapGV, se analizaron digestiones de DNA viral purificado con distintas enzimas de restricción: EcoRI, HindIII, BamHI, BglII, XbaI y NdeI. A partir de los resultados obtenidos se decidió avanzar en el mapeo del genoma con las primeras cuatro enzimas. Se dejó de lado el análisis con las enzimas XbaI y NdeI, debido a que las mismas produjeron un número excesivo de fragmentos. A fin de iniciar la caracterización molecular de EpapGV, se generaron cuatro colecciones de clones obtenidos a partir del DNA de EpapGV digerido con las enzimas EcoRI, BamHI, BglII y HindIII respectivamente. Para el análisis que se presenta a continuación se utilizó una

genoteca (genomic DNA libray) completa de fragmentos EcoRI construida en pZErO-2™ (Invitrogen, CA) y de genotecas parciales de los fragmentos: BamHI (en pZErO-2™), HindIII (en pZErO-2™ y pBluescript SK+, Stratagene) y BgIII (en pZErO-2™). La identidad de los mismos fue confirmada por hibridación con una sonda de DNA genómico de EpapGV, tanto en el formato "*colony blot*" como "*Southern blot*"¹. Luego, los fragmentos clonados fueron mapeados con las enzimas elegidas para el mapa (EcoRI, BamHI, HindIII y BgIII). La determinación del tamaño de los fragmentos genómicos se obtuvo mediante el análisis por electroforesis en geles de agarosa de los productos de digestiones simples y múltiples combinadas. El tamaño del genoma de EpapGV se calculó a partir de la suma de los fragmentos de simple y múltiple digestión de los clones de los fragmentos genómicos EcoRI y resultó de 120,1 kpb. En cuanto al mapa físico de EpapGV, éste fue determinado mediante una combinación de técnicas que involucraron la doble digestión de fragmentos clonados, *Southern blot*, PCR y secuenciamiento de los extremos de los fragmentos clonados.

Las hibridaciones sobre DNA de EpapGV digerido no mostraron resultados ambiguos y permitieron conjuntamente con el mapeo de los clones, presentar una primera hipótesis de mapa. En una segunda etapa se aplicó una variedad de técnicas, que en conjunto confirmaron el mapa propuesto.

Técnicas y análisis efectuados

Estrategias de exploración

- Elección de las enzimas de mapeo.
- Construcción de mapas de restricción individuales para los clones EcoRI, BamHI, HindIII y BgIII.
- Alineación de clones mediante hibridación con sondas radioactivas homólogas y heterólogas.
- Análisis de superposición de patrones de restricción de los extremos de los clones generados con las distintas enzimas.
- Confirmación de las contigüidades por PCR.
- Formulación de una hipótesis de mapa de restricción.

¹ Tanto la biblioteca de EpapGV, como la hibridación de los clones de la misma con el DNA viral fueron efectuadas por Alejandra Manzán.

Estrategias confirmatorias

- Secuenciamiento de los extremos de los fragmentos clonados y análisis de ORFs compartidos entre fragmentos².
- Ubicación de fragmentos pequeños mediante secuencia directa y PCR.
- Confirmación de la ubicación de sitios de restricción adyacentes a los extremos de fragmentos clonados.
- Control de los mapas de fragmentos a través del análisis de las dobles digestiones de DNA genómico.

Resultados y discusión

Mapa de restricción

El trabajo descrito en este capítulo llevó a la determinación del mapa de restricción que se esquematiza en la figura 5.1 y en la tabla 5.1. La secuencia de trabajo, los análisis específicos y sus resultados particulares pueden verse en detalle en las secciones que se indican a continuación.

| Sección | Página |
|--|---------------|
| Mapa de restricción del genoma de EpapGV: estrategia general | 140 |
| Análisis de la biblioteca de clones EcoRI | 145 |
| Análisis de la biblioteca de clones BamHI | 156 |
| Análisis de la biblioteca de clones HindIII | 163 |
| Análisis de la biblioteca de clones BglII | 166 |
| Ubicación de los distintos fragmentos en un mapa de restricción por <i>Southern blot</i> | 173 |
| Empleo de fragmentos BglII y BamHI como elementos alineatorios (caminata genómica) | 180 |
| Empleo de técnicas de PCR para determinar la contigüidad de fragmentos y para ubicar fragmentos pequeños en el mapa de restricción | 183 |
| Hipótesis final del mapa de restricción de EpapGV | 187 |
| Verificación de la hipótesis de mapa | 189 |
| Conclusiones | 194 |

² Se analizan en el capítulo 8 "Análisis del genoma de EpapGV".

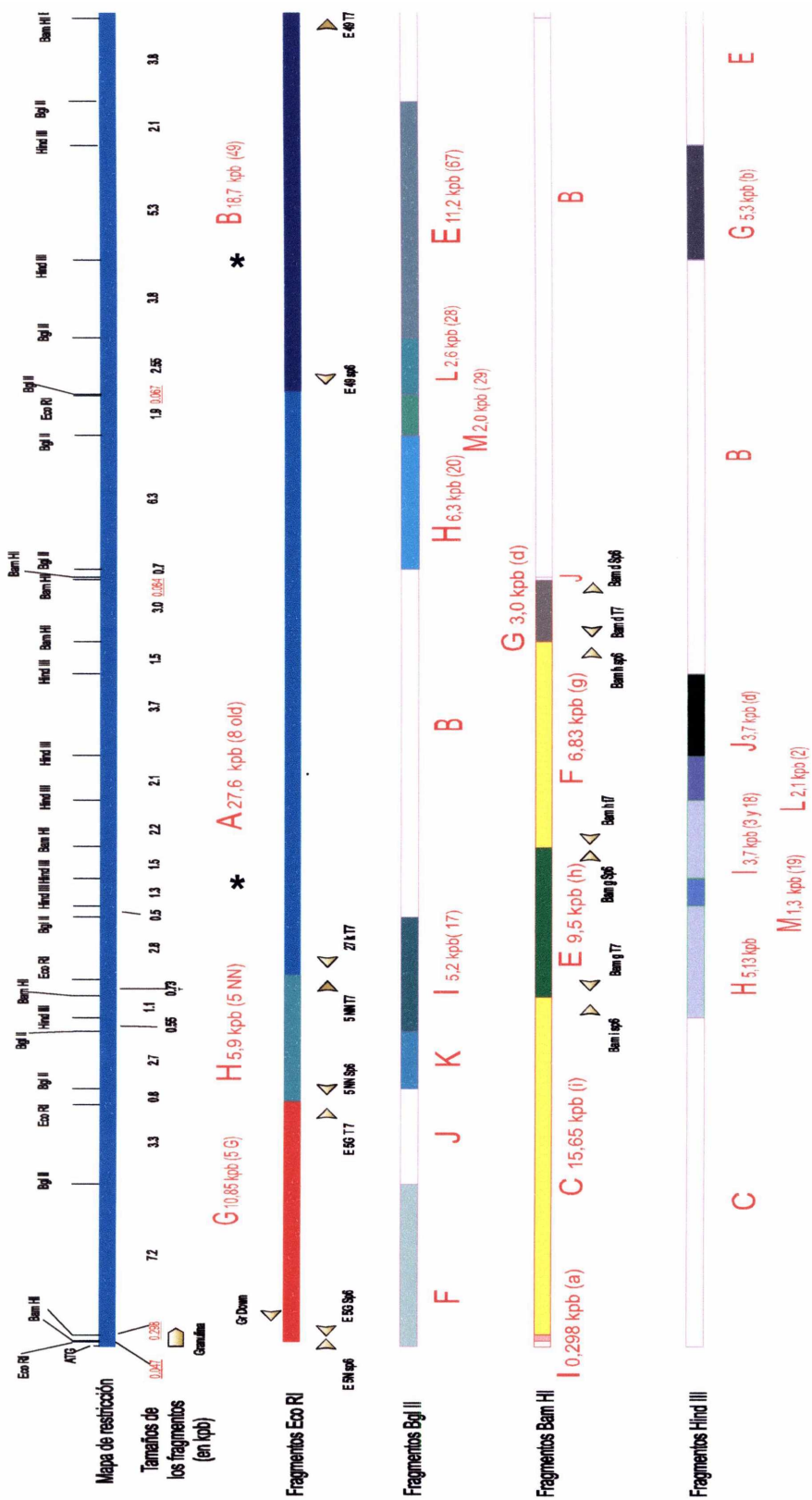


Figura 5.1. Mapa de restricción del genoma de EpapGV. Los tamaños de los fragmentos que están en rojo y subrayados han sido confirmados por secuenciación nucleotídica. Aquellos fragmentos clonados tienen una doble numeración: primero se indica el tamaño del mismo y, entre paréntesis, el nombre trivial de algunos de los clones representativos. No se cuenta en la actualidad, con clones de los fragmentos que aparecen en blanco. La posición de referencia corresponde al ATG del ORF de granulina. Las puntas de flecha indican las posiciones de los primers usados para confirmar los contigs. Con un asterisco se indican los fragmentos EcoRI empelados como sondas en experimentos de Southern blot.

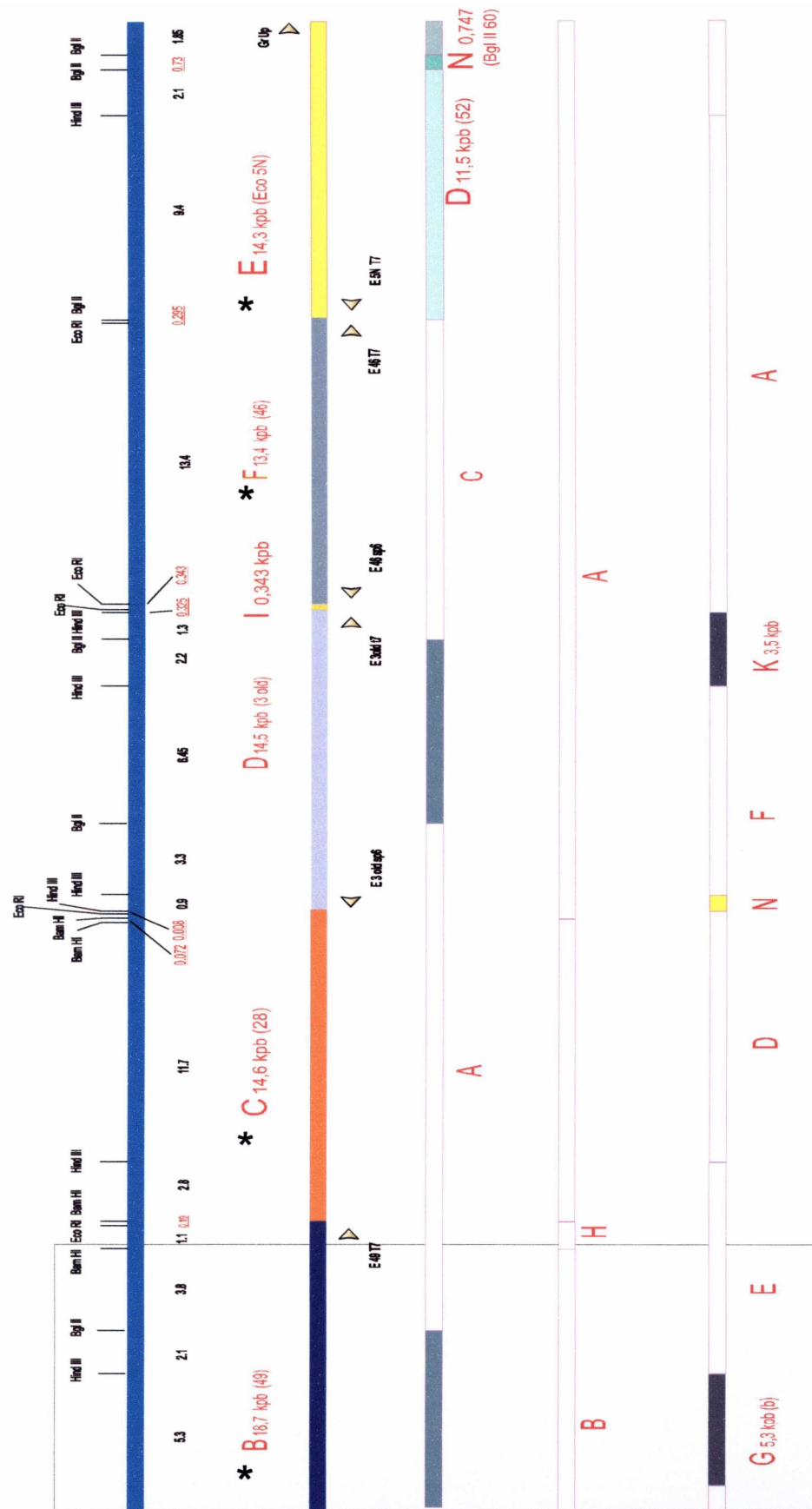


Figura 5.1. Continuación de la figura de la página anterior. En sombreado se muestra la región que se solapa con la figura de la página anterior.

Tabla 5.1. Tamaños de los fragmentos generados por digestión del DNA genómico de EpapGV. Los fragmentos están nombrados en orden alfabético comenzando por A para los fragmentos de mayor tamaño. Los tamaños se expresan en kpb.

| Fragmento | EcoRI | BamHI | HindIII | BglII |
|---------------------|--------------------------|--------------|----------------|--------------|
| A | 27,6^a | 43,6 | 23,75 | 23,5 |
| B | 18,7 | 25,6 | 19,8 | 16,58 |
| C | 14,6 | 15,65 | 19,58 | 15,65 |
| D | 14,4 | 14,2 | 11,4 | 11,5 |
| E | 14,3 | 9,5 | 10,1 | 11,2 |
| F | 13,4 | 6,83 | 9,8 | 9,4 |
| G | 10,85 | 3,0 | 5,3 | 8,7 |
| H | 5,9 | 1,3 | 5,13 | 6,3 |
| I | <u>0,343^b</u> | <u>0,298</u> | 3,7 | 5,2 |
| J | | <u>0,084</u> | 3,7 | 4,2 |
| K | | | 3,5 | 2,7 |
| L | | | 2,1 | 2,6 |
| M | | | 1,3 | 2,0 |
| N | | | 0,9 | <u>0,747</u> |
| | | | | |
| Tamaño total | 120,1 | 120,1 | 120,1 | 120,3 |

^a Fragmentos clonados (en negrita).

^b Los números subrayados indican que el tamaño del fragmento fue confirmado por análisis de secuencia.

Análisis de la biblioteca de clones EcoRI

Análisis de la construcción de algunos mapas de restricción de fragmentos EcoRI

Para el caso particular de los clones EcoRI, se muestran las digestiones (Figuras: 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 5.10, 5.12, 5.14) y los mapas de dichos clones (Figuras 5.3, 5.5, 5.7, 5.9, 5.11, 5.13, 5.15). A continuación se muestran y a modo de ejemplo, algunos análisis referidos a la construcción de mapas de restricción.

Fragmento EcoRI A (27,6 kpb), clon EcoRI 8

Debido a la gran cantidad de sitios de restricción que el fragmento EcoRI A posee, se presentaron algunas dificultades al intentar resolver su mapa de restricción mediante

digestiones múltiples. Estas dificultades fueron resueltas con la combinación de técnicas como *Southern blot* y PCR. Se identificaron fragmentos de otras bibliotecas que presentaron hibridación con una sonda del fragmento EcoRI A. Entre estos clones se encontraron los fragmentos BamHI (C y F), BglII (I, H y M), HindIII (M, I, L y J). Los mapas de restricción de todos estos fragmentos fueron analizados. Si bien el fragmento BamHI D (3,0 kpb) no fue detectado por *Southern blot*, éste se ubicó dentro de EcoRI A debido a la presencia de un banda de 3,0 kpb en los patrones de restricción (Fig. 5.2). Superponiendo los mapas de los fragmentos BamHI, BglII y HindIII se compuso el mapa de EcoRI A (Fig. 5.3). Posteriormente, mediante estrategias de PCR, se corroboraron las uniones entre los clones BamHI y se ubicó el fragmento pequeño BamHI I (86 pb).

Fragmento EcoRI C (14,6 kpb³), clon EcoRI 28

El mapa de restricción de este fragmento se estableció por digestión del plásmido que lo contenía (Fig. 5.6 y 5.7) con las enzimas seleccionadas. Sin embargo, al eluir los fragmentos de digestión del clon EcoRI 28 de geles de agarosa, aparecieron varias bandas "extrañas". Estas bandas aparecían con el DNA digerido y sin digerir en las posiciones del gel que correspondían a los 1.000 pb y entre 300 y 500 pb (Fig. 5.6), además las bandas se "marcaban" con [α ³²P] dATP luego de tratarlas con la enzima *Klenow*. Afortunadamente, las mismas no interfirieron en el mapeo del fragmento EcoRI C. El clon BglII 52 (fragmento BglII D), también mostró bandas fantasmas sin que las mismas interfirieran en la determinación de su mapa. Curiosamente, los clones EcoRI 28 y BglII 52 presentaron dificultades al intentar ser secuenciados con el *primer Sp6*. Estas bandas (también llamadas bandas "fantasmas" o "plásmido Freddy Krueger") ya habían sido informadas en plásmidos derivados del vector pBluescript (Hengen, 1994), purificados de la cepa de *E. coli* XL1-Blue. En particular, Hengen describió la presencia de una banda que migraba en gel de agarosa en la posición correspondiente a DNA lineal doble-hebra (aprox. 2,0-2,2 kpb), cuando se resolvían en geles de agarosa preparaciones de plásmidos digeridos. Cuando estas bandas eran aisladas y usadas para transformar *E. coli*, se recuperaba el plásmido original (Hengen, 1994).

³ Si bien los fragmentos de restricción EcoRI C, D y E migraban en el gel como una única banda de 14,4-14,6 kpb, algunos análisis posteriores determinaron pequeñas variaciones de tamaños entre ellos.

Basándose en estos datos, se sugirió que las bandas fantasmas corresponderían a DNA circular unido covalentemente (cccDNA), resistente a la digestión enzimática. Poco después, Sayers *et al.* (1996) comprobaron que la banda fantasma se reducía cuando el DNA en cuestión era tratado con exonucleasa de T5. Esta enzima es una 5'-exonucleasa que posee afinidad por DNA de simple hebra. Por otra parte, las preparaciones de plásmidos llevadas a cabo bajo condiciones no alcalinas no producían la banda contaminante. Finalmente, Sayers y sus colaboradores sugirieron que estas bandas consistían en DNA doble hebra circular y enrollado compuesto de por hebras simples de DNA plasmídico entrelazadas pero desnaturalizadas permanentemente.

Fragmento EcoRI F (13,4 kpb), clon EcoRI 46

El fragmento genómico EcoRI F de 13,4 kpb fue clonado en el clon EcoRI 46 y su mapa de restricción se estableció por digestión con las enzimas corrientemente usadas (dato no mostrado). Se determinó que el mismo no poseía sitios de restricción internos para las enzimas HindIII, BamHI y BglII. La presencia de sitios de restricción pequeños, adyacentes al sitio de clonado EcoRI se descartó por secuenciamiento a partir de los *primers* externos T7 y Sp6. El mapa se corroboró analizando los patrones de doble digestión genómica.

Fragmento EcoRI I (343 pb), clon EcoRI 47

Dado que este clon posee dos fragmentos clonados simultáneamente (uno de 14,4 kpb y otro de 0,3 kpb) (Fig. 5.14 y 5.15), y un reordenamiento en uno de sus extremos el análisis del mismo se efectúa posterior al análisis del fragmento EcoRI H.

Digestiones de clones y mapas de restricción de fragmentos EcoRI

Fragmento EcoRI A (27,6 kpb), clon EcoRI 8

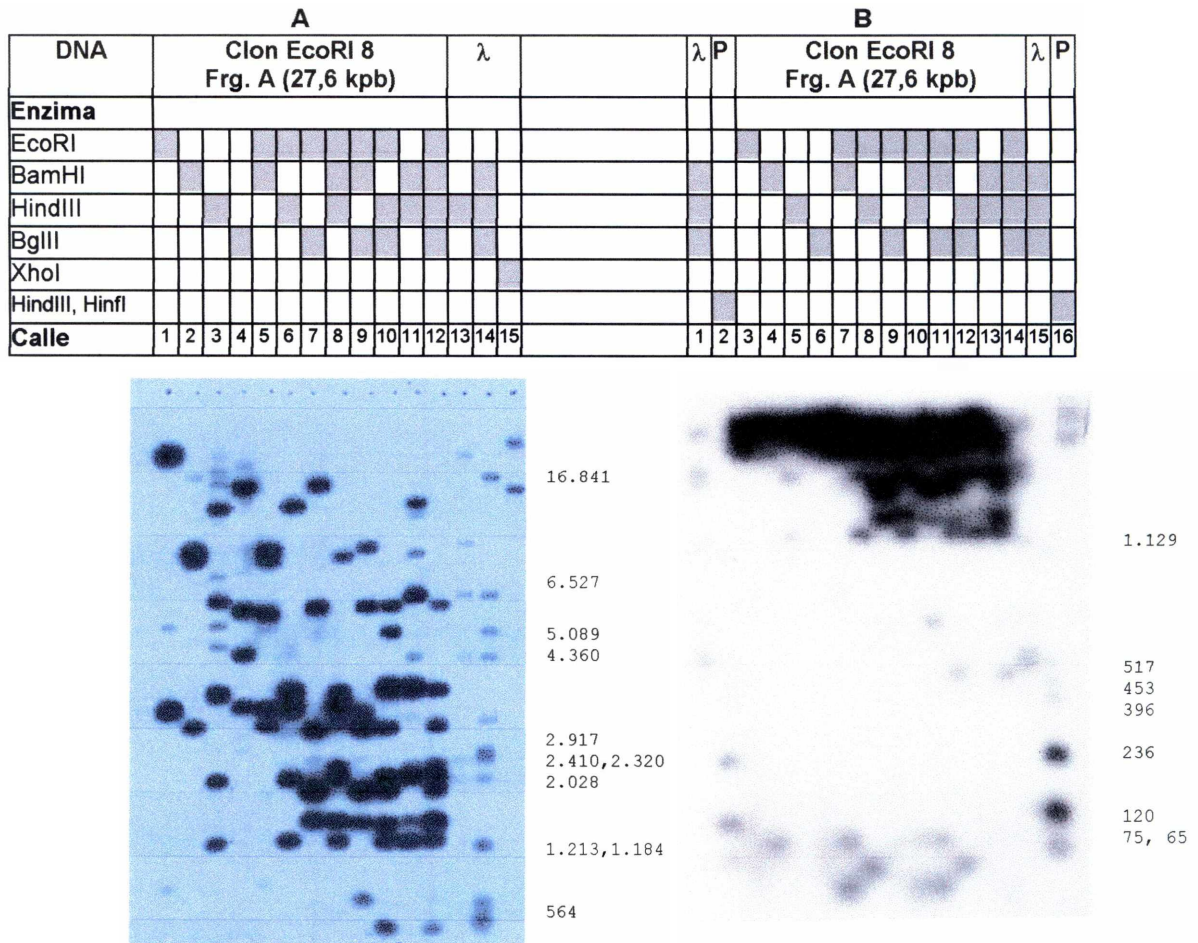


Figura 5.2. (A), Autorradiografía de los productos de digestión del clon EcoRI 8 (Frg. A) marcados con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP por *fill in* y resueltos en gel de agarosa 0,5% y (B), en gel de agarosa 1,5%. En la tabla ubicada encima de las autorradiografías se indican las enzimas utilizadas para generar los fragmentos resueltos en cada calle del gel. A la derecha de la figura A se indican los tamaños de los fragmentos del marcador de peso molecular (MPM), DNA del fago *Lambda* (λ) BamHI, BglII y HindIII (en pb). P: plásmido pcDNA II (Invitrogen, CA).

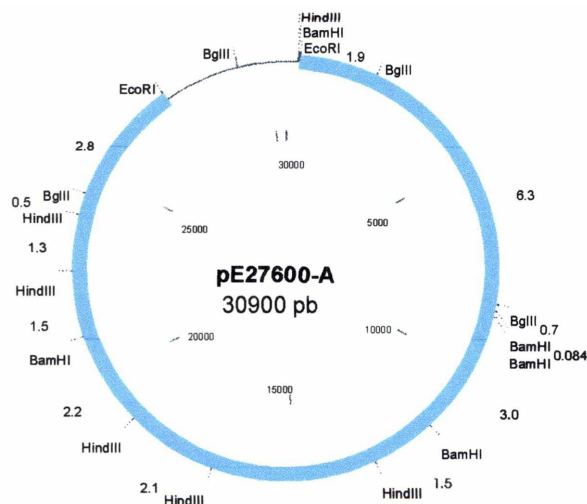


Figura 5.3. Mapa de restricción del plásmido EcoRI 8 (fragmento EcoRI A).

Fragmento EcoRI B (18,7 kpb), clon EcoRI 49

| DNA | λ | | Clon EcoRI 49 Frg. B (18,7 kpb) | | | | | | | λ | | EcoRI 49 | | |
|---------|---|---|------------------------------------|---|---|---|---|---|---|----|----|----------|----|----|
| Enzima | | | | | | | | | | | | | | |
| EcoRI | | | | | | | | | | | | | | |
| BamHI | | | | | | | | | | | | | | |
| HindIII | | | | | | | | | | | | | | |
| BglII | | | | | | | | | | | | | | |
| Calle | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |

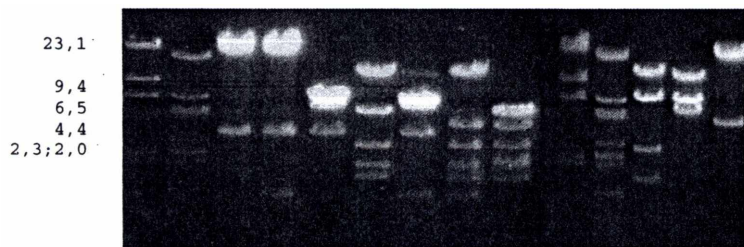


Figura 5.4. Gel de agarosa 0,5% con los productos de digestión del clon EcoRI 49 (Frg. B). En la tabla ubicada encima de las autorradiografías se indican las enzimas utilizadas para generar los fragmentos resueltos en cada calle del gel. A la izquierda se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, DNA del fago λ digerido con HindIII (en kpb).

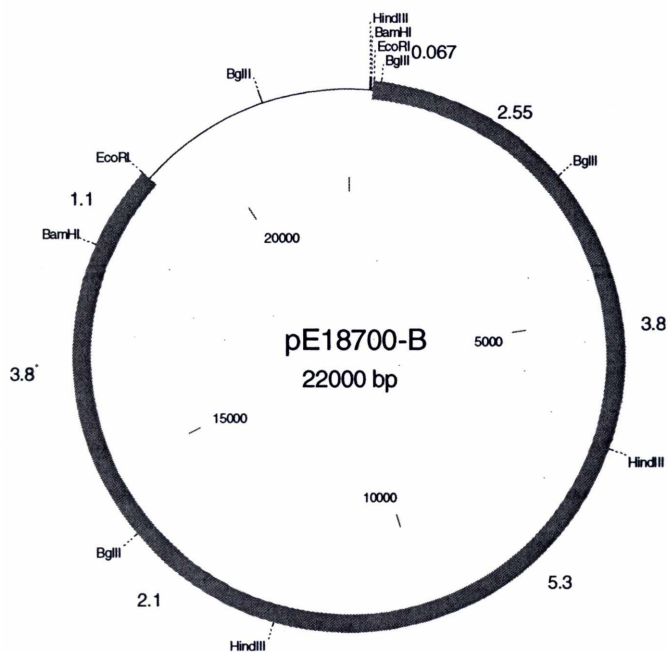


Figura 5.5. Mapa de restricción del plásmido EcoRI 49 (fragmento EcoRI B).

Fragmento EcoRI C (14,6 kpb), clon EcoRI 28

| DNA | Clon EcoRI 28 Frg. C (14,6 kpb) ^a | | | | | | | | | | | | | | λ |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|---|
| Enzima | | | | | | | | | | | | | | | |
| EcoRI | | | | | | | | | | | | | | | |
| BamHI | | | | | | | | | | | | | | | |
| HindIII | | | | | | | | | | | | | | | |
| BglII | | | | | | | | | | | | | | | |
| Calle | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | |

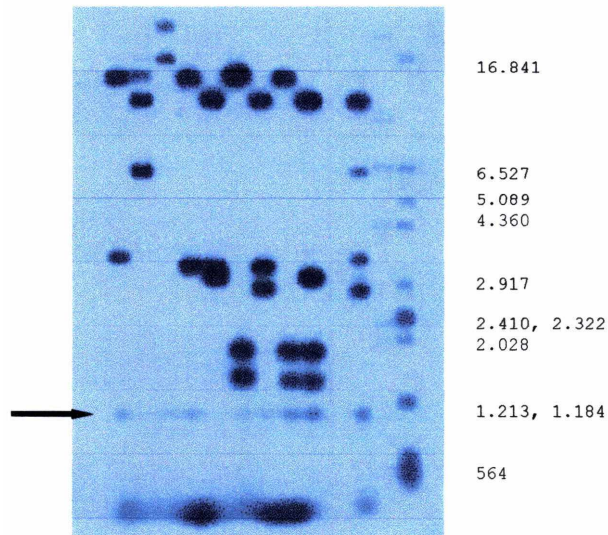


Figura 5.6. Autorradiografía de los productos de digestión del clon EcoRI 28 marcados con $[\alpha^{32}\text{P}]$ dATP por *fill in* y resueltos en gel de agarosa 0,5%. En la tabla ubicada encima de las autorradiografías se indican las enzimas utilizadas para generar los fragmentos resueltos en cada calle del gel. A la derecha de la figura se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, λ, BamHI, BglII y HindIII (en pb).^a La asignación del tamaño del fragmento varió entre 14,4 y 14,3 kpb. Con una flecha se indica una de las bandas de DNA "fantasma" que presentó este plásmido. Nota: el genoma de este clon digerido con EcoRI + BamHI + HindIII + BglII (calle 12) presentó digestión parcial.

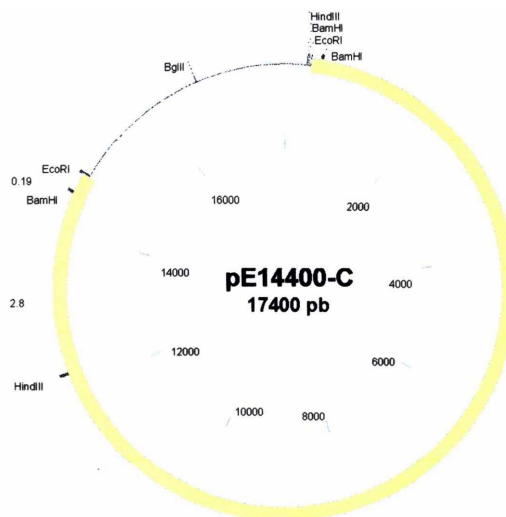


Figura 5.7. Mapa de restricción del plásmido EcoRI 28 (fragmento EcoRI C).

Fragmento EcoRI D (14,4 kpb), clon EcoRI 3 old

| DNA | Clon EcoRI 3 old Frg. D (14,4 kpb) | | | | | | | | | | | | | λ | | |
|---------------|---------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|-----------|---|---|
| Enzima | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EcoRI | ■ | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | |
| BamHI | | ■ | | | ■ | | | | | | | | | | ■ | ■ |
| HindIII | | | ■ | | ■ | | | | | | | | | | ■ | ■ |
| BglII | | | | ■ | | | | | | | | | | | ■ | ■ |
| Calle | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | | | |

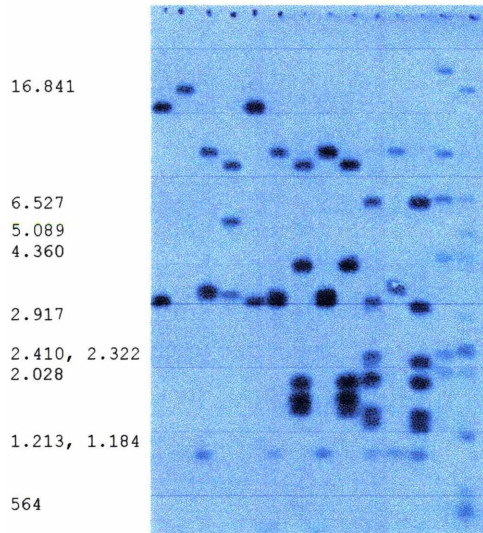


Figura 5.8. Autorradiografía de los productos de digestión del clon EcoRI 3 old marcados con $[\alpha^{32}\text{P}]$ dATP por *fill in* y resueltos en gel de agarosa 0,5%. En la tabla ubicada encima de las autorradiografías se indican las enzimas utilizadas para generar los fragmentos resueltos en cada calle del gel. A la derecha de la figura se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, λ BamHI, BglII y HindIII (en pb).

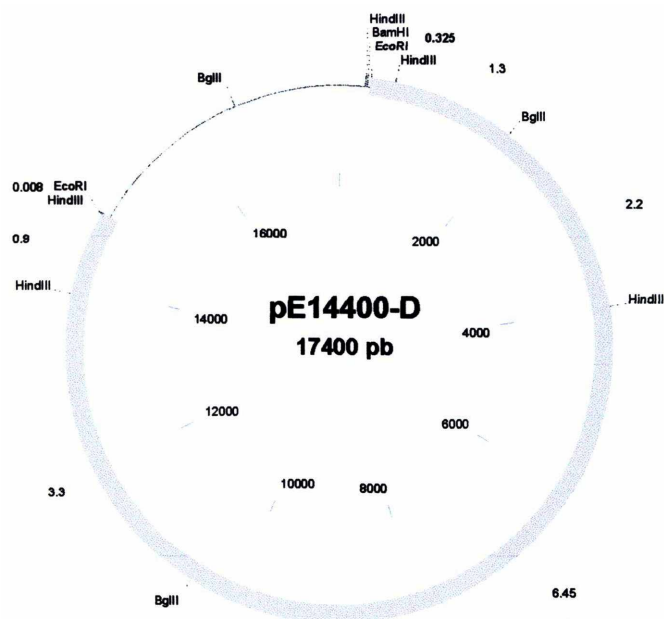


Figura 5.9. Mapa de restricción del plásmido EcoRI 3 old (fragmento EcoRI D).

Fragmento EcoRI E (14,3 kpb), clon EcoRI 5N

| DNA | Clon EcoRI 5N Frg. E (14,3 kpb) ^a | | | | | | | | | | | | | | | λ | |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|---|---|
| Enzima | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EcoRI | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BamHI | | ■ | | | ■ | | | | | ■ | | | | | ■ | | |
| HindIII | | | ■ | | | ■ | | | ■ | | | ■ | | | ■ | | |
| BglII | | | | ■ | | | | ■ | | | | ■ | | | | | |
| XhoI | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ |
| Calle | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | | |

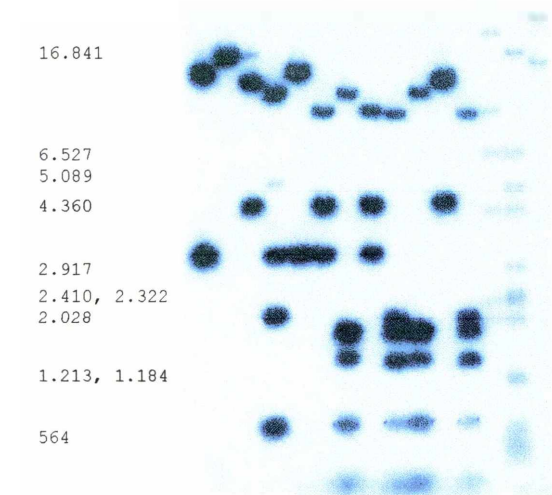


Figura 5.10. Autorradiografía de los productos de digestión del clon EcoRI 5N marcados con $[\alpha^{32}\text{P}]$ dATP por *fill in* y resueltos en gel de agarosa 0,5%. En la tabla ubicada encima de las autorradiografías se indican las enzimas utilizadas para generar los fragmentos resueltos en cada calle del gel. A la derecha de la figura se indican los tamaños de los fragmentos del MPM λ BamHI, BglII y HindIII (en pb).^a La asignación del tamaño del fragmento varió entre 14,4 y 14,3 kpb. Nota: el DNA digerido con HindIII presentó digestión parcial (calle 10).

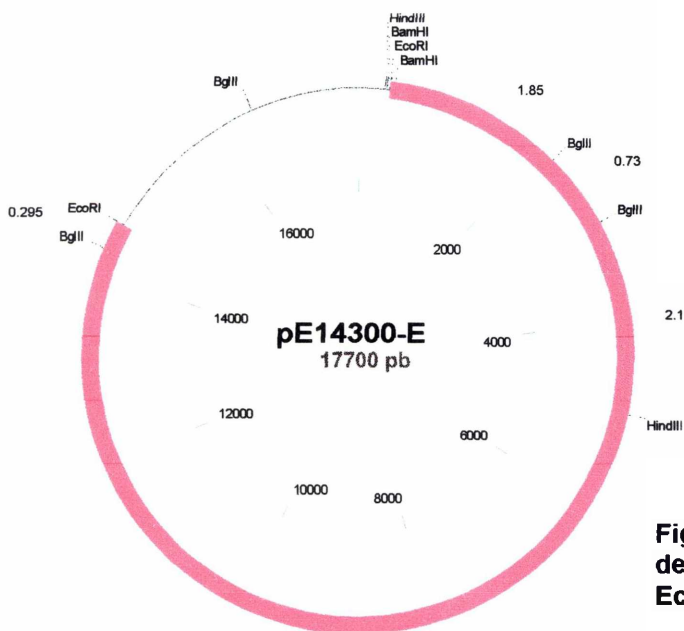


Figura 5.11. Mapa de restricción del plásmido EcoRI 5N (fragmento EcoRI E).

Fragmento EcoRI G (10,85 kpb), clon EcoRI 5G

| DNA | Clon EcoRI 5G Frg. G (10,85 kpb) | | | | | | | | | | | | | λ | |
|---------|-------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|--|
| Enzima | | | | | | | | | | | | | | | |
| EcoRI | ■ | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| BamHI | | ■ | | | ■ | | | ■ | | | ■ | | | ■ | |
| HindIII | | | ■ | | | ■ | | | ■ | | | ■ | | ■ | |
| BglII | | | | | | | | ■ | | | ■ | | | ■ | |
| Calle | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | |

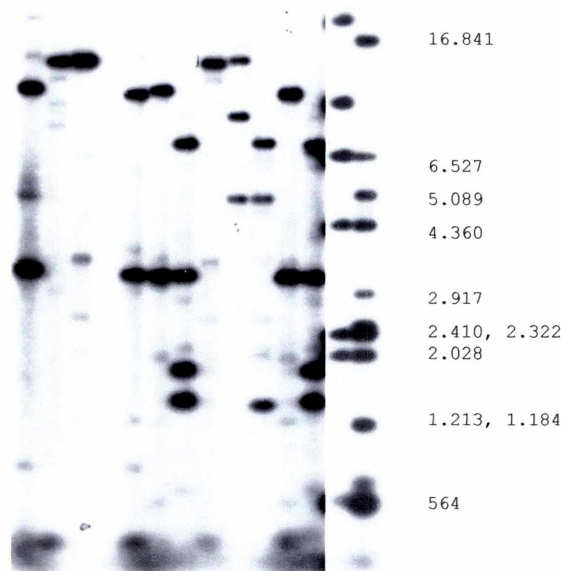


Figura 5.12. Autorradiografía de los productos de digestión del clon EcoRI 5G marcados con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP por *fill in* y resueltos en gel de agarosa 0,5%. En la tabla ubicada encima de las autorradiografías se indican las enzimas utilizadas para generar los fragmentos resueltos en cada calle del gel. A la derecha de la figura se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, λ BamHI, BglII y HindIII (en pb).

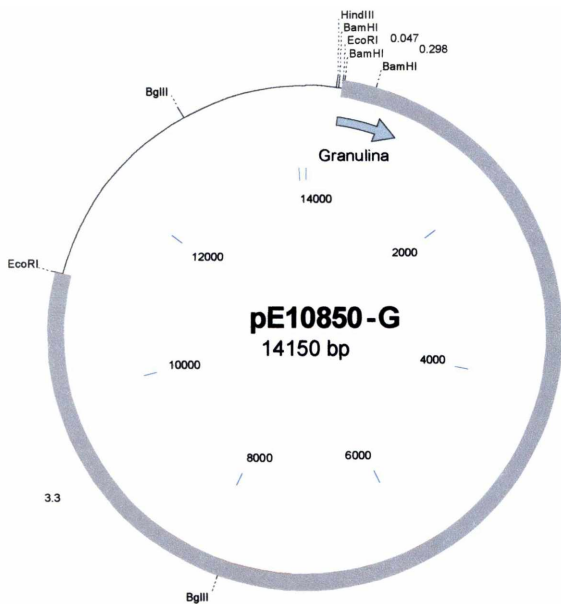


Figura 5.13. Mapa de restricción del plásmido EcoRI 5G (fragmento EcoRI G).

Fragmento EcoRI H (5,9 kpb), clon EcoRI 5NN

| DNA | λ | Clon EcoRI 5NN Frg. H (5,93 kpb) | | | | | | | | | | | | | | | | | | λ | p ^a | |
|---------------|---|-------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|----------------|--|
| Enzima | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EcoRI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BamHI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HindIII | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BglII | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hinfi | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Calle | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | | | |

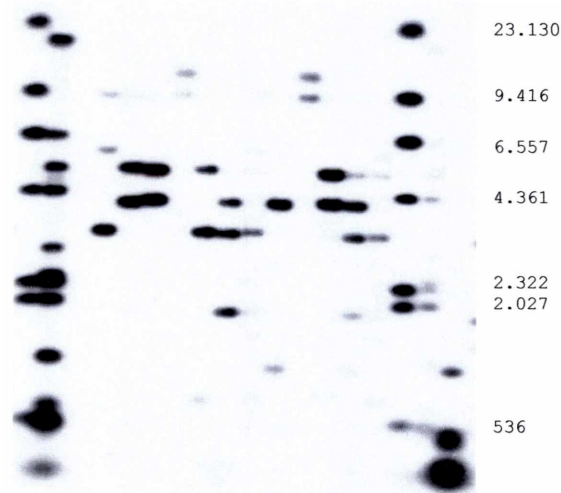


Figura 5.14. Autorradiografía de los productos de digestión del clon EcoRI 5NN marcados con $[\alpha^{32}\text{P}]$ dATP por *fill in* y resueltos en gel de agarosa 0,5%. En la tabla ubicada encima de las autorradiografías se indican las enzimas utilizadas para generar los fragmentos resueltos en cada calle del gel. A la derecha de la figura se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, λ HindIII (en pb).^a DNA del plásmido pcDNA II.

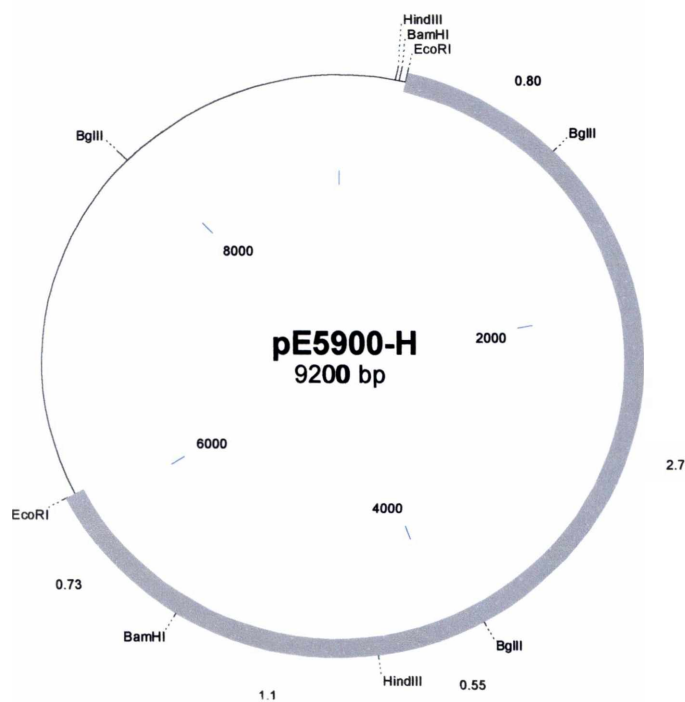


Figura 5.15. Mapa de restricción del plásmido EcoRI 5NN (fragmento EcoRI H).

Análisis de "clones espurios" EcoRI

Hemos llamado "clones espurios" a todos aquellos clones que resultaran del clonado de productos de digestiones parciales, religaciones, clones posiblemente provenientes de variantes virales minoritarias o resultado del clonado de DNAs exógenos o contaminantes. El análisis de estos clones se muestra en el capítulo 11 "Apéndices". El análisis de estos clones se muestra como un elemento más para completar el panorama del mapa y también para discutir sobre los posibles problemas que pueden plantearse al determinar un mapa de restricción. Cabe aclarar que todos estos clones habían dado señal positiva para la hibridación con el genoma de EpapGV.

Resumen de la asignación de fragmentos genómicos a clones

Luego de la descripción de los mapas de restricción de los fragmentos clonados, se incluye una tabla que resume la correspondencia entre clones y fragmentos genómicos EcoRI (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Sinonimia de nomenclaturas de fragmentos y clones EcoRI. Los fragmentos están nombrados en orden alfabético, comenzando por A para los fragmentos de mayor tamaño.

| Clones EcoRI | | |
|--------------------|--------------------------|---------------------|
| Fragmento genómico | Tamaño del inserto (kpb) | Clon representativo |
| A | 27,6^a | 8 |
| B | 18,7 | 49 |
| C | 14,6^b | 28 |
| D | 14,4^b | 3 old |
| E | 14,3^b | 5N |
| F | 13,4 | 46 |
| G | 10,85 | 5G |
| H | 5,9 | 5NN |
| I | 0,343 | 47 |

^a En negrita fragmentos clonados.

^b Si bien los fragmentos de restricción EcoRI C, D y E migraban en el gel como una única banda, algunos análisis posteriores determinaron pequeñas variaciones de tamaños entre ellos.

Análisis de la biblioteca de clones BamHI

En la determinación del mapa de restricción de los clones BamHI se empleó una estrategia de mapeo similar a la empleada para los demás clones. A partir del análisis de los perfiles de restricción de los fragmentos clonados (Figuras: 5.16 5.18, 5.19, 5.21, 5.23), se dedujeron los mapas correspondientes a cada uno de ellos (Figuras 5.17, 5.20, 5.22, y 5.24). La determinación de los mapas de restricción de los clones BamHI no presentó grandes dificultades, excepto por los fragmentos BamHI C (15,65 kpb) y BamHI E (9,5 kpb). Se muestran a continuación, a modo de ejemplo, algunos análisis referidos a la construcción de mapas de restricción. La atribución de los tamaños se resume en la tabla 5.3.

Fragmento BamHI E (9,5 kpb), clon BamHI h

La elucidación del mapa del fragmento BamHI 9,5 kpb resultó dificultosa dado que este fragmento sólo posee cortes para la enzima HindIII (3 cortes internos). El mapa del mismo se resolvió buscando una enzima distinta de las de mapeo que digiriese dentro de alguno de los fragmentos internos.

Cuando el clon BamHI h se digirió con la enzima HindIII aparecieron los siguientes fragmentos: 3,7 kpb; 2,1 kpb; 1,5 kpb y 5,5 kpb. Dado que al digerir el clon con las enzimas BamHI y HindIII aparecían fragmentos de 3,7 kpb; 3,3 kpb (pZErO-2TM); 2,2 kpb; 2,1 kpb y 1,5 kpb (Fig. 5.18A), dos de ellos debían pertenecer a cortes internos HindIII y los estantes tendrían extremos HindIII-BamHI. Los fragmentos internos (HindIII-HindIII) fueron atribuidos a 2,1 kpb 3,7 kpb por su correspondencia con los cortes del DNA genómico de manera simple con la enzima HindIII (Fig. 5.20). En tanto que los fragmentos de 2,2 kpb y 1,5 kpb se atribuyeron a cortes BamHI-HindIII y su pertenencia se confirmó por experimentos de doble digestión de DNA viral con las enzimas mencionadas. Inicialmente se definió la polaridad de los fragmentos HindIII-BamHI, en particular el fragmento de 1,5 kpb debía provenir de un corte entre un sitio HindIII del inserto y otro sitio del *polylinker* del vector. En tanto que el fragmento de 5,5 kpb se dividía en dos al efectuarse la digestión HindIII-BamHI, dando una banda de 3,3 kpb perteneciente al vector y otra de 2,2 kpb perteneciente a un corte BamHI-HindIII (Fig. 5.19). Con los experimentos de doble digestión se logró ubicar a los fragmentos BamHI-HindIII en los extremos del plásmido; 1,5 kpb hacia el lado del *polylinker* que contenía el sitio HindIII y 2,2 kpb hacia el lado del *polylinker* que contenía el sitio EcoRI. Restaba aún por determinar el ordenamiento de los fragmentos

de 3,7 kpb y 2,1 kpb. Para ello, se buscaron enzimas que cortaran en el *polylinker* y en los fragmentos a ordenar sin una alta multiplicidad de corte. De las enzimas empleadas (XbaI, Kpn I, SacI y PstI) sólo PstI cumplió los requisitos (Fig. 5.18B). A partir de digestiones combinadas con PstI se resolvió el orden de los fragmentos internos (Fig. 5.19 y 5.20).

Fragmento BamHI G (3,0 kpb), clon BamHI d

El fragmento de BamHI G de 3,0 kpb fue digerido con las enzimas de rutina. La figura 5.23 muestra la ausencia de cortes para las enzimas empleadas (excepto HindIII). Estas evidencias se correspondieron con los resultados de las dobles digestiones de DNA genómico, en las cuales el fragmento BamHI G no modificó su movilidad relativa en ninguna de las dobles digestiones. A fin de descartar la presencia de un sitio de restricción cercano a los sitios HindIII, se analizaron las secuencias de los extremos del fragmento. Las mismas confirmaron la ausencia de sitios restricción para las enzimas analizadas. El mapa de ese fragmento se muestra en la figura 5.24.

Digestiones y mapas de restricción de clones BamHI

Fragmento BamHI C (15,65 kpb), clon BamHI i

| DNA | λ | Clon BamHI i Frg. C (15,65 kpb) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | λ | |
|---------|---|------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|
| Enzima | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EcoRI | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BamHI | | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HindIII | | ■ | | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BglII | | ■ | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Calle | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | |

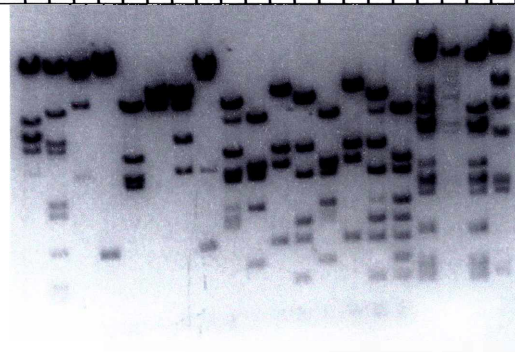


Figura 5.16. Productos de digestión del clon BamHI C teñidos con bromuro de etidio y resueltos en gel de agarosa 0,5%. En la tabla ubicada encima de las autorradiografías se indican las enzimas utilizadas para generar los fragmentos resueltos en cada calle del gel. A la derecha de la figura se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, DNA del fago λ digerido con HindIII (en pb). Nota: el DNA del fago λ digerido con las enzimas BamHI, HindIII y BglII de las calles 17, 18 y 19, presentó digestión parcial.

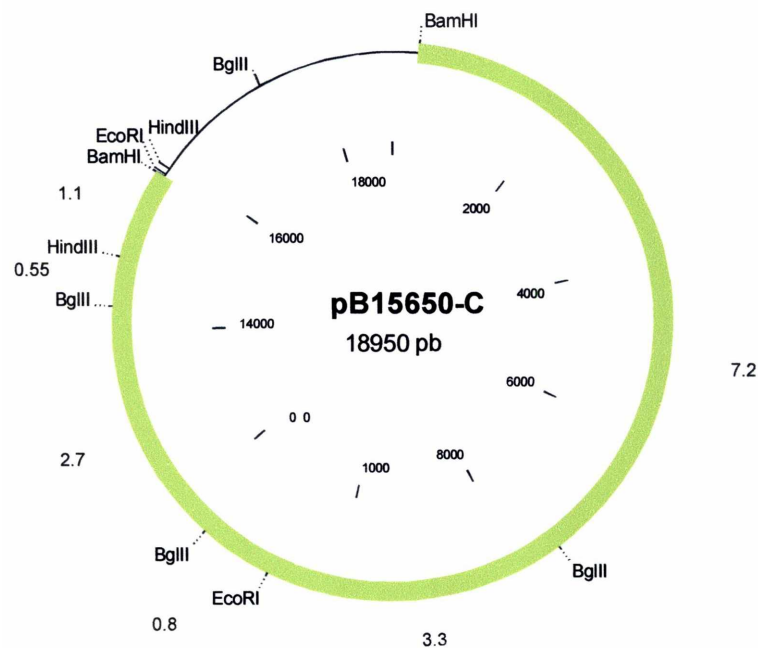


Figura 5.17. Mapa de restricción del plásmido BamHI i (fragmento BamHI C).

Fragmento BamHI E (9,5 kpb), clon BamHI h

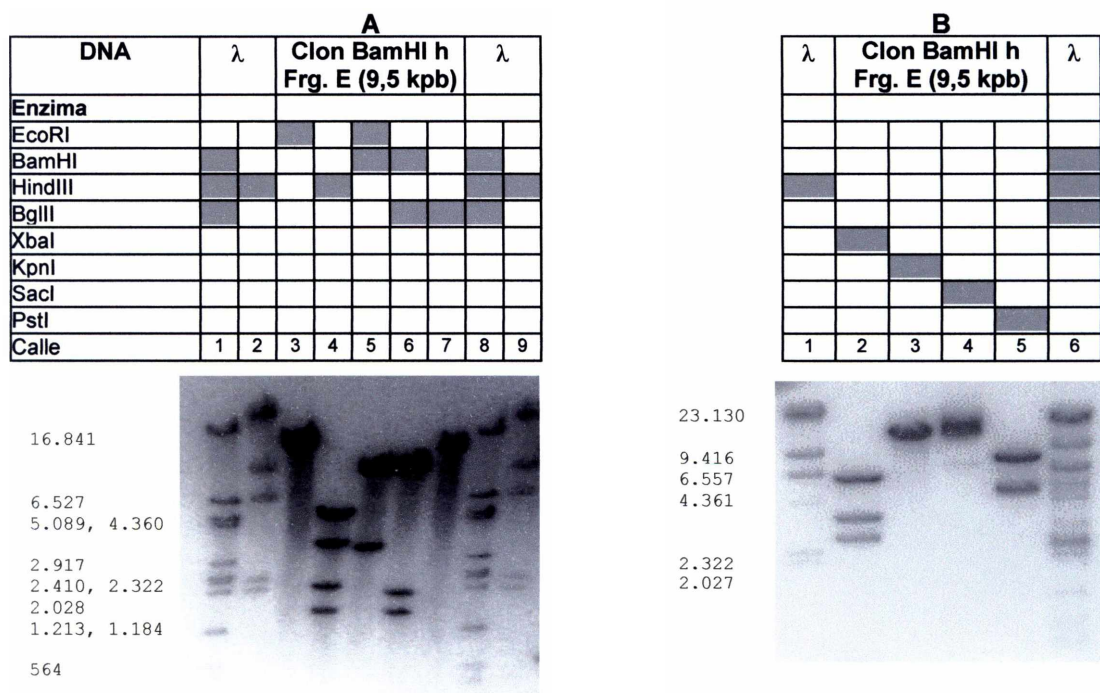


Figura 5.18. Productos de digestión del fragmento clonado BamHI E (9,5 kpb) teñidos con bromuro de etidio y resueltos en gel de agarosa 0,5%. En la tabla ubicada encima de las autorradiografías se indican las enzimas utilizadas para generar los fragmentos resueltos en cada calle del gel. A la izquierda de la figura A se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, DNA del fago λ digerido con BamHI, BglII y HindIII (en pb) y a la izquierda de la figura B se muestra los tamaños del MPM DNA del fago λ, digerido con HindIII. Nota: el DNA de la calle 6 A, presentó digestión parcial.

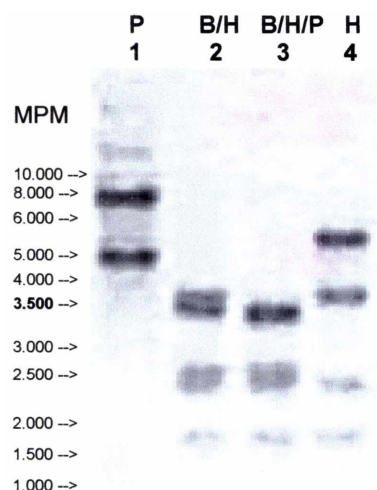


Figura 5.19. Productos de digestión del fragmento clon BamHI h, fragmento BamHI E en gel de agarosa 0,7%, teñidos con bromuro de etidio. Calle 1, PstI; calle 2, BamHI y HindIII; calle 3, BamHI, HindIII y PstI; calle 4, HindIII. A la izquierda de la figura se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, "1 kb" (Promega).

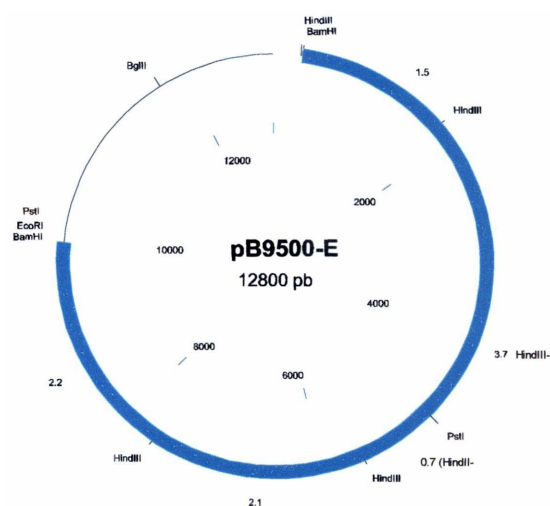


Figura 5.20. Mapa de restricción del plásmido BamHI h (fragmento BamHI E).

Fragmento BamHI F (6,83kpb), clon BamHI g

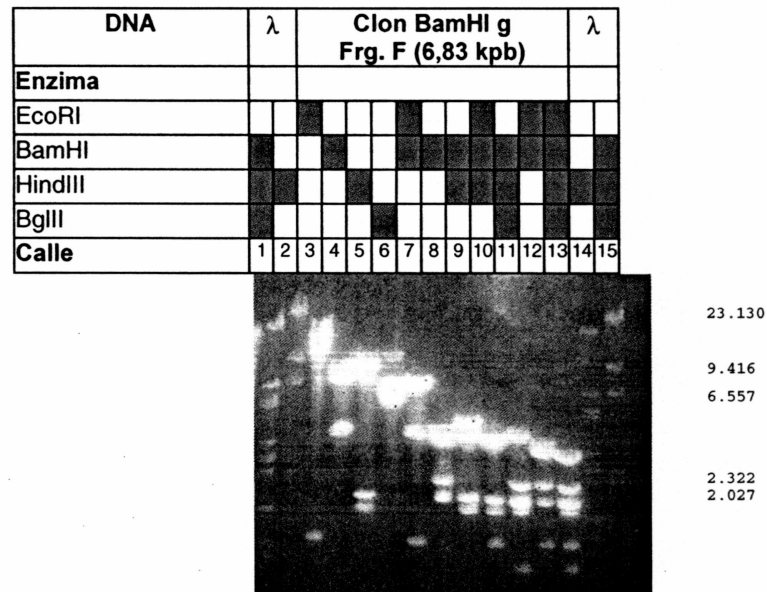


Figura 5.21. Productos de digestión del clon BamHI g teñidos con bromuro de etidio y resueltos en gel de agarosa 0,5%. En la tabla ubicada encima de las autorradiografías se indican las enzimas utilizadas para generar los fragmentos resueltos en cada calle del gel. A la derecha de la figura se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, DNA del fago λ digerido con HindIII.

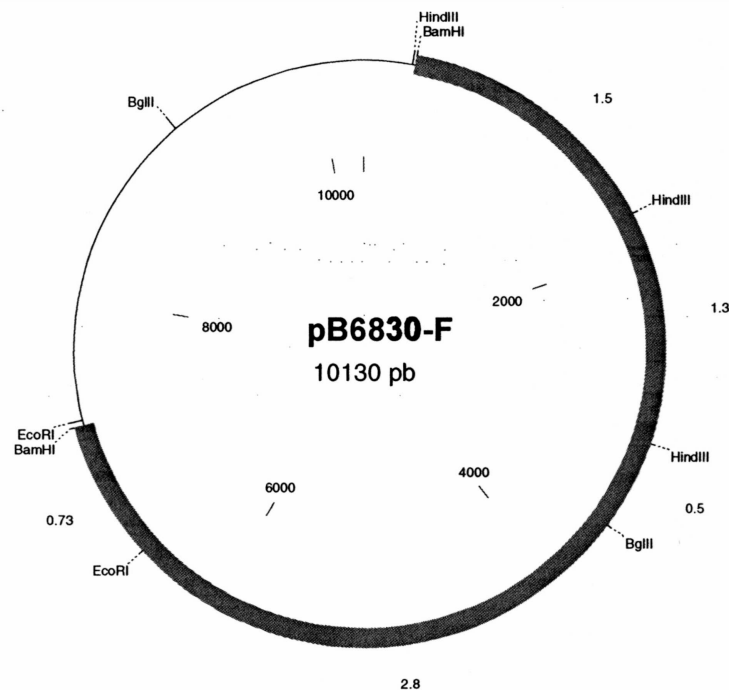


Figura 5.22. Mapa de restricción del plásmido BamHI g (fragmento BamHI F).

Fragmento BamHI G (3,0 kpb), clon BamHI d

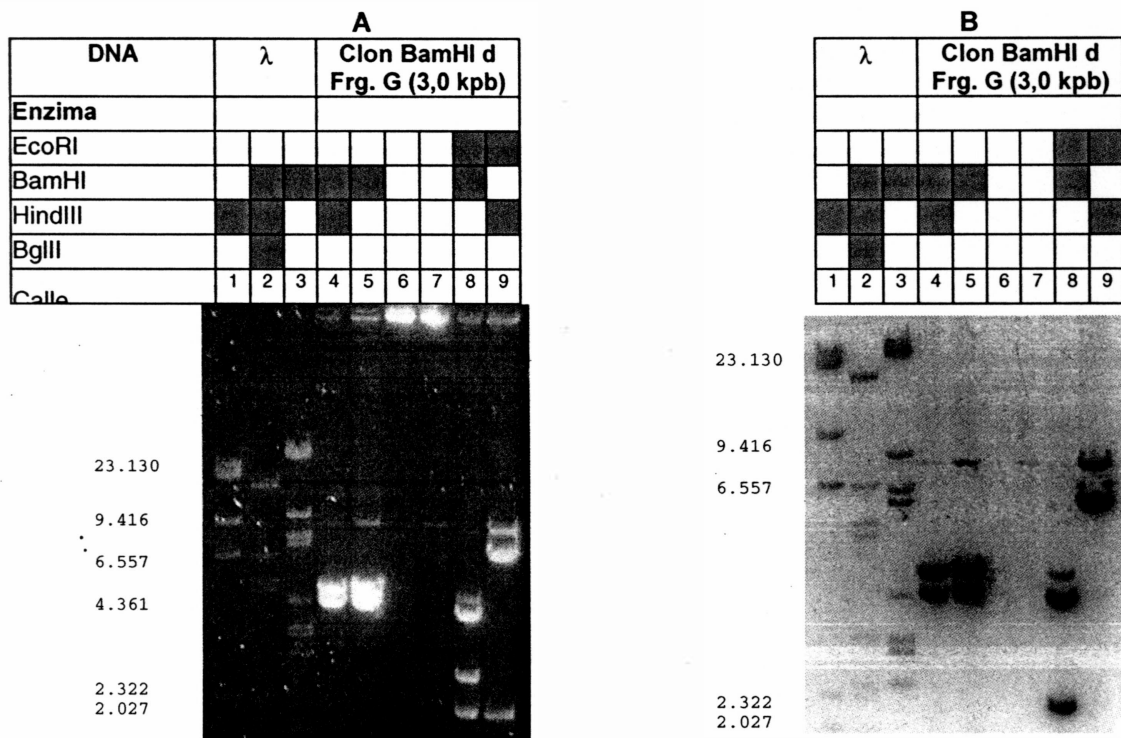


Figura 5.23. Productos de digestión del clon BamHI d (Frg. BamHI G) teñidos con bromuro de etidio y resueltos en gel de agarosa 0,5% (A). En la figura B se muestra el mismo gel, pero más resuelto. En la tabla ubicada encima de las autorradiografías se indican las enzimas utilizadas para generar los fragmentos resueltos en cada calle del gel. A la izquierda de ambas figuras se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, DNA del fago λ digerido con HindIII. Nota: el fragmento digerido con HindIII y EcoRI presentó digestión parcial (calle 9).

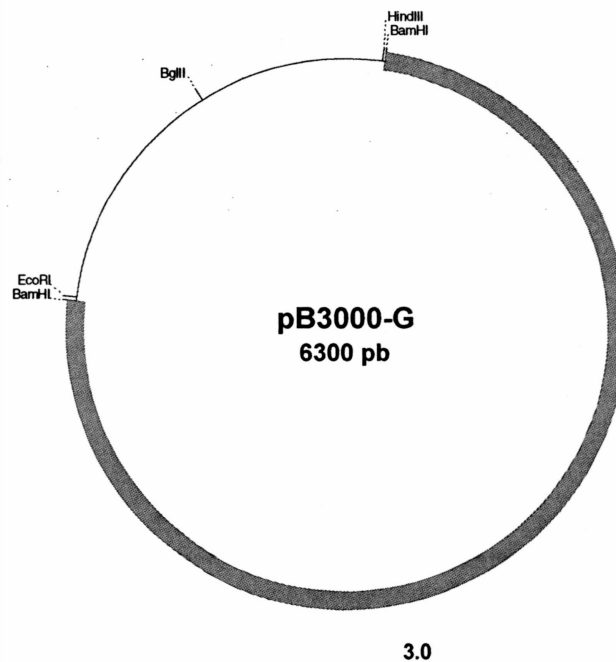


Figura 5.24. Mapa de restricción del plásmido BamHI d (fragmento BamHI G).

Aclaración: El tamaño del inserto en relación con el vector no se encuentra a escala.

Resumen de la asignación de fragmentos genómicos a clones BamHI

La tabla 5.3 resume los tamaños de los fragmentos genómicos BamHI y los clones representativos.

Tabla 5.3. Sinonimia de nomenclaturas de fragmentos y clones BamHI. Los fragmentos están nombrados en orden alfabético, comenzando por A para los fragmentos de mayor tamaño.

| Clones BamHI | | |
|--------------------|--------------------------|---------------------|
| Fragmento genómico | Tamaño del inserto (kpb) | Clon representativo |
| A | 43,51 | - |
| B | 25,6 | - |
| C | 15,65^a | i |
| D | 14,2 | - |
| E | 9,5 | h |
| F | 6,83 | g |
| G | 3,0 | d |
| H | 1,3 | - |
| I | 0,298 | a |
| J | 0,084 | - |

^a En negrita se indican los fragmentos clonados.

Análisis de la biblioteca de clones HindIII

Estrategia general

Se aprovechó la existencia de fragmentos HindIII clonados, para corroborar algunas regiones del mapa de restricción. Un primer análisis precisó el peso molecular de estos fragmentos y permitió identificar clones con más de un inserto (Fig. 5.25). Posteriormente, algunos de ellos fueron redigeridos con otras enzimas, obteniéndose así sus mapas de restricción (Figuras 5.26, 5.27 y 5.28, y Tablas 5.4 y 5.5). Asimismo el clon HindIII G fue ubicado en el genoma de EpapGV por hibridación, utilizando como sonda el clon EcoRI B de 18,7 kpb (dato no mostrado). La atribución final de tamaños y de correspondencia con fragmentos genómicos se resumen en las tablas 5.4 y 5.5. Los clones HindIII espurios se analizan en el capítulo 11 "Apéndices".

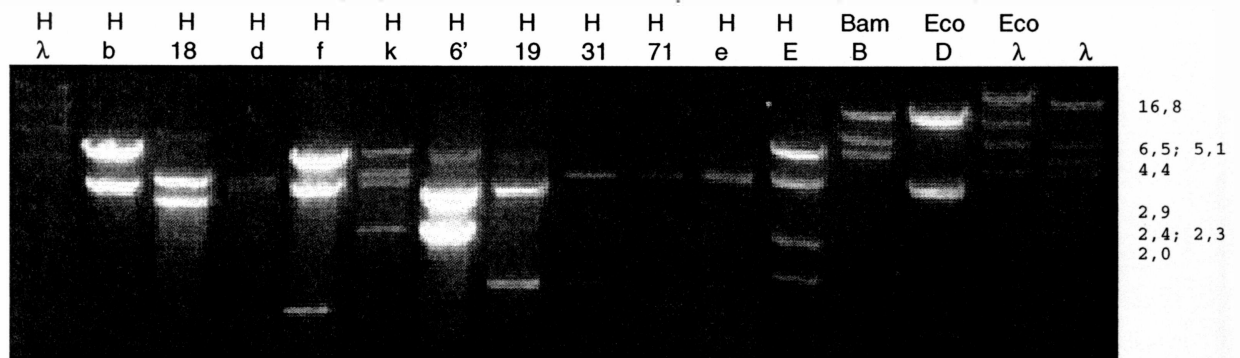


Figura 5.25. Gel de agarosa 0,7% con clones HindIII digeridos con la enzima HindIII. Calle 1, DNA del fago λ digerido con HindIII; calles 2 a 14, clones HindIII digeridos con HindIII; calle 2, HindIII b; calle 3, HindIII 18; calle 4, HindIII d; calle 5, HindIII f; calle 6, HindIII k; calle 7, HindIII 6'; calle 8, HindIII 19; calle 9, HindIII 31; calle 10, HindIII 71; calle 11, HindIII e; calle 12, BamHI E; calle 13, EcoRI B; calle 14, EcoRI D; calle 15, DNA del fago λ digerido con HindIII; calle 16, DNA del fago λ digerido con BamHI, HindIII y BgIII (Los números o letras a continuación del nombre de la enzima de restricción corresponden a las denominaciones de los clones en las tablas 5.4, 5.5 y 5.6). Por sobre el número o nombre del clon se encuentra la enzima de clonado del mismo (H, HindIII y Eco, EcoRI). A la derecha de la figura se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, DNA del fago λ digerido con BamHI, BgIII y HindIII (en kpb).

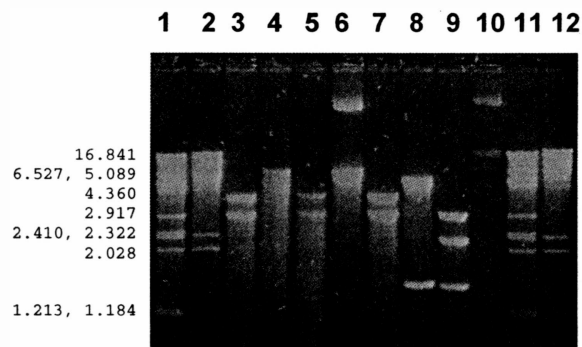


Figura 5.26. Perfil de digestión del clon HindIII 23 (fragmento genómico HindIII I) digerido con distintas enzimas de restricción y eluido en gel de agarosa 0,7%. Calles 1 y 11 DNA del fago λ digerido con las enzimas HindIII, BamHI y BgIII; calle 2 y 12, DNA del fago λ digerido con HindIII. Calles 3-10, clon BgIII 23 digerido con distintas enzimas de restricción; calle 3, HindIII; calle 4, EcoRI; calle 5, HindIII y EcoRI; calle 6, BgIII; calle 7, HindIII y BgIII; calle 8, BamHI; calle 9, HindIII y BamHI; calle 10, plásmido no digerido. A la izquierda de la figura se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, DNA del fago λ digerido con BamHI, BgIII y HindIII (en pb).

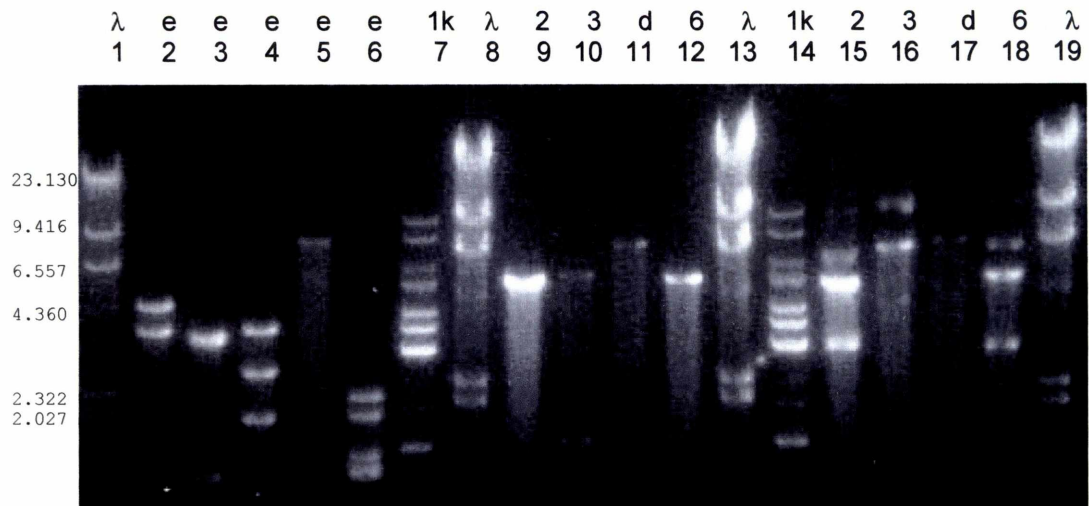


Figura 5.27. Productos de digestión de clones HindIII en gel de agarosa 0,7%. Calles 1, 8, 13 y 19 DNA del fago λ digerido con HindIII. Calles 7 y 14 MPM de 1000 pb ("1 kb DNA ladder"). Calle 2, clon HindIII e digerido con BglII; Calle 3, clon HindIII e, digerido con HindIII; calle 4, clon HindIII e digerido con BamHI y BglII; calle 5, clon HindIII e, digerido con BamHI; calle 6, clon HindIII e, digerido con HindIII y BglII. Calles 9, 10, 11 y 12, clones HindIII 2, 3, d y 6 digeridos con BamHI. Calles 15, 16, 17 y 18, clones HindIII 2, 3, d y 6 digeridos con BglII. Los números o letras a continuación del nombre de la enzima de restricción corresponden a las denominaciones de los clones en las tablas 5.4 y 5.5.



Figura 5.28. Mapas de restricción de clones HindIII. (A), clones con un solo inserto. (B), clones producto de religaciones. Se indican los nombres de los fragmentos genómicos y en caso de clones con más de un inserto se indica el nombre del clon por debajo de su mapa. Además para estos últimos, se indica la polaridad de los extremos de los insertos con una i o una d. Esta posición es relativa al punto cero del mapa (gen de granulina) para un mapa lineal. La i refiere al extremo más próximo a granulina y d, al extremo más alejado. Un análisis más pormenorizado de los clones religantes se ofrece en el capítulo 11.

Tabla 5.4. Resumen de la ubicación de los clones HindIII en el mapa de restricción.

| Fragmento genómico | Tamaño del inserto (en kpb) | Clon representativo | Clones análogos | Vector de clonado ^a | Sitios de restricción | | | Método de ubicación ^b |
|--------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------------|-------|-------|----------------------------------|
| | | | | | EcoRI | BamHI | BglII | |
| G | 5,3 | b | | pZ | - | - | - | H, D, A |
| I | 3,7 | 3 | 18 | pB | - | + | - | D, A |
| J | 3,7 | d | | pZ | - | - | - | D, A |
| L | 2,1 | 2 | 6 | pB | - | - | - | D, A |
| L | 2,1 | 6 | | pB | - | - | - | D, A |
| L | 2,1 | 6' | | pB | - | - | - | D, A |
| M | 1,3 | 19 | | pB | - | - | - | D, A |
| M | 1,3 | 31 | | pZ | - | - | - | D, A |
| M | 1,3 | 71 | | pZ | - | - | - | D, A |

^a Vector de clonado del clon representativo (pZ, pZErO-2TM; pB, pBluescript).

^b H, hibridación; D, digestiones; A, alineamiento.

Tabla 5.5. Sinonimia de nomenclaturas de fragmentos y clones HindIII. Los fragmentos están nombrados en orden alfabético, comenzando por A, para el fragmento de mayor tamaño.

| Clones HindIII | | |
|--------------------|--------------------------|-------------|
| Fragmento genómico | Tamaño del inserto (kpb) | Clones |
| A | 23,75 | |
| B | 19,8 | |
| C | 19,58 | |
| D | 11,4 | |
| E | 10,1 | |
| F | 9,8 | |
| G | 5,3^a | b |
| H | 5,13 | k |
| I | 3,7 | 3 y 18 |
| J | 3,7 | d |
| K | 3,5 | e |
| L | 2,1 | 2, 6 y 6' |
| M | 1,3 | 19, 31 y 71 |
| N | 0,9 | f |

^a En negrita fragmentos clonados.

Análisis de la biblioteca de clones BgIII

Caracterización preliminar de clones BgIII

Con el objeto de completar el análisis del mapeo del genoma de EpapGV, se han analizado los perfiles de restricción de clones BgIII y los resultados de la hibridación de DNA genómico de EpapGV con estos clones digeridos⁴. Los datos que se muestran en las dos secciones siguientes no fueron generados por el autor de la presente tesis. Se partió de clones BgIII correspondientes a fragmentos genómicos, que habían sido digeridos con la enzima BgIII para detectar la presencia de más de un inserto. Dado que estos fragmentos BgIII habían sido ligados al vector (pZErO-2TM) digerido con BamHI, se generaba un sitio híbrido BamHI-BgIII no digerible con ninguna de estas enzimas. Sin embargo, se aprovechó la presencia de un sitio BgIII alejado del *polylinker* para digerir el plásmido. Si el producto de la digestión presentaba una única banda (plásmido linealizado), era indicativo que el clon poseía sólo un inserto BgIII-BgIII, mientras que si se habían clonado dos o más fragmentos BgIII, debía aparecer más de una banda en el gel. De los 22 clones analizados (Fig. 5.29), cuatro de ellos poseían más de un inserto; estos eran los clones BgIII **18**, **43**, **24** y **68**. Los clones 18 y 68 poseen dos insertos BgIII clonados, en tanto que los clones BgIII 43 y 24 poseerían tres fragmentos clonados en pZErO-2TM.

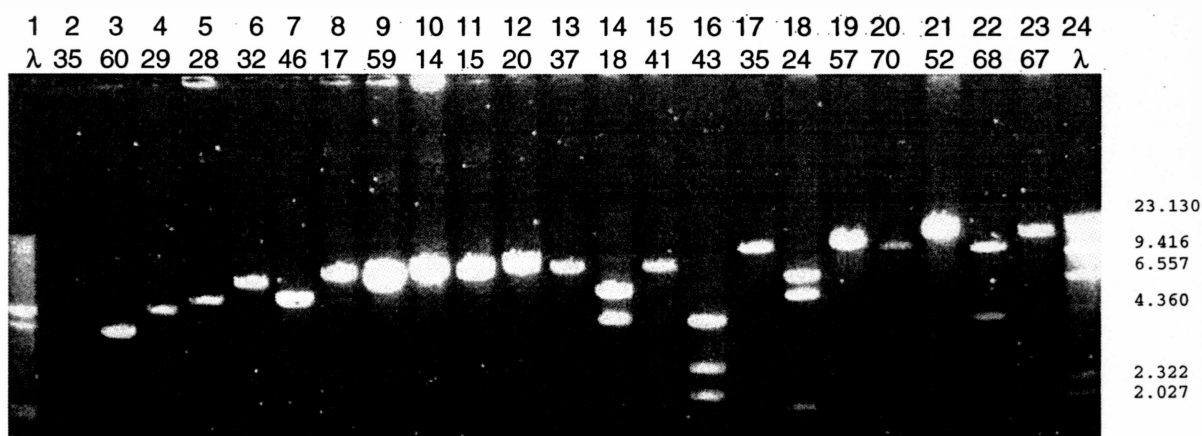


Figura 5.29. Clones BgIII digeridos con la enzima BgIII. Calle1, MPM DNA del fago λ digerido con Accl; calles 2 a 23, clones BgIII digeridos con la enzima BgIII. El número de los clones se aprecia en la parte superior de la figura. A la derecha de la figura se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, DNA del fago λ digerido con HindIII (en pb).

⁴ Estas digestiones fueron realizadas por Alejandra Manzán.

De forma adicional, los clones BgIII (digeridos tal como se muestra en la figura 5.29) se hibridaron con el DNA genómico de EpapGV marcado con [α 32 P] dATP por *fill in*. Todos los clones presentaron hibridación positiva, verificando así que se trataba de clones del genoma viral, excepto por la banda de 2,0 kpb del clon BgIII 43.

Empleo de los perfiles de restricción de los clones BgIII para confirmar los mapas de otros fragmentos clonados

Los clones BgIII fueron empleados para alinear de forma contigua clones EcoRI o como elementos confirmatorios de los mapas de restricción de los clones EcoRI y BamHI. Para ello, se analizó el perfil de digestión los fragmentos clonados BgIII, que habían sido digeridos con enzimas de restricción flanqueantes al inserto (EcoRI, HindIII), generando un patrón característico (Fig. 5.30)⁵. Estos patrones de digestión resultaron de utilidad para ubicar los fragmentos BgIII clonados dentro de los mapas EcoRI, cuyos mapas se conocían previamente y para confirmar su identidad. Los clones BgIII 18, 24 y 43 se analizan posteriormente.

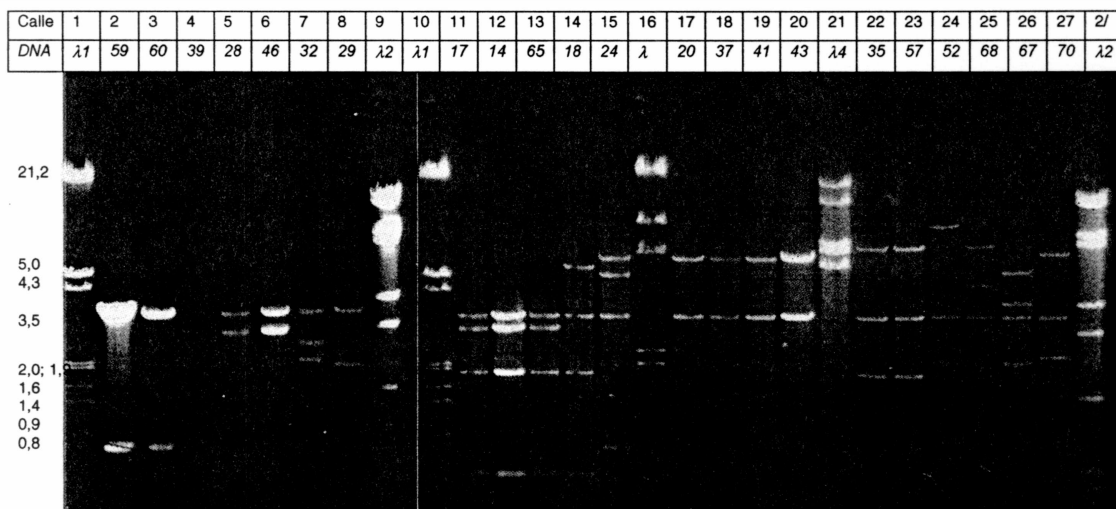


Figura 5.30. Clones BgIII digeridos con EcoRI y HindIII (enzimas flanqueantes del *polylinker*). Calles 1, 9, 10, 16, 21 y 28, marcadores de peso molecular: λ 1, DNA del fago λ digerido con EcoRI y HindIII; λ 2, DNA del fago λ digerido con Acc I; λ 3, DNA del fago λ digerido con HindIII; λ 4, DNA del fago λ digerido con BamHI. Calles 2 a 8, 11 a 15, 17 a 20 y 22 a 27, clones BgIII digeridos con las enzimas EcoRI y HindIII. El número correspondiente a cada clon se aprecia en la tabla superior. A la izquierda de la figura se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, DNA del fago λ digerido con EcoRI y HindIII (en kpb).

⁵ Estas digestiones fueron realizadas por Alejandra Manzán.

Resolución del tamaño e identidad de los clones que contienen a los fragmentos BgIII D, E, F y G

Pese a poseer perfiles de restricción característicos, la determinación del tamaño de algunos fragmentos BgIII clonados resultó dificultosa. Para ejemplificar, la sumatoria de los perfiles de restricción de los clones BgIII 35 y BgIII 70 daba pesos muy similares y una situación idéntica acontecía entre los fragmentos BgIII 67 y BgIII 52. Para definir el tamaño de los clones y por ende su correspondencia con fragmentos genómicos, se aprovechó la presencia de la enzima BgIII para linealizar el plásmido (tal como se explicó previamente), para luego resolver esta digestión en gel de agarosa. La digestión de los plásmidos recombinantes BgIII 35 y BgIII 70 (Fig. 5.31), permitió establecer que BgIII 35 tenía un inserto de mayor tamaño que BgIII 70. También se determinó que el clon 67 tenía un tamaño mayor que el clon 52 (digestiones no mostradas). A partir de estos resultados se atribuyeron las identidades de los clones a los fragmentos genómicos (Tabla 5.6). Posteriormente, la confirmación de la ubicación y correspondencia del clon BgIII 67 (Frg. BgIII E, 11,2 kpb) se obtuvo por hibridación de la sonda EcoRI B 18,7 kpb (clon 49) con todos los clones BgIII (dato no mostrado).

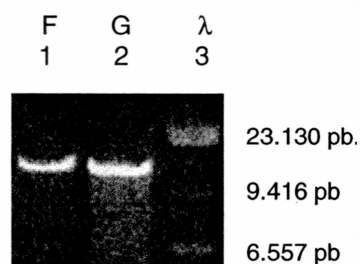


Figura 5.31. Gel de agarosa 0,7% con los productos de la digestión de clones BgIII. Calle 1, DNA del fragmento clonado BgIII F (clon BgIII 57) digerido con BgIII; calle 2, DNA del fragmento clonado BgIII G (clon BgIII 70) digerido con BgIII; calle 3, DNA del fago λ digerido con HindIII. Hacia la derecha se aprecia el tamaño de los fragmentos de restricción del MPM, (calle 3).

Tabla 5.6. Atribución de tamaño e identidad a fragmentos BgIII clonados

| Fragmento genómico | Tamaño del inserto (kpb) | Clon testigo |
|--------------------|--------------------------|--------------|
| D | 11,5 | 67 |
| E | 11,2 | 52 |
| F | 9,4 | 35 |
| G | 8,7 | 70 |

Ubicación de los fragmentos BgIII K (2,7 kpb) y L (2,6 kpb) en fragmentos EcoRI

De acuerdo con datos anteriores, se había determinado que los clones BgIII 46 y 28 presentaban un inserto de 2,7-2,6 kpb. Además, se había establecido que el clon BgIII 68 contenía el fragmento BgIII F de 9,4 kpb (Fig. 5.29 y 5.30) ligado con otro fragmento de tamaño similar al inserto de los clones BgIII 46 y 28 (Fig. 5.30). También se había determinado que los fragmentos genómicos EcoRI B y EcoRI H (Fig. 5.5 y Fig. 5.15) contenían fragmentos BgIII de 2,7 y 2,6 kpb. Sin embargo, no se había precisado a correspondencia de estos fragmentos con los clones BgIII.

Para resolver el tamaño y la identidad de los fragmentos clonados se digirió DNA del clon BgIII 46 con las enzimas flanqueantes HindIII y EcoRI de manera que liberaran su inserto y se digirió el fragmento EcoRI H (clon EcoRI 5NN) con la enzima BgIII (Figura 5.32). Los resultados indicaron que el fragmento EcoRI H no contenía al fragmento BgIII L (2,6 kpb), indicando que debía portar al fragmento BgIII K de 2,7 kpb. La ubicación del fragmento BgIII L se confirmó por *Southern blot* (Tabla 5.9 y 5.11), usando al fragmento EcoRI B como sonda sobre clones BgIII. Además, se determinó la presencia de dos clones que contenían al fragmento BgIII L (clones BgIII 28 y 46). Con posterioridad se determinó que el fragmento BgIII K de 2,7 kpb estaba contenido en dentro del clon BgIII 68.

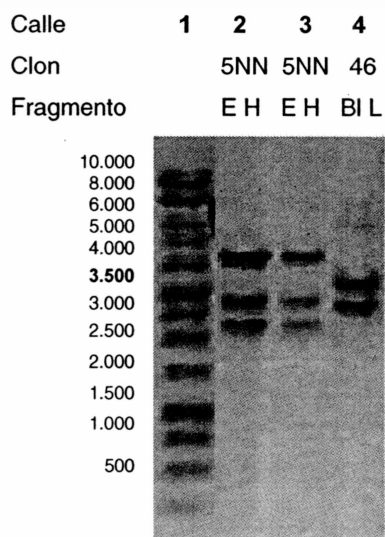


Figura 5.32. Asignación de tamaños en los fragmentos BgIII K y L por digestión de clones que los contienen [fragmento BgIII K, clon EcoRI 5NN (fragmento EcoRI H) y fragmento BgIII L, clon BgIII 46]. Calle 1, MPM "1 kb" (Promega); calle 2 y 3, dos preparaciones del clon EcoRI 5NN (Frg. H) digeridos con la enzima BgIII; calle 4, clon BgIII 46 digerido con las enzimas EcoRI y HindIII. A la derecha de la figura se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, "1 kb" (Promega), en pb.

Mapas de clones BgIII

A modo de resumen se incluye una figura que muestra los mapas de restricción de los fragmentos clonados y asignados (Fig. 5.33) y una tabla que aclara la correspondencia entre los fragmentos genómicos BgIII y sus clones (Tabla 5.7).

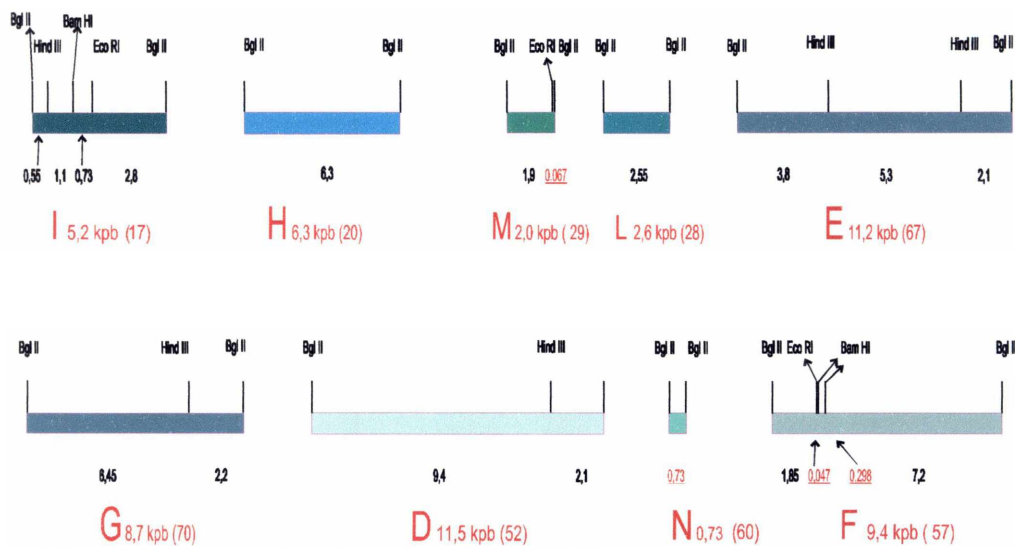


Figura 5.33. Mapas de restricción de los clones BgIII. En mayúscula, nombre y tamaño del fragmento genómico y entre paréntesis el número del clon (todos en letras rojas). Los sitios de restricción se indican en letras negras sobre la posición de los mismos y el tamaño de los fragmentos de restricción en negro y debajo de la barra que muestra la longitud del clon. Los mapas de restricción se han ordenado de acuerdo con su orientación en el genoma viral, así por ejemplo para el clon BgIII I el sitio HindIII a 0,55 kpb de BgIII se encuentra hacia el lado del punto cero del mapa (gen de granulina).

Tabla 5.7. Sinonimia de nomenclaturas de fragmentos y clones BgIII. Los fragmentos están nombrados en orden alfabético, comenzando por A para los fragmentos de mayor tamaño.

| Clones BgIII | | | |
|--------------------|--------------------------|--------------|-----------------|
| Fragmento genómico | Tamaño del inserto (kpb) | Clon testigo | Clones análogos |
| A | 23,5 | - | |
| B | 16,58 | - | |
| C | 15,65 | - | |
| D | 11,5^a | 52 | |
| E | 11,2 | 67 | |
| F | 9,4 | 57 | 35 |
| G | 8,7 | 70 | |
| H | 6,3 | 20 | 37, 41, 43 |
| I | 5,2 | 17 | 59, 14, 65 |
| J | 4,2 | - | |
| K | 2,7 | 68 | |
| L | 2,6 | 28 | 46 |
| M | 2,0 | 29 | |
| N | 0,747 | 60 | |

^a En negrita fragmentos clonados.

Determinación de las polaridades de clonado de los insertos

La determinación de la polaridad de los fragmentos clonados en relación con la ubicación del gen de granulina en el mapa lineal es de especial utilidad, en particular cuando éstos presentan marcos de lectura abiertos. Los extremos se ubicaron como i o próximos al gen de granulina, cuando éste se graficó en el mapa de restricción de forma lineal, y d en caso de estar más alejados de éste.

Por otra parte se determinó la polaridad dentro de los vectores de clonado y se indicó la misma respecto de la posición de los *primers* T7 y Sp6 (Fig. 5.34)

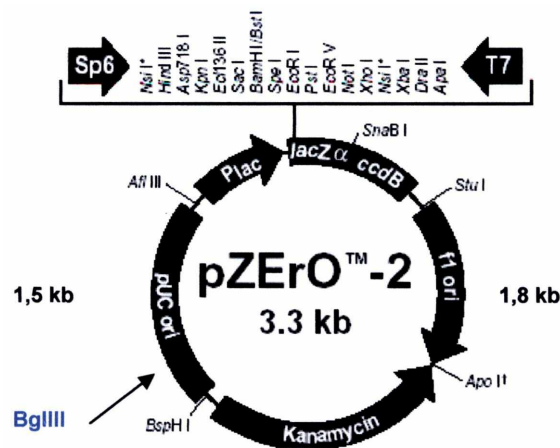


Figura 5.34. Esquema del plásmido pZErO-2TM. Se muestran las enzimas del sector de policorte (*polylinker*) así como la ubicación de las secuencias de los sitios *primers* genéricos T7 y Sp6. Se muestran además los sitios de restricción de algunas enzimas fuera del *polylinker*, en especial BglIII (en azul) y los tamaños aproximados de los fragmentos que resultan de la digestión conjunta con BglIII y alguna de las enzimas del *polylinker*.

Polaridad del fragmento BglIII G (8,7 kpb), clon BglIII 70

Para determinar la polaridad del clon BglIII 70 en el vector de clonado pZErO-2TM, éste fue digerido solamente con la enzima HindIII. En la digestión se obtuvo una banda de 3,7 kpb correspondiente al fragmento HindIII-HindIII entre el sitio del *polylinker* y el sitio del inserto. La polaridad de este clon se muestra en la figura 5.35 y en la tabla 5.8.

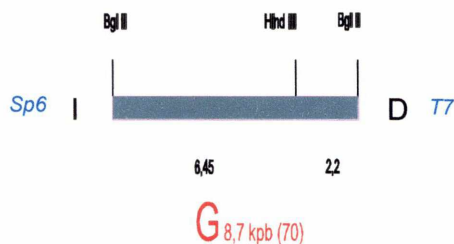


Figura 5.35. Mapa del clon BglIII 70 (Frg. BglIII G). Se muestra la polaridad del inserto respecto de los *primers* Sp6 y T7 en el vector pZErO-2TM.

Polaridad de fragmentos BgIII L (2,6 kpb) y BgIII M (1,9 kpb)

Si bien los fragmentos BgIII L (2,6 kpb) y BgIII M (1,9 kpb) habían sido ubicados en el mapa de restricción por experimentos de digestión y por *Southern blot*, las polaridades de los mismos se determinaron al secuenciar sus extremos con los *primers* T7 y Sp6. Para el caso de algunos fragmentos, la ubicación de sus extremos en el mapa de restricción se vio facilitada por que las secuencias de algunos de sus extremos se solaparon con contigs EcoRI. En particular la secuencia obtenida sobre el clon BgIII 29 (fragmento BgIII M; 1,9 kpb) con el *primer* T7 correspondió con la contigüidad generada por los fragmentos EcoRI A y B. Por otra parte el extremo T7 del clon BgIII 46 (fragmento BgIII 2,0 kpb) también coincidió con esta contigüidad (Tabla 5.8).

Tabla 5.8. Determinación de las polaridades de los clones BgIII. El sentido de orientación de los extremos de los clones BgIII ha sido establecido por experimentos de digestión y de secuenciamiento

| Fragmento genómico | Tamaño del inserto (kpb) | Clon testigo | Primer de secuencia en el clon testigo ^a | Polaridad del extremo adyacente al primer de secuencia ^b | Determinación de la polaridad ^c |
|--------------------|--------------------------|--------------|---|---|--|
| D | 11,5 | 67 | Sp6 | i | S |
| | | | T7 | d | |
| E | 11,2 | 52 | Sp6 | i | S |
| | | | T7 | d | |
| F | 9,4 | 35 | Sp6 | d | D |
| | | | T7 | i | |
| G | 8,7 | 70 | Sp6 | i | D |
| | | | T7 | d | |
| H | 6,3 | 20 | Sp6 | d | S |
| | | | T7 | i | |
| I | 5,2 | 17 | Sp6 | d | D, S y PCR |
| | | | T7 | i | |
| K | 2,7 | 68 | Sp6 | d | S |
| L | 2,6 | 46 | Sp6 | d | S |
| | | | T7 | i | |
| M | 2,0 | 29 | Sp6 | i | S |
| | | | T7 | d | |

^a Los *primers* T7 y M13F se encuentran del mismo lado respecto del sitio BamHI, en tanto que Sp6 y M13R de encuentran del lado opuesto.

^b i, próximo al gen de granulina; d, más lejano al gen de granulina.

^c S, secuenciamiento; D, digestión.

Ubicación de los distintos fragmentos en un mapa de restricción por *Southern blot*

Alineamiento de clones mediante hibridación con sondas radiactivas homólogas y confirmación de los mapas generados para los fragmentos utilizados como sondas

Los experimentos de *Southern blot* (Figuras 5.36, 5.37, 5.38 y 5.39; Tablas 5.9, 5.10 y 5.11), fueron de suma utilidad en la determinación del mapa de restricción del genoma de EpapGV. A continuación se analizan las hibridaciones efectuadas. Además, en el capítulo 6 se detalla la hibridación con una sonda heteróloga de un gen de granulina.

A continuación se indicaran los resultados de distintas hibridaciones con fragmentos genómicos

Sonda BglII N (0,747kpb), clon BglII 60

Esta sonda presentó hibridación con el fragmento BglII 0,747 kpb (Fig. 5.36B), confirmando la identidad del clon y con los fragmentos EcoRI C, D o E (14,4 kpb), HindIII B o C (19 kpb). Además, la sonda hibridó con los fragmentos BamHI A (43,6 kpb), B (25,1 kpb) y D (14,2 kpb), pero la mayor intensidad se registró en 43,6 kpb. Según el mapa generado, el fragmento de 0,747 kpb de BglII debería estar dentro del fragmento de BamHI de 43,6 kpb. Sin embargo, la intensidad de la señal de este fragmento no fue significativa respecto de las otras bandas. Esto se debería a que su gran tamaño dificultó su transferencia a la membrana, o a una degradación producida por ruptura de enlaces fosfodiéster durante su corrida en gel de agarosa.

Sonda EcoRI A (27,6 kpb), clon 8

La sonda EcoRI A hibridó con el fragmento EcoRI de 27,6 kpb, confirmando que el mismo provenía del genoma de EpapGV (Fig. 5.36C, Tabla 5.11). La hibridación con los fragmentos BamHI permitió identificar a las bandas de 25,6 kpb; 9,5 kpb y 6,83 kpb, pero falló en identificar al fragmento de 3,0 kpb. La falta de hibridación con BamHI de 3,0 kpb se debería a defectos en la transferencia en determinadas regiones de la membrana de hibridación. En las otras calles se ubicaron los fragmentos HindIII de 20 kpb (aproximado), 5,3 kpb; 3,8 kpb (posiblemente dos fragmentos) y 1,3 kpb, y los fragmentos BglII 16,58 kpb; 6,3 kpb; 5,2 kpb y 2,0 kpb. Las señales relativas de

hibridación de algunos fragmentos no mostraron los resultados esperados. Por ejemplo, la banda BamHI 6,83 kpb presentó una intensidad de hibridación mayor que la de 9,5 kpb siendo que la última se encontraba completamente contenida en EcoRI A y la primera sólo estaba contenida en 5,0 kpb. Esto obedecería a defectos en la transferencia o a defectos en la generación de la sonda por *multipriming*. Es probable que los *primers* pdN₆ se hayan pegado diferencialmente al molde y de esta forma algunas regiones habrían sido copiadas más veces que el promedio y serían las responsables de diferencias en las intensidades relativas de hibridación.

En conclusión, este experimento permitió identificar a los distintos fragmentos predichos por el mapa del plásmido, exceptuando el fragmento BamHI 3,0 kpb.

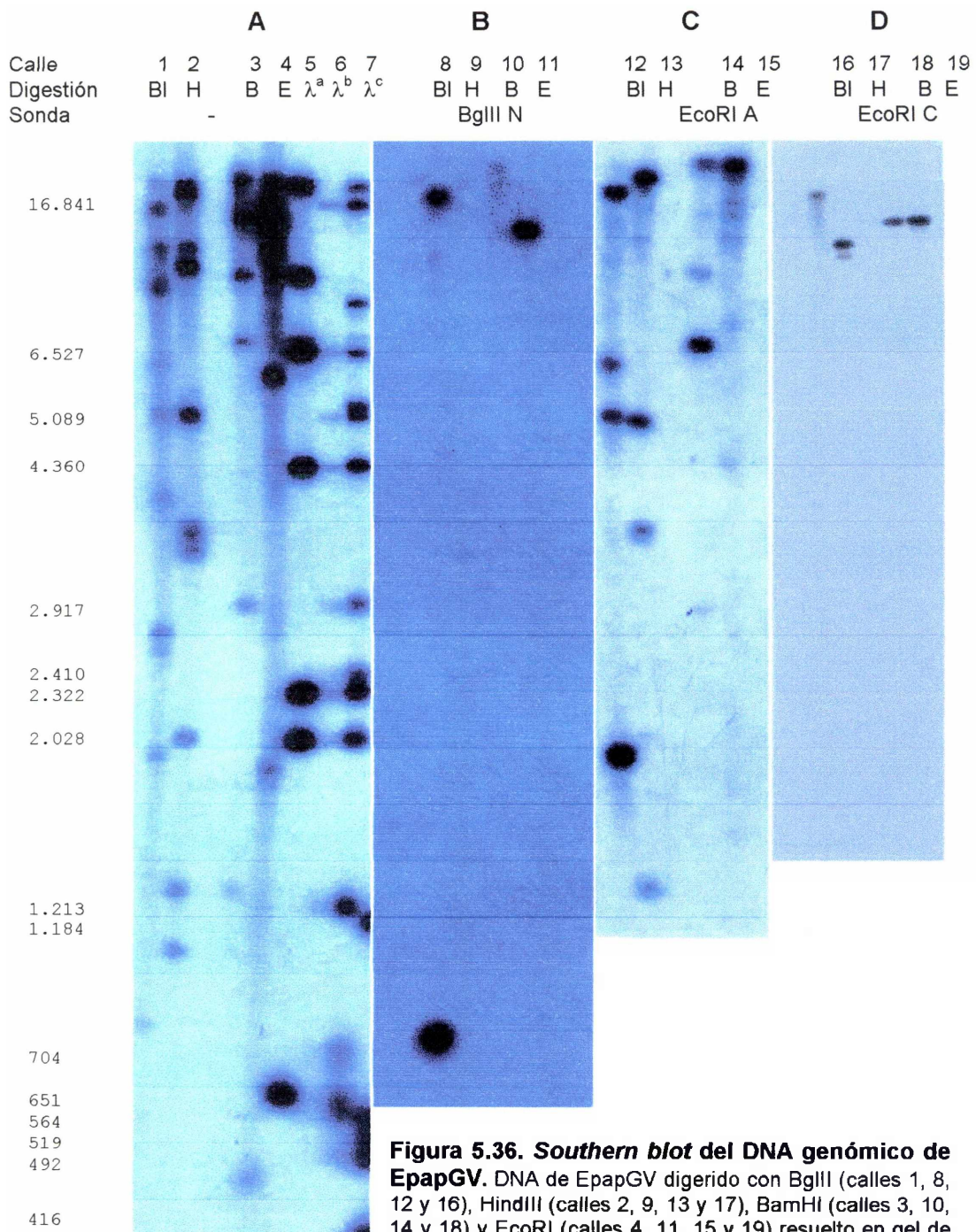


Figura 5.36. Southern blot del DNA genómico de EpapGV. DNA de EpapGV digerido con BgIII (calles 1, 8, 12 y 16), HindIII (calles 2, 9, 13 y 17), BamHI (calles 3, 10, 14 y 18) y EcoRI (calles 4, 11, 15 y 19) resuelto en gel de agarosa 0,5%. (A), DNA de EpapGV digerido y marcado con [α 32 P] dATP por fill in. El DNA fue hibridado con las sondas: (B), BgIII N (0,747 kpb); (C), EcoRI A (27,6 kpb) y (D), EcoRI C (14, 4 kpb). Los marcadores de peso molecular empleados en este gel fueron DNA del fago λ digerido con ^a HindIII; ^b BamHI, BgIII y HindIII; ^c HindIII y EcoRI. A la izquierda se indican los tamaños de los fragmentos del MPM λ BamHI, BgIII y HindIII (en pb).

Sonda EcoRI B (18,7 kpb), clon EcoRI 49

La sonda proveniente del fragmento genómico EcoRI B (18,7 kpb) se hibridó con DNA genómico de EpapGV digerido con las enzimas seleccionadas para el mapa de restricción (Fig. 5.37) y sobre los clones HindIII y BglII (hibridación no mostrada). Pese a que el DNA utilizado para éste último ensayo había sido poco resuelto y los fragmentos grandes no se diferenciaron satisfactoriamente, fue posible determinar con certeza fragmentos con hibridaciones positivas menores a 25 kpb y con los fragmentos resultantes de la cuádruple digestión (Tabla 5.9). Posteriormente, los análisis de hibridaciones sobre clones HindIII y BglII transferidos a membranas, facilitaron la identificación certera de los fragmentos con hibridación positiva. Los clones que presentaron reacción positiva para esta sonda fueron: HindIII b (5,3 kpb), BglII 28 (2,6 kpb) y 46 (2,6 kpb) y BglII 67 (6,4 kpb) tal como se indica en la tabla 5.9. Esta hibridación, en conjunto con los mapas de restricción de los clones HindIII y BglII, permitió confirmar que los clones BglII 28 y 46 corresponderían al fragmento genómico BglII L. Además, se confirmó que el clon BglII 67 contiene al fragmento genómico BglII E. Además, se comprobó que el clon BglII 68 no poseía el fragmento genómico BglII L, al no hibridar con esta sonda. Las hibridaciones en conjunto avalaron el mapa del fragmento EcoRI B (Fig. 5.5) y corroboraron su posición en el mapa de restricción.

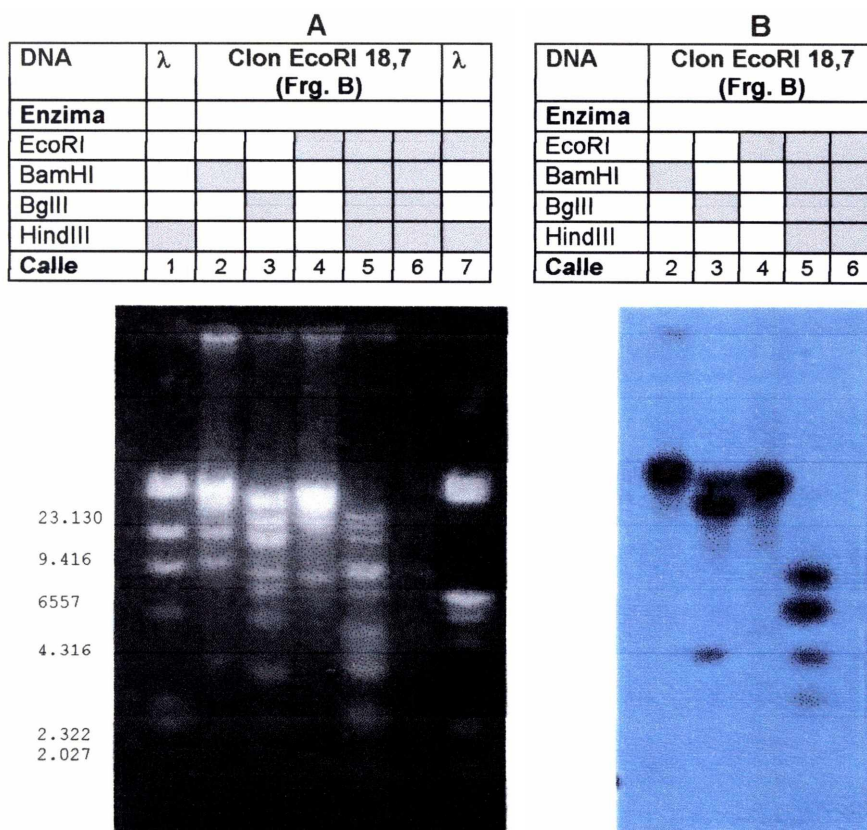


Figura 5.37. Southern blot de la sonda EcoRI B sobre DNA de EpapGV. (A), el DNA de EpapGV fue digerido con enzimas de restricción de la tabla superior, resuelto en gel de agarosa 0,5% y visualizado por tinción con BrEt. (B), el DNA de la figura anterior fue transferido a una membrana e hibridado con la sonda EcoRI B (18,7 kpb). A la izquierda de la figura se indican los tamaños de los fragmentos del MPM, DNA del fago lambda digerido con HindIII que se visualizan en el gel (en pb). **Nota:** el DNA digerido con BamHI presentó digestión parcial.

Tabla 5.9. Resultados del Southern blot de la sonda EcoRI B (18,7 kpb) con DNA genómico de EpapGV y con clones HindIII y BglII adsorbidos a membranas.

| Digestión | Hibridación positiva (en kpb) ^a | |
|--|--|--|
| | Fragmentos genómicos | Clones HindIII y BglII adsorbidos a membranas ^b |
| EcoRI | 18,7 | No se analizaron estos clones |
| BamHI | > 18,7 ^c ; 1,3 ^d | No se analizaron estos clones |
| BglII | 23,5; 11,2 y 2,7 | BglII 28 y 46 (2,6) y BglII 67 (6,4) |
| HindIII | No se digirió con esta enzima | HindIII b (5,3) |
| Cuádruple digestión: EcoRI + BamHI + HindIII + BglII | 5,3; 3,7; 3,7; 2,7; 2,2; 1,1 | |

^a Los tamaños de algunos fragmentos son aproximados.

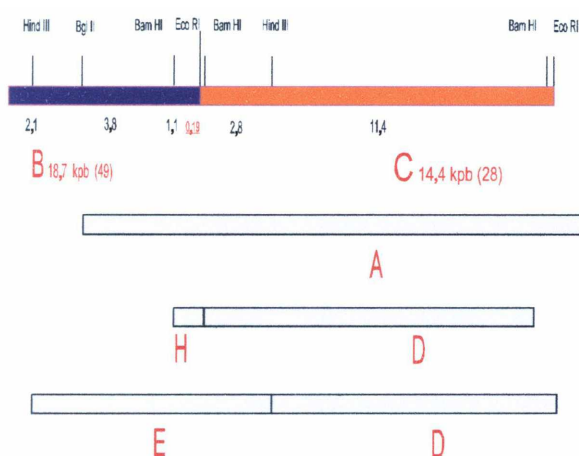
^b Se indica el nombre del clon y entre paréntesis el tamaño.

^c Indica que no se detectaron fragmentos menores a 18,7 kpb.

^d La hibridación positiva del fragmento BamHI de 1,3 kpb fue obtenida con una exposición prolongada de la membrana de la figura 5.37B.

Sonda EcoRI C (14,4 kpb), clon EcoRI 28

El fragmento EcoRI C fue ubicado en el mapa de restricción mediante un experimento de *Southern blot* (Fig. 5.36D, Tabla 5.11). El análisis conjunto de las hibridaciones efectuadas con las sondas de los fragmentos EcoRI B y EcoRI C, determinó que ambas sondas presentaban señal positiva para el fragmento BamHI H de 1,3 kpb. De acuerdo con los resultados, se conjeturó que este fragmento de 1,3 kpb estaba compartido por los fragmentos EcoRI B y C. El uso de este fragmento BamHI como elemento alineatorio, resultó concordante con los datos de doble digestión genómica (EcoRI más BamHI) en los cuales la banda de 1,3 kpb (BamHI) desaparecía generando dos nuevas bandas de 1,1 kpb y 0,2 kpb, respectivamente. Además de la banda BamHI de 1,3 kpb, los fragmentos BglII A y HindIII E, también hibridación con las sondas EcoRI B y C, confirmando el mapa y la posición de los fragmentos EcoRI B y C (Fig. 5.38).



Fragmentos

Eco RI

Figura 5.38. Ubicación del fragmento genómico EcoRI C.

Bgl II

Bam HI

Hind III

Sonda EcoRI F (13,4 kpb), clon EcoRI 46

Este experimento tubo como objetivo determinar la ubicación del fragmento EcoRI F en el genoma de EpapGV. Previamente se había determinado que el fragmento EcoRI F carecía de sitios de restricción para cualquiera de las enzimas seleccionadas para el mapa de restricción. En función de su tamaño, el fragmento EcoRI F estaría contenido en alguno de los fragmentos BamHI de dimensiones superiores a él [BamHI A (43,6 kpb), BamHI B (25,0 kpb), BamHI C (15,65 kpb), o BamHI D (14,2 kpb)]. Sin embargo, al analizar las regiones ya mapeadas, el mapa de restricción de los clones BamHI y los perfiles de restricción de las dobles digestiones genómicas, se descartaron los clones BamHI B, C y D. De acuerdo con estas premisas, este fragmento estaría inscripto dentro de BamHI A. Pese a que los fragmentos de la digestión genómica no se resolvieron satisfactoriamente, los resultados de la hibridación (Fig. 5.39) aportaron datos suficientes como para confirmar las suposiciones acerca de su ubicación. Con posterioridad la ubicación de este fragmento se confirmó por análisis de contigüidad mediante PCR.

| DNA | Clon EcoRI 46, Frg. F | | | | | | | | | |
|---------|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| Enzima | | | | | | | | | | |
| EcoRI | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| BamHI | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| HindIII | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| BglII | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Calle | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |

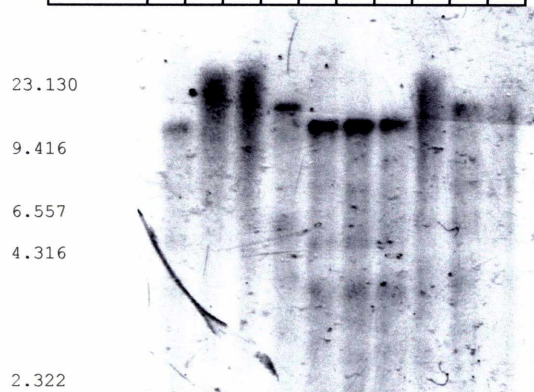


Figura 5.39. Hibridación del DNA de EpapGV con la sonda EcoRI F (13,4 kpb). El DNA de EpapGV digerido con las enzimas de la tabla superior fue resuelto en gel de agarosa 0,5% e hibridado con la sonda EcoRI F (13,4 kpb). A la derecha de la figura, se indican los tamaños de los fragmentos del MPM DNA del fago λ digerido con HindIII.

Tabla 5.10. Resultados del Southern blot de la sonda EcoRI F (13,4 kpb) con DNA genómico de EpapGV (Fig. 5.39).

| Calle ^a | Digestión | Fragmentos que presentaron hibridación positiva (en kpb) | Extremos del fragmento de hibridación positiva | Posibles Fragmentos |
|--------------------|-----------------|--|--|---------------------|
| 1 | EcoRI | 13,4 | EcoRI - EcoRI | F |
| 2 | BamHI | > 18 ^a | Nd ^b | A, B, C o D |
| 3 | HindIII | > 18 ^a | Nd | A, B, o C |
| 4 | BglII | 16,58 ó 15,65 | Nd | B o C |
| 5 | EcoRI + BamHI | 13,4 | EcoRI - EcoRI | |
| 6 | EcoRI + HindIII | 13,4 | EcoRI - EcoRI | |
| 7 | EcoRI + BglII | 13,4 | EcoRI - EcoRI | |
| 8 | BamHI + HindIII | > 18 ^a | HindIII - HindIII | |
| 9 | BamHI + BglII | 16,58 ó 15,65 | BglII - BglII | |
| 10 | BglII + HindIII | 14,2 | HindIII - BglII | |

^a Se refiere a las calles de la figura 5.41.

^b Indica que la banda de hibridación era difusa, pero mayor a 18,7 kpb.

^c No determinado.

Tabla 5.11. Resultados de las hibridaciones de sonda homólogas y heterólogas sobre DNA de EpapGV.

| Sonda | Tamaño (en kpb) | Fragmentos genómicos detectados (en kpb) | | | |
|----------------------|-----------------|--|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| | | EcoRI | BamHI | HindIII | BglII |
| Granulina TnGV | 0,75 | 10,85 y 14,4 | 15,65 | 19,58 | 9,4 |
| BglII N ^a | 0,747 | 14,4 | 43,6; 14,2 y 25,6 | 19,58 | 0,747 |
| EcoRI A | 27,6 | 27,6 | 25,6; 9,4 y 6,3 | 19,58; 5,13; 3,7; y 1,3 | 16,58; 6,3; 5,2 y 2,0 |
| EcoRI B | 18,7 | 18,7 | 1,3 y >18,7 ^b | 5,3 | 23,0; 11,2; 2,7 |
| EcoRI C | 14,6 | 14,6 | 14,2 y 1,3 | 11,4 y 10,1 | 23,5 |
| EcoRI F | 13,4 | 13,4 | > 18 | > 18 | 16,58 ó 15,65 |

^a Se refiere a los fragmentos genómicos clonados.

^b Indica que la banda de hibridación era difusa pero mayor a 18,7 kpb.

Empleo de fragmentos BgIII y BamHI como elementos alineatorios (caminata genómica)

Los mapas de los fragmentos BamHI y BgIII se utilizaron para asegurar la posición de fragmentos EcoRI en el mapa de restricción, gracias a la presencia de regiones solapadas entre estos fragmentos. Las superposiciones se expresaron de manera gráfica (Tabla 5.12), indicando los tamaños generados por las enzimas internas en cada fragmento EcoRI clonado. Por ejemplo, al digerir el fragmento EcoRI H con las enzimas EcoRI más BamHI, se detectaron dos fragmentos de extremos BamHI-EcoRI de 5,15 y 0,73 kpb (Fig. 5.40). En el supuesto fragmento contiguo (EcoRI A), al digerir el DNA con las mismas enzimas, se identificaron dos fragmentos de 6,1 y 8,94 kpb de extremos EcoRI-BamHI. Posteriormente, al analizar las digestiones de los clones BamHI con las enzimas mencionadas anteriormente, se determinó que el fragmento BamHI C presentaba dos fragmentos de 0,73 y 6,1 kpb. De esta forma se confirmó que el fragmento BamHI C estaba superpuesto con los fragmentos EcoRI H y A, avalando así, la contigüidad de estos últimos.

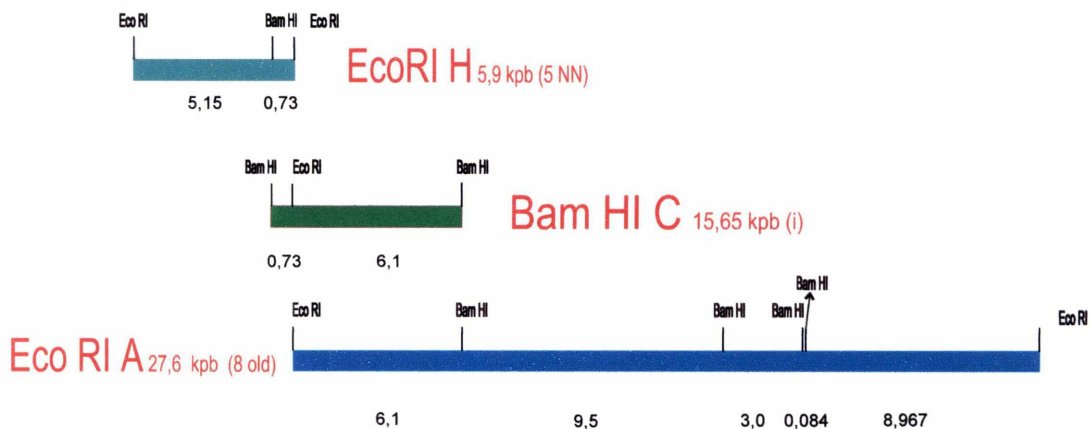


Figura 5.40. Ejemplo del empleo de sitios BamHI como un elemento para ubicar fragmentos EcoRI. Se indican los mapas de restricción de los fragmentos EcoRI H y A, además del clon BamHI C. En estos fragmentos sólo se han indicado los sitios de restricción EcoRI y BamHI. Los tamaños de los fragmentos se indican en kpb.

Tabla 5.12. Tamaño de los fragmentos generados por digestión de los clones de la genoteca EcoRI del genoma de EpapGV.

| Fragmentos genómicos | | A ^a | B | C | D | E | F | G | H |
|--|----------------|----------------|-------|--------|--------|-------|------|-------|------|
| Nombre del clon | | 8 | 49 | 28 old | 3 old | 5 N | 46 | 5 G | 5 NN |
| Tamaño | | 27,6 | 18,7 | 14,6 | 14,4 | 14,3 | 13,4 | 10,85 | 5,88 |
| Extremos del clon EcoRI → Digerido con ↓ | | | | | | | | | |
| BamHI | | | | | | | | | |
| | extremo 1 izq | 6,1 | 17,6 | 0,19 | | | | 0,047 | 5,15 |
| | extremo 2 der. | 8,94 | 1,1 | 0,02 | | | | 10,8 | 0,73 |
| Sumatoria de fragmentos BamHI | | 15,08 | 18,7 | 0,21 | | | | 10,5 | 5,88 |
| HindIII | | | | | | | | | |
| | extremo 1 izq | 3,3 | 6,4 | 3,0 | 0,9 | 9,7 | | | 4,05 |
| | extremo 2 der. | 13,5 | 7,1 | 11,4 | 0,325 | 4,68 | | | 1,88 |
| Sumatoria de fragmentos HindIII | | 16,8 | 13,5 | 14,4 | 1,225 | 14,38 | | | 5,93 |
| BglII | | | | | | | | | |
| | extremo 1 izq | 2,8 | 0,067 | | 4,2 | 0,295 | | 7,55 | 0,8 |
| | extremo 2 der. | 1,9 | 4,9 | | 1,625 | 1,85 | | 3,3 | 2,38 |
| Sumatoria de fragmentos BglII | | 4,7 | 4,967 | | 5,825 | 2,145 | | 10,85 | 3,18 |
| Fragmentos internos | | | | | | | | | |
| BamHI | | 9,5 | | 14,2 | | | | 0,298 | |
| | | 3,0 | | | | | | | |
| Sumatoria de fragmentos internos BamHI | | 12,5 | | 14,2 | | | | 0,298 | |
| HindIII | | 3,7 | 5,3 | | 3,5 | | | | |
| | | 3,7 | | | 9,75 | | | | |
| | | 2,1 | | | | | | | |
| | | 1,3 | | | | | | | |
| Sumatoria de fragmentos internos HindIII | | 10,8 | 5,3 | | 13,25 | | | | |
| BglII | | 16,4 | 11,2 | | 8,65 | 11,5 | | | 2,7 |
| | | 6,3 | 2,55 | | | 0,75 | | | |
| Sumatoria de fragmentos internos BglII | | 22,7 | 13,75 | | 8,65 | 12,25 | | | 2,7 |
| Sumatoria de fragmentos internos + extremos | BamHI | 27,58 | 18,7 | 14,41 | - | - | | 10,85 | 5,88 |
| | HindIII | 27,6 | 18,8 | 14,4 | 14,485 | 14,38 | | 10,85 | 5,93 |
| | BglII | 27,4 | 18,7 | - | 14,485 | 14,39 | | 10,85 | 5,88 |

^a Los tamaños de los fragmentos son aproximados y se expresan en kpb.

Caminata genómica

A partir de los mapas de los clones individuales y de experimentos de *Southern blot* se comenzó una caminata genómica, analizando la superposición de fragmentos. (Fig. 5.41). El mapa parcial generado fue confirmado con los datos de la tabla 5.12.

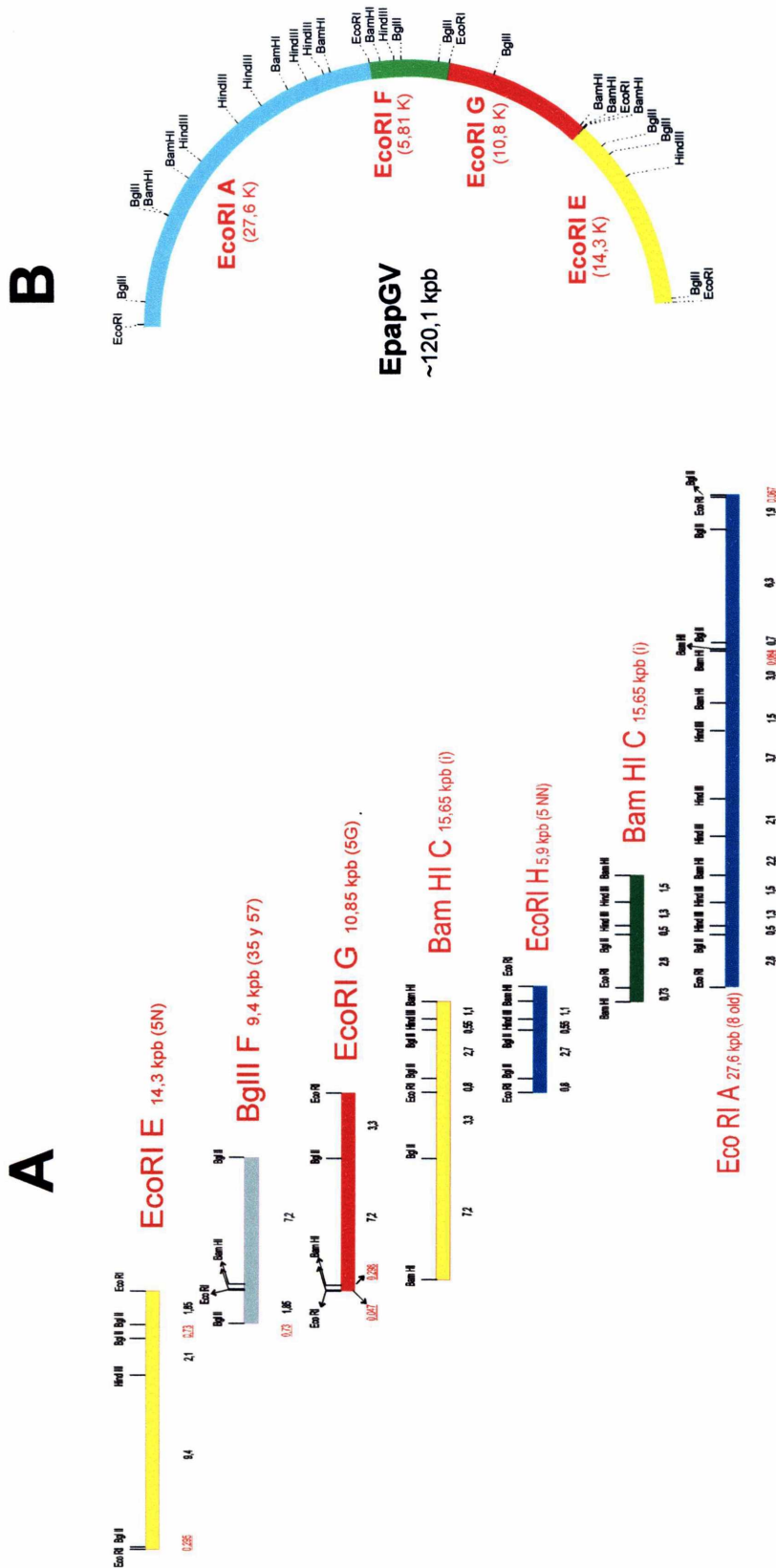


Figura 5.41. Alineamiento de clones genómicos de EpapGV. Los clones genómicos, cuyos mapas habían sido determinados previamente, fueron alineados de acuerdo con el solapamiento de fragmentos de restricción. Este alineamiento genómico se generó inicialmente, a partir de los fragmentos que presentaron hibridación con la sonda del gen de granulina. Posteriormente, se fueron añadiendo fragmentos mediante hibridaciones con sondas genómicas. (A), caminata. (B), posición de los clones EcoRI en el mapa circular.

Empleo de técnicas de PCR para determinar la contigüidad de fragmentos y para ubicar fragmentos pequeños en el mapa de restricción

Se aprovechó la disponibilidad de *primers* diseñados, para otros fines, por Daniel Ghiringhelli para confirmar las contigüidades de fragmentos en el genoma de EpapGV y para ubicar fragmentos pequeños. A partir de múltiples experimentos se arribó a una imagen preliminar del mapa de restricción. Durante la determinación del mismo, las técnicas de PCR fueron empleadas para buscar fragmentos pequeños (caso BamHI J) y para indagar sobre ambigüedades en la posición de fragmentos adyacentes, pero en la mayoría de los casos, esta técnica fue empleada para confirmar los mapas parciales que iban surgiendo de los resultados de hibridación y digestión de fragmentos. Por cuestiones de conveniencia en la escritura de esta tesis, esta técnica ha sido encuadrada dentro de un rol indagatorio.

Se diseñó un ensayo de PCR a fin de corroborar la mayor parte de las contigüidades de los fragmentos EcoRI, así como algunas contigüidades BamHI. Este ensayo estaba basado en reacciones de PCR con *primers* diseñados a partir de secuencias terminales de clones genómicos. Los *primers* se utilizaron de a pares en diferentes combinaciones, de tal modo que una reacción positiva implicaba adyacencia de fragmentos (Tabla 5.13). Debido a causas diversas, no todas las contigüidades se corroboraron por análisis de PCR y ellas fueron: EcoRI A-B, EcoRI B-C, EcoRI C-D. En el caso de la contigüidad EcoRI A-B, la misma fue verificada por solapamiento de la secuencia del extremo d (el más alejado del gen de granulina) del fragmento BgIII L (clon BgIII 46) sobre las secuencias de los extremos EcoRI A *Sp6* y EcoRI B *Sp6*. En el caso del clon EcoRI C su posición fue asegurada, entre otros, por *Southern blot*; pero no fue posible obtener la secuencia del extremo T7. En tanto que la secuencia del otro extremo (*Sp6*), no presentó la calidad deseada como para diseñar un *primer*.

Ubicación en el mapa de restricción de fragmentos pequeños

En la determinación del mapa de restricción de EpapGV una gran cantidad de clones fueron mapeados y sus fragmentos asignados. Sin embargo, dos fragmentos pequeños (EcoRI I y BamHI J), no pudieron ser ubicados en el mapa por técnicas de digestión. Para ello fue preciso recurrir a estrategias en las cuales la PCR jugó un rol primordial.

Fragmento EcoRI I

El clon EcoRI I (0,343 pb) se ubicó en el mapa de restricción merced a una reacción de PCR sobre DNA genómico, empleando los *primers* EcoRI 46 Sp6 y EcoRI 3 old T7 (Fig. 5.42 y 5.43; Tabla 5.13, reacción 5). En la misma, se encontró que la banda correspondiente tenía un peso superior al esperado (aprox. 350 nucleótidos mayor), lo cual indicó que entre los fragmentos EcoRI F y EcoRI D se encontraba el fragmento EcoRI I. Este resultado de PCR permitió asimismo corroborar la ubicación de los fragmentos EcoRI D y EcoRI F. A partir de la secuencia del fragmento de amplificación se obtuvo el tamaño preciso de este fragmento (343 pb).

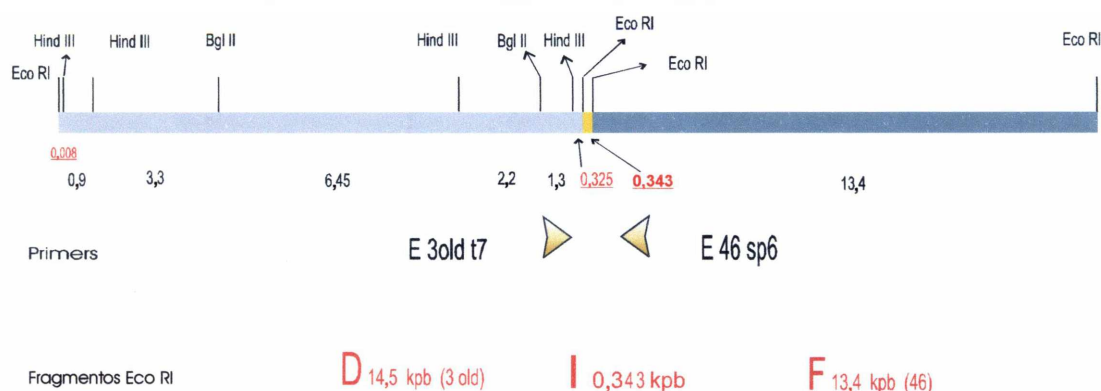


Figura 5.42. Ubicación del fragmento EcoRI I en el mapa de restricción.

| |
|--|
| <p>Clon EcoRI F, <i>Primer</i> EcoRI 46 Sp6: 5'-CCACAGCTTGGATTGTG-3' Clon EcoRI D, <i>Primer</i> EcoRI 3 old T7: 5'-AGGTCCGCGCTGTAGAT-3' Tamaño esperado: 559 pb (sin el fragmento EcoRI I) Tamaño encontrado: 896 pb</p> |
|--|

Figura 5.43. *Primers* utilizados en la ubicación del fragmento EcoRI I.

Fragmento BamHI J

Al digerir el clon EcoRI A con la enzima BamHI se detectó el fragmento BamHI J (100 pb aprox.). Sin embargo, mediante experimentos de digestión no se pudo establecer con precisión su ubicación en el mapa del fragmento EcoRI A. Con el objeto de ubicar este fragmento, se emplearon *primers* previamente diseñados que apuntaban hacia "afuera" de los fragmentos clonados BamHI F, E y G (Fig. 5.44). Mediante reacción de PCR se analizaron las contigüidades BamHI F-E y BamHI G-E. Como ningún fragmento de amplificación presentó un tamaño mayor a lo esperado (Fig. 5.45, calles 2 y 4), la hipótesis de trabajo que surgió, indicaba que el fragmento buscado sólo podía encontrarse adyacente al fragmento BamHI G (3,0 kpb) en el extremo que no

colindaba con el fragmento BamHI E (Fig. 5.46). La secuenciación del fragmento EcoRI A con el *primer* BamHI d Sp6, permitió confirmar la hipótesis de trabajo (Fig. 5.47).

Reacción a
 Clon BamHI F *primer* BamHI g Sp6:
 5'-GACACCGATCGTGTGGT-3'
 Clon BamHI E *primer* BamHI h T7:
 5'-GGTCGCCGAAATCGTAC-3'
 Tamaño esperado: 264 pb

Reacción b
 Clon BamHI G *primer* BamHI d T7:
 5'-GGCAAAGAACACGTTG-3'
 Clon BamHI E *primer* BamHI h Sp6:
 5'-TCCGACGGTGTATCGCT-3'
 Tamaño esperado: 433 pb

Figura 5.44. Primers utilizados en la búsqueda del fragmento BamHI J.

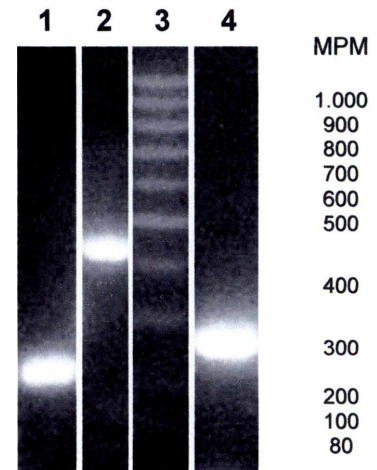


Figura 5.45. Determinación de la contigüidad de fragmentos por reacciones de PCR. Calle 1, reacción de PCR sobre un molde de DNA genómico de EpapGV con *primers* EcoRI 46 T7 y EcoRI 5N T7; calle 2, reacción de PCR con los *primers* BamHI d T7 y BamHI h Sp6; calle 3, marcador de peso molecular "100 pb ladder"; calle 4, reacción de PCR con los *primers* BamHI g Sp6 y BamHI h T7. A la derecha se aprecian los tamaños de los fragmentos del MPM (en pb).

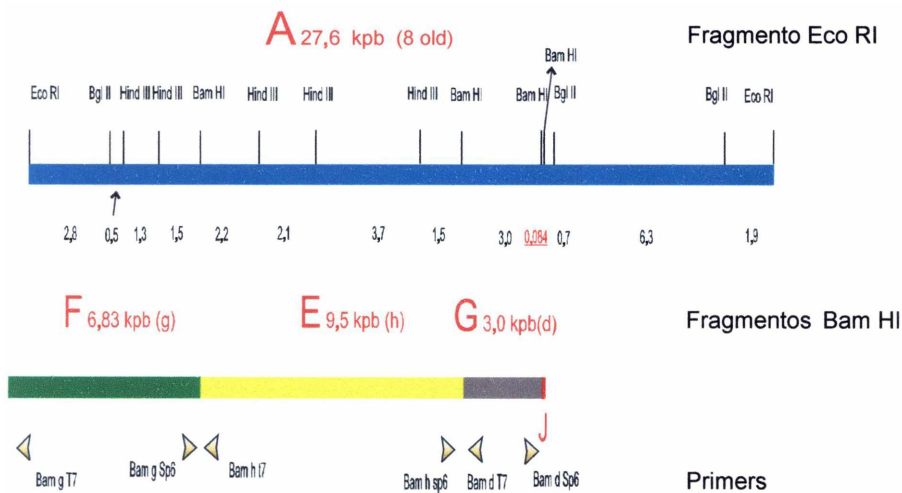


Figura 5.46. Ubicación del fragmento BamHI J.

Clon BamHI G
Primer BamHI d Sp6 5'-TAGCCTCTGAGCAGCTG-3'
Contig Bam G Sp6
 GTCGGATGTGATCAATGTAGGACGGCTTCCAGATGCAAACCGTTAACCTTGTGGGACTAGCGGAAAATTGATAATACTCAAACCTTC
 CTTACACTGGCTCGTTCATATTTCCGGACAAATCGTAGCCTCTGAGCAGCTGCGAATACACGTAGGGCAGCCCATTCATTGC
 GTTACCCGCGCCACGAATCCACCCAGAGAAGTGGTGGCTGTGGGAAGATATAGGCCGAGTATGTGGGTGGTGAATCGGCGCAAGA
 CTCGTAATAATCGGTGTCGCTCAGCGCCGCGTGACGCACATGTACACTTCAGGCATGGTGATTGTGAAGTGATACCAGTCAGCCAC
 AGGTCCCCACGGCGCTTGTAAATGGGCGCGGGATCCGGTAGTCTGGACGAAATTTGCACCAGGGCGTTATGTANATTTGTGCGCAAT
 TTGAATGTCATTGTAgTGTTCGCTCGTTGGATCCaCAAAGGTAACGGCAAACCTAATGACTCTGTGACA

Figura 5.47. Ubicación del fragmento BamHI J. En color verde se indican los sitios BamHI y en color rojo se muestra el *primer* utilizado para la extensión de la secuencia. El fragmento BamHI J de 84 nucleótidos se encuentra subrayado. Aquellos nucleótidos que aparecen en letra minúscula necesitan ser confirmados por lectura reversa.

Determinación de la posición del fragmento EcoRI F (13,4 kpb)

El fragmento EcoRI F fue ubicado en el mapa de restricción mediante el empleo de reacciones de PCR con *primers* específicos (Fig. 5.48) que generaron la banda esperada de 216 pb (Fig. 5.45, calle 1). Por esta reacción se determinó que EcoRI F era contiguo al fragmento EcoRI E (Fig. 5.49). Previamente se había resuelto la ubicación de los fragmentos EcoRI D, EcoRI I, EcoRI F de modo adyacente (Fig. 5.42). Con la confirmación de la posición contigua de EcoRI F y E, se generó una región de 57 kpb que abarcó el resto del genoma sin mapear hasta ese momento. A modo confirmatorio, se utilizaron datos de *Southern blot* generados con el fragmento EcoRI F como sonda (Tabla 5.11).

Clon EcoRI F, *primer* EcoRI 46 T7: 5'-GTGTTGCACCAACCGTG-3'

Clon EcoRI E, *primer* EcoRI 5N T7: 5'-CGTTAGGTTGGACACGT-3'

Tamaño esperado: 216 pb

Figura 5.48. *Primers* utilizados para asegurar la contigüidad EcoRI F y E.

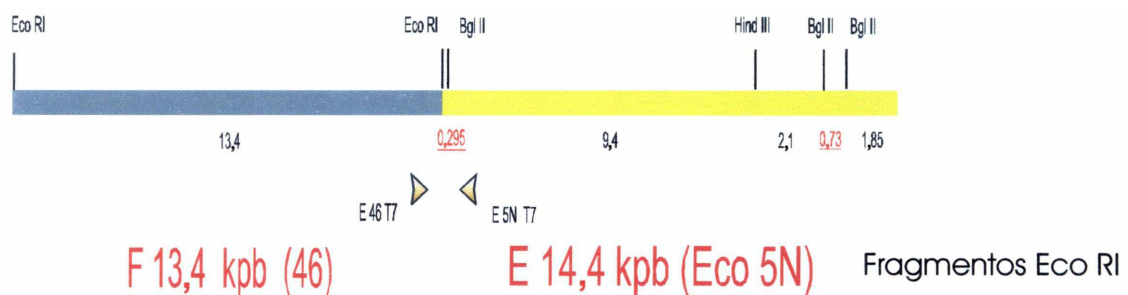


Figura 5.49. Contigüidad de los fragmentos EcoRI I F y E.

Análisis de contigüidades

Otras posibles contigüidades fueron analizadas por ensayos de PCR, pero con resultado negativo (Tabla 5.13, reacciones 10-12).

Tabla 5.13. Resultados de las amplificaciones de PCR con combinaciones de primers complementarios de los fragmentos EcoRI y BamHI, sobre DNA genómico.

| Reacción | Contigüidad | Primer (nombre y secuencia 5'→3') | Primer (nombre y secuencia 5'→3') | Resultado | Tamaño del fragmento amplificado (pb) |
|----------|-------------|---|---|-----------|--|
| 1 | Gr up-Gr dw | Gr up TTACAACAGCGACGTGT | Gr dw CGCTTGACTCAGTAGAT | + | 886 |
| 2 | EcoRI E-G | EcoRI 5N Sp6 CGCTTGACTCAGTAGAT | EcoRI 5G Sp6 AGAGCGTACTGCATCGT | + | 347 |
| 3 | EcoRI G-H | EcoRI 5G T7 CCAGTCTGACATAGCGT | EcoRI 5NN Sp6 GTCGTCGCAGTAAGCGT | + | 609 |
| 4 | EcoRI H-A | EcoRI 5NN T7 CTACGAACCTAGGCGTG | EcoRI 27k T7 TGATATTATGATCGTCAC | + | 305 |
| 5 | EcoRI D-i-F | EcoRI 46 Sp6 CCACAGCTTGGATTGTG | EcoRI 3 old T7 AGGTCGCGCTGTAGAT | + | 896 |
| 6 | EcoRI F-E | EcoRI 46 T7 GTGTTGCACCAACCGTG | EcoRI 5N T7 CGTTAGGTTGGACACGT | + | 216 |
| 7 | BamHI C-F | BamHI i Sp6 TCTACAAGCAGCAGCCG | BamHI g T7 ACGGAATCGAACCGCTG | + | 302 |
| 8 | BamHI F-E | BamHI g Sp6 GACACCGATCGTGTGGT | BamHI h T7 GGTCGCCGAAATCGTAC | + | 264 |
| 9 | BamHI E-G | BamHI h Sp6 TCCGACGGTGTATCGCT | BamHI d T7 CGGCAAAGAACACGTTG | + | 433 |
| 10 | EcoRI E-B | EcoRI 5N T7 CGTTAGGTTGGACACGT | EcoRI 49 Sp6 GTCGGTTACGACACGTG | - | - |
| 11 | EcoRI E-B | EcoRI 5N T7 CGTTAGGTTGGACACGT | EcoRI 49 T7 AGCTGTACGGTGCACGT | - | - |
| 12 | EcoRI E-D | EcoRI 5N T7 CGTTAGGTTGGACACGT | EcoRI 3 old Sp6 GCGTAATCGACGCTAG | - | - |

Hipótesis final del mapa de restricción de EpaGV

En función de los experimentos expuestos en los puntos anteriores, una imagen acabada del mapa de restricción de EpaGV ha sido propuesta. La tabla 5.1 se adjunta a modo de guía para ubicar los fragmentos en el mapa de restricción (Fig. 5.1). El punto cero del mapa fue elegido como el ATG del gen de granulina, la ubicación clonado y secuencia de este gen se muestra en el capítulo 6.

En las próximas dos páginas se resumen las posiciones de los diferentes sitios de restricción obtenidas a partir del análisis de *Southern blot*, digestiones simples y dobles, y mediante el uso de la PCR.

Tamaño del genoma de EpapGV

El peso del genoma fue calculado a partir de la sumatoria del peso de cada uno de los fragmentos EcoRI. Los pesos de estos fragmentos se obtuvieron a partir de la suma de los distintos fragmentos generados en las digestiones múltiples. Los pesos de los fragmentos genómicos producidos por las otras enzimas empleadas en el mapeo, han sido recalculados en función de las digestiones de los clones EcoRI. A partir de esta metodología el peso obtenido fue de 120,1 kpb (Tabla 5.1). Con el fin de evaluar la dispersión del tamaño calculado, se comparó este último peso (120,1 kpb) con el peso promedio obtenido a partir de la sumatoria de bandas de digestiones genómicas extrapoladas directamente de geles de agarosa (Figuras 5.50, 5.51 y 5.52). Estos cálculos, arrojaron un peso molecular promedio de 120,77 kpb y valores extremos entre 118,84 kpb y 122,1 kpb (Tabla 5.14). A los fines prácticos se tomará el peso obtenido a partir de la digestión de fragmentos clonados EcoRI como el más correcto, dado que en su cálculo han intervenido una menor cantidad de fragmentos grandes que podrían incrementar el grado de dispersión de los resultados.

Tabla 5.14. Pesos del genoma de EpapGV según distintas digestiones (simples y dobles). Los pesos de los fragmentos (en kpb) resultaron de la extrapolación directa de su movilidad en geles de agarosa.

| EcoRI | BamHI | HindIII | BglII | EcoRI + BamHI | BamHI + BglII | EcoRI + BglII | EcoRI + HindIII | HindIII + BamHI | HindIII + BglII |
|-------|-------|---------|-------|------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 120,5 | 120,6 | 122,1 | 119,2 | 121,9 | 120,8 | 118,8 | 121,4 | 120,0 | 122,0 |

El tamaño del genoma de EpapGV resultó muy semejante a los tamaños de los granulovirus del grupo I, cuyos tamaños varían entre los 112 kpb y los 120 kpb. Los miembros del grupo II poseen genomas que difieren sustancialmente de los del grupo I (174-179 kpb). La división de los granulovirus en grupos se aborda en el capítulo 6.

Verificación de la hipótesis de mapa

Si bien los experimentos de análisis de contigüidad de fragmentos mediante el empleo de *primers* se incluyeron dentro del grupo de estrategias de indagación sobre el orden de los fragmentos, su rol también permitió confirmar contigüidades. En este apartado se muestran estrategias confirmatorias que en conjunto avalaron completamente la hipótesis de mapa presentado. La primera estrategia se analiza en el capítulo 8, las demás se desarrollan a continuación.

- Análisis de las contigüidades de fragmentos por secuencia de extremos de fragmentos clonados y presencia de ORFs compartidos.
- Control de los mapas de fragmentos mediante el análisis de las dobles digestiones genómicas.
- Ubicación de fragmentos pequeños mediante secuencia de los extremos de fragmentos clonados.

Control de las digestiones individuales de los clones con las dobles digestiones genómicas

A fin de corroborar la hipótesis del mapa de restricción se analizaron las dobles digestiones genómicas (Figs. 5.50, 5.51 y 5.52; Tablas 5.15, 5.16 y 5.17), ubicando cada fragmento de las mismas en el correspondiente modelo de mapa. Se verificó que para cada inserto los fragmentos generados en una doble digestión del plásmido, se correspondieran en la doble digestión de DNA genómico. Así, por ejemplo, el fragmento EcoRI F (13,4 kpb) no presentaba sitios internos para las enzimas del mapa tanto en el fragmento clonado como en el fragmento genómico. El fragmento EcoRI G de 10,85 kpb fue un ejemplo de correlación entre los perfiles de digestión de DNA genómico y de DNA de fragmentos clonados. Al ser digerido el DNA del clon que contenía a EcoRI G con BamHI más EcoRI aparecían dos bandas características, una de 10,5 kpb y la otra de 0,3 kpb. Este perfil fue idéntico al obtenido al digerir DNA genómico de EpapGV I con las mismas enzimas.

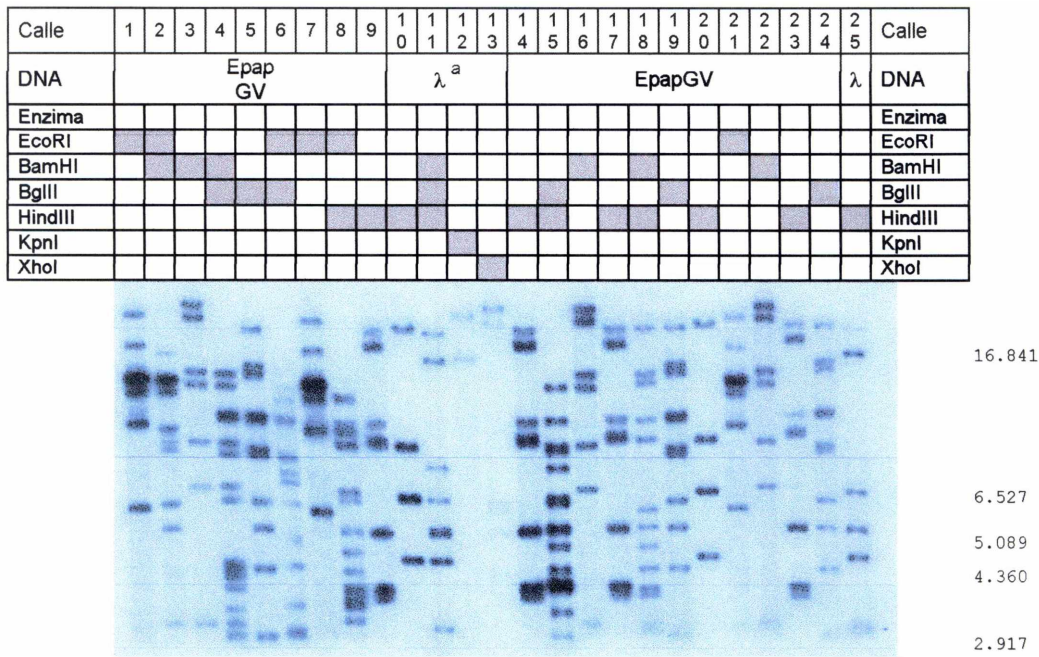


Figura 5.50. Autorradiografía de fragmentos de restricción de DNA de EpapGV marcados por *fill in* y resueltos por electroforesis en gel de agarosa 0,4%. A la derecha, se indican únicamente los tamaños de las bandas del MPM que se visualizan en el gel (DNA del fago λ digerido con HindIII, BamHI y BglII). ^a DNA del fago λ .

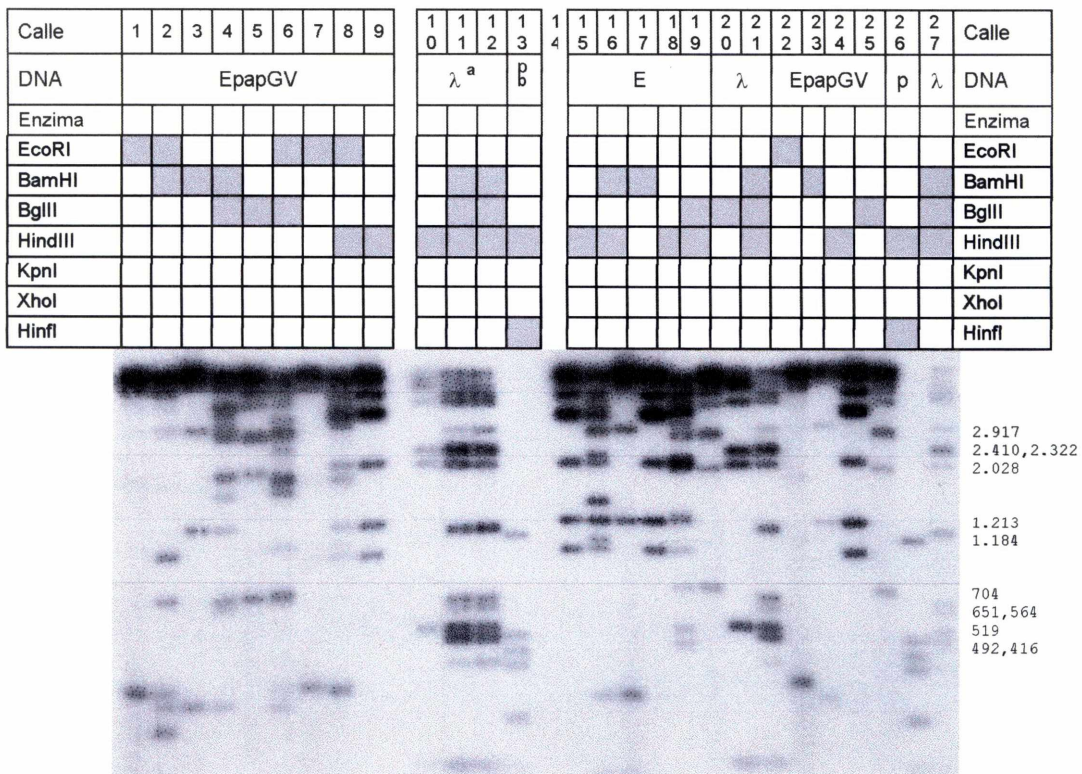


Figura 5.51. Autorradiografía de fragmentos de restricción de DNA de EpapGV marcados por *fill in*, y resueltos por electroforesis en gel de agarosa 1,5%. A la derecha, se indican únicamente los tamaños de las bandas del MPM que se visualizan en el gel (DNA del fago λ digerido con HindIII, BamHI y BglII). ^a DNA del fago λ ; ^b DNA del plásmido pCDNA II.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|-------------|-------|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|---------|
| Calle | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | Calle | |
| DNA | EpapGV | | | | | | | | | λ^a | P^b | EpapGV | | | | | | | | P | DNA | |
| Enzima | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Enzima |
| EcoRI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | EcoRI |
| BamHI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | BamHI |
| BglII | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | BglII |
| HindIII | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | HindIII |
| KpnI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | KpnI |
| XhoI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | XhoI |
| HinfI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | HinfI |



Figura 5.52. Autorradiografía de fragmentos de restricción de DNA de EpapGV marcados por fill in, y resueltos por electroforesis en gel de agarosa 2,0%. Sólo se aprecian los fragmentos mayores a 70 pb. A la izquierda, se indican únicamente los tamaños de las bandas del MPM que se visualizan en el gel (DNA del plásmido pCDNA II digerido con HindIII y HinfI) y a la derecha los tamaños del MPM DNA del fago λ digerido con HindIII, BamHI y BglII. ^a DNA del fago λ ; ^b DNA del plásmido pCDNA II.

Tabla 5.15. Ubicación de los fragmentos de doble digestión en el mapa de restricción. Los extremos de los fragmentos de restricción están ordenados de izquierda a derecha de acuerdo con el sentido del mapa de restricción. La tercer y sexta columna asignan ubicación al fragmento en cuestión dentro de otros fragmentos de referencia. Los tamaños de los fragmentos se expresan en kpb.

| Doble digestión EcoRI + BamHI | Extremos del fragmento ^a | Ubicación del fragmento dentro de frg. BglII | Doble digestión EcoRI + HindIII | Extremos del fragmento | Ubicación del fragmento dentro de frg. BamHI. |
|-------------------------------|-------------------------------------|--|---------------------------------|------------------------|---|
| 18,9 | E-B | BglII L-D-A | 13,5 | H-E | BamHI E-G-J-B |
| 14,25 | E-E (EcoRI E) | BglII E-N-F | 13,4 | E-E (EcoRI F) | BamHI A |
| 14,6 | E-E (EcoRI D) | BglII A-G-C | 11,6 | H-E | BamHI A |
| 14,2 | B-B (BamHI D) | BglII A | 10,65 | E-E (EcoRI G) | BamHI C |
| 13,4 | E-E (EcoRI F) | BglII C | 10,0 | E-H | BamHI A |
| 10,6 | B-E | BglII F-J | 9,6 | H-H (HindIII F) | BamHI A |
| 9,4 | B-B (BamHI E) | BglII B | 7,4 | H-E | BamHI B-J |
| 9,2 | B-E | BglII B-H-M | 6,9 | E-H | BamHI B |
| 6,1 | E-B | BglII K-B | 5,3 | H-H (HindIII H) | BamHI B |
| 5,3 | E-B | BglII F-K | 4,8 | H-E | BamHI A |
| 3,1 | B-B (BamHI G) | BglII B | 4,3 | E-H | BamHI C |
| 1,1 | B-E | BglII A | 3,8 | H-H (HindIII I) | BamHI F-E |
| 0,78 | B-E | BglII K | 3,5 | H-H (HindIII J) | BamHI E |
| 0,31 | E-E (EcoRI I) | BglII C | 3,5 | H-H (HindIII K) | BamHI A |
| 0,28 | B-B (BamHI I) | BglII F | 3,4 | E-H | BamHI F |
| 0,19 | E-B | BglII A | 3,1 | E-H | BamHI J-A |
| 0,09 | B-E | BglII A | 2,1 | H-H (HindIII L) | BamHI E |
| 0,09 | B-B (BamHI J) | BglII B | 1,85 | H-E | BamHI C-F |
| 0,02 | E-B | BglII F | 1,3 | H-H (HindIII M) | BamHI F |
| | | | 0,90 | E-H | BamHI A |
| | | | 0,26 | H-E | BamHI A |
| | | | 0,26 | E-E (EcoRI I) | BamHI A |
| Peso total: 121,91 | | | Peso total: 121,42 | | |

^a En caso que el fragmento de doble digestión coincidiese con un fragmento de digestión simple, el mismo se indica entre paréntesis.

Tabla 5.16. Ubicación de los fragmentos de doble digestión en el mapa de restricción. Los extremos de los fragmentos de restricción están ordenados de izquierda a derecha de acuerdo con el sentido del mapa de restricción. La tercer y sexta columna asignan ubicación al fragmento en cuestión dentro de otros fragmentos de referencia. Los tamaños de los fragmentos se expresan en kpb.

| Doble digestión EcoRI + BglII | Extremos del fragmento ^a | Ubicación del fragmento dentro de frg. BamHI | Doble digestión BamHI + HindIII | Extremos del fragmento | Ubicación del fragmento dentro de frg. EcoRI |
|-------------------------------|-------------------------------------|--|---------------------------------|------------------------|--|
| 15,5 | Bl-BI (BglII B) | BamHI F-E-G | 23,0 | H-H (HindIII A) | EcoRI D-I-F-G |
| 14,1 | E-E (EcoRI C) | BamHI D | 15,3 | B-H | EcoRI A-B |
| 13,4 | E-E (EcoRI F) | BamHI A | 15,1 | B-H | EcoRI G-H |
| 11,6 | Bl-BI (BglII D) | BamHI B | 11,5 | H-B | EcoRI C |
| 11,3 | Bl-BI (BglII E) | BamHI | 9,8 | H-H (HindIII F) | EcoRI D |
| 8,9 | Bl-BI (BglII G) | BamHI | 6,1 | H-B | EcoRI B |
| 7,2 | E-BI | BamHI J-C | 5,3 | H-H (HindIII H) | EcoRI B |
| 6,4 | Bl-BI (BglII H) | BamHI B | 4,8 | H-B | EcoRI D-G |
| 4,9 | Bl-E | BamHI B | 4,2 | B-H | EcoRI H-A |
| 4,3 | E-BI | BamHI A | 3,7 | H-H (HindIII J) | EcoRI A |
| 3,4 | Bl-E | BamHI C | 3,5 | H-H (HindIII K) | EcoRI D |
| 2,8 | E-BI | BamHI F | 2,9 | B-B (BamHI G) | EcoRI A |
| 2,7 | Bl-BI (BglII K) | BamHI C | 2,8 | B-H | EcoRI C |
| 2,5 | Bl-BI (BglII L) | BamHI B | 2,2 | B-H | EcoRI A |
| 2,3 | Bl-E | BamHI C-F | 2,1 | H-H (HindIII L) | EcoRI A |
| 1,8 | Bl-E | BamHI A | 1,6 | H-B | EcoRI A |
| 1,8 | Bl-E | BamHI B | 1,5 | H-B | EcoRI A |
| 1,65 | E-BI | BamHI D | 1,3 | H-H (HindIII M) | EcoRI A |
| 0,85 | E-BI | BamHI C | 1,3 | B-B (BamHI H) | EcoRI B C |
| 0,78 | Bl-BI (BglII N) | BamHI A | 1,0 | H-B | EcoRI H |
| 0,31 | E-E (EcoRI I) | BamHI A | 0,90 | H-H (HindIII N) | EcoRI D |
| 0,26 | E-BI | BamHI A | 0,28 | B-B (BamHI I) | EcoRI G |
| 0,09 | E-BI | BamHI B | 0,1 | B-B (BamHI J) | EcoRI A |
| | | | 0,1 | B-H | EcoRI C-D |
| Peso total: 118,84 | | | Peso total: 120,38 | | |

^a En caso que el fragmento de doble digestión coincidiese con un fragmento de digestión simple, el mismo se indica entre paréntesis.

Tabla 5.17. Ubicación de los fragmentos de doble digestión en el mapa de restricción. Los extremos de los fragmentos de restricción están ordenados de izquierda a derecha de acuerdo con el sentido del mapa de restricción. La tercer y sexta columna asignan ubicación al fragmento en cuestión dentro de otros fragmentos de referencia. Los tamaños de los fragmentos se expresan en kpb.

| Doble digestión BamHI + BglII | Extremos del fragmento ^a | Ubicación del fragmento dentro de frg. EcoRI | Doble digestión HindIII + BglII | Extremos del fragmento | Ubicación del fragmento dentro de frg. EcoRI |
|-------------------------------|-------------------------------------|--|---------------------------------|------------------------|--|
| 15,1 | Bl-BI (BglII C) | EcoRI F | 14,2 | H-H (HindIII A) | EcoRI D-I-F-E |
| 14,2 | B-B (Bam D) | EcoRI C | 11,6 | H-H (HindIII D) | EcoRI C |
| 11,6 | Bl-BI (BglII D) | EcoRI B | 9,4 | H-H (HindIII F) | EcoRI B-C |
| 11,3 | Bl-BI (BglII E) | EcoRI E | 9,3 | Bl-H | EcoRI E |
| 9,4 | B-B (BamHI E) | EcoRI A | 8,4 | Bl-BI (BglII F) | EcoRI G |
| 8,9 | Bl-BI (BglII G) | EcoRI D | 6,5 | Bl-H | EcoRI D |
| 7,1 | B-BI | EcoRI G | 6,4 | Bl-BI (BglII H) | EcoRI A |
| 6,4 | Bl-BI (BglII H) | EcoRI A | 5,3 | H-H (HindIII G) | EcoRI B |
| 4,3 | B-BI | EcoRI A-C | 5,3 | H-BI | EcoRI A |
| 4,2 | Bl-BI (BglII J) | EcoRI G-H | 4,8 | H-BI | EcoRI H-A |
| 4,1 | Bl-B | EcoRI B | 4,3 | Bl-BI (BglII J) | EcoRI G-H |
| 3,9 | B-BI | EcoRI H-A | 3,9 | H-H (HindIII J) | EcoRI A |
| 3,3 | Bl-B | EcoRI H | 3,9 | H-H (HindIII I) | EcoRI A |
| 3,0 | B-B (BamHI G) | EcoRI A | 3,7 | Bl-H | EcoRI B |
| 2,7 | Bl-BI (BglII K) | EcoRI H | 3,3 | H-BI | EcoRI D |
| 2,6 | Bl-BI (BglII L) | EcoRI B | 3,2 | Bl-H | EcoRI H |
| 2,0 | Bl-BI (BglII M) | EcoRI A-B | 2,7 | Bl-BI (BglII K) | EcoRI H |
| 1,9 | Bl-B | EcoRI E-G | 2,6 | Bl-BI (BglII L) | EcoRI B |
| 1,6 | Bl-B | EcoRI H | 2,1 | H-BI | EcoRI B |
| 1,3 | B-B (BamHI H) | EcoRI A | 2,1 | H-H (HindIII L) | EcoRI A |
| 0,78 | Bl-BI (BglII N) | EcoRI E | 2,0 | H-BI | EcoRI E |
| 0,69 | B-BI | EcoRI A | 1,9 | Bl-BI (BglII M) | EcoRI A-B |
| 0,28 | B-B (BamHI I) | EcoRI G | 1,3 | H-H (HindIII M) | EcoRI A |
| 0,10 | B-B (BamHI J) | EcoRI A | 1,3 | Bl-H | EcoRI D |
| | | | 0,90 | H-H (HindIII N) | EcoRI D |
| | | | 0,78 | Bl-BI | EcoRI E |
| | | | 0,53 | Bl-H | EcoRI H |
| | | | 0,45 | Bl-H | EcoRI A |
| Peso total: 120,75 | | | Peso total: 122,03 | | |

^a En caso que el fragmento de doble digestión coincidiese con un fragmento de digestión simple el mismo se indica entre paréntesis.

Fragmentos descartados

De acuerdo a los análisis de los fragmentos de restricción mostrados, pudo determinarse que algunos fragmentos provendrían de digestiones parciales: EcoRI + BglII: 7,7 kpb y 1,1 kpb; BamHI + HindIII: 14,8 kpb; EcoRI + HindIII: 2,5 kpb y 1,0 kpb.

Confirmación de la presencia y el tamaño de sitios de restricción por análisis de secuencias terminales de fragmentos clonados

Uno de las metodologías elegidas para verificar la validez del mapa de restricción, fue confirmar que los sitios de digestión predichos se encontraran cercanos a los extremos de los fragmentos clonados. Se escogieron estos sitios dada la disponibilidad de secuencias. Todos los fragmentos predichos pudieron ser confirmados (Tabla 5.18), excepto un fragmento muy pequeño EcoRI-BamHI que se encontraba dentro de EcoRI C. Este sitio no pudo ser confirmado debido a la imposibilidad de obtener una secuencia de buena calidad de este extremo. Además, se localizó un sitio HindIII a 8 pb de un sitio HindIII en el fragmento genómico EcoRI D. En algunos casos los sitios fueron confirmados por la secuencia de clones que presentaron solapamiento, como el fragmento de 67 pb de extremos EcoRI y BglII.

Tabla 5.18. Análisis de clones que presentaron sitios de restricción en sus secuencias terminales.

| Clon | Tamaño (en kpb) | Frg. genómico corresp. | Primers empleados | Sitio de restricción | Extremos del fragmento | Tamaño del frg. (pb) | Tamaño predicho (en pb) |
|-------------|-----------------|------------------------|-------------------|----------------------|------------------------|----------------------|-------------------------|
| BglII 29 | 2,0 | BglII M | M13D | EcoRI | BglII- EcoRI | 67 | 100 |
| EcoRI 8 | 27,6 | EcoRI A | Sp6 | BglII | EcoRI-BglII | 67 | 100 |
| EcoRI 28 | 14,6 | EcoRI C | T7 | BamHI | EcoRI-BamHI | 190 | 200 |
| EcoRI 3 old | 14,4 | EcoRI D | T7 | HindIII | EcoRI-HindIII | 325 | 300 |
| EcoRI 3 old | 14,4 | EcoRI D | Sp6 | HindIII | EcoRI-HindIII | 8 | - |
| EcoRI 5N | 14,3 | EcoRI E | T7 | BglII | EcoRI-BglII | 295 | 300 |

Conclusiones

- Se determinaron los mapas de restricción de los clones EcoRI, BamHI, HindIII y BglII del genoma de EpapGV mediante experimentos de restricción enzimática y análisis de los fragmentos de restricción.
- Se determinó el tamaño del genoma de EpapGV en 120,1 kpb.
- Se analizaron "clones espurios", producto de digestiones parciales y religaciones, así como otros posiblemente originados en el clonado de variantes virales minoritarias.
- Un 60% del genoma viral fue hibridado en ensayos de *Southern blot* con el DNA de EpapGV y con bibliotecas de clones BglII y HindIII, contribuyendo a la determinación del mapa de restricción.
- Se determinó la polaridad de la mayoría de los fragmentos genómicos clonados BglII y HindIII.
- Los fragmentos pequeños EcoRI I, BamHI I y BamHI J, fueron ubicados en el mapa de restricción.
- Se alinearon los distintos fragmentos generando un mapa físico continuo del DNA genómico de EpapGV.
- Las contigüidades predichas en el mapa fueron corroboradas mediante ensayos de PCR.
- El mapa generado fue confirmado mediante el análisis de las dobles digestiones del genoma de EpapGV.
- Los sitios de restricción situados en los extremos de los fragmentos clonados, se confirmaron mediante la secuencia de los extremos de estos fragmentos.

CAPÍTULO 6

GEN DE GRANULINA: UBICACIÓN, CLONADO, SECUENCIA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Introducción

Una de las características prominentes de los baculovirus es la capacidad de persistir bajo condiciones ambientales adversas. Para ello se han valido de una estrategia simple: recubrir su virión con una gran masa proteica llamada cuerpo de oclusión o de inclusión (*Occlusion body*, OB). El 95% de la masa del OB está constituido por una única proteína de alrededor de 30 kDa (Bergold, 1964).

Los OBs de los *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) contienen, en general, más de un virión por cuerpo de inclusión, sus formas son regulares en arreglos del tipo poliédricos, y la proteína mayoritaria se denomina poliedrina. Los cuerpos de inclusión de los *Granulovirus* (GVs) son más pequeños, de formas ovoides y, en general, sólo presentan un virión por cuerpo de inclusión. La proteína mayoritaria del cuerpo de inclusión, de los GVs, granulina, presenta una alta similitud con respecto a la poliedrina.

Algunos otros virus de insectos de las familias *Reoviridae* (Virus de la Poliedrosis Citoplásmica, CPV) (Payne & Mertens, 1983) y *Poxviridae* (Entomopoxvirus, EPV) (Arif, 1984), al igual que los baculovirus, también ocluyen sus viriones en matrices cristalinas como una estrategia para garantizar la persistencia de estos organismos en medios ambientes hostiles (luz UV, deshidratación). Sin embargo, existen diferencias sustanciales entre estas familias virales, los CPV son virus con genomas segmentados de RNA doble cadena, en tanto que los EPV poseen un genoma a DNA de doble hebra, lineal y de gran tamaño.

Los virus de la poliedrosis citoplásmica (por ejemplo *Choristoneura fumiferana* CPV) ocluyen a sus viriones con una proteína de inclusión de llamada poliedrina. Sin embargo, pese a que ésta proteína tiene un tamaño similar a las poliedrinas/granulinas de los baculovirus (alrededor de 29 kDa), la similitud aminoacídica entre ellas es escasa.

Con respecto a los EPV, éstos virus ocluyen a sus viriones en cuerpos de inclusión de forma elipsoidal llamados esférulas, compuestas principalmente por esferoidina, también conocida como spindilin, una proteína cuyo tamaño varía de 38,5 kDa a 102 kDa. Esta proteína presenta cierta homología la proteína GP37 de los baculovirus, aunque su función aún no ha sido establecida. De acuerdo con estas y otras evidencias, Rohrmann (1986), ha postulado que las proteínas de inclusión de baculovirus, EPV y CPV respectivamente, han surgido a lo largo de la evolución, en tres eventos independientes.

El nivel de expresión de las proteínas de inclusión es muy alto y alcanza el 50% de las proteínas totales de las células infectadas (Smith *et al.*, 1983). Las proteínas de inclusión no son esenciales para la infección secundaria de célula a célula dentro del insecto, ni están involucradas en la replicación viral. El carácter no esencial de la poliedrina ha favorecido permitido su empleo en biotecnología. En particular, se ha logrado expresar numerosas proteínas eucariotas si se reemplaza el gen de la proteína mayoritaria por otro foráneo y se coloca el nuevo gen bajo el control del promotor de poliedrina (Pennock *et al.*, 1984; Smith *et al.*, 1983).

Objetivos

- Ubicar al gen de granulina en el mapa de restricción de EpapGV.
- Clonar el gen y sus regiones flanqueantes.
- Analizar las regiones no traducidas en busca de motivos transcripcionales.
- Analizar, de forma preliminar, la filogenia de EpapGV a partir de secuencia del gen de granulina.
- Emplear el ordenamiento de genes alrededor del gen de granulina como herramienta para el análisis de la filogenia.

Resultados y discusión

Estrategia empleada

El DNA genómico de EpapGV digerido de forma simple con las enzimas EcoRI, BamHI, HindIII y BglII, se analizó por *Southern blot* para la búsqueda y ubicación del gen de granulina empleando una sonda heteróloga del gen de granulina de *Trichoplusia ni* GV (TnGV). Aquellos clones de DNA genómico que contenían los fragmentos identificados se digirieron y rehibridaron con la sonda heteróloga, confirmando la ubicación del gen. Los fragmentos clonados que resultaron positivos para la sonda de granulina fueron secuenciados desde ambos extremos. Estas secuencias fueron traducidas a proteínas y los marcos se compararon por BLAST con el GenBank. Las secuencias obtenidas permitieron generar el ORF completo de la granulina y sus regiones adyacentes *upstream* y *downstream*. A partir de esta secuencia, se diseñaron pares de *primers* para amplificar el ORF completo y sus regiones adyacentes. El producto de esta amplificación fue clonado en el vector pZErO-2™ y secuenciado. La secuencia derivada del producto de clonado no difirió de la secuencia directa del fragmento amplificado ni de la generada inicialmente a partir de los extremos de los fragmentos genómicos. La secuencia nucleotídica fue analizada en busca de elementos promotores y terminadores y se definió un nuevo motivo con posibles roles transcripcionales. A partir de la secuencia aminoacídica del gen de granulina se construyeron árboles filogenéticos, éstos dividieron a los GVs en dos grupos. El resultado del agrupamiento filogenético fue avalado al encontrar correlaciones entre los grupos y el orden de genes alrededor del gen de granulina.

Ubicación del gen de granulina por *Southern blot* del DNA genómico de EpapGV

A fin de ubicar el gen de granulina en los fragmentos genómicos se efectuó un ensayo de *Southern blot* con el DNA de EpapGV digerido con distintas enzimas de restricción, tal como se describe en materiales y métodos. La hibridación se llevó a cabo con una sonda heteróloga correspondiente al gen de la granulina de TnGV (Ghiringhelli *et al.*, 1996) sobre el DNA viral digerido de forma simple (Fig. 6.1, Tabla 6.1).

Los resultados mostraron que el gen de granulina estaba contenido en dos fragmentos EcoRI, un fragmento HindIII, en un fragmento BglII y, posiblemente, en varios fragmentos BamHI (Fig. 6.1). Los tamaños de los fragmentos genómicos que

presentaron señal positiva con la sonda de granulina de TnGV se muestran en la tabla 6.1. A partir de sus intensidades relativas, se estableció que uno de los fragmentos EcoRI (EcoRI 10,85 kpb) contendría la mayor parte del gen, en tanto que la otra parte debía estar en el fragmento EcoRI de 14,4 kpb. Con respecto a los clones BamHI, sólo una parte del gen se encontraría en el fragmento BamHI de 15,65 kpb; la parte faltante del gen no pudo atribuirse a otro fragmento, debido a la débil señal de las restantes bandas. Las bandas HindIII 19,58 kpb y BglII 9,4 kpb, aparentemente, contendrían al gen completo. La leve hibridación de la sonda con el marcador de peso molecular (DNA del fago λ digerido con HindIII), se podría deber a las condiciones de lavado no totalmente estrictas. En particular, la hibridación se habría producido por la presencia en la sonda granulina-TnGV, de secuencias del *polylinker* del vector de clonado (pGEM T, Promega, EE.UU.) remanentes de la digestión.

Tabla 6.1. Fragmentos genómicos que presentaron hibridación positiva para la sonda de granulina de TnGV.

| Digestión | Tamaño del fragmento (en kpb) | Posible fragmento genómico |
|-----------|-------------------------------|----------------------------|
| EcoRI | 10,85 y 14,48 | C, D o E y G |
| BamHI | 15,65 | C |
| HindIII | 19,58 | B o C |
| BglII | 9,4 | F o G |

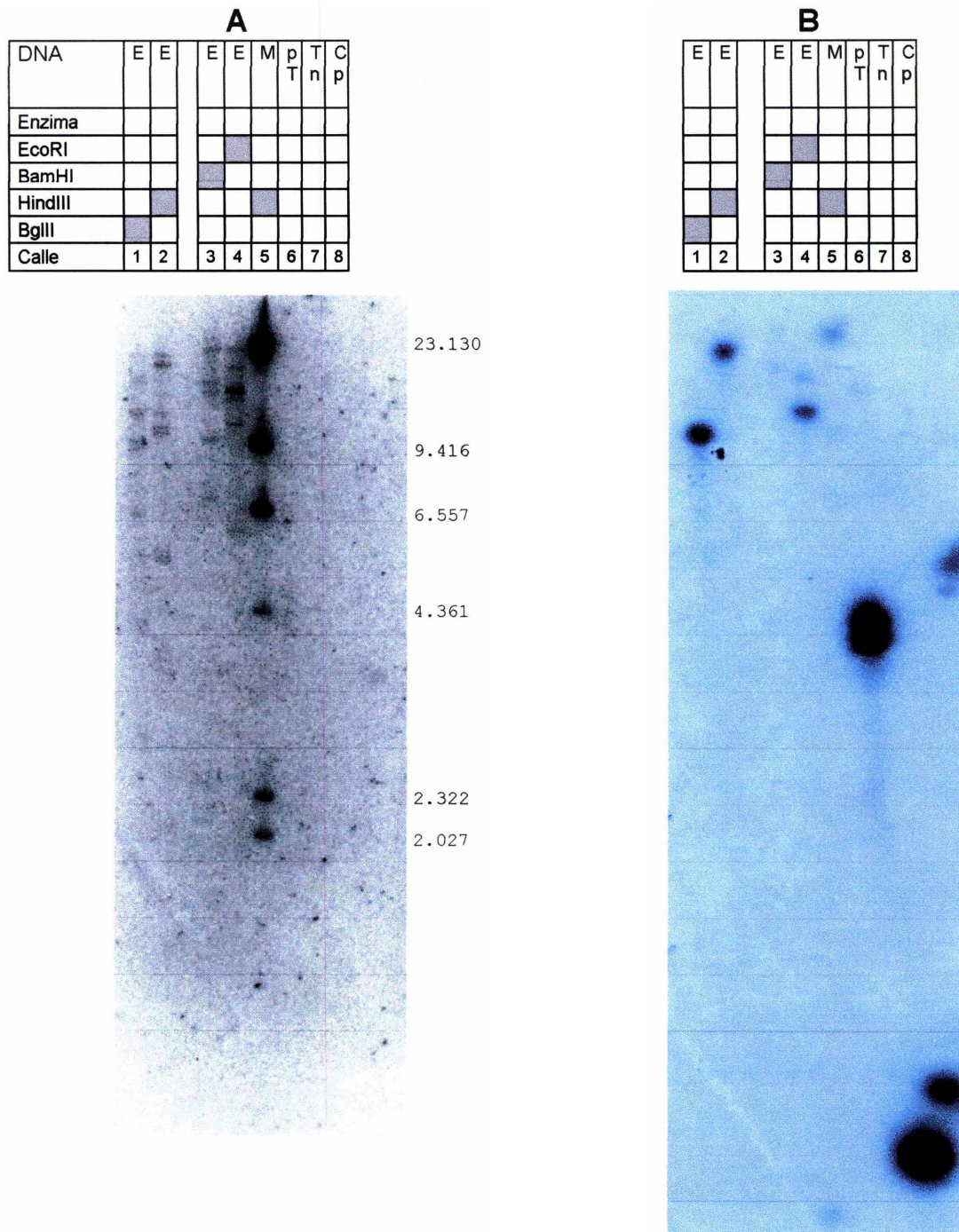


Figura 6.1. Hibridación del DNA de EpapGV con la sonda del gen de granulina de TnGV. (A), DNA de EpapGV digerido con las enzimas de la tabla, resuelto en gel de agarosa 0,7% y visualizado por transiluminación con luz UV luego de la tinción con bromuro de etidio (BrEt). (B), resultado de la hibridación de la sonda de granulina de TnGV sobre el DNA de EpapGV. En la figura B a la altura de 5.000 pb se ubica una mancha radiactiva no asociada a ninguna calle. Referencias: E, DNA de EpapGV; M, marcador de peso molecular (MPM) DNA del fago λ . Los tamaños de los fragmentos visualizados en el gel se indican a la derecha de la figura A; pT, DNA plasmídico conteniendo el gen de granulina de TnGV; Tn, gen de granulina de TnGV, digerido y eluído previamente; Cp, gen de granulina de CpGV, digerido y eluído previamente.

Construcción de mapas de restricción para fragmentos clonados que hibridaron con la sonda de granulina de TnGV

El mapa de restricción de la región genómica que contiene al gen de granulina, fue determinado de la superposición de los mapas de fragmentos clonados. Para ello, se seleccionaron los clones de los fragmentos genómicos que presentaron hibridación con la sonda de granulina de TnGV (Fig. 6.1). En particular, el DNA de los clones BgIII 35 y 57 (fragmento BgIII F; 9,4 kpb), BgIII 68 (12,1 kpb) y EcoRI 12 (fragmento EcoRI G; 10,85 kpb) y BamHI i (fragmento BamHI C; 15,65 kpb) fue digerido con diferentes combinaciones de las enzimas de restricción (simples, dobles, triples y cuádruples). Los fragmentos se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa y del análisis sus tamaños, se determinaron sus mapas de restricción (Fig. 6.2).

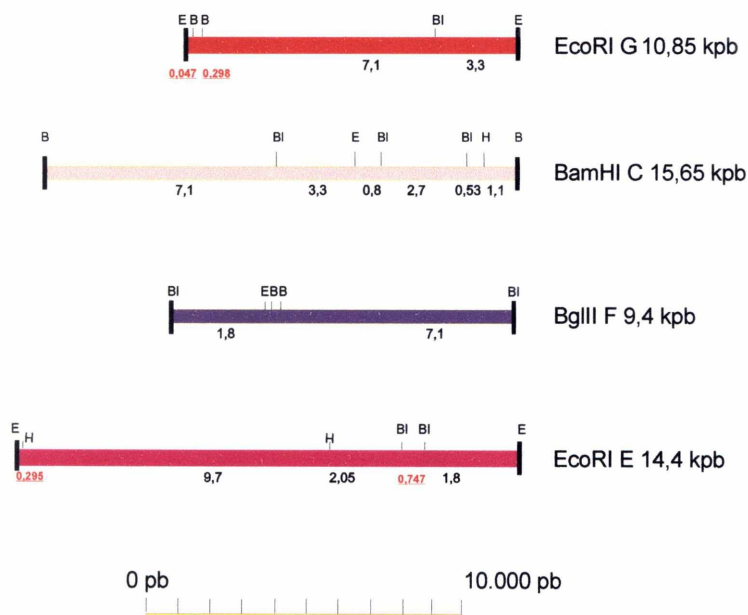


Figura 6.2. Mapas de restricción de fragmentos que presentaron hibridación positiva para el gen de granulina. El tamaño está expresado en kpb.

Para componer el mapa de la región genómica se superpusieron los mapas de los fragmentos clonados **EcoRI G**, **BgIII F** y **BamHI C** gracias a la presencia de regiones compartidas. La generación de un mapa de esta región fue de especial utilidad para la búsqueda del fragmento genómico EcoRI E de 14,4 kpb, del cual en un primer momento no se contaba con ningún clon. Basándose en el mapa generado, se buscaron fragmentos EcoRI que al ser digeridos con BgIII presentasen una banda de 747 pb (Fig. 6.3). Una vez que se determinó la identidad de un clon EcoRI E, su mapa se estableció por digestión con enzimas de restricción (Fig. 6.3), extendiéndose así la región mapeada hasta ese momento. Más tarde, al secuenciar el plásmido con el

inserto EcoRI G (10,85 kpb) desde ambos extremos, se detectó la presencia de un sitio BamHI en la región correspondiente al gen de granulina, a 47 pb del sitio EcoRI.

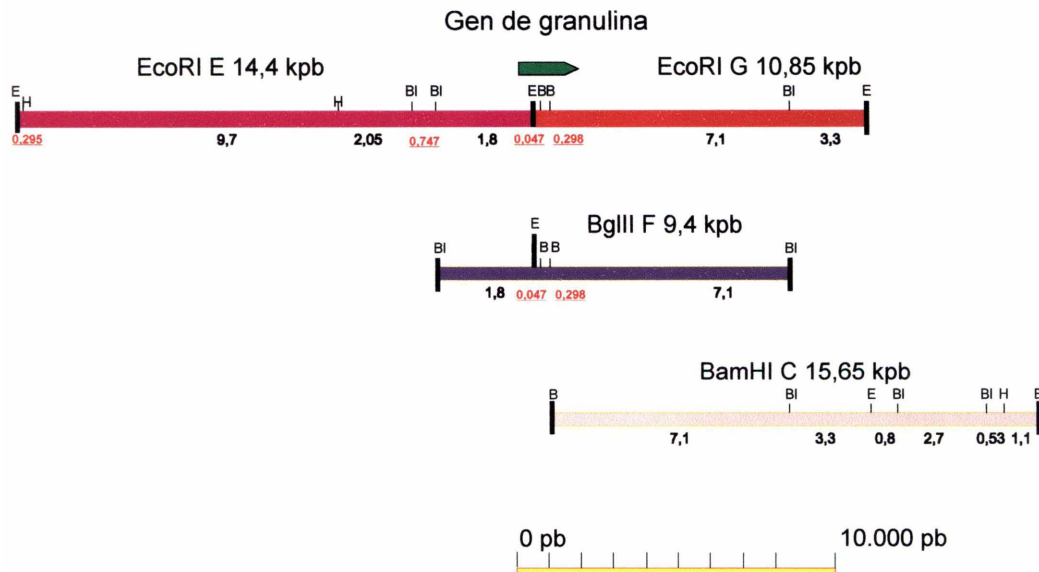


Figura 6.3. Ubicación del gen de granulina. Los fragmentos de DNA clonados, parcialmente superpuestos, fueron alineados basándose en sus patrones de restricción y los experimentos de *Southern blot* con la sonda de granulina de TnGV. El tamaño está expresado en kpb.

Confirmación de la posición del mapa de la región del gen de granulina por *Southern blot* sobre los clones de BglIII 35 y 68

Para confirmar la ubicación del gen de granulina en la región del mapa se realizó un ensayo de *Southern blot* sobre las digestiones dobles y simples de los clones BglIII 35 (9,4 kpb) y 68 (12,1 kpb) hibridándolos con la sonda heteróloga de granulina marcada con [α 32 P] dATP. Estos clones, fueron seleccionados por contener la región completa del gen de granulina.

Inicialmente, se determinó que el fragmento clon BglIII 68 presentaba dos insertos de 9,4 kpb (fragmento BglIII F) y 2,7 kpb. Con posterioridad, se comprobó que el fragmento de 2,7 kpb correspondía al fragmento genómico BglIII K. En las figuras 6.4 y 6.5 se puede observar que la sonda del gen de granulina hibridó con los fragmentos: BglIII - EcoRI de 1.800 pb, BamHI - BamHI de 300 pb, BamHI - BglIII de 7.200 pb, pertenecientes al clon BglIII 35 de 9,4 kpb (fragmento BglIII F).

El fragmento BglIII - BglIII de 2,7 kpb del clon BglIII 68 no presentó hibridación alguna, tal como lo predicho en el mapa, por tratarse de una región fuera del gen de granulina (Fig. 6.3). En la Fig. 6.5 se observó la hibridación de la sonda con secuencias del vector de clonado (pZErO-2TM). Esta señal podría deberse a la presencia en la sonda,

de una secuencias de 38 nucleótidos derivadas del *polylinker* del vector de clonando de granulina-TnGV (pGEM T) o a regiones de la sonda con similitud aleatoria respecto a (pZErO-2TM). Estos resultados permitieron corroborar la ubicación del gen de granulina como se describe en la Fig. 6.3.

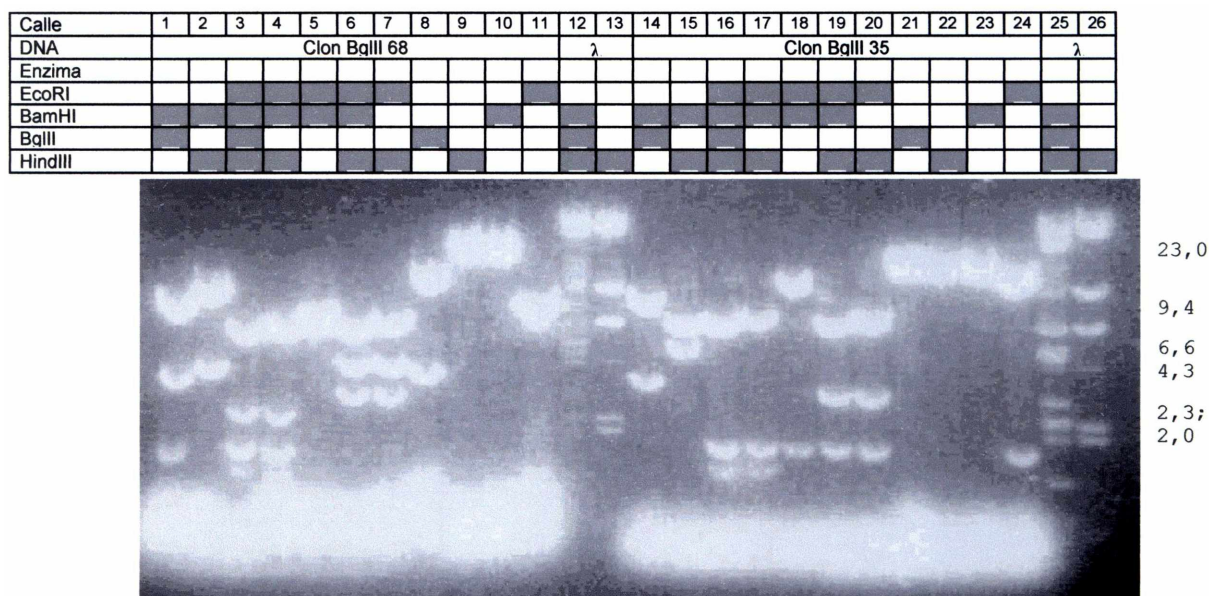


Figura 6.4. Fotografía que muestra a los clones BglII 35 y 68 digeridos con diferentes enzimas de restricción y resuelto en gel de agarosa 0,5%. A bajos pesos moleculares se observa la presencia de RNA. Los pesos (en kpb) del MPM (DNA de λ digerido con HindIII) se indican a la derecha de la figura.

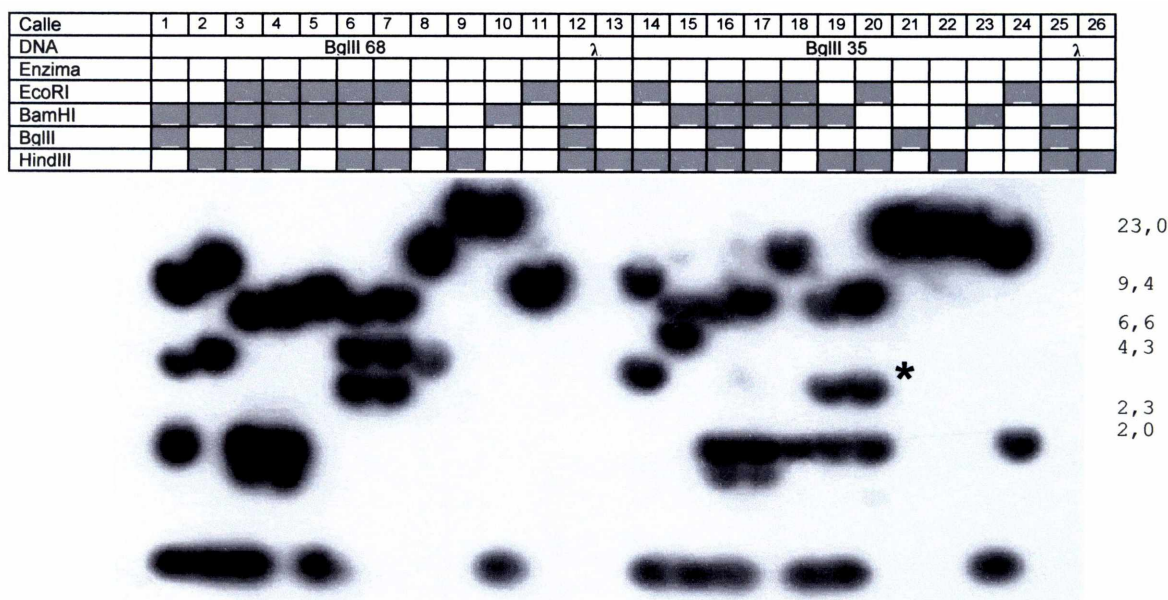


Figura 6.5. Autorradiografía de la membrana que contiene los clones BglII 35 y 68 digeridos con diferentes enzimas de restricción, resuelto en gel de agarosa 0,5% e hibridados con la sonda TnGV granulina marcada con [α ³²P] dATP. λ: DNA del fago λ. Los pesos (en kpb) del MPM (DNA de λ digerido con HindIII) se indican a la derecha de la figura. El DNA de λ presenta digestión parcial, (calle 12). El asterisco indica la hibridación de la sonda con el DNA del plásmido pZErO-2^T linealizado (3,3 kpb) sin inserto.

Clonado del gen de granulina

Para contar con el marco de lectura continuo del gen de granulina en un solo clon, se escogió una estrategia de clonado de productos de PCR, que resultaron de la amplificación del gen y de sus regiones flanqueantes.

En la reacción de amplificación se utilizaron los *primers* gr-dn y gr-up (gr-up: 5'-TTACAACAGCGACGTGT-3'; gr-dn: 5'-CGCTTGACTCAGTAGAT-3') (Fig. 6.6), sobre moldes de DNA genómico de EpapGV y de distintas preparaciones de clones BgIII (BgIII F, clon 57 preparaciones a, b c y d; clon BgIII 68). La reacción de PCR generó productos del tamaño esperado (886 pb) (Fig. 6.6).

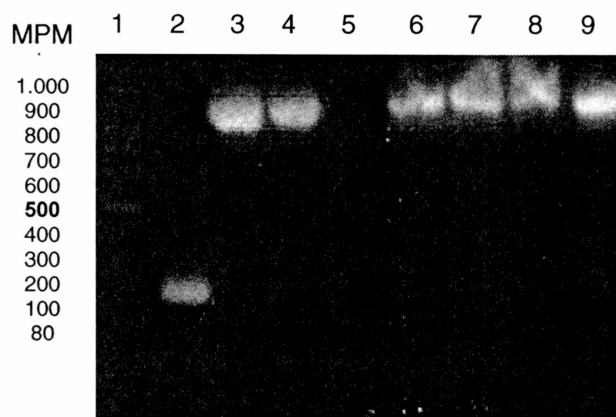


Figura 6.6. Gel de agarosa 1,5% con los productos de la reacción de PCR para amplificar el gen de granulina. Calle 1, MPM "100 pb"; calle 2, control positivo: reacciones de PCR con *primers* BamHI I *Sp6* y BamHI *T7* sobre DNA genómico de EpapGV; calles 3 y 4, reacciones de PCR con *primers* gr-up y gr-dn sobre dos muestras de DNA genómico; calles 5 a 9, reacciones de PCR con *primers* gr-up y gr-dn sobre distintas preparaciones de clones BgIII; calle 5, clon BgIII 57a; calle 6 clon BgIII 57b; calle 7, clon BgIII 57c; calle 8, clon BgIII 57d; calle 9, clon BgIII 68. A la izquierda de la figura se indican los pesos del MPM.

Los productos generados en la reacción de PCR, sobre DNA genómico de EpapGV y con el DNA del clon BgIII 57 (preparación a) fueron ligados al vector pZErO-2™ previamente digerido con la enzima EcoRV. Los productos de ligación se usaron para transformar bacterias *E. coli* Top10™ electrocompetentes (Invitrogen, CA). Las colonias obtenidas fueron analizadas por PCR utilizando los *primers* internos 5N *Sp6* (5'-AGCCACGAGTTGCTACA-3') y 5G *Sp6* (5'-TCTCGCATGACGTAGCA-3'), empleando como fuente de DNA molde lisados de bacterias de cada una de las colonias (Fig. 6.7). Los resultados indicaron la presencia de tres clones provenientes del clonado de productos de amplificación sobre DNA genómico de EpapGV y siete colonias obtenidos por amplificación de distintas preparaciones del clon BgIII 57.

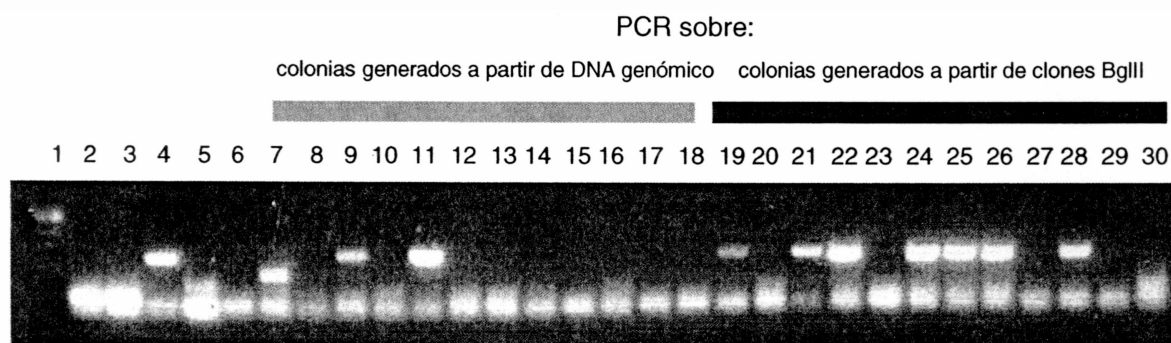


Figura 6.7. Identificación de clones de granulina de EpaGV. Los productos de amplificación del gen de granulina sobre distintos moldes se resolvieron en gel de agarosa 1,5%. Calle 1, MPM “100 pb”; calle 2, reacción de PCR con los *primers* T7 y Sp6 sobre la reacción de ligación; calle 4, control positivo: reacción de PCR con los *primers* 5N Sp6 y gr-dn sobre DNA de EpaGV; calle 5, control positivo: reacción de PCR con los *primers* BamHI i Sp6 y BamHI T7, empleando como molde DNA genómico; calle 6, control negativo: reacción de PCR con los *primers* 5N Sp6 y gr-dn, sobre agua; **calles 7-18**, reacciones de PCR con los *primers* 5N Sp6 y gr-dn sobre colonias obtenidos a partir de reacciones de ligación de productos de PCR empleando DNA de clones BglIII como moldes; **calles 19-30**, reacciones de PCR con los *primers* 5N Sp6 y gr-dn sobre estrías de colonias generados a partir de reacciones de ligación de productos de PCR empleando DNA de clones BglIII.

Secuenciamiento del gen de granulina

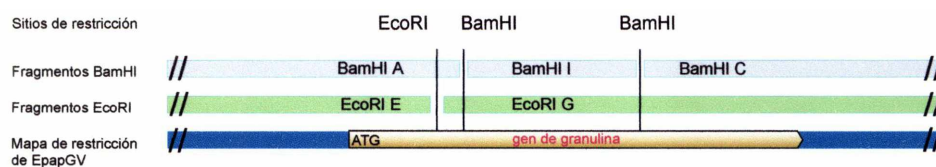
Estrategia empleada para obtener la secuencia completa del gen de granulina

Con el fin de obtener la secuencia completa del gen de granulina y asegurar la misma por lectura reversa, se utilizó un método iterativo. Inicialmente, se secuenciaron todos los clones que contenían partes del gen de granulina de acuerdo con los resultados del *Southern blot* de la figura 6.1 y de acuerdo con el mapa de la figura 6.3 [fragmento EcoRI E (clon EcoRI 5N), fragmento EcoRI G (clon EcoRI 5G), fragmento BamHI C, fragmento BamHI I (clon BamHI a)] (Fig. 6.8). Además, se secuenciaron tres clones diferentes que contenían al fragmento BamHI i. Con esas secuencias se generó un apilamiento que abarcaba la totalidad del ORF. A partir de este apilamiento se diseñaron *primers upstream* del ATG (*gr-up*) y *downstream* del sitio de terminación (*gr-dn*) (Fig. 6.8 y 6.9). Los *primers* *gr-up* y *gr-dn* se emplearon para amplificar el gen de granulina y sus regiones flanqueantes. El producto amplificado PCR fue secuenciado, empleando para ello, los *primers* de amplificación más dos *primers* internos (5N Sp6 y 5G Sp6). Posteriormente, se clonaron los productos de amplificación y se secuenciaron tres clones obtenidos por PCR sobre el molde de DNA de clones BglIII (clones 3.1, 3.2 y 3.3).

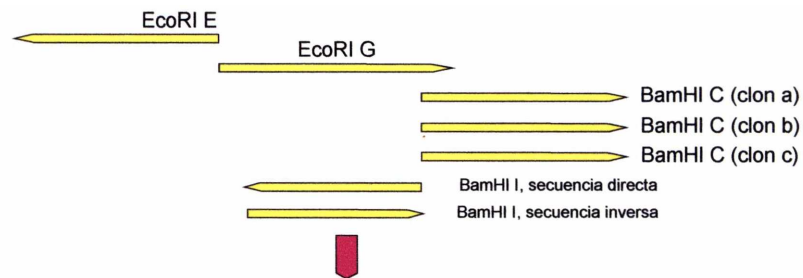
En conjunto, todas las lecturas generaron una secuencia continua del gen de granulina y de sus regiones flanqueantes. Estas secuencias fueron alineadas y al se compuso una secuencia consenso (Fig. 6.10). Como mínimo, se obtuvieron seis lecturas de

secuencia por cada nucleótido, algunas en el sentido directo y otras en el sentido reverso. El ATG del gen de granulina se usó como el punto cero del mapa de restricción (Crook *et al.*, 1997).

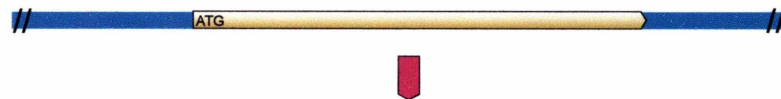
Ubicación del gen de granulina en el mapa de restricción



Fragmentos genómicos secuenciados



Composición de la secuencia de granulina y regiones flanqueantes



Secuencias con primers específicos sobre DNA genómico y sobre clones del gen de granulina

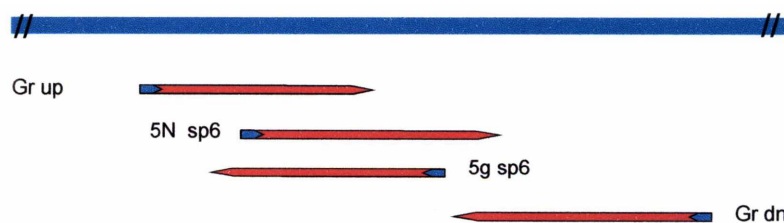


Figura 6.8. Región del gen de granulina. Ubicación de los fragmentos genómicos secuenciados (en amarillo), así como las secuencias obtenidas por *primers* externos e internos (en rojo). Los nombres de los clones se aprecian a la derecha de la barra que indica la secuencia obtenida. Se secuenciaron tres clones BamHI C.

| | |
|-----------------|-------------------------|
| 5N <i>Sp6</i> : | 5'-AGCCACGAGTTGCTACA-3' |
| 5G <i>Sp6</i> : | 5'-TCTCGCATGACGTAGCA-3' |
| gr-up: | 5'-TTACAACAGCGACGTGT-3' |
| gr-dn: | 5'-CGCTTGACTCAGTAGAT-3' |

Figura 6.9. Primers utilizados en reacciones de secuencias de clones que contenían al gen de granulina.

Secuencia completa del gen de granulina y de sus regiones adyacentes

A partir de la secuencia nucleotídica de la región del gen de granulina se determinó que éste contiene un marco de lectura abierto 747 nucleótidos, que codifica para una proteína de 248 aminoácidos (Fig. 6.10). Esta proteína tiene un peso teórico de 29,1 kDa. Este peso es muy similar al estimado por SDS-PAGE ($28,5 \pm 0,5$ kDa), para más detalles ver el capítulo 3.

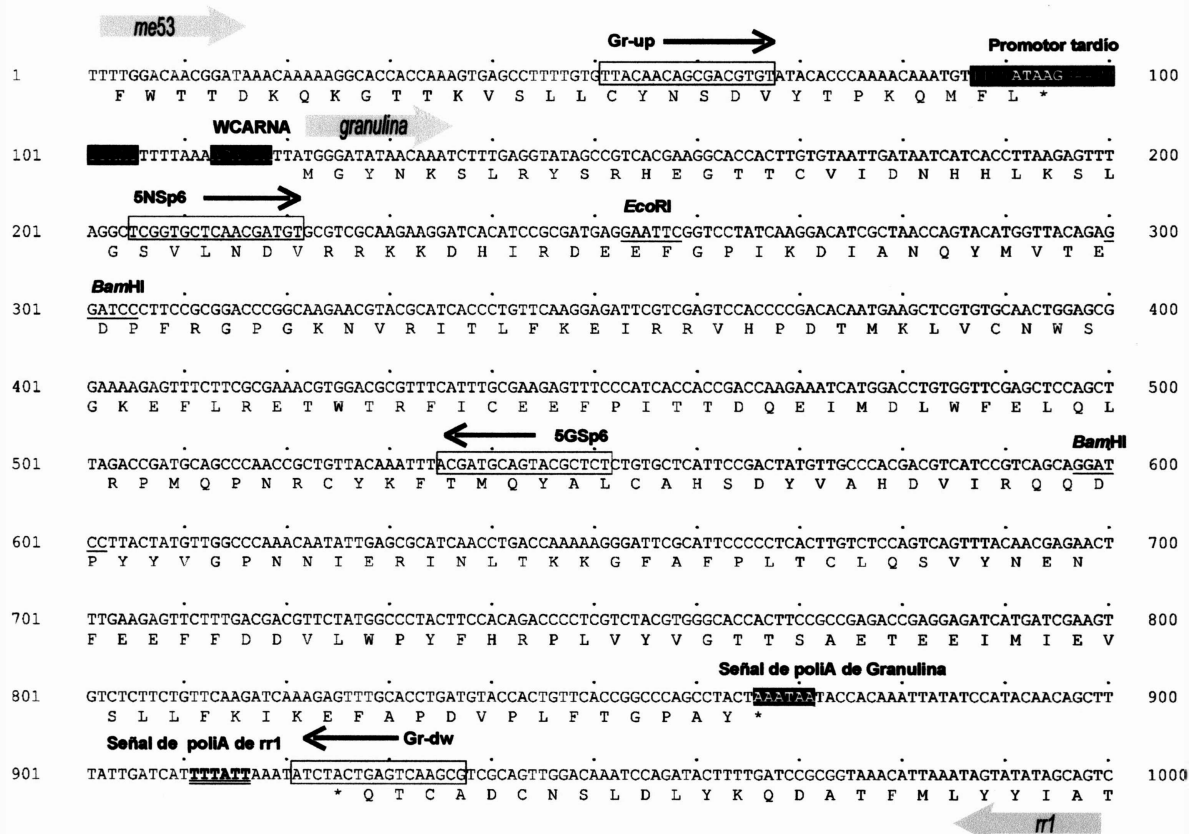


Figura 6.10. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la región del gen de granulina. El gen de granulina así como dos ORF parciales adyacentes (*me53* y la sub-unidad mayor de la ribonucleotídica reductasa, *rr1*) fueron traducidos y sus sentidos de traducción se indican con flechas grises y anchas. Los aminoácidos se muestran con letras mayúsculas debajo de la secuencia nucleotídica. Los posibles motivos transcripcionales y señales de poliadenilación para el gen de granulina se muestran como cajas negras. El núcleo del promotor tardío ATTAG está resalado en blanco dentro de una caja con fondo negro. La posible señal de poliadenilación del gen *rr1* se indica en negrita y con doble subrayado. Las secuencias de los primers (o de sus secuencias complementarias) se indican en cajas y la dirección de los mismos se señala con una flecha negra y con sus nombres respectivos. Los sitios de restricción EcoRI y BamHI están subrayados. La secuencia de EpapGV entre los primers Gr-up y Gr-dw tiene el número de acceso al GenBank AF473703.

La secuencia amino-terminal de la proteína, deducida de la secuencia nucleotídica fue concordante con los datos obtenidos por microsecuenciamiento de péptidos, excepto por la ausencia del aminoácido metionina (M) determinada por esta última técnica. En la única otra secuencia amino-terminal de una granulina (*Agrotis segetum* GV), obtenida a partir del análisis directo de la proteína tampoco se encontró la metionina. Es probable que la ausencia de este residuo se deba a un procesamiento postraduccional de la proteína (Sciocco-Cap *et al.*, 2001).

Análisis comparativo de identidades y similitud a nivel aminoacídico para genes de granulina

La comparación de identidades y similitudes entre el gen de granulina de EpapGV y otras proteínas de la familia de los *Granulovirus*, indicó que el rango de identidad varió entre 81,4 a 92,7% y el grado de similitud a nivel aminoacídica entre 91,9 a 98% (Tablas 6.2 y 6.3). La granulina de CIGV presentó los porcentajes de identidad y de similitud más altos respecto de la granulina de EpapGV. Los porcentajes más bajos para los mismos parámetros correspondieron a la granulina de AsGV. En general, las granulinas pertenecientes a *Granulovirus* del grupo II (XcGV, TnGV y SpliGV), así como AsGV y PbGV, presentaron los menores porcentajes de identidad respecto de EpapGV.

Tabla 6.2. Comparación de las relaciones de identidad entre secuencias aminoacídicas de genes de granulina. La tabla fue calculada a partir de un alineamiento múltiple de genes de granulina (Fig. 6.11). En gris se indican los mayores y menores porcentajes de identidad entre granulinas. Además, se han introducido en esta comparación los genes de poliedrina de AcMNPV y NsNPV.

| | AsGV | CfGV | CpGV | CIGV | HbGV | PbGV | PxGV | TnGV | XcGV | PhopGV | SpliGV | AcNPV | NsNPV |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|-------|-------|
| EpapGV | 81,4 | 90,7 | 92,3 | 92,7 | 91,5 | 82,2 | 86,2 | 87,9 | 88,3 | 90,3 | 88,0 | 54,4 | 34,6 |
| AsGV | | 82,2 | 83,0 | 82,2 | 81,0 | 75,7 | 77,3 | 79,8 | 79,8 | 79,8 | 79,1 | 49,6 | 33,1 |
| CfGV | | | 94,7 | 93,1 | 91,1 | 83,8 | 85,4 | 87,9 | 88,3 | 91,5 | 86,3 | 53,6 | 36,3 |
| CpGV | | | | 97,6 | 93,9 | 83,8 | 85,0 | 86,6 | 87,0 | 95,1 | 86,7 | 55,6 | 34,6 |
| CIGV | | | | | 95,1 | 84,2 | 85,0 | 87,0 | 87,4 | 93,9 | 87,1 | 55,2 | 34,0 |
| HbGV | | | | | | 83,4 | 84,6 | 85,4 | 85,8 | 91,5 | 85,1 | 54,0 | 34,4 |
| PbGV | | | | | | | 78,1 | 76,9 | 77,3 | 83,4 | 77,5 | 55,8 | 34,4 |
| PxGV | | | | | | | | 86,2 | 86,6 | 85,8 | 84,3 | 52,8 | 35,7 |
| TnGV | | | | | | | | | 99,6 | 85,0 | 92,8 | 52,4 | 36,9 |
| XcGV | | | | | | | | | | 85,4 | 93,2 | 52,4 | 36,9 |
| PhopGV | | | | | | | | | | | 84,7 | 54,4 | 34,1 |
| SpliGV | | | | | | | | | | | | 52,6 | 36,4 |
| AcNPV | | | | | | | | | | | | | 44,5 |

Tabla 6.3. Comparación de las relaciones de similitud entre secuencias aminoacídicas de genes de granulina. La tabla fue calculada a partir de un alineamiento múltiple de genes de granulina (Fig. 6.11) empleando la matriz PAM 250. En gris se indican los mayores y menores porcentajes de similitud entre granulinas. Además, se han introducido en esta comparación los genes de poliedrina de AcMNPV y NsNPV.

| | AsGV | CfGV | CpGV | CIGV | HbGV | PbGV | PxGV | TnGV | XcGV | PhopGV | SpliGV | AcNPV | NsNPV |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|-------|-------|
| EpapGV | 91,9 | 97,2 | 96,8 | 98,0 | 97,6 | 95,1 | 95,1 | 96,4 | 96,4 | 96,0 | 94,4 | 73,8 | 61,0 |
| AsGV | | 92,7 | 92,3 | 91,9 | 91,9 | 89,9 | 91,5 | 92,3 | 92,3 | 91,5 | 89,6 | 72,2 | 59,7 |
| CfGV | | | 99,6 | 99,2 | 99,2 | 96,4 | 96,4 | 97,2 | 97,2 | 98,4 | 95,2 | 74,6 | 61,0 |
| CpGV | | | | 98,8 | 98,8 | 96,0 | 96,0 | 96,8 | 96,8 | 98,8 | 94,8 | 74,6 | 61,0 |
| CIGV | | | | | 99,6 | 95,5 | 96,0 | 97,2 | 97,2 | 98,0 | 95,2 | 73,8 | 60,9 |
| HbGV | | | | | | 95,5 | 96,0 | 96,8 | 96,8 | 98,0 | 94,8 | 73,8 | 61,3 |
| PbGV | | | | | | | 95,1 | 94,3 | 94,3 | 95,5 | 92,4 | 74,7 | 62,0 |
| PxGV | | | | | | | | 97,6 | 97,6 | 96,4 | 95,6 | 74,2 | 62,2 |
| TnGV | | | | | | | | | 100 | 96,4 | 97,2 | 74,2 | 62,7 |
| XcGV | | | | | | | | | | 96,4 | 97,2 | 74,6 | 63,1 |
| PhopGV | | | | | | | | | | | 94,4 | 73,8 | 60,6 |
| SpliGV | | | | | | | | | | | | 73,5 | 60,4 |
| AcNPV | | | | | | | | | | | | | 71,7 |

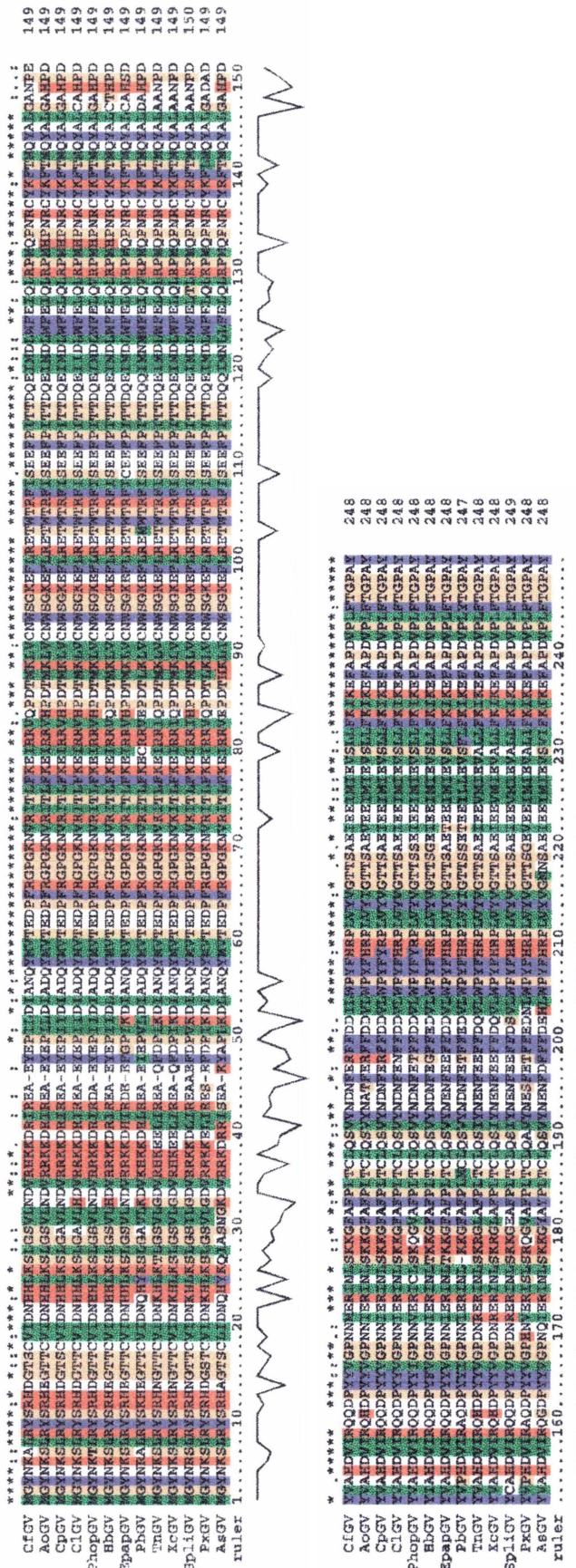


Figura 6.11. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de genes de granulina. Los alineamientos fueron realizados con el programa CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1994), utilizando una penalización para la apertura de gap de 11 y una penalización por extensión de gap de 1 y la tabla de cambios conservativos BLOSUM62. En ambos casos, la última línea muestra sintéticamente la similitud global. Los asteriscos indican identidad, los puntos simples y dobles, indican cambios conservativos y el guión indica un gap.

A partir del apilamiento de genes de granulina (Fig. 6.11) se construyeron perfiles de homología. Los resultados de este análisis indicaron la presencia de dos regiones con un alto grado de conservación, una ubicada en la parte central de la proteína (aminoácidos 57 a 120) y otra en el extremo carboxilo terminal (en los últimos 25 aminoácidos). Por otra parte, se determinó que 155 aminoácidos permanecieron invariables entre las granulinas comparadas (62,5% de los aminoácidos) y 73 aminoácidos están conservados entre poliedrinas y granulinas (29% de los aminoácidos).

Análisis de las regiones flanqueantes al gen de granulina

Empleando el programa BLASTX (Altschul *et al.*, 1990), se pudieron ubicar dos ORFs parciales flanqueando al gen de granulina (Fig. 6.10). El ORF *upstream* codificaría para una proteína que presenta un 48% de similitud con el ORF 909 de CIGV (para 154 aminoácidos comparados) el cual pertenece a la familia del gen *me53* (Jehle & Backhaus, 1994; Manzán *et al.*, 2002a). El ORF *downstream* mostró un 66% de similitud con la sub-unidad mayor del gen de la ribonucleótido reductasa (*rr1*) de OpMNPV para la secuencia de 54 aminoácidos comparados.

Secuencias promotoras y terminadoras

Análisis de la región *upstream* al gen de granulina

Con el objeto de analizar la región *upstream* al gen de granulina de EpapGV en busca de elementos transcripcionales que actúen en *cis*, todos los promotores de granulina conocidos fueron apilados en CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1994) y comparados. A partir de la comparación de 13 secuencias *upstream* de genes de granulina (EpapGV, AoGV, CIGV, CpGV, HbGV, CfGV, PhopGV, XcGV, TniGV, PxGV, SpliGV, PbGV y LoGV), se encontró una secuencia consenso conservada de 19 nucleótidos de largo: 5'-wWTTATAAGGAatTTWwaw-3' ubicada a 34 nucleótidos *upstream* del codón de iniciación de la traducción (W= A o T) (Fig. 6.12). Se indican con mayúsculas los nucleótidos totalmente conservados y en minúsculas aquellos con sólo una divergencia entre las trece secuencias analizadas. Los únicos GVs que contienen estas divergencias con el consenso son: LoGV (un nt), SpliGV (dos nt) y HbGV (tres

nt). Este motivo contiene la secuencia consenso descrita en los promotores de genes expresados tardíamente en los baculovirus ATAAG (Fig. 6.12), y extiende la descrita previamente por Bideshi *et al.* (2000). Además, se ha localizado un hexanucleótido WCARNA (W= A o T y R= A o G) altamente conservado en doce de los trece GVs analizados (excepto en HbGV); llamativamente, SpliGV presentó dos motivos WCARNA. Este motivo está situado entre la región promotora consenso descrita anteriormente y el codón de inicio (ATG) del gen de granulina, hasta el momento no hay ningún informe sobre la presencia o la función de este motivo en los baculovirus.

Además, en la región *upstream* al gen de granulina se encontró el codón de finalización para un ORF homólogo a *me53*, dentro de los 19 nt de la región consenso del promotor del gen de granulina. A diferencia de sus homólogos de CpGV y SpliGV (Crook *et al.*, 1997; Taha *et al.*, 2000) el gen *me53* de EpapGV, aparentemente, carece de señal de poliadenilación.

| | |
|----------------------|---|
| XnGV | AAAATG---ATTTATAAGGAATTTATAT-----CAAAACA--ATG |
| TniGV | AAAATG---ATTTATAAGGAATTTATAT-----CAAAACA--ATG |
| SpliGV | TTTTTG---TATTATAAGGAATTTACACAACA CAAACAACACA--ATG |
| CpGV | GTCAGA---TTTTATAAGGAATTTAATTTTAATAACAACATC--ATG |
| ClGV | AACACT---TTTTATAAGGAATTTAATTTTAATAACAAGAT--ATG |
| EpapGV | AAATGT---TTTTATAAGGAATTTAATTTTAAAACAGTATT--ATG |
| PhopGV | TTCCGA---TTTTATAAGGAATTTTAAATTAA--ACAAT-----ATG |
| AoGV | ATGTTT---AATTATAAGGAATTTAATTTTA--TCAAAACT--ATG |
| CfGV | AAACGA---TTTTATAAGGAATTTAATTTTA--ACAAGAACA--ATG |
| PxGV | CCAATT---TATTATAAGGAATTTTATTTTT--ACAAAAAC--ATG |
| LaolGV | GTTTTATAAGGAATTTTATTTTTA--ACAGAAAATCATG |
| PbGV | GCCGGA---ATTTATAAGGAATTTAATTTTA--ACAAAAT--ATG |
| HbGV | TTAAAT---ATTTATAAGGAGCTTTTAAATTT-----AAAC--ATG |
| Consenso | wTTTATAAGGAatTTWwaw wcaRNA |
| Consenso restringido | wTTTATAAGGAATTTWwAw WCARNA |

Figura 6.12. Análisis de la región promotora. Alineamiento de las regiones promotoras a genes de granulina. El consenso nucleotídico de regiones promotoras se muestra en mayúsculas para las letras totalmente conservadas y en minúsculas cuando entre los 13 baculovirus aparece al menos una variación (marcada en violeta). En verde se marcan los consensos estrictos y con celeste se resalta la región en donde se encuentran la mayoría de los motivos WCARNA, un segundo motivo WCARNA en SpliGV se marca como una caja, (W= A o T y R= A o G). En el centro de la región verde más extendida se señala en negrita la secuencia consenso de los promotores tardíos de baculovirus. El consenso restringido surge de extraer de la comparación a los promotores de LaolGV, HbGV y SpliGV.

Análisis de la región *downstream* al gen de granulina

La señal consenso de poliadenilación AATAAA no fue localizada en la región *downstream* al gen de granulina de EpapGV. Esta señal está también ausente en las regiones *downstream* de otros GVs como SpliGV, PxGV, CpGV, CfGV, HbGV, PbGV, AoGV y ClGV, pero se encuentra presente en XcGV, TniGV y PhopGV (Akiyoshi *et al.*, 1985; Hayakawa *et al.*, 1999; Taha *et al.*, 2000). Sin embargo, una posible señal de

poliadenilación AAATAA (similar a la informada por Akiyoshi *et al.*, 1985) fue ubicada de manera superpuesta con el codón de *stop* TAA en EpapGV y en ClGV (Fig. 6.13). Para el gen *rr1*, se ha encontrado también una *señal* de poliadenilación (AATAAA) a 2 pb *downstream* de su correspondiente codón de *stop* (Fig. 6.10).

| | |
|--------|---|
| EpapGV | TAAATAA TACCACAAATTATATCCAT |
| XnGV | TAAAAAAATAAA CACATATTTATGTAA |
| TniGV | TAAATAAA TAAATAAA CGTTTGTATTG |
| SpliGV | TAAGCGGTGCTCCATTCTTCGTTATT |
| PxGV | TGATTTTTGACATAGACTTCATTGAG |
| CpGV | TAAACTAGTGAAGTACAAATTTGTCA |
| CfGV | TAA TCCGTTTTTTCAGCGACATTTTC |
| HbGV | TAAAACATTCT --CACTTTTACTTTT |
| PbGV | TAAACGTC AAAATCATCGGTATTTT |
| ClGV | TAAATAA CTATCTTTTAAACTAAAA |
| PhopGV | TAAATTTATTAGTGTATAATTTTGAT |
| LaolGV | TAGAAGATAAGTTAATAATATGTGGT |
| AoGV | TAAGCAAAGCTTTCTGATTTGTCACC |
| AcMNPV | TAAAACACGATA -CATTGTTATTAGT |

Figura 6.13. Región *downstream* de genes de granulina y poliedrina. Se muestra un alineamiento manual de las regiones *downstream* al gen de granulina, en negrita se han marcado los codones de *stop* y en gris las señales de poliadenilación AATAAA y la posible señal de poliadenilación AAATAA. Los gaps fueron introducidos por el programa CLUSTALX para maximizar el alineamiento.

Análisis filogenético de los GVs

Filogenia a partir de secuencias aminoacídicas de proteínas de inclusión

Con el objeto de trazar relaciones filogenéticas entre EpapGV y los demás virus de este género, se emplearon tres metodologías distintas. Inicialmente, se efectuó un estudio filogenético a partir del alineamiento de las secuencias proteicas de granulinas y poliedrinas. Posteriormente, se comparó el orden de genes en la región del gen de granulina, en distintos genomas de granulovirus. Finalmente, se analizó el contenido y el orden de genes entre los genomas de EpapGV y otros granulovirus (se analiza con más profundidad en el capítulo 8 "Análisis del genoma de EpapGV").

Los genes de las proteínas de inclusión de los GVs y NPVs han sido los elegidos a la hora de trazar las relaciones filogenéticas entre estos organismos, en parte debido a la disponibilidad de un número relativamente grande de estas secuencias y, también, debido a su alto grado de conservación. El análisis filogenético fue efectuado en base a las secuencias de aminoácidos de poliedrinas (34 secuencias) y granulinas (14 secuencias) de diferentes baculovirus (Fig. 6.14).

Como una primera aproximación se construyeron distintos árboles utilizando los criterios de distancia y parsimonia, empleando los programas PAUP y PHYLIP

(Swofford, 2000; Felsenstein, 1995). Cada uno de los árboles fue analizado, tomando como criterio de validez de los mismos, aquellos cuyos valores de soporte para la separación de las ramas de los NPVs y los GVs fueran altos. Además, los NPVs debían dividirse en los dos grupos reconocidos previamente. En todos los casos se empleó el gen poliedrina de un NPV que infecta a un himenóptero (NsSNPV) como grupo externo (*outgroup*).

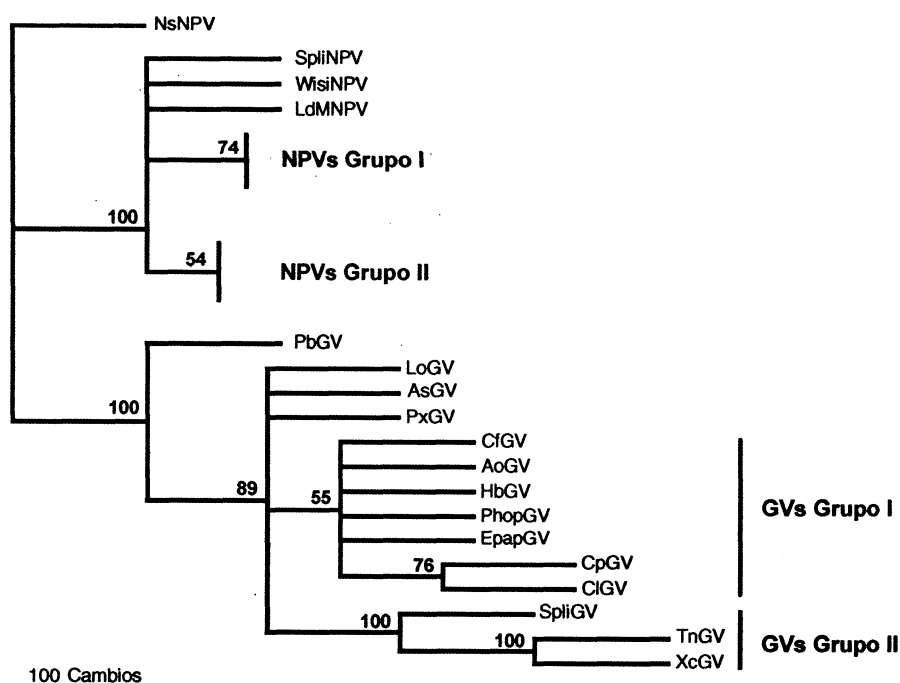


Figura 6.14. Análisis filogenético de secuencias aminoacídicas de poliedrinas y granulinas, empleando el criterio de distancia (*Neighbor Joining*) analizado con el programa PAUP. Un árbol filogenético basado en la secuencia aminoacídica de genes de granulina y poliedrina disponibles en GenBank fue construido con el programa PAUP empleando un criterio de distancia (*Neighbor Joining*). La figura muestra el consenso estricto, en el cual los números debajo de los nodos indican los valores de *bootstrap* como porcentajes sobre 1.000 réplicas. Los valores por debajo de 50% han sido omitidos. El gen de poliedrina de NsSNPV fue usado como *outgroup*. El árbol fue editado con los programas Treeview y Corel Draw. Los números de acceso se encuentran en el capítulo 2 "Materiales y métodos".

Sólo los árboles calculados a partir de un método de distancia (*Neighbor Joining*) y calculados por PAUP (Fig. 6.14) cumplieron con los requisitos explicados arriba; el resto de los árboles falló en estas premisas (ver capítulo 11 "Apéndices"). El árbol de la figura 6.14) muestra a los GVs separados de los NPVs con un alto valor de *bootstrap*; además, los NPVs se segregan en dos grupos, tal como fue propuesto por Zanotto *et al.* (1993). Herniou *et al.* (2001) han postulado que los NPVs del grupo I han evolucionado más recientemente a partir de las del grupo II. Esto explicaría por qué en diversos árboles filogenéticos las poliedrinas del grupo I están apoyadas por altos

valores de *bootstrap*, a diferencia de las del grupo II (Fig. 6.14). Por otra parte, Herniou *et al.* (2001) han identificado 12 genes propios del grupo I que no se encuentran en ninguno de los miembros del grupo II.

Con respecto a EpapGV, este virus se agrupó con GVs que habían sido aislados de huéspedes no noctuidos en un taxón designado **grupo I** (EpapGV, AoGV, CpGV, CIGV, CfGV HbGV, y PhopGV), separado del **grupo II** (TnGV, XcGV y SpliGV), y de tres grupos conformados por un sólo virus cada uno (PxGV, AsGV y LoGV). La composición de los grupos I y II habían sido propuesta previamente por Bideshi *et al.* (2000) y está en acuerdo general con los datos publicados recientemente por Wormleaton & Winstanley (2001). Nuestro análisis también indica que PbGV aparece como un grupo de un único virus (taxón ramificado), en concordancia con los resultados de Bulach *et al.* (1999) y Taha *et al.* (2000). Basándose en análisis filogenéticos, Wormleaton & Winstanley (2001) habían incluido a PbGV en el **grupo I** de los GVs; sin embargo, en nuestros análisis, y en concordancia con Bulach *et al.* (1999) y Taha *et al.* (2000), PbGV aparenta ser un taxón que se separa de los grupos I y II.

En conclusión, de acuerdo a los análisis filogenéticos empelando el gen de granulina, EpapGV formaría parte del llamado **grupo I** de GVs, que agrupa mayoritariamente a granulovirus que infectan a noctuidos.

Correlación entre el análisis filogenético de los GVs, en base a secuencias aminoacídicas de proteínas de inclusión y el orden genómico alrededor del gen de granulina

Como una estrategia alternativa para analizar la filogenia de EpapGV, se examinó la organización genómica alrededor del gen del gen de granulina. Heldens *et al.* (1998) había sugerido el uso del orden de genes en la región del gen de poliedrina para analizar las relaciones entre los NPVs. Posteriormente, Taha *et al.* (2000) y Wormleaton & Winstanley (2001) mostraron que la región *upstream* al ORF de granulina presenta una organización genómica que distingue a los GVs de los grupos I y II. Se procuró entonces ampliar y analizar la posible correlación entre los árboles filogenéticos generados a partir del gen de granulina con el orden de genes alrededor del mismo en los distintos GVs.

Al igual que otros GVs que infectan a tortricidos pertenecientes al grupo I de GVs (CIGV, CpGV, CfGV, PhopGV, HbGV y AoGV), EpapGV muestra el mismo orden *upstream* del gen de granulina (*egt-me53-gran*) (Fig. 6.15). Sólo en un miembro de grupo I (HbGV) el gen *egt* no ha sido localizado, debido a la falta de información de secuencia para la región *upstream* a *me53* (Fig. 6.15). Por el contrario, en los GVs que no pertenecen al grupo I (grupo II: XcGV, TnGV y SpliGV; tanto como para LoGV) el ORF inmediatamente *upstream* a granulina no mostró similitud con la familia de genes de *me53*. En el caso de PxGV y PbGV (postulados como taxones aparte de los grupos I y II) la secuencia *upstream* a granulina muestra un ORF con similitud a *me53*.

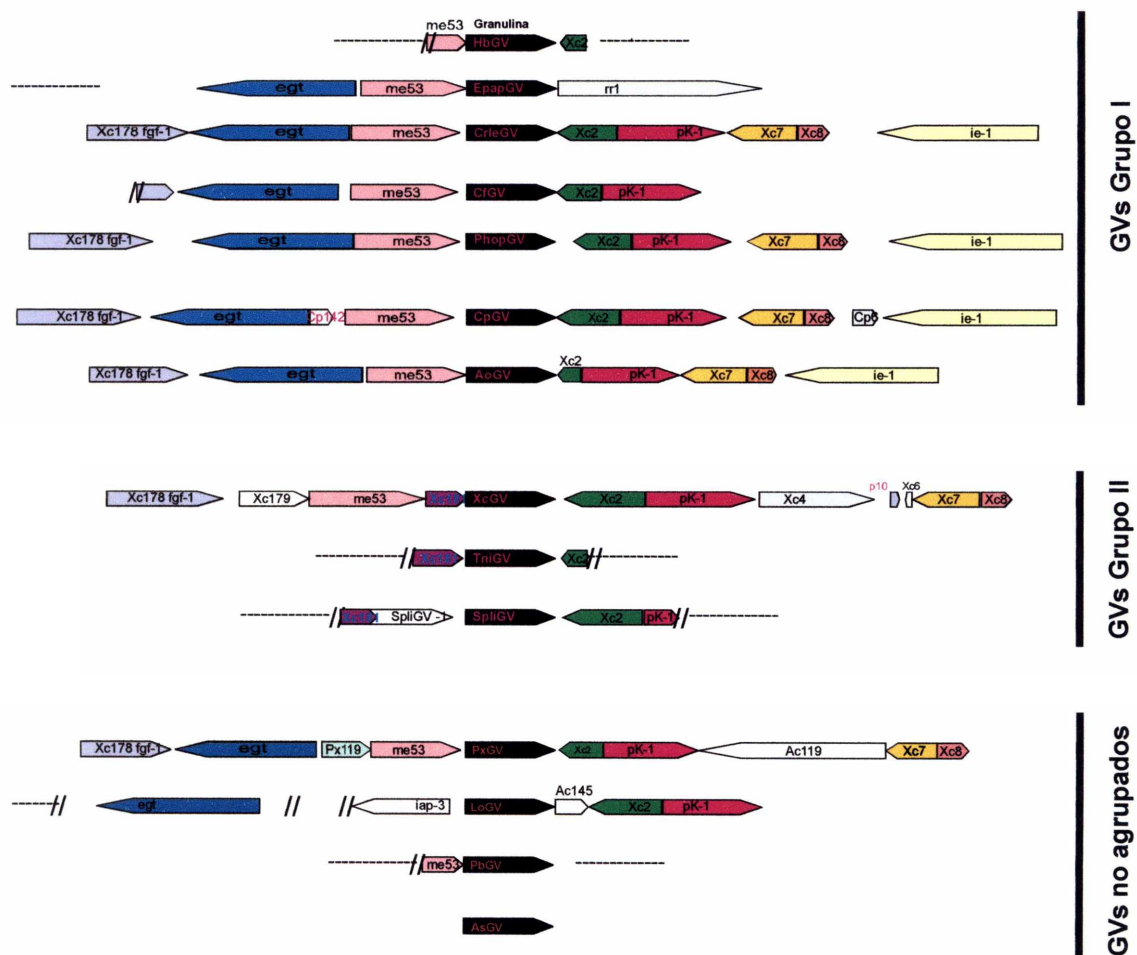


Figura 6.15. Mapa de la región del gen de granulina y genes adyacentes en los granulovirus. Se muestran los ORFs alrededor del gen de granulina de diferentes granulovirus, los ORFs similares se dibujaron con el mismo color. La ausencia de información de secuencia se muestra con una línea de puntos. Las dos barras diagonales indican que se carece información para un gen determinado más allá de la esa posición. Dentro de la flecha del gen de granulina se indicaron los nombres de cada uno de los granulovirus analizados.

En la región *downstream* al gen de granulina se ha localizado un ORF parcial, similar al gen *rr1* de CpGV, OpMNPV y LdMNPV. La presencia de este gen en esta región es, hasta ahora, única comparada con el resto de los GVs. Hasta el momento, el gen *rr1* ha sido encontrado solamente en dos genomas de granulovirus del grupo I (CpGV, Luque *et al.*, 2001; PhopGV, Croizier *et al.*, 2002), mientras que ningún homólogo a *rr1* fue descrito en las secuencias completas de los genomas de AoGV, XcGV y PxGV. Basándose en el grado de similitud entre los genes *rr1* Luque *et al.* (2001) han postulado la existencia de dos linajes: uno perteneciente a perteneciente a SeMNPV muy relacionado con las *rr1* eucariotas y otro nuevo formado por las *rr1* de OpMNPV, LdMNPV y CpGV. Pese a que la secuencia del gen *rr1* de EpapGV no está aún completa, el grado de similitud de la secuencia aminoacídica de su producto es mayor con los productos homólogos de la familia de LdMNPV, OpMNPV y CpGV (50% de identidad y 66% de similitud con el *rr1* de OpMNPV).

En la región *downstream* al gen de granulina, Wormleaton & Winstanley (2001) mostraron la presencia de homólogos al ORF 2 de XcGV (Xc2) y a la proteína quinasa 1 (*pk-1*), en la mayoría de los GVs. En la mayoría de los GVs (AoGV, CpGV, PhopGV, CfGV, PxGV, SpliGV y XcGV) estos dos genes también conservan su posición relativa y su orientación (Fig. 6.15). En tanto que en LoGV, estos ORFs están separados por un ORF homólogo a Xc20 y, en TnGV, sólo una pequeña porción de un homólogo a Xc2 fue localizada al final de la secuencia disponible.

Con el objeto de ampliar el análisis de los ORFs correspondientes a la región *downstream* al gen de granulina, se analizaron las secuencias de nucleótidos de GVs disponibles en GenBank, empleando BLASTX. A partir de esta búsqueda, se encontraron dos ORFs con similitud a miembros de la familia Xc2: HbGV (AAF66611; ORF 2, secuencia parcial) y CIGV (Número de acceso a GenBank: X79569, marco -1). Estos ORFs se encontraban *downstream* de granulina, con sentido de transcripción opuesto a ésta (Fig. 6.15), y no habían sido informados previamente. Los Xc2 pertenecientes al grupo I presentan similitud sólo en sus secuencias amino-terminales (en los primeros 74 a 90 aa) y sus porcentajes de identidad varían en el rango de 21% a 44%, en tanto que los porcentajes de similitud fluctúan entre el 40% y el 75%. Por el contrario, el ORF Xc2 y su homólogo de SpliGV contienen una región rica en prolinas (dato no mostrado) que no está presente en los análogos Xc2 encontrados en los miembros del grupo I de los GVs (Parola *et al.*, 2002). Por otra parte, la similitud entre Xc2 y SpliGV Xc2 esta más extendida que con los homólogos del grupo I (aa: 1-100 y

aa: 140-230). El análisis de secuencias de los análogos Xc2 de diferentes granulovirus, refuerza la separación entre los grupos I y II.

La comparación de la estructura genómica de la región *upstream* al gen de granulina brinda apoyo al árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia aminoacídica de este gen y confirma informes previos que indican una división en el género de los *Granulovirus* en dos grupos diferentes (Bideshi *et al.* 2000, Taha *et al.*, 2000, Wormleaton & Winstanley, 2001).

Conclusiones

- Se ubicó el gen de granulina en el mapa físico del DNA de EpapGV.
- El ORF de granulina y sus regiones flanqueantes fue amplificado y clonado.
- Se determinó la secuencia nucleotídica del gen de granulina y se identificaron genes vecinos.
- Para el ORF de granulina, se localizaron secuencias promotoras de la transcripción en la región *upstream* y señales de poliadenilación en la región *downstream*.
- Se amplió el consenso descrito para la región promotora a wWTTATAAGGAatTTWwaw y se describió un posible motivo transcripcional (WCARNA).
- La filogenia del gen de granulina se analizó empleando la secuencia aminoacídica de éste. Los resultados indicaron que EpapGV se agruparía dentro del grupo I de GVs, compuesto mayoritariamente por virus que infectan a tortrécidos.
- Se empleó el orden de genes alrededor del gen de granulina en los distintos GVs como herramienta para el análisis de la filogenia, observándose una correlación con la filogenia generada a partir de su secuencia de aminoácidos.
- Además, se ampliaron los miembros de la familia Xc2, describiéndose dos nuevos miembros, HbGV Xc2 y CIGV Xc2.

CAPÍTULO 7

LOCALIZACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIA DE UN GEN INHIBIDOR DE LA APOPTOSIS EN EL GENOMA DE EpapGV

Introducción

Los baculovirus, al igual que muchos otros virus, han desarrollado estrategias de escape frente a la apoptosis. Este mecanismo consiste en un conjunto de eventos genéticamente programados que llevan finalmente a la muerte celular. Los procesos en los cuales la apoptosis cobra vital importancia incluyen la remodelación tisular durante la embriogénesis (Ucker, 1991), el mantenimiento de la homeostasis, el funcionamiento del sistema inmune y la metamorfosis en los insectos (Jiang *et al.*, 1997; Steller & Grether, 1994). También, interviene en la eliminación de células cuya supervivencia podría resultar deletérea para el organismo y constituye una estrategia de defensa contra las infecciones virales y el crecimiento tumoral (Blissard 1996; Vaux *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1988).

Dos tipos de genes inhibidores de la apoptosis se han descrito en los baculovirus: genes inhibidores (*iaps*) y supresores (*p35* y *p49*) de la apoptosis. Dichos genes actúan inhibiendo la apoptosis en diferentes niveles (Fig. 7.1). La proteína P35 bloquea la apoptosis mediante la inhibición de la actividad de las caspasas, una familia de proteasas de cisteínas que se cree cumplen un rol central como componentes del proceso de apoptosis. P35 es un sustrato de caspasas, pero forma un complejo estable con la enzima inhibiendo su actividad de un modo estequiométrico. Las proteínas anti apoptóticas IAP actúan en etapas previas a las afectadas por P35 (*upstream*). Ellas pueden prevenir la activación de las caspasas pero, a diferencia de *p35*, no pueden bloquear la apoptosis una vez que las caspasas blanco han sido activadas. Una serie de clivajes proteolíticos están involucrados en la activación de las caspasas para dar origen a enzimas heterotetraméricas, formadas por dos subunidades grandes y dos pequeñas (Fig. 7.2). Recientemente, se ha demostrado que la proteína IAP-3 de *Orgyia pseudotsugata* multi *Nucleopolyhedrovirus* (OpMNPV) es capaz de inhibir la activación de la *caspasa-1* de *Spodoptera frugiperda* mediante el bloqueo de la activación inicial por clivaje, entre la subunidad grande y la subunidad pequeña (Fig. 7.2) (LaCount *et al.*, 2000). Las proteínas IAPs de los baculovirus interactúan también con las proteínas pro-apoptóticas de *Drosophila*, Doom, Hid, Grim y Reaper (Miller *et al.*, 2002). Sin embargo, dado que los baculovirus no infectan a *Drosophila*, la relevancia de estas interacciones en células permisivas no están aclaradas. La situación es bastante complicada por cuanto existen varias clases de IAPs en los baculovirus y porque algunos baculovirus expresan múltiples IAPs durante la infección viral.

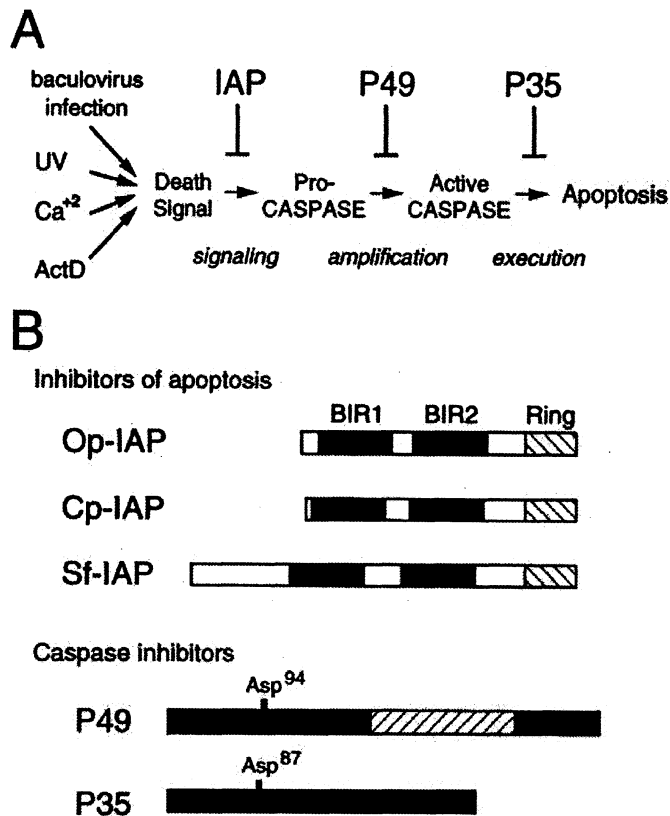


Figura 7.1 Inhibidores de la apoptosis de baculovirus. (A), Vía apoptótica. Las infecciones por baculovirus, entre otros agentes, disparan el mecanismo de la apoptosis en células de *S. frugiperda* (SF21), los cuales causan un clivaje proteolítico de procaspasas inactivas hacia sus formas activa. P35 funciona inhibiendo las caspasas activas, incluyendo a la caspasa Sf-1, mientras que el gen P49 actúan *upstream*, inhibiendo a caspasas apicales. Las proteínas IAP de los baculovirus funcionan *upstream* de P49 bloqueando la activación de las procaspasas. (B), Comparación de los reguladores de apoptosis de baculovirus. Las proteínas IAPs contienen dos motivos BIRs (baculovirus inhibitor of apoptosis repeats) y un motivo C-terminal RING-Finger. Las proteínas virales, Op-IAP y Cp-IAP, son muy similares a un inhibidor de la apoptosis celular de células de *S. frugiperda* (Sf-IAP). Los inhibidores de caspasas P49 y P35 son 49% idénticos y contienen dos residuos de aspartato (Asp⁹⁴ y Asp⁸⁷) requeridos para el clivaje de las caspasas. P49 contiene una inserción de 120 residuos no relacionados con P35. Extraído de Friesen, P. D. & Miller, L. K. (2001).

Los genes *p35* están casi exclusivamente presentes en los NPVs del grupo I (Clem *et al.*, 1991), en tanto que los *iaps* están ampliamente distribuidos tanto entre los NPVs como en los GVs. Las proteínas IAP contienen un dominio conservado C3HC4 (RING) zinc Finger en el extremo carboxilo terminal y una repetición doble de 60-75 aminoácidos, próxima a la zona amino terminal, conocida como "baculovirus iap repeat" o BIR (Birnbaum *et al.*, 1994).

Cuatro familias de IAPs (IAPs 1 a 4) comparten estas características, en tanto una quinta (IAP-5) carece de un motivo BIR. La familia IAP-1 es exclusiva de los NPVs del grupo I, en tanto las IAP-5 están presentes sólo en los granulovirus.

El estudio y la caracterización de genes involucrados en la interacción huésped patógeno resulta de sumo interés, ya que la progenie viral depende del funcionamiento efectivo de estos inhibidores de apoptosis. La búsqueda de inhibidores de apoptosis más potentes podría llevar en un futuro a la creación de baculovirus recombinantes

con posibilidades de mejorar la eficiencia de la infección y/o modificar el rango de huéspedes.

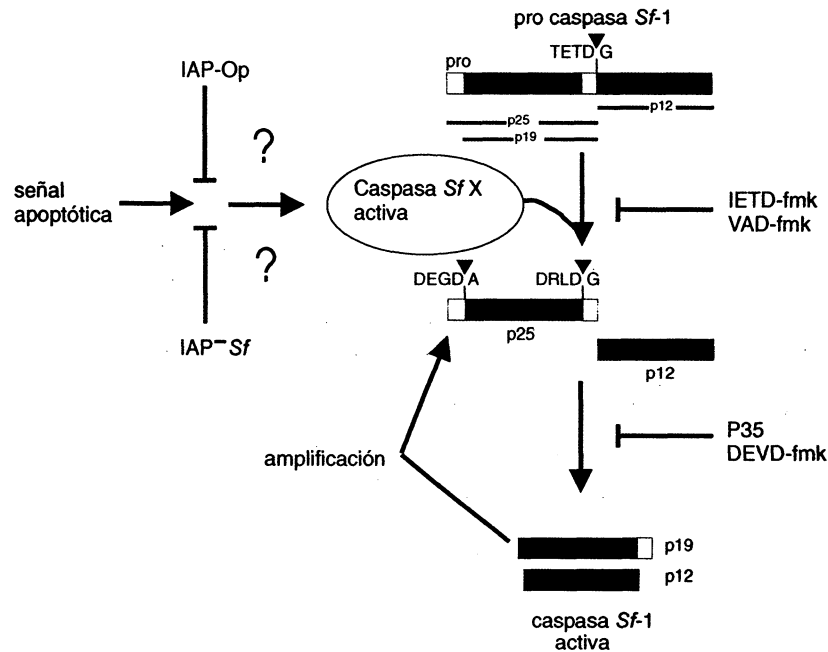


Figura 7.2. Posibles sitios de acción de los genes inhibidores de la apoptosis presentes en los baculovirus (*p35* e *iaps*) en células de *Spodoptera frugiperda*. Ante una señal apoptótica (por ejemplo: luz UV o infección por virus), la caspasa Sf-X activada procesa a pro-caspasa Sf-1 en el punto de clivaje TETD¹⁹⁵G. Mientras que P35 no afecta el clivaje de caspasa Sf-1 por la caspasa Sf-X, Op-IAP funciona *upstream* bloqueando la actividad o la activación de la caspasa Sf-X. P35 bloquea la maduración por clivaje en el sitio [DXXD¹(G/A)] del intermediario P25 de caspasa Sf-1, probablemente por una inhibición directa de la Sf-caspasa-1 activa. Los péptidos IETD-fmk y VAD-fmk preferentemente inhiben a la pro-Sf-caspasa-1 en el sitio de clivaje TETD¹G, mientras que DEVD-fmk inhibe el clivaje múltiple y bloquea la amplificación de la caspasa Sf-1. Esta figura es una adaptación de lo publicado por Manji & Friesen (2000).

Objetivos

- Analizar la presencia de genes *iap* en el genoma de EpapGV.
- Obtener la secuencia nucleotídica de estos genes.
- Caracterizar sus secuencias y sus regiones flanqueantes.
- Comparar las regiones que rodean al gen *iap-3* en diferentes genomas de GVs.
- Realizar un análisis filogenético de los genes *iap*.

Resultados y discusión

Estrategia experimental

En primer lugar, se evaluó la presencia en el genoma de EpapGV de inhibidores de la apoptosis a partir del análisis de las secuencias disponibles de este genoma. Posteriormente, se abordó la búsqueda de estos genes sobre la biblioteca genómica de EpapGV por experimentos de *Southern blot* empleando sondas homólogas. De acuerdo con los resultados, se seleccionó una región genómica positiva para *iap-3* y se determinó y secuenció. Su análisis mediante diversas herramientas bioinformáticas permitió definir un marco de lectura abierto (ORF) cuyo producto presentaba similitud con las proteínas de la familia IAP-3. Finalmente, se analizó la historia filogenética de EpapGV IAP-3 y de sus homólogos.

Análisis de secuencias terminales de fragmentos clonados

En un principio, se realizó una búsqueda de genes homólogos *iap*, empleando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997), en las secuencias nucleotídicas obtenidas de los extremos de los fragmentos clonados. En este conjunto limitado de secuencias genómicas no se encontraron trechos de aminoácidos que presentasen homologías con IAPs de baculovirus. Tampoco se obtuvieron resultados positivos cuando las secuencias de aminoácidos traducidas del DNA de EpapGV se compararon con un banco de motivos conservados.

Análisis por *Southern blot*

Se utilizó la hibridación con sondas heterólogas para detectar *iaps* sobre DNA de fragmentos clonados del genoma de EpapGV, transferidos a membranas de *nylon* (Fig. 7.3). Se emplearon como sondas los genes clonados de *Cydia pomonella* GV (CpGV) *iap-3*, *iap-5* e *iap-4* (Cp94). Los detalles de la amplificación del DNA, purificación de la sonda e hibridaciones se describen en el capítulo 2 "Materiales y métodos".

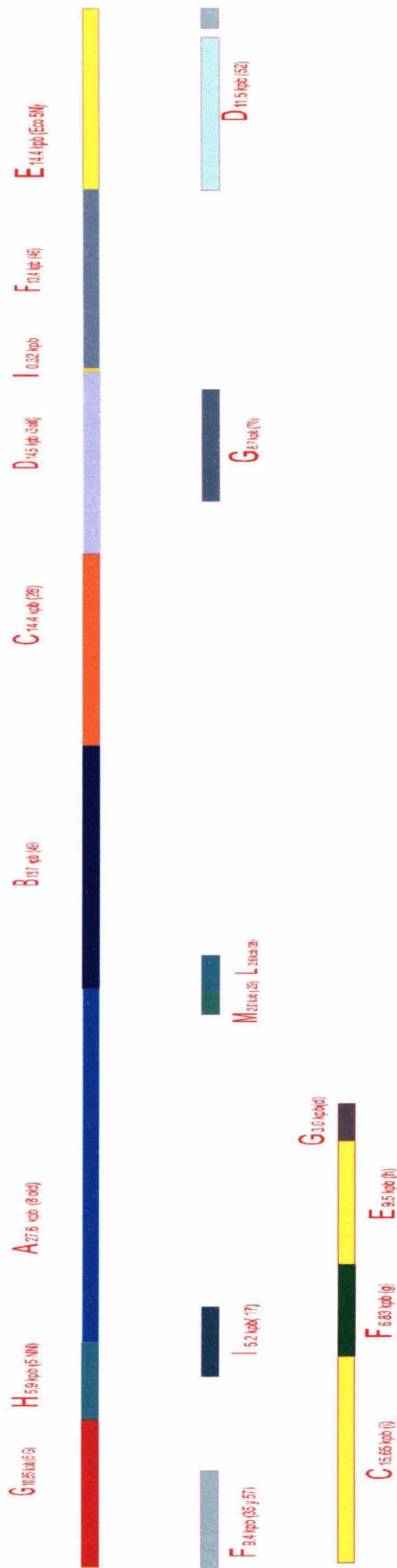


Figura 7.3. Fragmentos de EpapGV clonados y analizados por Southern blot para *iap-3*. El tamaño de los fragmentos se indican en rojo (aquellos tamaños confirmados por secuencias están subrayados).

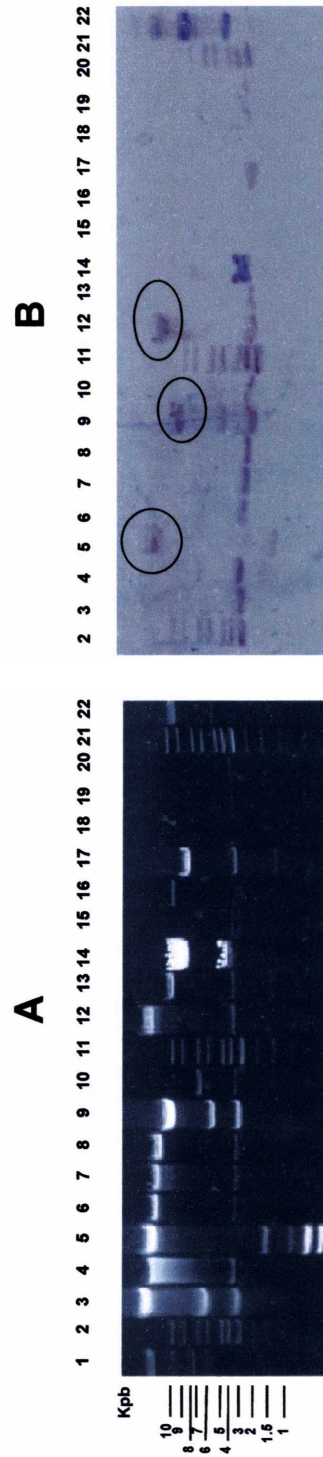


Figura 7.4. Southern blot de clones seleccionados del genoma de EpapGV DNA empleando la sonda *iap-3*. El panel A muestra distintos clones del genoma de EpapGV digeridos con enzimas seleccionadas y resueltos por electroforesis en gel de agarosa 0,7%. Calle 1, DNA de fago lambda digerido con HindIII; calles 2, 11 y 21, marcador de peso molecular (MPM) "1 kb"; calles 3-10, clones con fragmentos EcoRI A, B, C, D, E, F, G y H digeridos con EcoRI; calles 12-15, clones con fragmentos BamHI C, E, F y G digeridos con BamHI; calles 16-19, clones con los fragmentos BglII D, F, G, I y M digeridos con las enzimas flanqueantes EcoRI y HindIII; calle 22, control positivo: plásmido del gen CpGV *iap-3* no digerido. El DNA del panel A fue transferido a membranas de nitrocelulosa e hibridado toda la noche a 45 °C, con la sonda CpGV *iap-3*. El panel B muestra el resultado de la hibridación con la sonda. El ensayo fue revelado usando un kit inmunoenzimático. Las barras y letras hacia la izquierda de la figura A indican el tamaño del marcador de peso molecular. Con círculos se han indicado los fragmentos genómicos positivos para la hibridación.

Southern blot con la sonda CpGV *iap-3*

En el experimento de hibridación con la sonda CpGV *iap-3*, se identificaron varios fragmentos positivos (Fig. 7.4), entre ellos los fragmento EcoRI G (10,85 kpb) y el fragmentos BamHI C (15,65 kpb) (Fig. 7.4B, calles 9 y 12) y el fragmento EcoRI C (14,4 kpb) (Fig. 7.4B, calle 5). Además, se detectaron otros fragmentos con hibridación positiva, entre ellos el vector pZerO-2TM linealizado (3,3 kpb) y bandas del marcador de peso molecular. La señal producida por el vector pZerO-2TM linealizado y por los marcadores de peso molecular, se debería a que la sonda CpGV *iap-3* conservaba parte del *polylinker* del vector de clonado. Estas secuencias de la sonda tendrían similitud el vector pZerO-2TM y con los marcadores de peso molecular. La hibridación positiva del fragmento EcoRI C se debería a la presencia del vector pZerO-2TM, el cual aparentemente no fue escindido del inserto (en la foto se aprecia la ausencia del vector linealizado a aproximadamente 3,3 kpb).

De acuerdo con el análisis de los fragmentos con hibridación positiva y de sus mapas de restricción (Fig. 7.5), se estableció la posición tentativa de un homólogo a CpGV *iap-3* en el segmento BglIII-EcoRI de 3,3 kpb, dentro del fragmento genómico EcoRI G.

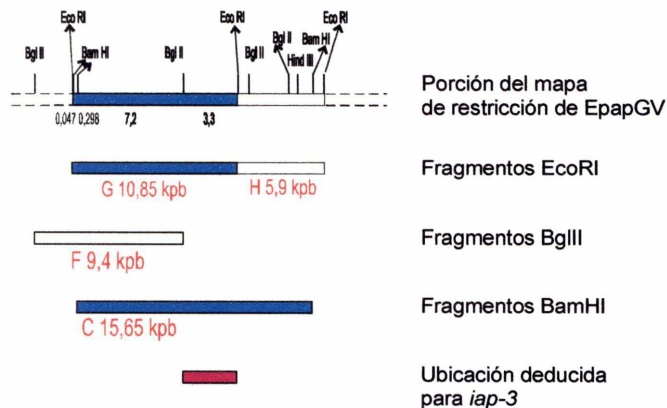


Figura 7.5. Fragmentos de DNA de EpapGV analizados con la sonda de CpGV-*iap3*. Se esquematizan los fragmentos parcialmente superpuestos correspondientes a la región BamHI C, que hibridaron con la sonda (en azul), los fragmentos que no hibridaron aparecen en blanco. La ubicación deducida del gen *iap-3* se indica con una barra de color fucsia. Los sitios de restricción y los tamaños de los fragmentos, se muestran debajo del mapa de restricción.

Búsqueda de los genes *iap-4* e *iap-5* en EpapGV

Análisis comparativo de regiones genómicas de EpapGV y CpGV

De acuerdo a la información que se presenta en el capítulo 8, se dedujo que la organización de los genes de CpGV y EpapGV era similar (Parola *et al.*, 2002). Conociendo la ubicación de los genes *iap-4* e *iap-5* en CpGV, se comparó la organización genómica de ambos virus en las regiones relevantes. Así, se tomaron en

cuenta aquellos genes que habían sido identificados en el genoma de EpapGV (*odv-e25* y *vp39*) cuyos homólogos se encuentran en las cercanías de *iap-4* en el genoma de CpGV. Sobre esta base, se supuso que el gen *iap-4* de EpapGV se encontraría en el fragmento EcoRI-BgIII de 3,5 kpb ubicado hacia el extremo más cercano a granulina del fragmento EcoRI D (Fig. 7.6). Apoyando estos análisis, la distancia que separa a estos genes posee un tamaño similar en ambos genomas. De acuerdo con las mismas comparaciones el gen EpapGV *iap-5* se encontraría en la región comprendida por los genes *dna-pol* y *fgf*. Sin embargo, la región flanqueada por los mismos genes en EpapGV (fragmento EcoRI F; 13,4 kpb) es 2,5 kpb menor que su correspondiente en CpGV, haciendo difícil aventurar hipótesis respecto de su posible ubicación. Gracias a estas comparaciones de posición de genes en CpGV y en EpapGV, se seleccionaron dos fragmentos genómicos (EcoRI D y F) para ser digeridos y analizados por *Southern blot*.

Southern blots con las sondas iap-4 e iap-5

Al igual que para la sonda CpGV *iap-3*, en estos experimentos los fragmentos genómicos clonados se fijaron a una membrana e hibridaron con las sondas correspondientes (CpGV *iap-4* e *iap-5*). En forma complementaria se realizaron digestiones múltiples de fragmentos genómicos clonados, con el objeto facilitar la detección de los *iaps*. Los clones analizados, EcoRI D y F, fueron seleccionados de acuerdo con las ubicaciones potenciales de los *iaps* en EpapGV propuestos basándose en la supuesta colinealidad de los genomas de EpapGV y CpGV. El clon EcoRI B también fue digerido y transferido a las membranas, debido a que en un ensayo preliminar este fragmento había presentado una leve hibridación para una de las sondas de *iaps* (dato no mostrado). La estrategia de hibridación elegida consistió en emplear inicialmente temperaturas altas, y en caso que el resultado fuera negativo realizar nuevas hibridaciones a temperaturas más bajas. A pesar de las múltiples temperaturas de hibridación empleadas (55, 50 y 45 °C), no se han detectado clones con niveles de hibridación similares a los registrados para los controles positivos (dato no mostrado) o que resultaran inequívocamente positivos, tal como se habían obtenido para *iap-3* o para el gen de granulina (ver capítulo 6). Es posible que, en caso de existir en el genoma de EpapGV, los genes *iap-5* e *iap-4* presenten bajos niveles de similitud con las sondas empleadas, o bien que estos genes no se encuentren en EpapGV.

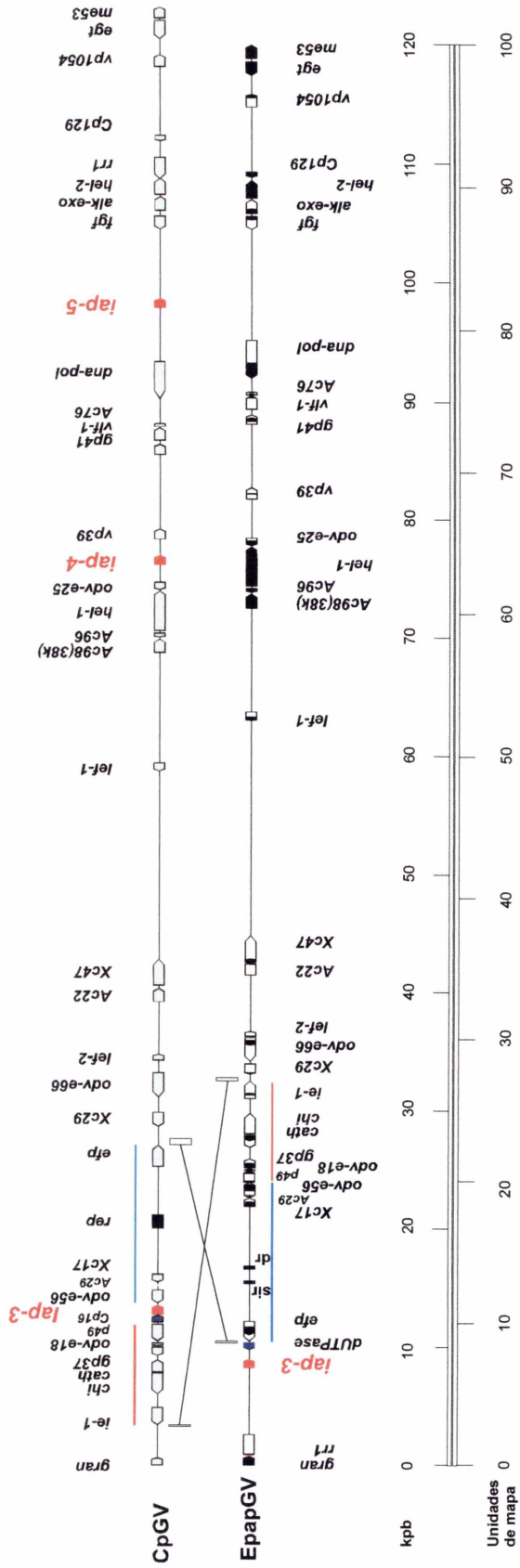


Figura 7.6. Comparación del orden genómico entre EpapGV y CpGV. Se graficó la posición de ORFs homólogos en los genomas de EpapGV y CpGV. Las cajas con flechas indican la localización y la dirección de transcripción de los ORFs homólogos, con sus nombres correspondientes. Los tamaños de los ORFs de EpapGV que no han sido completamente secuenciados se asumieron iguales a sus homólogos en CpGV y se ha pintado de negro sólo la región secuenciada de los mismos. Las cajas negras, representan repeticiones directas (dr) y elementos inversamente repetidos de forma simple (sir) presentes en el genoma de EpapGV y una región de repeticiones en el genoma de CpGV. Las cajas sólidas (en gris) unidas por líneas finas representan los posibles sitios de recombinación que llevaron a una inversión en el genoma de EpapGV. Las líneas finas debajo del mapa de EpapGV y por encima del mapa de CpGV resaltan las posiciones en donde los ORFs de EpapGV y en CpGV mantienen distancias y polaridades similares. Abajo de la figura se muestra una escala doble en kbp y en unidades de mapa.

Análisis de la región secuenciada y caracterización de los ORFs encontrados

Marcos de lectura en la región EpapGV *iap-3*

La región del gen de *iap-3* fue secuenciada y analizada con el programa ORF-finder en busca de marcos de lectura abiertos (ORFs). Los ORFs no solapados mayores a 50 aminoácidos (aa) se han seleccionado y nombrado de acuerdo con el número de nucleótidos que poseen, o con el nombre de un homólogo (Fig. 7.7). Así se ha encontrado los siguientes marcos: ORF 162, *iap-3*, ORF 273 y ORF 174. En una región adyacente Alina Goldberg ha detectado al gen de la desoxi UTPasa (*dUTPase*) y el marco completo del gen *Ld130 (efp)* (Goldberg *et al.*, 2003). Posteriormente, los ORFs detectados se analizaron con BLASTP contra las secuencias de GenBank. En posteriores análisis, la búsqueda se limitó a las secuencias propias de los baculovirus y a las secuencias de CpGV empleando parámetros suficientemente laxos como para detectar secuencias de baja similitud. Sólo el marco de lectura *iap-3* mostró un 57% de identidad y un 68% de similitud con el gen *iap* del *Trichoplusia ni*. Si bien la posición del gen *iap-3* en los genomas de EpapGV y CpGV difiere sustancialmente, las reorganizaciones genómicas son poco frecuentes en los genomas de los *Granulovirus*. Más adelante, en el capítulo 8 se analizan los eventos que podían haber dado como resultado la actual posición de este gen en EpapGV.

Caracterización de las secuencia de los ORFs ubicados en la región *iap-3*

La caracterización de los ORFs encontrados se amplió analizando la presencia de motivos proteicos conocidos, de señales transcripcionales y del contenido GC de los ORFs y de las regiones intergénicas.

Búsqueda de motivos estructurales

La presencia de motivos estructurales se analizó empleando los programas CDD (*Conserved Domain Search*; Altschul *et al.*, 1997); BLOCKS (Henikoff S. & Henikoff, J. G., 1994) y SMART (Simple Modular Architecture Resources; Letunic *et al.*, 2002; Schultz *et al.*, 1998).


```

1 CTGTGAGGCAAGACATAATATGCTAGTCCATGTTCCACCTGGCGGAGATTATACAAGGGCGTTGCTGCGCAGC
1 ORF 162 >>> M F H L A E I Y T R A L L R Q L
76 TGGAGGGACACAAGGAGGAGACTACTACAGTTGGATAACCTATGATGGAGCGTTTGGATGATGATGGCGGAC
26 E G H K E G D Y Y R L D N P M M E R L M M M A D Q
151 AGTATAAGATCTACGGTATCAACATCGCCCCACCATAATTTAATAAAACAATAAAGAGTTTTTTTTTACATAC
51 Y M R S T V S T S P P P *
226 TTTTGATTTATTTTTCATGAACCTTACCAAGACTAATAATCTAATCTATACTTTATATATTCCGCCTGGGTATA

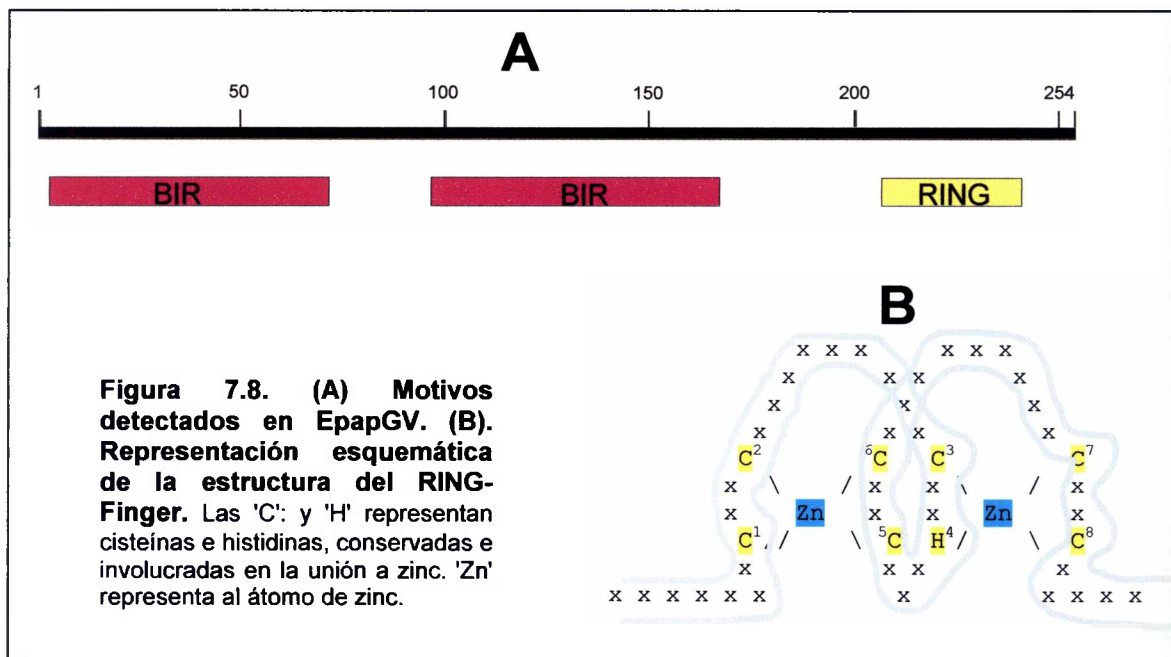
301 TATATGGCGTTGTGTGTAAAATTAATTGTTAAATTATGATGGACCGTGAAGAGGCTCGGTTAAGCACTTTCAAGA
1 IAP-3 >>> M M D R E E A R L S T F K N
376 ATTGGCCCGTGCCGTTTCTTGATCCCCAACTATGGCCCGCAACGGGTTTTATTTATTTGGGTGAAGAGACGAGG
15 W P V P F L D P Q T M A R N G F Y Y L G R R D E V
451 TGCCTTGCGCGTTTTGTAAAGTGGAAATCATGCGGTGGTTCGAAGGTGACGATCCGGAGAAGGACCATCGGAAGT
40 R C A F C K V E I M R W V E G D D P E K D H R K W
526 GGGCACCGCAGTGTCCGTTTCTGCGTTGTTGACCGTCCGGCGGGCGGACGAGGTTGGTTCGGGCGCGGTGCACA
65 A P Q C P F L R S L T V G G R D E V G S G A V H T
601 CCCCCGCCCAGCCAACCTTAGGTACGCTTGAGGCAAGTGCCTCTGCTCACGTTCAAGGACTGGCCGAAGAGTA
90 P G P A N P R Y A L E Q V R L L T F K D W P K S I
676 TAAAGCAGAACCAAAGCAGCTTGCCGAAGCTGGATTACTACACGGCCGGCTATGACAAAGTGTCTTACT
115 K Q N Q S S L P K L D Y T T R A A A M T K C F Y C
751 GTGACGGGGTCTCAAAGATTGGGAGGAAAACGATATACCGTGGGAGCAACACGCGCGCTGGTTGATAAATGCG
140 D G G L K D W E E N D I P W E Q H A R W F D K C A
826 CATATGTCAAAGTCAAGGGGAGGAATATGTTTCAAGAGTAATTACTGAAGCGTCCGCGTTTCAACGGAGC
165 Y V K L V K G E E Y V Q K V I T E A C A V S T E Q
901 AAGCGCCGCAACCGGAGAATGTTGAGTCGCCGAAAAAATTTACAACACTAGAGGAGTGTAAAATTTGTTTTGAAA
190 A P Q P E N V E S P K K F T T L E E C K I C F E N
976 ATAATCGTAACGTGTGCTTTGTTCCGTGCGGACATGTGGTGGCATGCGCCAAGTGGCGTTTAAACCACGAACACGT
215 N R N V C F V P C G H V V A C A K C A L T T N T C
1051 GCCCAATGTGTAGGCAGAAGTATAATAACGCTGTACGTGTTACTATTCTTGATTTAACTTTTACGCTAAATAAA
240 P M C R Q K Y I N A V R V Y Y S *
1126 TACATATTTTTTTTACATATTCATTTATTAATTTTACACATATTACGAAATGATTCCCTACTCGTAACATAAAAT
1 ORF 273 >>> M I P T R N I K L
1201 GTTTTCTTCTGTAAGTCGGAGATACAAAATGACCAATTTTGTACCTTATATCAACGTTGTTTTCTAATGGTAA
10 F S S A K S E I Q N D Q F C H L I S T L F S N G K
1276 ACCACCGAAAAAGTCTGAACTTTGTAGTCATATTTAAGACCGACAACCTACACAGGAACGCGTGGACAATCAA
35 P P K K S E L L V I F K T D N T Y T G T R Q S N
1351 TTACATAAAAAAATATGAAATGAATTTACGAAAAATTTCAATTTGAACGTTGACAGAGTTTTTACTTTAAATACAT
60 Y I K K Y E M N L R K F H L N V D R V F T L K Y I
1426 ATCAGCTATAGACGCAGGATAAACTGAGCGTTTATTTTTTAAAAATATATAAATTAACCAACTGTAGTTTTTAT
85 S A I D A G *
1501 TTTATATGGATAACAAAAACCTTAGATATTTCTGTTGTTGCTAGTGAACACTAGTACAGGAAAAATTTATGTAT
58 * I N R N N S T F S T C R F I K H I
1576 GGGCATTATAAAAAATTAACCAACTTTTATAGTGTCTTGTGCATAAATATGTATGGGCATAAAAAATCAAAATG
41 P M I F I L W S K Y H E Q A Y I I Y P C L F I L H
1651 ATGTCGAATGTGTAATCTAAAAGTTGAGTTTTGAATTTACACATTCGACATCATATTAGGAACTAATAATTTTG
15 H R I H L D L L Q T K F K C M <<< ORF 174
1726 TAAAGGGTTAATAATACGGTAAATATGGATAAATCATTATTTTAAATAAATGTTACAATAAAGTATATATA

1801 ATTAATTAGTACCGTTGACCCAAACCTCCCTCTCCGCGCGATTGGTGTGAGTGTGGAAGTAACCTCTACCA
* N T G T S G F G G E G G R N T D T T S T <<<dUTPase

```

Figura 7.7. Secuencia nucleotídica de la región del gen *EpapGV iap-3*. Se han traducido los marcos de lectura no solapados mayores a los 50 aa de la región con hibridación positiva para la sonda *iap-3* de CpGV. Las direcciones de transcripción de los ORFs se muestran con flechas según poseen el mismo sentido de transcripción que granulina (>>>) o el opuesto (<<<). La secuencia aminoacídica se muestra con letras mayúsculas por sobre la secuencia nucleotídica. Con un sombreado horizontal se marcan los motivos BIR y en cajas sin relleno el motivo RING-Finger. Los posibles motivos transcripcionales TATA y CAGT (y sus reversas complementarias) han sido marcados en dos tonos distintos de gris, los ATG, los codones de stop han sido marcados con negrita y las posibles señales de poliadenilación (AATAAA) están subrayadas. El sitio BgIII se encuentra subrayado doblemente. Se muestra solamente la secuencia parcial de la *dUTPase*.

En particular, se han detectado los motivos característicos de los IAPs de los baculovirus, dos motivos BIR y un motivo RING-Finger (Fig. 7.8A). El core de la secuencia BIR definida para los baculovirus responde al consenso acotado GX_9 ₁₁ $CX_2CX_{8-10}E/D/hX_5HX_{3-6}C$ (Maguire *et al.*, 2000). Dado que el motivo BIR se ha encontrado en numerosos IAPs de organismos diversos, la misma se ha ampliado a $[HKEPILVY]-x(2)-R-x(3,7)-[FYW]-x(11,14)-[STAN]-G-[LMF]-X-[FYHDA]-X(4)-[DESL]-X(2,3)-C-X(2)-C-X(6)-[WA]-X(9)-H-X(4)-[PRSD]-X-C-X(2)-[LIVMA]$, según los accesos del banco de datos Prosite, PS01282 para BIR-1 y PS50143, para el BIR-2. El motivo BIR estaría relacionado con las interacciones proteína-proteína que se establecerían entre los IAPs y los inductores de apoptosis de naturaleza proteica (Vucic *et al.*, 1997).



El motivo RING-Finger detectado cumple con el consenso C_3HC_4 . Esta estructura es un tipo especializado de Zn-Finger de 40 a 60 residuos que une iones Zn^{+2} y está probablemente involucrada en mediar interacciones proteína-proteína (Saurin *et al.*, 1996). Se conocen varias estructuras tridimensionales de RING-Fingers, pero la forma que adopta el sistema que liga zinc es única y es conocida como motivo "cross-brace". El par de cisteínas (Cys) 1 y 3 (par 1: Cys 1 y 2; par 3 Cys 5 y 6) coordina la unión a un átomo de Zn, mientras que el par 2 y 4 (par 2: Cys 3 e His 4; par 4: Cys 7 y 8) une al segundo Zn (Fig. 7.8B).

Los otros ORFs encontrados en las proximidades de *iap-3* (ORFs 172, 273 y 174) no mostraron motivos proteicos conocidos.

Análisis de elementos promotores y señales de poliadenilación

En este análisis se examinó la presencia de promotores tempranos, definidos previamente como la secuencia TATA seguida por el elemento CABT [CA(C/G/T)T] unos 20-40 nt después. También, se analizó la presencia de promotores tardíos, definidos como (A/T/G)TAAG, y secuencias de unión a factores de transcripción eucarióticos, GATA [(T/A)GATA(A/G)] y CACGTG.

Para el gen EpaGV *iap-3*, se ha detectado un motivo característico de un promotor temprano (E) muy alejado del ATG (-288) y una serie de elementos característicos de promotores TATA y CAGT más cercanos al ATG (Tabla 7.2). Sin embargo, este último conjunto de promotores no cumple con los requisitos básicos que se han observado experimentalmente en promotores funcionales. Por ejemplo, que la secuencia de inicio de la transcripción CA(C/G/T)T se encuentre 20-40 nt *downstream* de la secuencia TATA.

Tabla 7.2. Análisis de elementos promotores y señales de poliadenilación de los ORFs de la región de EpaGV *iap-3*.

| ORF | Posible promotor y elementos promotores extras ^a | Señal de poliadenilación | Trascripción ^b | Motivo ^c | %GC |
|--------------|--|--------------------------|---------------------------|---------------------|------|
| 162 | - | AATAAA (+4,+11) | >>> | - | 50,6 |
| <i>iap-3</i> | E: TATA:-288, CAGT:-267 TATA: -288,-64,-57,-39 CAGT: -267,-189,-67 | AATAAA (+12) | >>> | 2 BIR, RING | 52,0 |
| 273 | CAGT: -5 | - | >>> | - | 31,9 |
| 174 | E: TATA: -103,CAGT:-98 | - | <<< | - | 27,0 |

^a E: *early promoter* (o promotor temprano), TATA seguido del motivo CAGT a no más de 40 nt del primero. Además, se ha señalado la posición de elementos promotores TATA y CA(C/G/T)T.

^b La dirección de transcripción se define como >>> cuando posee el mismo sentido que el gen de granulina y <<< cuando el sentido de transcripción es opuesto al mismo.

^c BIR (*Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Repeat*), RING (*RING-Finger*).

Recientemente, Miller *et al.* (2002) han demostrado que el gen *iap-3* de CpGV es expresado (en cultivos celulares infectados) en etapas tempranas y tardías de la infección. El cambio de la expresión temprana hacia la tardía acontece entre sitios promotores distales (propios de la transcripción temprana) a sitios proximales (propios de transcripción tardía). Los análisis por extensión de *primers* de este *iap-3* realizados por estos autores indicaron que los productos de transcripción tardía parten de la

secuencia ATAAG. Sin embargo, por experimentos de RACE-PCR no se detectaron motivos transcripcionales tempranos conocidos.

La caracterización se amplió comparando las regiones promotoras del gen *iap-3* en EpapGV y en CpGV, Sin embargo, estas regiones no presentaron similitudes sustanciales (dato no mostrado).

Con respecto a las señales detectadas en los otros marcos de lectura, sólo para el ORF 174 se detectó un posible motivo transcripcional temprano. Para toda la región analizada, las secuencias de unión a factores de transcripción eucarióticos GATA y CACGTG no fueron detectadas.

Nuestros análisis respecto a posibles señales de poliadenilación, indicaron sólo elementos canónicos de poliadenilación para el ORF 162 y para el gen *iap-3* de EpapGV.

Análisis del contenido GC entre las regiones intergénicas y las secuencias codificantes

Si bien la región analizada mostró un contenido GC (42,3%) muy similar al contenido GC en base a las secuencias parciales de este genoma (42%) (Parola *et al.*, 2002), estos análisis indicaron la presencia de dos grupos de secuencias con diferentes contenidos GC (Tabla 7.3).

Un grupo de secuencias con un contenido GC alto, está formado por las secuencias de los ORFs 162, *iap-3*, *dUTPase* y sus valores GC son cercanos al 50%. A diferencia de la región anterior, otro grupo de secuencias comprende a los ORFs 273 (GC: 31,9%) y al ORF 174 (GC: 27,0%) y a todas las regiones intergénicas (GC: 15-21 %). El contenido GC sirve entre otros para dar indicios sobre la funcionalidad de las secuencias analizadas en los genomas de los baculovirus. Por ejemplo, las regiones con altos valores de GC son comunes en secuencias *upstream* a promotores tardíos (Kuzio *et al.*, 1999) y es probable que estas regiones tengan roles transcripcionales (Ayres *et al.*, 1994). Por otra parte, un bajo contenido GC de un gen funcional podría indicar que ha sido capturado recientemente y que no ha tenido tiempo en adaptarse al huésped.

Tabla 7.3. Porcentaje AT de los ORFs y de las regiones intergénicas en la región del gen *EpapGV iap-3*. En negrita se han indicado por porcentajes GC inferiores a 35%.

| Regiones u ORFs | Tamaño (en pb) | %GC |
|---|----------------|-------------|
| 162 | 162 | 50,6 |
| Entre ORF 162 e <i>iap-3</i> | 144 | 21,8 |
| <i>iap-3</i> | 773 | 51,8 |
| Entre <i>iap-3</i> y ORF 273 | 72 | 15,3 |
| 273 | 273 | 31,9 |
| Entre ORF 273 y ORF 174 | 74 | 20,3 |
| 174 | 174 | 27,0 |
| Entre ORF 174 y <i>dUTPase</i> | 106 | 19,8 |
| <i>dUTPase</i> | 576 | 51,6 |
| Entre <i>dUTPase</i> y <i>Id130 (efp)</i> | 137 | 43,8 |
| Región ORF162- <i>dUTPase</i> | 2514 | 42,1 |

Con respecto a la región analizada, los bajos contenidos GC de los ORF 273 y 174 podrían indicar que estos marcos de lectura no son funcionales y que, en cambio, se trata de regiones con funciones transcripcionales. Alternativamente, estos ORFs podrían haber sido adquiridos recientemente y aún no han adaptado su contenido GC al del huésped.

Pese a los análisis de motivos conservados, la búsqueda de promotores y las comparaciones del porcentaje GC, hasta que no se efectúe un ensayo de *Northern blot* no será posible determinar si estos ORFs son transcriptos.

Conclusiones respecto a la caracterización de secuencia de los ORFs de la región *iap-3*

En primer lugar, el marco de lectura del gen *iap-3* posee todas las características de los genes de la familia de las IAPs, entre ellos, sus motivos BIR y RING-Finger. Además, su contenido GC es similar a los otros ORFs identificados en *EpapGV*; indicando que su captura se ha producido en un pasado lejano en la línea evolutiva que condujo a *EpapGV*. Para el caso de *iap-3*, tal vez no sólo sea especialmente interesante identificar la existencia de sitios de inicio de la transcripción reales sino también analizar su cinética de expresión y determinar en qué tejidos de *E. aporema* es expresado. En cuanto a los demás ORFs localizados en las proximidades de *iap-3* (ORFs 162, 273 y 174), los mismos deberán ser analizados a fin de determinar la función de las proteínas para las cuales codificarían.

Análisis filogenético del gen *iap-3*

El gen EpaGV *iap-3* fue comparado con las secuencias de proteínas del GenBank empleando BLAST, a partir de este análisis se rescataron numerosas secuencias similares de diversos organismos. Dada la variabilidad en el largo de las IAPs se generó un apilamiento inicial con la secuencia completa de los IAPs de lepidópteros y de baculovirus. Posteriormente, este apilamiento fue refinado manualmente, dejando sólo las regiones conservadas BIR y RING-Finger y unas secuencias posteriores a este último motivo (Fig. 7.9). El apilamiento fue empleado para generar árboles filogenéticos con el paquete PHYLIP, mediante el criterio de máxima parsimonia. Análisis previos agrupaban a los IAPs de baculovirus en los grupos IAP-1, IAP-2 e IAP-3 (Maguire *et al.*, 2000). Con posterioridad, y a partir de la descripción de nuevos genes en otros baculovirus, Luque *et al.* (2001) definieron dos nuevas familias: IAP-4, compuesta por proteínas truncas e IAP-5, formada por IAPs solamente presentes en los GVs.

El árbol filogenético obtenido (Fig. 7.10) mostró resultados similares a los descritos por Luque *et al.* (2001). Al igual que lo observado por estos autores, los valores *bootstrap* para las familias IAP-1, IAP-2 e IAP-5 resultan sumamente altos (>98%). La separación entre los IAP-2 que pertenecen a NPVs de los grupos I y II, se asemejó a la establecida por Herniou *et al.* (2001) al trabajar con un apilamiento que contenía 63 genes comunes a los NPVs. Es probable que estas proteínas contengan en sus secuencias, señales filogenéticas indicadoras del camino evolutivo de estos virus. El ORF *iap-3* de EpaGV se encontraría inequívocamente ubicado dentro de la familia IAP-3. Los miembros de este grupo son altamente divergentes entre sí y no se agrupan con valores consistentes de *bootstrap*. Por otra parte los IAPs de lepidópteros no forma un grupo separado del resto de los IAP-3 de baculovirus.

De acuerdo con estos análisis, la familia de IAP-4, que originariamente contenía a OpMNPV IAP-4 y EppoNPV IAP-4 debería ser ampliada a los miembros *Spodoptera littura* NPV (SpltNPV) IAP, *Phthorimaea operculella* GV (PhopGV) ORF86 y *Lymantria dispar* MNPV (LdMNPV) IAP-3, todas ellas carentes del primer BIR. La ubicación de los ORFs Cp94 (IAP-4) y PhopGV ORF 86 en regiones similares de ambos genomas, indicaría que estos dos ORFs son homólogos entre sí.

RING-Finger

BIR 2

BIR 1

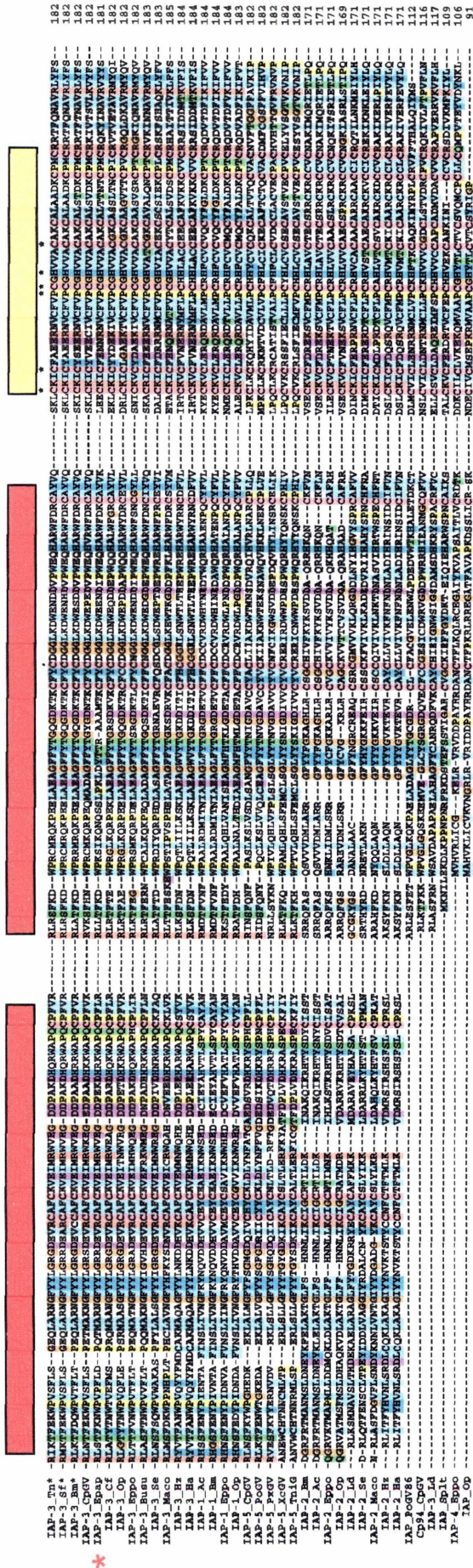


Figura 7.9. Alineamiento de secuencias de proteínas IAP de baculovirus y lepidópteros. Secuencias aminoácidas de proteínas homólogas a IAPs fueron alineadas empleando el algoritmo CLUSTALX. El alineamiento fue efectuado empleando la matriz BLOSUM62, con penalidades de apertura de gap de 11 y extensión del gap de 1. Posteriormente, el apilamiento fue editado manualmente empleando el editor SEAVIEW. Sólo los motivos BIR y RING-Finger se han dejado para esta comparación. Los asteriscos indican identidad y el guión simple indica un cambio conservativo y el guión doble indica un gap. Los nombres de los genes sin un motivo BIR han sido conservados para facilitar su identificación, pese a que en la actualidad han sido agrupados dentro de la familia de genes IAP-4. Sobre el margen izquierdo del alineamiento se ha indicado con un asterisco la secuencia de Epa3G1 IAP-3.

De acuerdo con el árbol de la figura 7.10 la delección del primer BIR parece haber ocurrido una vez en el ancestro hipotético común a los baculovirus. La proximidad de IAP-2 respecto de IAP-4 indicaría que el ancestro hipotético de los IAP-4 actuales podría haber evolucionado a partir de IAP-2. Por cuestiones que permanecen aún sin resolverse, la delección del BIR cercano al extremo amino terminal no ocasionó la desaparición de estos genes, probablemente debido a que aún sin ese motivo cumplen roles anti-apoptóticos no determinados.

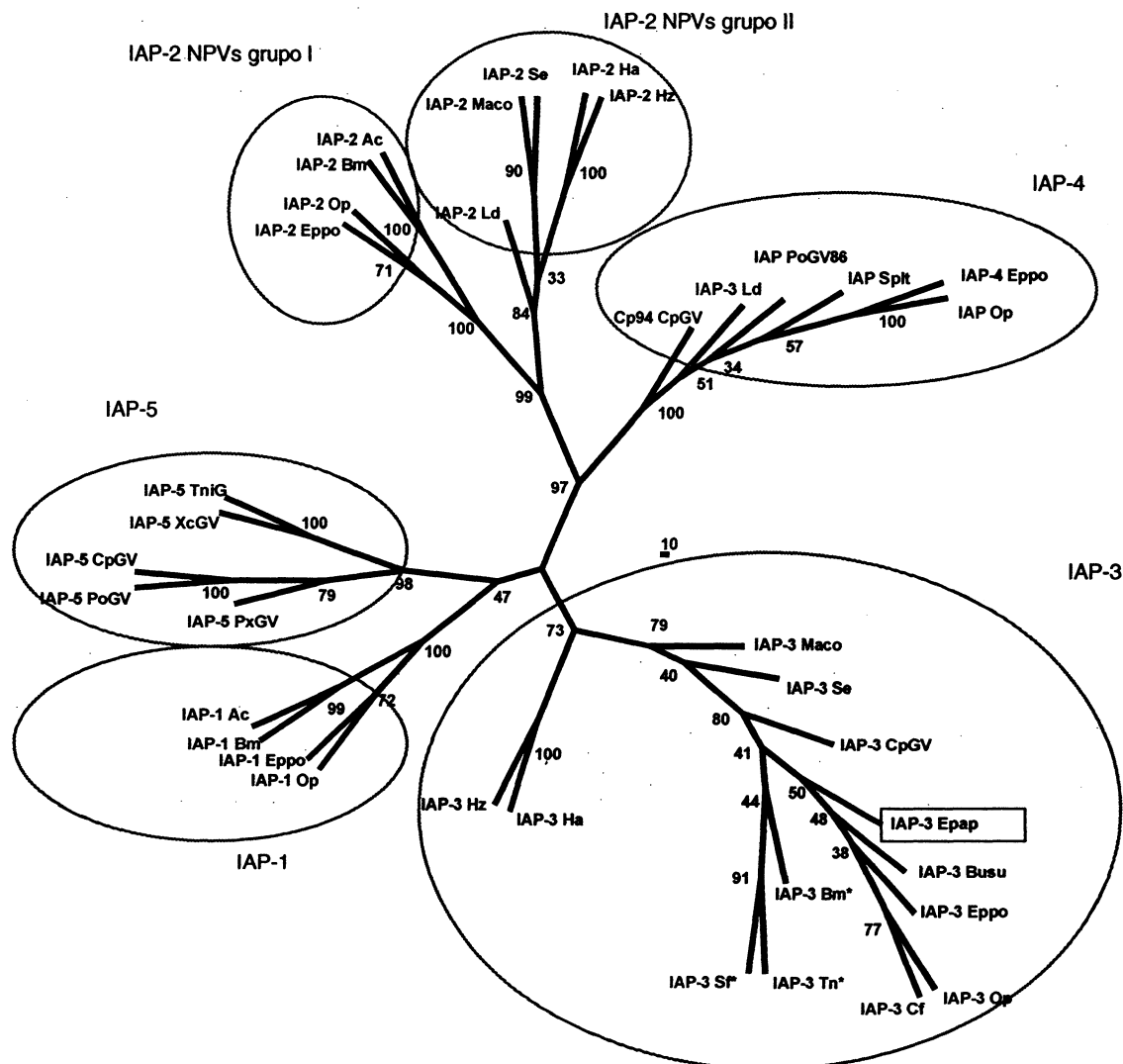


Figura 7.10. Árbol filogenético generado a partir de proteínas homólogas IAP-3 de baculovirus y lepidópteros. A partir del apilamiento de la figura 7.11, se construyó un árbol filogenético. El árbol fue elaborado con el paquete de programas PHYLIP empleando máxima parsimonia y la consistencia de la filogenia fue estimada por análisis de *bootstrap*. La figura muestra el árbol consenso de tipo radial con número de cambios, los números debajo de los nodos indican el *score* de *bootstrap* como porcentaje de 100 replicas y la barra indica 10 cambios. Se ha señalado los miembros de las familias IAP-1, IAP-2, IAP-3, IAP-4 e IAP-5. Las proteínas IAP-3 de insectos se distinguen de los IAPs virales por un asterisco (*), con una caja negra se indica la posición de EpapGV IAP-3.

Conclusiones

- Usando la sonda *iap-3* de CpGV, se ha localizado la posición del EpapGV *iap-3* a 9 kpb del final del gen de granulina.
- De la secuencia de un clon positivo para la sonda CpGV *iap-3*, se determinó que el gen EpapGV *iap-3* codificaba para una proteína de 256 amino ácidos.
- Este polipéptido presenta dos motivos BIR y un motivo RING-Finger característicos de las proteínas IAPs.
- El análisis filogenético de las proteínas de la familia IAPs de baculovirus y lepidópteros mostró que EpapGV IAP-3 se agrupó con el resto de las proteínas de la familia.
- La presencia de otros genes *iaps* fue explorada empleando sondas heterólogas arrojando resultados negativos. Sin embargo, hasta que la secuencia de EpapGV no se determine por completo, no es posible asegurar que los homólogos de estos ORFs no estén presentes en este genoma.

CAPÍTULO 8

ANÁLISIS DEL GENOMA DE EpapGV

Introducción

Uno de los desafíos que encuentran los Virólogos en su trabajo consiste en la determinación de la historia evolutiva de los virus. Previamente a la aparición de los métodos moleculares numerosos virus, en especial los patógenos para el ser humano, se clasificaron mediante reacciones serológicas. Por el contrario, las herramientas que tradicionalmente se han empleado en la clasificación de organismos tales como el uso de características morfológicas o el empleo de herramientas moleculares como el uso de secuencias, por ejemplo de DNA ribosomal (Woese *et al.*, 1990) no son fácilmente transferibles a los virus. Entre otras razones para ello, se destacan la ausencia de registro fósil para los virus y la plasticidad de sus genomas respecto de los organismos celulares. Pese a los problemas mencionados, se han empleado algunos genes para establecer relaciones filogenéticas entre los virus a DNA; en particular, se ha empleado el gen de la DNA polimerasa viral para analizar la evolución de los virus a DNA (Chen, F. & Suttle 1996; Iyer *et al.*, 1991; Moser *et al.*, 2001; Pellock *et al.*, 1996).

Se cree que los virus de insectos han existido desde la aparición de los insectos hace 350 millones de años. Posteriormente, 280 millones de años atrás, los baculovirus que infectaban a los dípteros y lepidópteros se separaron. En la actualidad es posible reconocer esta antigua separación al analizar el contenido de genes de los baculovirus que infectan a dípteros y lepidópteros (Afonso *et al.*, 2001).

Con la determinación de numerosos genomas completos de baculovirus, ha sido posible establecer relaciones filogenéticas entre los mismos, empleando los genes comunes a todos ellos. Hasta el presente se ha determinado la secuencia de 17 genomas de baculovirus de lepidópteros y uno de un baculovirus de un díptero. Herniou *et al.* (2001) fueron los primeros en reconstruir la filogenia de los baculovirus trabajando con un apilamiento que contenía a los 63 genes comunes a 9 baculovirus de lepidópteros totalmente secuenciados. Posteriormente, estos mismos autores analizaron la filogenia de 12 baculovirus de lepidópteros y uno de dípteros (Herniou *et al.*, 2003). Estos análisis han permitido clarificar las posibles estrategias evolutivas empleadas por los baculovirus.

A continuación, se analizará la porción secuenciada del genoma de EpapGV mediante herramientas bioinformáticas, se describirán los ORFs encontrados, y se analizará la evolución de éste genoma.

Objetivos

- Confirmar el alineamiento de fragmentos en el mapa de restricción.
- Identificar potenciales genes de interés en el genoma de EpapGV.
- Caracterizar los genes identificados a partir de sus secuencias.
- Determinar la presencia de regiones repetidas.
- Comparar el ordenamiento de genes potenciales de EpapGV con respecto a sus homólogos en otros baculovirus.
- Analizar eventos de reordenamiento en el genoma de EpapGV.
- Efectuar un análisis filogenético empleando los ORFs comunes a todos los baculovirus completamente secuenciados.

Resultados y discusión

Estrategia experimental

En este capítulo se aborda el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas del genoma de EpapGV. Estas secuencias se ensamblaron en secuencias continuas o *contigs* de acuerdo su ubicación en el mapa de restricción. Los *contigs* y las secuencias aisladas, se analizaron buscando sitios de restricción para las enzimas del mapa. La presencia de estos sitios se usó como un elemento adicional para asegurar su posición en el genoma. Los marcos de lectura con homólogos en otros organismos se detectaron por análisis de BLAST (Altschul *et al.*, 1997) y los ORFs fueron ubicados en el mapa de restricción. La descripción parcial del genoma de EpapGV se completó con marcos de lectura previamente identificados por otros investigadores de este proyecto. Cada uno de los ORFs y sus regiones adyacentes fue analizado para la presencia de promotores, *enhancers*, sitios de poliadenilación y motivos proteicos. Además, el genoma viral fue examinado con el fin de buscar elementos repetidos. Por otra parte, la continuidad de un ORF compartido por los extremos de dos fragmentos de restricción fue usada para confirmar el ordenamiento del mapa físico propuesto.

La posición de los genes de EpapGV fue comparada con respecto a otros genes de baculovirus y algunas regiones fueron analizadas con el fin de obtener información sobre la evolución del género *Granulovirus*. Finalmente, se seleccionaron todos los ORFs comunes a los baculovirus de lepidópteros totalmente secuenciados (20 en total) y con ellos se analizó la filogenia de acuerdo a la metodología de alineamientos concatenados (Herniou *et al.*, 2001).

Caracterización parcial del genoma de EpapGV

Ubicación de secuencias en el mapa de restricción

La mayor parte de las secuencias nucleotídicas analizadas fueron obtenidas por el autor a partir de los extremos de clones EcoRI, HindIII y BamHI utilizando *primers* universales y otros *primers* específicamente diseñados para corroborar la contigüidad de fragmentos genómicos (ver capítulo 2 “Materiales y métodos”). La secuencia del gen de granulina ha sido obtenida a partir de varios clones generados por PCR y de la secuencia de fragmentos genómicos de la región del gen de granulina con *primers* específicos (ver capítulo 6 y/o Parola *et al.*, 2002). Los extremos de los clones BgIII han sido secuenciados inicialmente por Alejandra Manzán; posteriormente, algunos de ellos fueron confirmados por secuenciamiento por el autor de esta tesis. Las secuencias completas de los genes *egt* y *me53* de EpapGV descritos por Manzán *et al.* (2002a) también se incorporaron al análisis.

Se ha incluido en este análisis la secuencia de un clon obtenido por Daniel Ghiringhelli (dato no publicado), que codifica para un fragmento de la subunidad mayor de la ribonucleótido reductasa (*rr1*). Su ubicación en el mapa de restricción se estableció en base a PCR sobre distintos fragmentos del genoma (dato no mostrado). Juan Cruz Casabona, ha provisto los datos de las secuencias de los fragmentos genómicos BgIII M, que corresponden a los marcos completos de las secuencias EpapGV *Xc17* y EpapGV *Ac29* y secuencias parciales del gen EpapGV *odv-e56*, tal como se describe en Casabona *et al.* (2002). La posición del gen de la *dUTPase* ha sido establecido por Alina Goldberg (Goldberg *et al.*, 2002a). También, se ha incluido en este análisis la posición de los genes *helicasa-1* (*hel-1*), *hel-2*, CpGV *ORF 88* (*Ac98*), *ORF 89* (*Ac96*) y CpGV *ORF 129* descritas en Manzán *et al.* (2002b). Las secuencias determinadas se muestran en el mapa de restricción de la figura 8.1.

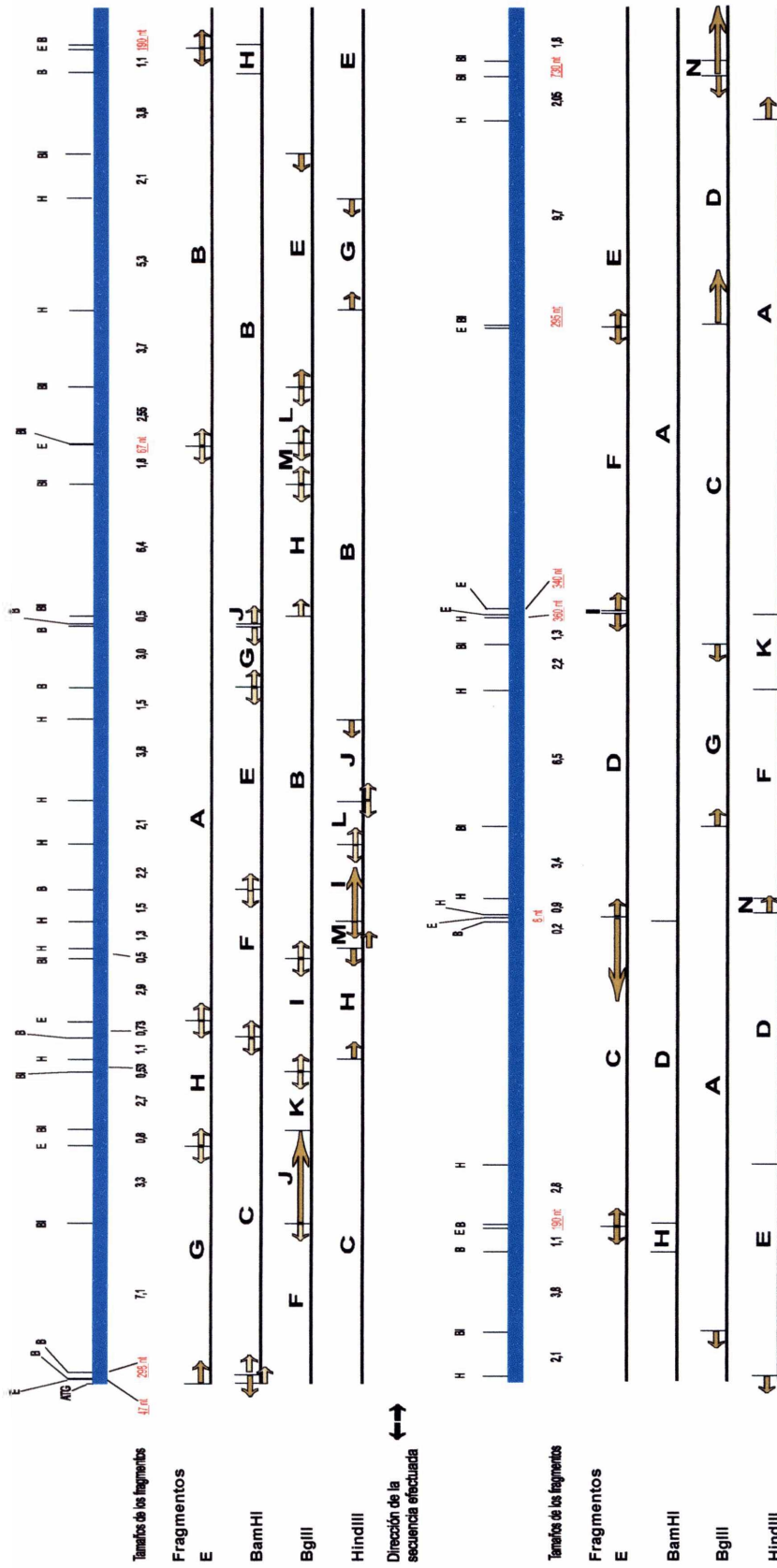


Figura 8.1. Regiones secuenciadas del genoma de EpapGV. Se muestra el mapa de restricción con todos los sitios de restricción en azul, debajo del mismo se han señalado los fragmentos generados con cada enzima de restricción. Sobre estos se ha señalado las direcciones de las secuenciaciones efectuadas. Se han abreviado los sitios de restricción: EcoRI: E, BamHI: B, BglII: BI y HindIII: H.

Búsqueda de ORFs con homólogos en otros organismos

Para determinar la existencia de ORFs con similitud a genes conocidos de otros organismos, se siguió la secuencia de análisis de la figura 8.2. Las secuencias se ensamblaron en *contigs* de acuerdo a su posición y cada uno de ellos fue analizado por BLASTX con el GenBank, seleccionándose las secuencias con similitudes significativas con respecto a genes de otros organismos. Posteriormente, se tradujeron los marcos de lectura y éstos se compararon con las secuencias del GenBank por BLASTP. La caracterización de los mismos se completó con análisis de motivos proteicos, así como de sitios promotores y de poliadenilación. Aquellas secuencias que no mostraron similitud con genes conocidos, fueron traducidas para detectar marcos de lectura continuos mayores a 50 aa y analizadas por BLASTP y BLAST-2 *sequences* (BLAST-2 seq; Tatusova & Madden, 1999), restringiendo la búsqueda a genes presentes en los baculovirus, en general, y los granulovirus, en particular.

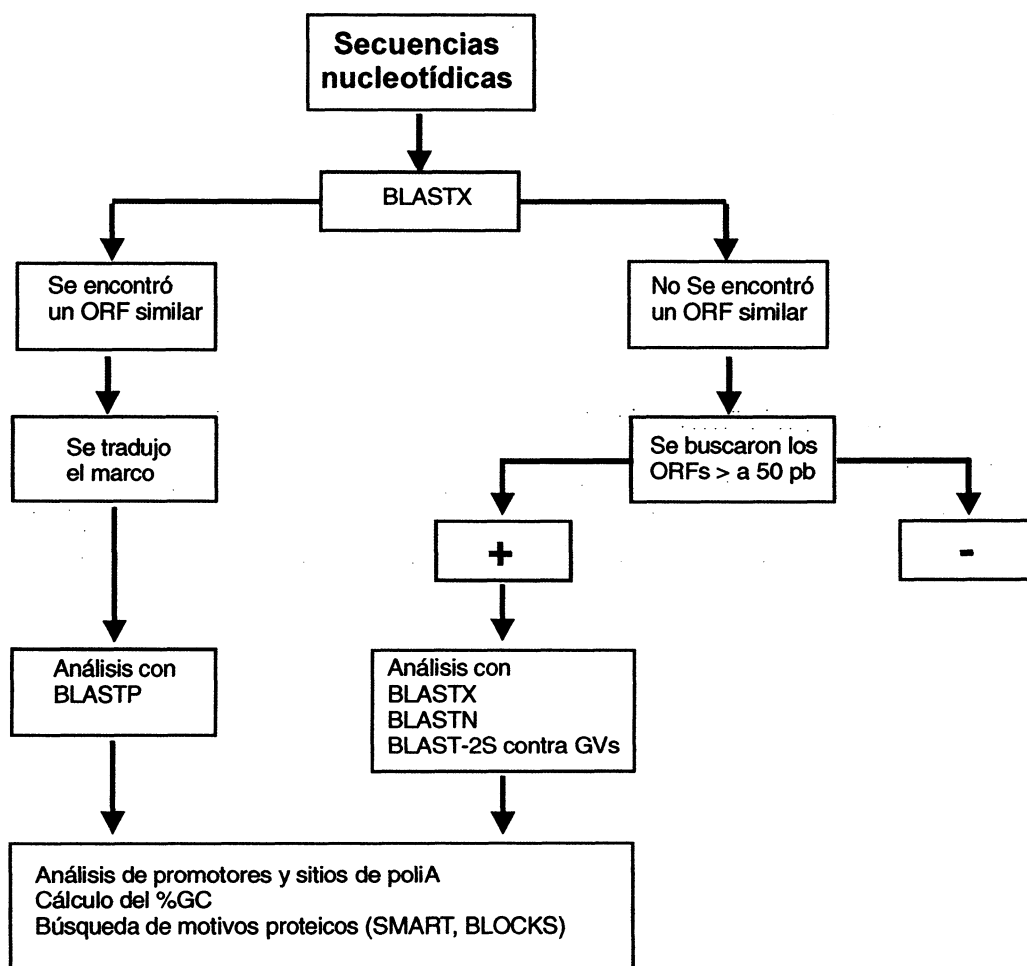


Figura 8.2. Estrategia empleada en el análisis de secuencias nucleotídicas de EpapGV para la búsqueda de ORFs con homólogos en otros organismos.

También se analizó la presencia de regiones características con buscadores de motivos: SMART (Simple Modular Architecture Resources; Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2002) y BLOCKS (Henikoff S. & Henikoff, J. G., 1994). Además, se amplió la caracterización de los ORFs sin homólogos analizando la presencia de promotores y sitios de poliadenilación. El algoritmo BLASTN se usó para analizar *contigs* sin homólogos conocidos.

Los resultados de la comparación de BLASTP con el GenBank, se describen en la tabla 8.1 y la posición de lo mismos se muestra en la figura 8.3. Los ORFs fueron nombrados de acuerdo a los marcos de lectura que presentaron el *score* más alto en BLASTP. Si bien algunos de ellos presentaron valores de "Expect" (E)¹ altos, tales como el gen de la *quitinasa* ($E= 2,2$) esos *matches* podrían deberse a la pequeña cantidad de aminoácidos comparados. A pesar de ello, su ubicación coincidió con ORFs similares en otros baculovirus. Solamente fueron comparados en BLASTP aquellos ORFs secuenciados por el autor, o en los cuales el mismo ha contribuido a su determinación.

Confirmación del mapa de restricción

Las posiciones de los fragmentos de restricción planteadas en el mapa del capítulo 5, han sido confirmadas a partir de un análisis de BLAST de cada una de las secuencias de los extremos de los fragmentos clonados. De esta forma, se aseguraron las contigüidades de fragmentos que tenían un ORF compartido por dos fragmentos (Fig. 8.3. A, Tabla 8.1). Así por ejemplo se aseguraron las contigüidades EcoRI E-G (*gran*)², B-C (*lef-1*), C-D (*odv-e25*), D-I-F(*dna-pof*), F-E (*exo-alk*), BamHI F-E (*odv-e56*), G-J (*odv-e66*), HindIII M-I (Xc17), I-L (*gp37*), L-J (*cath*) y BglII D-N-F (*egt*) (Fig. 8.3)

¹ Indica el número de diferentes alineamientos con *scores* (S) equivalentes, o mayores al valor S que se espera que aparezcan en la búsqueda en una base de datos por azar. Mientras más bajo es el Expect, más significativo es el *score*

² Se indica entre paréntesis los ORFs contenidos en las contigüidades.

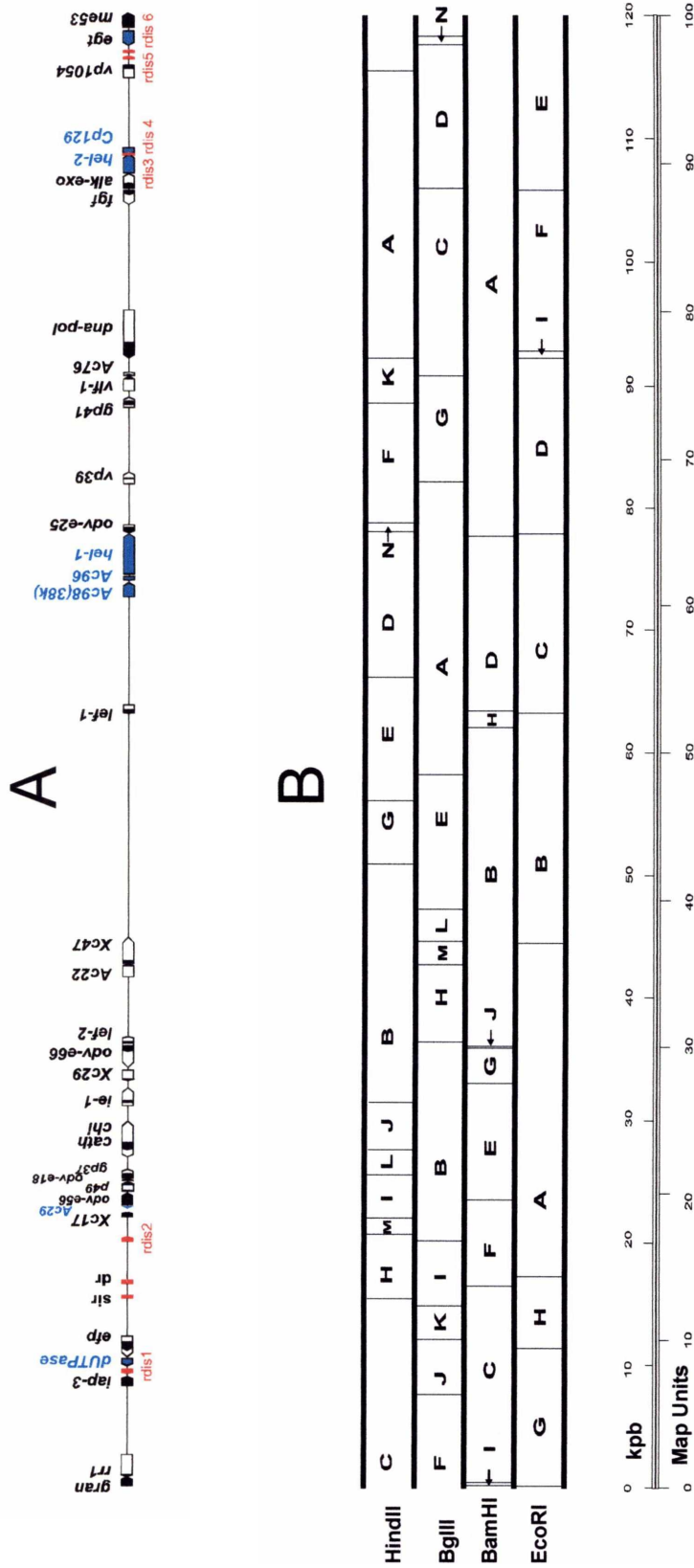


Figura 8.3. A: Marcos de lectura detectados en el genoma de EpapGV. Por encima del mapa de restricción se muestran los ORFs ubicados, se han abreviado los sitios de restricción: EcoRI: E, BamHI: B, BglII: B, HindIII: H. El nucleótido +1 del mapa se definió como el primer nucleótido del codón ATG de ORF de granulina. Las cajas con flechas indican la localización y la dirección de transcripción de los ORFs encontrados en EpapGV (en negro y blanco los determinados por trabajos del autor y en celeste los determinados por otros autores), con sus nombres correspondientes. Los tamaños de los ORFs de EpapGV que no han sido completamente secuenciados se asumieron iguales a sus homólogos en CpGV. Las porciones de los ORFs de EpapGV que han sido secuenciadas se pintaron en negro o de celeste. Las cajas rojas, representan repeticiones repetidas de forma simple (sir) y elementos inversamente repetidos de forma simple (dr) y las flechas rojas indican las repeticiones dispersas (rdis). **B: Mapa de restricción de EpapGV.**

Tabla 8.1. ORFs de EpapGV con homólogos presentes en otros baculovirus. Se muestra la posición y orientación de 36 marcos de lectura potenciales de EpapGV y los resultados de la comparación con las secuencias del GenBank usando BLASTP.

| Nombre del ORF | Largo del ORF (aa) | Fragmento genómico ^a | %GC | BLASTP, mejor match | Prot. similar (aa) | Región de alineamiento ^b | Largo Comparado (aa) | Expect. ID/S (%) ^d | Dirección de transcripción ^e | Prom. f | Posición de ORFs similares en otros baculovirus ^g | | | |
|-------------------------|--------------------|---------------------------------|------|--|--------------------|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------|---|---------|--|----|-----|-----|
| | | | | | | | | | | | Cp | Px | Xc | |
| <i>gran</i> | 248 | EcoRI E-G | 49,9 | <i>gran</i> CIGV | 249 | 1-248/1-248 | 248 | 1e-134 | >>> | L | 1 | 4 | 1 | 8 |
| <i>rr1</i> ^h | 29 | EcoRI G izq | 40,7 | <i>rr1</i> OpMNPV | 593 | 34-62/562-590 | 29 | 2e-6 | <<< | nd | 127 | A | A | A |
| <i>rr1</i> | 222 | EcoRI G | 50,4 | <i>rr1</i> OpMNPV | 593 | 1-220/288-488 | 220 | 2e-92 | <<< | nd | 127 | A | A | A |
| <i>iap-3</i> | 254 | BglII J | 52,0 | <i>iap</i> Tni | 378 | 1-254/97-379 | 254 | 5e-87 | >>> | e | 17 | A | A | A |
| <i>dUTPase</i> | 191 | BglII J | 51,6 | PEST <i>Anopheles gambiae</i> str. | 162 | 52-191/24-162 | 140 | 1e-53 | <<< | - | A | A | A | A |
| <i>efp</i> | 238 | EcoRI G-H | 42,7 | <i>efp</i> PhopGV | 595 | 2-238/134-391 | 237 | 5e-68 | <<< | nd | 31 | 26 | 27 | 23 |
| <i>Xc17</i> | 178 | HindIII M izq | 39,5 | ORF 5 AsGV | 206 | 1-88/1-88 | 88 | 3e-30 | >>> | L | 20 | 20 | 17 | A |
| <i>Ac29</i> | 66 | HindIII I | 43,7 | ORF 16 XcGV | 71 | 7-66/12-71 | 59 | 8e-05 | <<< | - | 19 | 17 | 16 | 29 |
| <i>odv-e56</i> | 180 | BamHI F-E | 46,0 | <i>odv-e56</i> CfGV | 353 | 1-180/131-310 | 180 | 3e-75 | >>> | L | 18 | 16 | 15 | 148 |
| <i>p49</i> | 145 | HindIII I | 32,4 | <i>p49</i> CIGV | 451 | 4-100/356-451 | 96 | 8e-20 | >>> | E/L | 15 | 14 | 13 | 142 |
| <i>odv-e18</i> | 89 | HindIII I-L | 47,4 | <i>odv-e18</i> CfGV | 88 | 7-77/7-72 | 71 | 0,36 | >>> | nd | 14 | 13 | 12 | 143 |
| <i>gp37</i> | 124 | HindIII I-L | 47,1 | <i>gp37</i> CpGV | 251 | 1-103/9-128 | 103 | 5e-28 | >>> | L/e | 13 | A | 107 | 64 |
| <i>cath</i> | 138 | HindIII L-J | 40,1 | <i>cath</i> CpGV | 333 | 3-138/6-145 | 136 | 8e-30 | <<< | L/E | 11 | A | 58 | 127 |
| <i>chi</i> | 36 | HindIII L-J | 42,6 | <i>chi</i> <i>Antheraea pernyi</i> NPV | 552 | 8-36/11-39 | 29 | 2,2 | >>> | L/E | 10 | A | 103 | 126 |
| <i>ie-1</i> | 119 | HindIII J der | 40,8 | <i>ie-1</i> CpGV | 488 | 44-117/89-162 | 74 | 2e-12 | >>> | nd | 7 | 10 | 9 | 147 |
| <i>Xc29</i> | 48 | BamHI E-G | 33,2 | ORF 33 CpGV | 294 | 9-48/255-294 | 40 | 0,19 | <<< | nd | 33 | 28 | 29 | A |
| <i>odv-e66</i> | 137 | BamHI G-J | 50,6 | <i>odv-e66</i> RaouMNPV | 701 | 15-136/133-259 | 122 | 1e-137 | <<< | nd | 37 | 30 | 149 | 46 |
| <i>lef-2</i> | 74 | BglII H izq | 48,8 | <i>lef-2</i> CpGV | 171 | 3-54/8-60 | 52 | 0,034 | >>> | nd | 41 | 32 | 35 | 6 |
| <i>Ac22</i> | 40 | BglII H-M | 58,1 | <i>Ac22</i> PhopGV | 366 | 2-38/327-363 | 37 | 2e-9 | >>> | nd | 48 | 37 | 45 | 22 |
| <i>Xc47</i> | 438 | BglII H-M | 43,7 | ORF 47 XcGV | 220 | 1-58/1-56 | 58 | 0,021 | >>> | L | 50 | 38 | 47 | A |

| Nombre del ORF | Largo del ORF (aa) | Fragmento genómico ^a | %GC | BLASTP, mejor match | Prot. similar (aa) | Región de alineamiento ^b | Largo Comparado (aa) | Expect ^c | ID/S (%) ^d | Dirección de transcripción ^e | Prom. ^f | Posición de ORFs similares en otros baculovirus ^g | | | |
|----------------|--------------------|---------------------------------|------|-----------------------|--------------------|-------------------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|---|--------------------|--|-----|-----|-----|
| | | | | | | | | | | | | Cp | Px | Xc | Ac |
| <i>lef-1</i> | 128 | EcoRI B-C | 40,0 | <i>lef-1</i> PhopGV | 233 | 1-127/105-231 | 127 | 1e-27 | 46/62 | <<< | nd | 74 | 55 | 82 | 14 |
| <i>Ac98</i> | | | | | | | | | | >>> | | 88 | 70 | 96 | 98 |
| <i>Ac96</i> | | | | | | | | | | <<< | | 89 | 71 | 97 | 96 |
| <i>hel-1</i> | | | | | | | | | | >>> | | 90 | 72 | 98 | 95 |
| <i>odv-e25</i> | 116 | EcoRI D izq | 45,1 | <i>odv-e25</i> CpGV | 213 | 2-116/96-212 | 115 | 2e-41 | 74/89 | <<< | nd | 91 | 74 | 99 | 94 |
| <i>vp39</i> | 69 | BglII G izq | 55,2 | <i>vp39</i> PxGV | 320 | 2-48/131-177 | 47 | 0,058 | 31/65 | >>> | nd | 96 | 79 | 111 | 89 |
| <i>gp41</i> | 125 | HindIII K der | 49,5 | <i>gp41</i> CpGV | 289 | 1-115/86-200 | 115 | 3e-41 | 66/86 | >>> | nd | 104 | 87 | 121 | 80 |
| <i>vif-1</i> | 75 | BglII G izq | 46,5 | <i>vif-1</i> CPGV | 378 | 36-242/308-376 | 207 | 1e-13 | 46/68 | >>> | nd | 106 | 89 | 123 | 77 |
| <i>Ac76</i> | 54 | BglII G izq | 39,0 | ORF 125 XcGV | 85 | 15-54/15-54 | 39 | 3e-4 | 60/80 | >>> | L | 107 | 91 | 125 | 76 |
| <i>dna-pol</i> | 334 | EcoRI D-I-F | 44,3 | <i>dna-pol</i> PhopGV | 1021 | 14-312/724-1020 | 298 | 3e-91 | 59/72 | <<< | nd | 111 | 93 | 132 | 65 |
| <i>fgf</i> | 97 | EcoRI F-E | 37,5 | <i>fgf-2</i> PhopGV | 387 | 26-93/27-94 | 67 | 1e-4 | 36/57 | <<< | - | 123 | 104 | 144 | 32 |
| <i>alk-exo</i> | 105 | EcoRI F-E | 43,7 | <i>alk-exo</i> PxGV | 378 | 6-79/3-79 | 70 | 1e-18 | 62/75 | >>> | - | 125 | 106 | 145 | 133 |
| <i>hel-2</i> | | | | | | | | | | >>> | | 126 | 106 | 145 | A |
| <i>Cp129</i> | | | | | | | | | | <<< | | 129 | A | A | A |
| <i>vp1054</i> | 63 | BglII D izq | 38,9 | <i>vp1054</i> CpGV | 332 | 4-63/271-331 | 60 | 1e-15 | 60/73 | >>> | nd | 138 | 115 | 175 | 54 |
| <i>egt</i> | 446 | BglII D-N-F | 43,6 | <i>egt</i> LaoIGV | 460 | 17-439/19-453 | 422 | 2e-22 | 55/73 | <<< | E | 141 | 128 | A | 15 |
| <i>me53</i> | 317 | BglII F der | 41,1 | <i>me53</i> CfGV | 296 | 26-247/33-264 | 221 | 2e-34 | 38/59 | >>> | E | 143 | 120 | 180 | 39 |

^a izq, indica que la secuencia del extremo del fragmento se encuentra próximo al punto cero del mapa; der, indica que la secuencia del extremo del fragmento encuentra distal del punto cero.

^b Se indica la región de alineamiento el ORF de EpapGV y el ORF más similar.

^c Expect: Indica el número de diferentes alineamientos con scores (S) equivalentes, o mayores al valor S que se espera que aparezcan en la búsqueda en una base de datos por azar. Mientras más bajo es el Expect, más significativo es el score.

^d ID: identidad, S: similitud.

^e >>>: sentido de transcripción igual al gen de granulina; <<<: transcripción en el sentido contrario al gen de granulina.

^f E: promotor temprano, comprende la secuencia TATA seguido por el sitio de inicio de la transcripción CA(GC/T)T, 20 a 40 nt downstream. L: promotor tardío, consiste en el motivo (A/T)GTAAG; nd: no descripto debido a la ausencia de la secuencia correspondiente a la región promotora. Los promotores indicados con la letra minúscula e, han sido atribuidos provisionariamente pese a encontrarse a distancias superiores a los 180 pb upstream del ATG.

^g A: ORF ausente.

^h Esta secuencia proviene de un clon originado en una PCR sobre DNA genómico de EpapGV.

Abreviaturas: Ac: *Autographa californica Nucleopolyhedrovirus*, CpGV: *Cydia pomonella Granulovirus*, CIGV: *Cryptophlebia leucotreta Granulovirus*, EpapGV: *Epinotia aporema Granulovirus*, LaoGV: *Lacanobia oleracea Granulovirus*, Op: *Orgyia pseudotsugata Nucleopolyhedrovirus*, PxGV: *Plutella xylostella Granulovirus*, XcGV: *Xestia c-nigrum Granulovirus*, Tni: *Trichoplusia ni*.

Potenciales ORFs ubicados

En total se secuenció y analizó aproximadamente el 30% del genoma de EpaGV (36,0 kpb). El contenido global GC calculado a partir de estas secuencias fue de 41,1%, similar a PxGV (40,7%), XcGV (40,7) y CpGV (45,2%), pero diferente del contenido GC de PhopGV (35,4). El contenido GC para las regiones codificantes osciló entre 32 y 52% (Tabla 8.1). Si bien se registraron algunos valores extremos para marcos de lectura poco secuenciados, es probable que los mismos tiendan a valores de %GC cercanos a 38-52% una vez que todos estos marcos estén completos. En general, las regiones intergénicas identificadas mostraron valores GC entre 20 y 30%, tal como han sido descrito por otros autores (Kuzio *et al.*, 1999).

A partir del análisis de estas secuencias se ubicaron veintiocho (28) genes potenciales, asignados en base a búsquedas de BLAST (Tabla 8.1). Incluyendo además ocho ORFs descritos por otros autores del mismo laboratorio (*Ac29*, *dUTPase*, *hel-1*, *hel-2*, *Ac96*, *Ac98*, *CpGV ORF 129* y *egt*). En total, se han localizado 36 ORFs en EpaGV.

Los ORFs asignados pueden dividirse en seis categorías de acuerdo con sus funciones: genes codificantes para **proteínas estructurales** [*granulina*, *odv-e66*, *p49*, *odv-e18*, *odv-e25*, *odv-e56*, *gp41*, *vp39*, *efp* (proteína de fusión o *envelope fusion protein*), *vp1054* y *Ac22* (*pif-2*)]; genes **involucrados en la replicación del DNA** (*lef-1*, *lef-2*, *dna-pol*, *vlf-1*³, *iap-3*, *hel-1* y *hel-2*); genes que codifican para **proteínas reguladoras o involucradas en la transcripción viral** (*vlf-1*, *ie-1* y *me53*); genes involucrados en el **metabolismo de nucleótidos** (*rr1* y *dUTPase*), **genes auxiliares** [*gp37*, *catepsina* (*cath* o *v-cath*), *quitinasa* (*chi*, *chiA* o *v-chi*), *egt* y *fgf*] y **ORFs con funciones desconocidas** (*Xc17*, *Xc29*, *Xc47*, *Ac22*, *Ac76*, *Ac29*, *Ac98*, *Ac96*, *alk-exo*, *Cp129*).

Los ORFs mencionados arriba, han sido detectados y asignados en base a su similitud con ORFs previamente descritos en otros GVs. Todos, excepto *dUTPase*, han sido hallados en la secuencia de CpGV, y **veinticuatro** de los genes localizados en EpaGV están conservados en todos los miembros de la familia *Baculoviridae* que infectan a lepidópteros (*lef-2*, *polh/gran*, *lef-1*, *ac22*, *efp*, *ac29*, *fgf*, *me53*, *odv-e66*, *vp1054*, *dna-pol*, *ac76*, *vlf-1*, *gp41*, *vp39*, *odv-e25*, *alk-exo*, *odv-e18*, *ie-1*, *odv-e56*, *Ac98*, *Ac96*, *hel-1* y *p49*).

³ El gen *vlf-1* es un activador de la transcripción de genes tardíos y, a su vez, estaría involucrado en el procesamiento y/o reparación de genomas maduros.

También, se han encontrado ORFs que sólo están presentes en todos los *Granulovirus* secuenciados (ORFs de EpapGV homólogos a Xc 17, Xc29 y Xc47) (Tabla 8.1).

Niveles de identidad y similitud

En general, en las búsquedas en BLASTP los índices de identidad más elevados se obtuvieron con genes pertenecientes al género *Granulovirus*. En particular, con *granulina* y *vp39* se obtuvieron los índices de identidad más altos y más bajos (Tabla 8.1). Cuando se analizaron los niveles de similitud para los mismos genes, el valor más alto encontrado correspondió a *granulina* (*gran*) y el más bajo a *quitinasa* (*chi*).

Orden de transcripción

La mayoría de los ORFs de EpapGV mostraron igual sentido de transcripción que sus homólogos en CpGV, PxGV y XcGV (dato no mostrado). La excepción lo constituyeron los marcos de lectura localizados entre *efp* e *ie-1* y el gen *rr1*, que mostraron una dirección de transcripción opuesta a sus homólogos en CpGV y en otros GVs. Los ORFs de EpapGV *fgf*, *alk-exo* y *hel-2* presentan sentidos de transcripción inversos a sus homólogos en PhopGV. Este último genoma es el único que posee esos genes invertidos.

Análisis de promotores y sitios de poliadenilación

La presencia de secuencias promotoras y señales de poliadenilación se analizó para todos los ORFs cuyas secuencias habían sido generadas por este autor y/o en las cuales el mismo hubiera colaborado (Tabla 8.2). Los resultados indicaron que de las regiones promotoras analizadas, sólo los genes *egt* y *me53* poseerían un promotor temprano exclusivamente, tal como lo había descrito previamente Manzán *et al.* (2002a). Los genes *granulina*, *Xc17*, *odv-e56*, *Xc47* y *Ac76* presentaron solamente promotores tardíos. Mientras que los genes *p49*, *gp37*, *quitinasa* y *catepsina* contarían con secuencias consenso características tanto de promotores tempranos como tardíos.

Pese a que los promotores tempranos están definidos como la secuencia TATA seguido del elemento CABT [CA(C/G/T)T] a no más de 180 nt previos del ATG. En la

Tabla 8.2 se ha incluido dos potenciales promotores tempranos que se encuentran en a distancias mayores a las convencionales en las regiones previas a los marcos de lectura de *iap-3* y *gp37*. Sus roles como promotores sólo podrán ser confirmados mediante estudios transcripcionales.

Se analizó también la presencia de señales de poliadenilación, tanto canónicas (AATAAA) como no canónicas (AAATAA). De las once señales potenciales de poliadenilación, nueve fueron del tipo canónicas y dos no canónicas. La posición de las mismas con respecto al final del marco de lectura varió desde cero pb, para aquellas que se encontraban solapadas con el codón de terminación TAA, hasta 50 pb *downstream* en la mayoría de los casos. Para los genes *efp*, *ie-1*, *odv-e66*, *lef-2*, *odv-e25*, *vp39* y *gp41*, no se ha podido extraer ninguna información dado que se carece de información sobre sus regiones flanqueantes 5' y 3'.

Tabla 8.2. Análisis de potenciales promotores y de potenciales sitios de poliadenilación.

| ORFs de EpapGV | Promotores | | Señales de poliadenilación ^c |
|------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---|
| | Tempranos (E) ^a | Tardíos (L) ^b | |
| <i>granulina</i> | - | ATAAG (-29) | AAATAA (*) |
| <i>rr1</i> | nd | nd | AATAAA (+2) |
| <i>iap-3</i> | TATA (-285), CAGT (-264) | --- | AATAAA (+17) |
| <i>dUTPase</i> | --- | --- | AATAAA (+33) |
| <i>Xc17</i> | --- | ATAAG (-13) | --- |
| <i>Ac29</i> | --- | --- | AATAAA (+27) |
| <i>odv-e56</i> | --- | ATAAG (-5) | nd |
| <i>p49</i> | TATA (-44, -34) CAGT (-17) | TTAAG (-11) | AATAAA (*) |
| <i>odv-e18</i> | nd | nd | AATAAA (*) |
| <i>gp37</i> | TATA (-230), CATT (-206) | ATAAG (-16); GTAAG (-12) | nd |
| <i>cath</i> | TATA (-15), CATT (-6) | TTAAG (-20); ATAAG (-56, -65) | nd |
| <i>chi</i> | TATA (-150), CATT (-140) | TTAAG (-6) | nd |
| <i>ie-1</i> | nd | nd | --- |
| <i>Xc29</i> | nd | nd | --- |
| <i>Ac22</i> | nd | nd | --- |
| <i>Xc47</i> | --- | ATAAG (-6) | --- |
| <i>lef-1</i> | nd | nd | --- |
| <i>vif-1</i> | nd | nd | AAATAA (+80) |
| <i>Ac76</i> | --- | ATAAG (-7) | --- |
| <i>dna-pol</i> | nd | nd | --- |
| <i>fgf</i> | --- | --- | nd |
| <i>alk-exo</i> | --- | --- | nd |
| <i>vp1054</i> | nd | nd | AATAAA (+92) |
| <i>egt</i> | TATA (-38), CATT (-8) | --- | AATAAA (*), AATAAA(+50) |
| <i>me53</i> | TATA (-141 y -104), CATT (-135 y-66) | --- | --- |

^a E: promotor temprano, comprende la secuencia TATA seguida por el sitio de inicio de la transcripción CA(G/C/T)T 20 a 40 nt *downstream*, hasta 180 nt *upstream* del ATG.

nd: no descripto debido a la ausencia de la secuencia correspondiente. Los promotores de los genes *iap-3* y *gp37* se encuentran a más de 180 nt *upstream* del ATG, pero han sido incluidos en esta tabla de forma provisoria.

^b L: promotor tardío, consiste en el motivo (A/T/G)TAAG.

^c Señales de poliadenilación, canónicas: AATAAA y no canónicas: AAATAA. Las señales macadas con un asterisco (*) indican que la señal de poliadenilación está superpuesto con el codón de terminación.

Descripción y análisis de los productos de traducción de los ORFs asignados

Proteínas estructurales

En base a la homología con respecto a otros baculovirus se han identificado diez (10), las proteínas estructurales. Éstas se han dividido de acuerdo con su ubicación en el cuerpo de inclusión. Algunas de ellas se encuentran localizadas en el cuerpo de oclusión, tales como Granulina, ODV-E66, P49, ODV-E18, ODV-E25 y ODV-E56. Otras, en cambio, son componentes de las nucleocápsides, como VP1054 y VP39 (la proteína mayoritaria), mientras que la proteína GP41 es parte del tegumento. A diferencia de los anteriores, EFP se localizaría sólo en los viriones brotantes. Recientemente, Pijlman *et al.* (2003) han demostrado que la proteína SeMNPV ORF35 (Se35) homóloga a Ac22, se encuentra asociada al ODV y es un factor esencial para la infección *per os* de insectos. Estos autores han llamado a esta proteína *per os infectivity factor-2* (PIF-2).

Si bien la mayoría de estas proteínas poseerían únicamente roles estructurales, EFP merece especial atención. Actualmente, se cree que las proteínas EFP median la fusión de los viriones con la membrana celular (Ijkel *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2000). Finalmente, en un reciente trabajo Lung *et al.* (2002) han demostrado que la proteína EFP (o F) del grupo II de NPVs es un análogo funcional de GP64. En la secuencia determinada de EFP, se han detectado motivos típicos para estas proteínas; uno de ellos consiste en una secuencia consenso de clivaje por la proteasa celular furina (K/RXXXK/R) y un grupo de aminoácidos conservados en estas proteínas. El otro motivo, *downstream* al sitio de clivaje (Fig. 8.4), consiste en una región conservada de 21 amino ácidos GXΦBΦΦGXΦXKΦΦΦGXΦDXXD en donde Φ representa sitios con aminoácidos predominantemente hidrofóbicos, B representa D o N, y X representa cualquier aminoácido. (Rohrmann & Karplus, 2001). Este sitio de clivaje y estos motivos apoyan la caracterización de éste ORF como una EFP.

| | |
|------------|--|
| EpapGV EFP | -----GRRSKRSIFGGTFNFVGRFYKSTIGLMDDTDAELLYEMARREN |
| Ld ORF 103 | SRWELNTKDPLAPRRKRGVLNFVGTVDKFLFGVMDSDARELHDLAKTSN NP_047767 |
| Se ORF 8 | ATLTKATLSPTKRRSKRGLNFNMGHVDPKYLFGIMSDDAHELHMLANTTN NP_037768 |
| Xc ORF 27 | ---TKPVKNGAKRNIFGGALNFVGRVDKYLFGVMDDKDAELLYKLAIKEN NP_059175 |
| Px ORF 26 | -----KKRQRRELLGGAFNFVGRFNKYVYGTMDDEDAELLYDVVRHEN NP_068245 |
| | * :*:*: * . * * *. *. *: : * |

Figura 8.4. Alineamiento de ORFs que presentan similitud con EpapGV EFP. El sitio del clivaje por la furina está subrayado y en gris se indican los aa conservados. Los números de acceso se indican a un costado del apilamiento. Se han apilado algunos miembros de EFP del grupo II de NPVs y de GVs.

Posteriormente, Goldberg *et al.* (2002a) obtuvieron la secuencia completa de esta proteína y realizaron un análisis funcional de la misma. Estos autores han encontrado el péptido señal, regiones transmembrana, y regiones de estructuras *coil-coil*, así como 11 cisteínas conservadas en todos los miembros de la familia.

Genes involucrados en la replicación y reparación del DNA

Dentro de esta categoría, en EpapGV se han localizado los siguientes genes: *lef-1*, *lef-2*, *dna-pol*, *iap-3*, *hel-1* y *hel-2*, *ie-1*, *vlf-1*, *dna-pol* y *exonucleasa alcalina (alk-exo)*. Pese a estar involucrados en la replicación, algunos de ellos (*ie-1*, *vlf-1* y *me53*) también intervienen en el control de la transcripción de ciertos genes.

Si bien no se conoce el mecanismo exacto por el cual los baculovirus replican sus genomas, se cree que el mismo se efectuaría mediante el mecanismo de círculo rodante. Se ha postulado que la proteína IE-1 se uniría a sitios específicos en el DNA, reclutando posteriormente proteínas que formarían el complejo de replicación. Entre las proteínas que se han postulado como parte del complejo de replicación, en EpapGV se ha identificado a: HEL-1, DNA-pol, LEF-1 (primasa), LEF-2. Todos ellos han sido identificados como esenciales para la replicación en los genomas de AcMNPV y OpMNPV en ensayos de replicación transientes (Mc Dougal & Guarino, 1999). Un segundo grupo de genes no imprescindibles para la replicación, pero asociados a la misma han sido encontrados también: *iap-3*, *hel-2*, *alk-exo* y *vlf-1* (Gomi *et al.*, 1997). El producto del gen *iap-3* estaría involucrado en la inhibición de la apoptosis, permitiendo de esta forma que el ciclo de infección viral llegue a su término, generando progenie. Un análisis más detallado del mismo se brinda en el capítulo 7.

La *hel-2* pertenece a la superfamilia I de las helicasas, que incluyen a PIF1 de eucariotas y RecD de *Escherichia coli*. Estas enzimas están típicamente involucradas en el metabolismo del DNA, en eventos tales como la replicación, la recombinación, o la reparación. Sin embargo, la *hel-2* no es un análogo funcional de la *hel-1* (Pearson & Rohrmann (1998).

Otro grupo de genes conservado en todos los virus de la familia *Baculoviridae* (*vlf-1* y *exonucleasa alcalina*) formarían parte de un sistema de procesamiento y/o reparación de genomas maduros (Hayakawa *et al.*, 2000).

Genes que codifican para proteínas reguladoras de la expresión génica o involucradas en la transcripción

El gen *ie-1* se transcribe tempranamente y su producto posee la capacidad de unirse a las regiones *hr* y activar la transcripción de genes tempranos. Si bien se ha secuenciado sólo 116 aa del extremo amino terminal de este gen, los primeros 43 aa del fragmento obtenido no presentan similitudes significativas con otros genes de esta familia. La falta de semejanza de esta porción, está en concordancia con observaciones de Ijkel *et al.* (1999) quienes han descrito que el extremo amino de estas proteínas está poco conservado, al igual que en el caso de otros activadores transcripcionales tales como *me-53* e *ie-0*.

La proteína ME-53 posee un motivo RING-Finger (Manzán *et al.*, 2002a). Este motivo *Zinc-Finger* del tipo GATA es capaz de unir específicamente a secuencia de DNA (A/T)GATA(A/G) en regiones regulatorias de genes. ME-53 poseería el rol de activador de la transcripción y actuaría en estadios tempranos de la infección. El gen EpapGV *me-53* posee dos promotores de la transcripción temprana (Tabla 8.2), la presencia de los mismos está en concordancia con su expresión temprana, necesaria para la transactivación de otros genes.

Además, de los genes nombrados anteriormente se ha detectado la presencia de del gen *vlf-1*, que está presente en todos los baculovirus secuenciados. Yang & Miller, (1999) han determinado que el producto de este gen se une a secuencias promotoras permitiendo la expresión alta de ciertos genes con promotores muy tardíos, tales como el de la poliedrina.

Genes con funciones auxiliares

La presencia en el genoma de EpapGV de los ORFs *cath* y *chi*, es consistente con la liquefacción observada en las larvas infectadas con EpapGV, las cuales poco después de muertas se hinchan, se tornan amarillentas, y sus tegumentos se rompen fácilmente (Sciocco-Cap *et al.*, 2001) (Fig. 8.2). Este efecto patogénico incrementa la dispersión de los poliedros en el ambiente.

Los genes *chi* y *cath* se encuentran adyacentes en el genoma de EpapGV, en un arreglo idéntico al observado en los genomas de los NPVs del grupo I (AcMNPV, BmNPV, OpMNPV y EppoNPV) y en CpGV. Curiosamente, la región intergénica que separa a los genes de *quitinasa* y *catepsina* posee una repetición directa de 30 nt separada por 38 pb (ver capítulo 11: "Apéndices"). Posiblemente, esta secuencia

repetida tenga roles transcripcionales, dado que los dos ORFs poseen sus promotores en esta región.



Figura 8.5. Larva de EpapGV melanizada. Las larvas infectadas se hinchan, se tornan amarillentas y su desarrollo se ve interrumpido. Los controles de larvas no infectadas exhiben un característico color rosa propio del estadio prepupa. Poco después de la muerte, la larva se torna amarronada y su tegumento se rompe fácilmente. Figura extraída de Sciocco-Cap *et al.* (2001).

Con el fin de analizar las secuencias intergénicas *chi-cath* de AcMNPV, BmNPV, OpMNPV, EppoNPV, CpGV y EpapGV, estas se apilaron en CLUSTAL (Thompson *et al.*, 1994). Este análisis determinó que las secuencias intergénicas *chi-cath* de otros baculovirus carecen de secuencias repetidas. Además, las regiones intergénicas *chi-cath* de CpGV y EpapGV son más largas que las de los NPVs, y no guardan similitud entre sí, como tampoco con respecto a las de los NPVs.

La proteína CATH pertenece a la superfamilia de las papaínas y al igual que la catepsina celular L, es sintetizada como una proenzima inactiva (pro-CATH) y es activada por el clivaje del propéptido (Hom *et al.*, 2002). La forma madura de esta enzima tiene un peso de 27,5 kDa. El procesamiento de la pro-CATH ocurriría tras la muerte del insecto, posiblemente al ser clivada por proteasas lisosomales. CATH se liberaría al medio gracias a la lisis celular y no por el sistema de excreción. Pese a ello, es sugestiva la presencia de un péptido señal en EpapGV *cath* entre los aa 1-18. Una situación similar se presenta con EpapGV *chi*, en donde pese a que la misma posee un péptido señal (aa: 1-16). Saville *et al.* (2002) han encontrado que la liberación de la quitinasa de AcMNPV en el medio extracelular, se produciría por lisis celular, más que por un mecanismo de secreción activa. La conservación de estos péptidos en EpapGV *cath* y en EpapGV *chi* podría sugerir un mecanismo de secreción aún no detectado o ser secuencias "fósiles" del organismo de donde se adquirieron. Tanto el gen *cath* como *chi* de EpapGV poseen promotores tempranos y tardíos de forma simultánea. Sin embargo, Kang *et al.* (1998) han descripto que el inicio de la transcripción de CpGV *cath* comienza desde promotores tardíos cercanos al ATG.

Análisis filogenéticos efectuado por Kang *et al.* (1998) han determinado que tanto *cath* como *chi* se habría adquirido de forma muy temprana en la evolución de los baculovirus. Sin embargo, en muchos genomas ambos genes están ausentes pero nunca se ha detectado la presencia en los baculovirus de uno solo de ellos. Recientemente, Hom & Volkman (2000) han mostrado evidencia que sugiere que la *quitinasa* podría servir también como una chaperona molecular para pro-CATH. Esta observación podría explicar por qué estos dos genes están siempre presentes en forma simultánea en todos los genomas de los baculovirus.

Aunque no se ha determinado la función de la proteína codificada por el gen *gp37*, su secuencia guarda similitud con las proteínas de inclusión de los *Entomopoxvirus* llamadas *spindilin*, las cuales son enhancers de la infección *in vivo*. Phanis *et al.* (1999), mapearon el inicio de la transcripción de los genes *gp37* de MbNPV y LdMPV en el motivo característico de un promotor tardío TAAG, situado a 11 nt previos al ATG. En concordancia, el gen *gp37* de EpapGV posee dos motivos TAAG a -16 y -12 nt (Tabla 8.2). La caracterización de éste gen se afianzó mediante una búsqueda de motivos en SMART, esta búsqueda detectó un péptido señal (aa: 1-8) y un dominio de unión a quitina (aa: 2-124), que también se encuentra en la familia *spheroidin/spindilin* de los *Entomopoxvirus*. Asimismo, a partir del apilamiento de EpapGV GP37 con otros miembros de esta familia, se han identificado regiones conservadas (Fig. 8.6). Por otra parte, EpapGV GP37 presenta un tripéptido His-Glic-Tir, característico del extremo amino terminal maduro de las *spindilin* (Dall *et al.*, 1993).

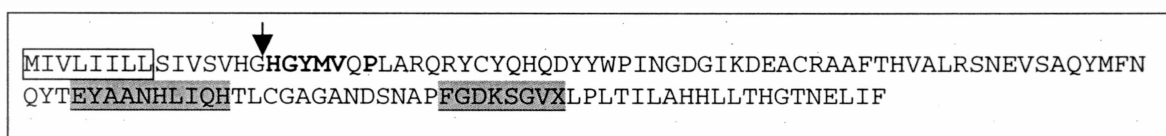


Figura 8.6. Regiones significativas en la secuencia parcial de EpapGV *gp37*. La flecha indica el sitio consenso de clivaje de la secuencia señal (en negrita), las secuencias coloreadas en gris y subrayadas indican regiones conservadas identificados por Vialard *et al.* (1990). El recuadro indica el péptido señal.

Manzán *et al.* (2002a) han determinado que EpapGV contiene un gen *egt* y determinado su función enzimática. Esta proteína se secretaría en la hemolinfa durante estadios tempranos de infección, inactivando a una de las hormonas que disparan el fenómeno de muda (ecdisona), mediante la adición de un residuo glucosa o galactosa. Es probable que el péptido señal encontrado en *egt* entre los aa 1 al 15 esté involucrado en la secreción de esta enzima.

Si bien en los *Granulovirus* se han descrito dos copias del gen promotor del crecimiento de fibroblastos (*fibroblast growth factor, fgf*), por el momento sólo una de ellas fue encontrada en el genoma de EpapGV. La función de éste gen, conservado en los genomas de los baculovirus que infectan a lepidópteros aún no ha sido establecida, pero en *Drosophila* un homólogo a *fgf* se requiere para el desarrollo traqueal (Sutherland *et al.*, 1996). Hayakawa *et al.* (2002), han sugerido que este gen estaría involucrado en la estimulación de la morfogénesis del sistema traqueal del insecto huésped, vía por la cual se propagan las infecciones sistémicas en las larvas infectadas.

Genes involucrados en el metabolismo de nucleótidos

La ribonucleótido reductasa (*rr1*) cataliza la producción de desoxinucleótidos (dNTPs) requeridos para la replicación del DNA, en células que no están en mitosis y para la reparación del DNA dañado (Reichard, 2002). La presencia de éste gen ha sido descrita sólo en los genomas de CpGV y PhopGV (dentro de los GVs). La *rr1* de EpapGV pertenece a la Clase I de estas enzimas, que se caracterizan por una enzima funcional formada por dos subunidades no idénticas (Reichard P., 2002).

En EpapGV se encuentra otra enzima involucrada en el metabolismo de nucleótidos, la *dUTPase*, encargada de convertir dUTP en dUMP. La conversión de éste nucleótido previene la incorporación de dUTP en el DNA (el cual es mutagénico) y genera una fuente de dUMP, el precursor de la síntesis de dTTP (Mathews & van Holde, 1995). La *dUTPase* sólo ha sido descrita para el granulovirus de *Agrotis segetum*, siendo el informe de Goldberg *et al.* (2002a) el segundo dentro de éste género. La homología de esta enzima con otros miembros de la familia se extiende desde el aminoácido 524, hacia el extremo carboxilo. En la región amino terminal de esta proteína (aa: 26-53), se ha detectado un motivo *coil-coil*; que podría ser utilizado para la interacción con otras proteínas. En este sentido, Herniou *et al.* (2003) han postulado que los genes *rr1*, *dUTPase* y *Ld138* (ausente en la secuencia analizada de EpapGV) estarían asociadas de manera funcional, formando parte de un posible sistema de reparación del DNA. De acuerdo con los postulados de Herniou *et al.* (2003), se presume que EpapGV codificaría para los genes *rr2a* y *Ld138*. Esta hipótesis se basa en que *rr2a* siempre ha sido encontrado junto a una copia de *rr1* y que *Ld138* sólo está descrito cuando está presente el gen de la *dUTPase*.

ORFs con roles desconocidos

En EpapGV se han encontrado ocho marcos de lectura cuyas funciones no han sido descritas aún, *Xc17*, *Xc29*, *Xc47*, *Cp129*, *Ac29*, *Ac76*, *Ac96* y *Ac98*. De estos ORFs, tres se encuentran en los GVs exclusivamente (*Xc17*, *Xc29*, *Xc47*) y son parte del grupo de 27 genes comunes a todos los GVs, mientras que *Cp129* está sólo presente en los genoma de CpGV y EpapGV.

Los genes *Ac96* y *Ac98* (*38K*) se encuentran presentes en todos los miembros de la familia *Baculoviridae*. Herniou *et al.* (2003), aseguran que estos genes junto con *helicasa-1* y *lef-5* se encuentran siempre presentes en 16 genomas de baculovirus en el arreglo *hel-1-Ac96-Ac98-lef-5* (Fig. 8.7). Según estos autores, es probable que los mismos estén asociados de tal forma que su transposición en el genoma de manera independiente sea desfavorable o que esta región sea esencial para la replicación viral y deba ser preservada.

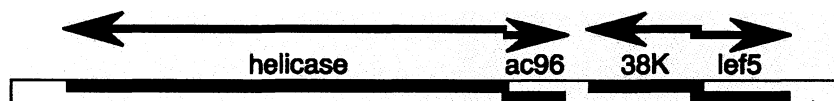


Figura 8.7. Esquema de los genes del cluster *Baculoviridae* *helicasa-lef-5*. La posición relativa de los genes *hel-1*, *Ac96*, *Ac98* (*38K*) y *lef-5* se encuentra conservada en 16 baculovirus secuenciados por completo. Figura extraída de Herniou *et al.* (2003).

Los genes *Ac29* y *Ac76* se encuentran presentes en todos los miembros de la familia *Baculoviridae* que infectan a lepidópteros. La búsqueda de motivos proteicos conocidos por SMART encontró en la proteína *Xc29* una región transmembrana (TM) entre los aa 24 a 46. Sin embargo, en *Ac76* se encontraron dos motivos más interesantes: un péptido señal (aa: 1-18) y una región transmembrana (aa: 24-46). En general, los péptidos señal y los motivos TM están asociados a funciones estructurales, resultaría de interés analizar la presencia de estas proteínas en el cuerpo de inclusión.

Los miembros de la familia *Xc47* fueron apilados con el fin de detectar regiones comunes a todos ellos (apilamiento no mostrado). Los resultados mostraron tres regiones comunes, una de ellas en el extremo amino terminal con 24 aa de largo, otra cercana a esta última 12 aa y una tercera región de 38 aa con un dominio *coil-coil*. La búsqueda de motivos para los distintos miembros de esta familia la familia sólo arrojó

un valor significativo de E , para el motivo *coil-coil*. Este motivo, es el único común a todos los miembros de esta familia. En EpapGV estas proteínas poseen además repeticiones internas exclusivas con funciones no asignadas asociadas a ningún motivo.

Desafortunadamente, el análisis de motivos no brindó resultados significativos como para ampliar el conocimiento de estas proteínas. Indudablemente, sus funciones deberán ser atribuidas mediante análisis funcionales.

Análisis de ORFs potenciales

Aquellas secuencias y *contigs* sin genes homólogos aparentes en BLAST, fueron traducidas y se escogieron los marcos de lectura mayores a 50 aminoácidos no solapados. En regiones poco secuenciadas se analizaron, de manera provisoria, marcos de lectura solapados entre sí (fragmento HindIII G). Todos los ORFs potenciales se analizaron de acuerdo con el protocolo de análisis de la figura 8.2 y los resultados se muestran en la Tabla 8.3.

Los resultados de la Tabla 8.3 aportaron pocos datos respecto a motivos proteicos, F-Box (ORF 471), PHD (ORF 413, péptido señal (ORF 234) y regiones transmembrana (ORF 357 y 294). El análisis funcional de estos motivos podría aportar algunas pistas sobre los roles proteicos.

Si bien la mayoría de los ORFs seleccionados tienen un porcentaje GC (35-48%,) muy similar al contenido de las regiones codificantes de ORFs con homólogos conocidos (38-52%), algunos de ellos poseen valores GC notablemente bajos (ORFs: 273 y 174) (Tabla 8.3). Es probable que estos últimos ORFs hayan sido adquiridos recientemente y aún no hayan adaptado su contenido GC al del huésped.

El ORF 471 presentó un motivo F-box, este dominio fue inicialmente descrito en las ciclinas-F que interactúan con la proteína SKP1 9 (Bai *et al.*, 1996). El motivo F-box está presente en numerosas proteínas y sirve como un nexo entre una proteína blanco y una enzima conjugada con ubiquitina. El complejo SCF (por ejemplo: Skp1-Cullin-F-box) juega un papel similar al de la ligasa E3 en la vía de degradación proteica mediada por ubiquitina (Patton *et al.*, 1998). En los baculovirus, al menos se ha descrito una proteína con un dominio F-Box (AcMNPV ORF 12), de función aún no caracterizada. Sin embargo, el ORF 471 y Ac12 no tienen similitudes sustanciales excepto por el dominio F-Box.

Tabla 8.3. Análisis de ORFs potenciales

| ORFs ^a | Nombre abreviado | % GC | Promotores ^b | PoliA ^c | Motivos ^d |
|---|------------------|------|-------------------------------------|--------------------|--|
| Bgl II F der 162 +3 | 162 | 50,6 | nd | AATAAA (+3) | --- |
| Bgl II J izq 273 +2 | 273 | 31,9 | --- | --- | --- |
| Bgl II J izq 174 -2 | 174 | 27,0 | TATA(-103), CAGT(-98) CATT(-85), | AATAAA (+21 y +60) | --- |
| Contig BglII K-I 348 -2 | 348 | 42,8 | --- | --- | --- |
| Contig EcoRI H-A 594 +1 | 594 | 47,0 | nd | nd | --- |
| ORF HindIII H-M 357 -3 | 357 | 45,9 | --- | --- | --- |
| ORF HindIII H-M 244 +1 | 244 | 43,9 | --- | nd | --- |
| Contig BamHI E-G 639 -3 | 639 | 35,8 | --- | --- | F-BOX: 2-50 |
| Contig EcoRI A-B 852 +1 | 850 | 46,4 | --- | --- | --- |
| Contig BglII L-E 680 +3 | 680 | 39,3 | nd | nd | --- |
| HindIII C izq 234 +3 | 234 | 35,9 | --- | --- | TM: 43-65 |
| HindIII C izq 357 +2 | 357 | 41,5 | --- | --- | PS: 1-17 Rep1: 21-80 Rep2: 29-89 |
| ORFs localizados en clones cuya polaridad aún no se ha determinado ^e | | | | | |
| ORF HindIII G 77 164 +2 (54 aa) | 164 | 39,6 | nd | nd | --- |
| ORF HindIII G 77 114 +3 (38 aa) | 114 | 41,6 | TATA (-22), CATT (-5) | nd | PS: 1-34 |
| ORF HindIII G Sp6 413 -3 (137aa) | 413 | 41,9 | nd | nd | PHD: 30-84 |
| ORF HindIII G Sp6 249 -1 (82 aa) | 249 | 41,0 | nd | --- | PS: 1-41 TM1: 27-40 TM2: 21-52 |
| ORF HindIII G Sp6 186 +2 (61 aa) | 186 | 42,2 | nd | --- | --- |
| ORF HindIII G Sp6 165 +1 (54 aa) | 165 | 43,6 | nd | --- | --- |

^a Se indica el nombre del ORF en función de su ubicación y el largo del mismo en nt. Además, se añade el marco en el que está codificado. Para el caso de secuencias en los extremos de fragmentos, la posición de los ORFs se indica con izq y der. Izq, indica que la secuencia del extremo del fragmento se encuentra próximo al punto cero del mapa y der, indica que la secuencia del extremo del fragmento encuentra distal del punto cero del mapa, cuando el mismo es graficado de manera lineal. (+), indica que posee el mismo sentido de transcripción que el gen de granulina y (-), el contrario.

^b Promotor temprano (E), consiste en la secuencia TATA seguida por el sitio de inicio de la transcripción CA(G/C/T)T, hasta 180 nt *upstream* del ATG. Promotor tardío (L), consiste en el motivo (A/T/G)TAAG. nd: no descripto debido a la ausencia de la secuencia correspondiente.

^c Señales de poliadenilación, canónicas (AATAAA) y no canónicas (AAATAA).

^d Se indica el tipo y la posición de los motivos analizados por SMART. Abreviaturas: PS: Péptido señal, TM: Región transmembrana, Rep: regiones con secuencias repetidas y PHD: motivo PHD-Finger.

^e Dado que la polaridad de éste fragmento no ha sido atribuida, sus extremos se nombran de acuerdo con el *primer* con que fueron secuenciados. Los ORFs del clon HindIII G se solapan entre sí. Sólo para estos ORFs se ha escrito entre paréntesis su largo en aminoácidos.

La secuencia del ORF 357 presenta un péptido señal y secuencias repetidas de 33 pb que codifican el motivo: EKSTETTPKGI con un papel desconocido aún. Además, este ORF posee secuencias que codifican para dos repeticiones imperfectas del motivo anterior (ver capítulo 11: "Apéndices").

El motivo PHD-Finger, localizado en el ORF 413, es una señal del tipo PHD zinc-Finger-like C₄HC₃ y se encuentra en proteínas nucleares que estarían involucradas en la regulación transcripcional mediada por cromatina (Aasland *et al.*, 1995; Pascual *et al.*, 2000). El motivo PHD-Finger es reminiscente pero distinto de los C₃HC₄ RING-Finger. Este dominio podría estar involucrado en interacciones proteína-proteína y ser importante para el ensamblado o la actividad de complejos de multicomponentes

involucrados en la activación o represión transcripcional. De modo similar al RING-Finger, el PHD-Finger uniría dos iones zinc.

Los ORFs 294 y 357 podrían tratarse de proteínas estructurales, dada la presencia de un motivo asociado al direccionamiento de la proteína a la membrana (en el ORF 357 y en el ORF 294) y de dos regiones transmembrana (en el ORF82)

En conclusión, el análisis de estos ORFs no provee información sustancial como para asignarles funciones conocidas. Sin embargo, los datos presentados aquí podrían ser de utilidad para estudios funcionales.

Búsqueda y análisis de secuencias repetidas en el genoma de EpapGV.

La presencia de secuencias repetidas y palindrómicas en EpapGV se analizó extensamente. Si bien no se localizaron las típicas secuencias *hrs* presentes en otros baculovirus, se han detectado seis secuencias repetidas dispersas (*rdis*) del tipo palíndromo imperfecto (Fig. 8.3 y 8.8), así como una variedad de elementos repetidos y palindrómicos (Tabla 8.5).

| | | *** | *** | * | | *** | * | *** | ** | | * | ***** | ** |
|---|--------|--|--|---|--|-----|---|-----|----|--|---|-------|----|
| 1 | B1-FJ | ATGATGTCGAATGTGTAAATTCAAAACT | -CAACTTTTAGATTTCACATTCGACATCAT | | | | | | | | | | |
| 3 | Eco-E | ATGATGTCGAATGTGAAAAATC | -AAAACCCAACTTTTCATTTTCACATTCGACATCAT | | | | | | | | | | |
| 6 | B1-DNF | ATGATGTCCAATCTGGAAATTAT | -AAAATCAAAAAGTTTATATTTCCAGATTGGACATTAT | | | | | | | | | | |
| 2 | B1-KI | ATGACGTCGAACTCATTTCCGCAAAAAAATAAAAGTTTATATTTCCACATTCGACATCAT | | | | | | | | | | | |
| 5 | B1-DNF | ATGCTGTTCGA-----GAAAAGCCAAAAAGTTAAAGTTTAGATTTCACATTCGACATCAT | | | | | | | | | | | |
| 4 | Eco-E | ATGATGTCGAATTTGGAAAATA--AAACTTTTAATTTTACAATTCAAATTTGGACATCAT | | | | | | | | | | | |

Figura 8.8. Secuencias repetidas dispersas (*rdis*) en EpapGV. Alineamiento de CLUSTALX empleando parámetros estándar de las regiones repetidas dispersas del genoma de EpapGV. Sobre la izquierda se indica el número de la repetición, en función de su aparición en el genoma, y la posición de acuerdo al *contig* en el que se encuentra. Con estrellas se indican identidad del 100% para ese nucleótido en todas las secuencias y con gris cuando al menos cuatro nucleótidos coinciden. Las repeticiones con extremos complementarios han sido subrayadas. La secuencia de *rdis1* se ha invertido para facilitar su comparación con las demás repeticiones.

Las repeticiones dispersas son secuencias del genoma de EpapGV cuyos largos varían de 49 a 59 pb que poseen un elevado nivel de identidad entre sí, en especial en ambos flancos. Las *rdis* 1, 3 y 6 presentan altas similitudes entre sí (mayores al 75 %) y poseen la capacidad de formar estructuras cruciformes gracias a sus extremos complementarios. Cinco de estas secuencias se encuentran dispuestas de forma directa en el genoma y sólo *rdis1* presenta un sentido opuesto. Las *rdis* no parecen agruparse en lugares particulares del genoma, sin embargo de las seis secuencias

detectadas dos pares se encuentran muy cercanos (**rdis3** y **rdis4** separadas por 113 pb y **rdis5** y **rdis6** separadas por sólo 85 pb) (ver capítulo 11 “Apéndices”). Ambos pares de repeticiones se encuentran en regiones no codificantes, **rdis3** y **rdis4** en la región intergénica entre *hel-2* y *Cp129* y **rdis5** y **rdis6** en la región *downstream* a *egt*. Con respecto a las repeticiones que aparecen de a pares, la similitud que presentan entre sí los miembros de estos pares (rdis 3 respecto de rdis 4 y rdis 5 con rdis 6) es menor que la que presentan las rdis 1, 3 y 6 entre sí. Otra de las repeticiones (**rdis1**) se encuentra interrumpiendo el marco de lectura del ORF 174, ubicado entre *iap-3* y *dUTPase* y posee una longitud de 58 pb. La segunda repetición (**rdis2**), se encuentra en el *contig* BgIII-KI *upstream* al ORF potencial 348.

Ninguna de las repeticiones dispersas de EpapGV muestra similitud a nivel de secuencia con respecto a las repeticiones de CpGV, ni con ninguna repetición conocida, el único es a nivel estructural. Sin embargo, las rdis de EpapGV y CpGV son del tipo son palíndromes imperfectos y pueden formar estructuras cruciformes. Esta observación sugeriría que, tal vez, las repeticiones dispersas de los genomas de EpapGV, CpGV y PhopGV tengan una alta tasa de variabilidad con respecto a los ORFs comunes, o bien que las distancias evolutivas que separan estos genomas sean grandes.

Luque *et al.* (2001), han sugerido que las regiones repetidas en el genoma de CpGV poseen roles transcripcionales y/o orígenes de replicación. Es posible que algunas repeticiones, por ejemplo la repetición contigua a *dUTPase* hayan estado involucradas en reordenamientos genómicos. Un análisis más detallado del rol de esta repetición, se abordará más adelante. Si bien existe cierta similitud entre algunas rdis de EpapGV con las repeticiones de CpGV, como su tamaño y la complementariedad de sus extremos, no existen parecidos a nivel de secuencia entre sí, ni con otras repeticiones de GVs.

Un segundo grupo de secuencias repetidas, sin similitud con repeticiones propias de los baculovirus, fue agrupado en la Tabla 8.5 en donde se muestran sus secuencias y principales características. Además, en el capítulo 11 “Apéndices” se amplía la caracterización de las mismas. Estas repeticiones pueden agruparse de acuerdo a la posición que ocupan en el genoma en: a) regiones sin ORFs conocidos o tentativos, b) repeticiones en localizadas en regiones promotoras *upstream* al ATG y c) repeticiones dentro de marcos de lectura de ORFs tentativos.

En la primera categoría encontramos las repeticiones directas de 79 pb en el *contig* BamHI C-F y las repeticiones inversas simple (SIR, *simple inverted repeats*) del extremo derecho del clon HindIII H. Estas secuencias se hallan separadas entre sí por 1,1 kpb y en la posiciones equivalente del genoma de CpGV se halla una región con ORFs exclusivos (ORFs 25-27) rica en elementos repetidos grandes. Sin embargo, las repeticiones de ambos genomas no guardan similitud entre sí. Luque *et al.* (2001) han postulado que esta región repetida de CpGV tendría características de *ori no-hr*. Cuando la secuencia completa de EpaGV esté disponible, será posible generar un mejor análisis comparativo de diversas regiones repetidas y analizar su evolución.

Tabla 8.5. Resumen de las repeticiones encontradas en el genoma de EpaGV. Las repeticiones se encuentran ubicadas en la tabla de acuerdos con su aparición en el genoma de EpaGV.

| Ubicación ^a | Tipo de repetición y secuencia ^b | Dist. entre repeticiones | Comentarios |
|------------------------|---|--------------------------|---|
| Contig BamHI C-F | Repetición directa imperfecta (79 pb) CTTGTGTGACTGTTACAACCTCGTGGTTCTGA (X ₇) AATCT TATGTAATTGGTATAACACGTCGGTTCGATTCCACCG | 10 | - |
| HindIII H, izq | Repeticiones inversas A: CAATTTTAACCAATAATTGACATTTTAAAATTG B: ATTTTTCgAgTCGAAAAAAT C: CGTACTATTTTAgTTACATAgTACG | A-B: 137 B-C: 47 | - |
| Contig HindIII M-I | Repetición directa (23 pb) CATCTTGAAAAGGTT (X ₂) AGGTTAA | 0 | Se ubica en la región promotora de los ORFs <i>Ac29</i> y <i>odv-e56</i> . Posible rol transcripcional. |
| Contig HindIII L-J | Repetición directa (30 pb) TTAATTATTGCAAAAATTAATACATATCAC | 38 | Se ubica en la región promotora de los ORFs <i>chi</i> y <i>cath</i> . Posible rol transcripcional |
| Contig BgIII L-E | Repetición del elemento AAC AAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA ACACCA | 0 | Codifica para una secuencia rica en treoninas en uno de los marcos de lectura |
| HindIII C-der | Repetición directa (33 pb) AGAAAAATCAACAGAGACAACCAAAAAGGAAT | 0 | Interrumpe el marco 357 y codifica para una secuencia repetida proteica: EKSTETTPKGI |

^a izq: extremo izquierdo; der: extremo derecho.

^b Entre paréntesis, se indica la longitud de secuencia no consenso. Con una X se indican los nucleótidos que no presentan similitud entre una unidad repetida y otra. Las secuencias complementarias se han subrayado.

Las repeticiones encontradas en los contigs HindIII M-I y HindIII L-J, poseen características comunes, ambas se ubican en regiones intergénicas que separan a genes enfrentados por sus extremos 5'. Dado que en general, en estas regiones el DNA viral interactúa con factores de transcripción y el complejo RNA-pol, es posible que las secuencias repetidas dentro de regiones promotoras tengan roles transcripcionales.

El tercer grupo de repeticiones, ubicado en el *contig* BgIII L-E y en HindIII C-extremo izquierdo, interrumpe ORFs potenciales y codifica para secuencias repetidas (poli treoninas y motivo EKSTETTPKGI). Dado que estas repeticiones están interrumpiendo

ORFs potenciales (sin caracterización funcional), no es posible descartar que las secuencias repetidas estén relacionadas con la transcripción o con la replicación.

En conjunto, se ha ampliado considerablemente conocimiento del genoma de EpapGV en cuanto a las regiones repetidas encontradas. Por otra parte, la descripción de estas secuencias ha brindado elementos para la caracterización de ORFs no conocidos y de regiones promotoras.

Organización genómica de EpapGV

Con respecto a la organización genómica de los granulovirus, Luque *et al.* (2001) han señalado que el orden de genes de los GVs totalmente secuenciados (CpGV, PxGV y XcGV) es muy similar entre sí. Además, en CpGV se encuentran cuatro regiones con alta homología de orden respecto a otras en AcMNPV, que incluyen además regiones descritas en Xc y Px⁴: **a**), Cp7-9 (*ie-1*); **b**), Cp83-96 (*p6.9*, *lef-5*, *hel-1*, *odv-e25*, *iap-Cp94*, *lef-4*, *vp39-capsid*); **c**), Cp101-108 (*vp91-capsid*, *t1p*, *gp41*, *vlf-1*); **d**), Cp111-114 (*dna-pol*, *desmoplakin*, *lef-3*). Estas regiones corresponden a los ORFs de AcMNPV: **a**), Ac147-145; **b**), Ac103-89; **c**), Ac83-75; **d**), Ac65-68 (Luque *et al.*, 2001).

Con el fin de ampliar el conocimiento de los genomas de los granulovirus, se ha analizado el contenido y el orden de genes de EpapGV con respecto de otros miembros del género totalmente secuenciados. El análisis del orden fue efectuado empleando gráficos de paridad de posición de genes (*gene parity plot*), en los cuales se comparan las posiciones relativas de los genes en los distintos virus de acuerdo con Hu *et al.* (1998), (Fig. 8.9, Tabla 8.6).

Con respecto al contenido de genes de EpapGV, éste es muy similar al de CpGV. De los 36 ORFs identificados con homólogos en otros organismos, el único gen presente en EpapGV y ausente en CpGV es el gen de la *desoxiUTPasa* (*dUTPase*). Por el contrario, los genomas de XcGV, PxGV y PhopGV difieren en 5, 7 y 6 ORFs, respectivamente. La mayoría de los ORFs asignados en EpapGV cubren regiones entre los 20-43 kpb y 77-120 kpb y en líneas generales el orden de genes en EpapGV es muy similar a los descriptos para otros genomas (Fig. 8.9, Tabla 8.6).

⁴ Entre paréntesis se han señalado algunos ORFs localizados en estas regiones, y aquellos ORFs identificados en EpapGV se han subrayado.

La región más colineal entre EpapGV y los GVs: Cp, Px, y Phop está delimitada por los ORFs *Xc29* y *granulina* (en el sentido creciente de números). Esta región se solapa parcialmente con el único cluster conservado entre los GVs y los NPVs llamada "región central" de los genomas de los baculovirus dentro de la cual se encuentra, entre otros, *hel-1* (Heldens *et al.*, 1998; IJkel *et al.*, 1999; Luque *et al.*, 2001).

Tal como se indica arriba, EpapGV posee un arreglo de genes muy similar a CpGV, excepto por una región invertida limitada por *efp* e *ie-1* (Fig. 8.10) y por la posición de *rr1* e *iap-3*. A continuación, se analizarán estas diferencias de ordenamiento de genes.

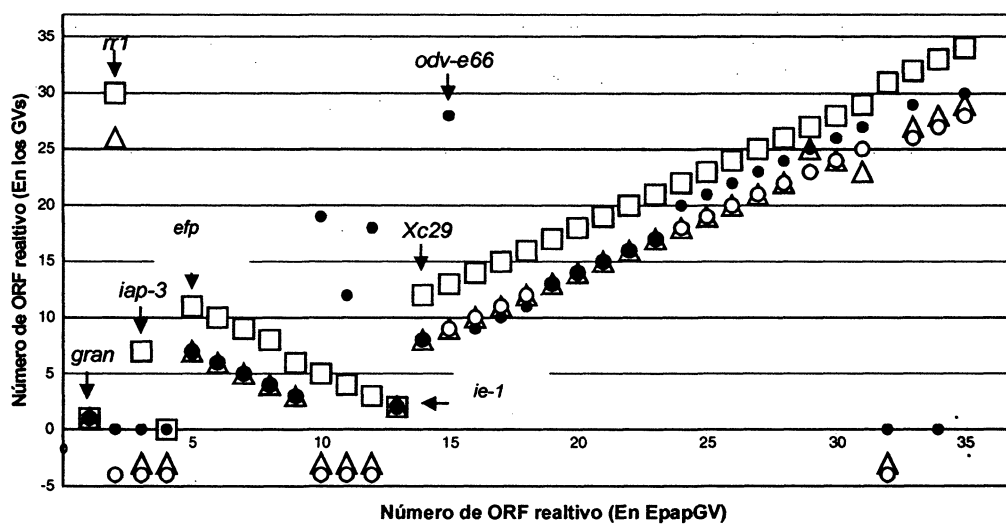


Figura 8.9. Análisis del ordenamiento de genes en EpapGV con respecto a sus homólogos en otros GVs. Los ORFs de EpapGV y sus ORFs homólogos en: CpGV (□), PhopGV (Δ), PxGV (○) y XcGV (●), fueron graficados basándose en su posición relativa en estos genomas, de acuerdo con Hu *et al.* (1998). Algunos ORFs de EpapGV se indicaron con flechas con el fin de individualizarlos mejor. Los genes ausentes se graficaron con ceros o números negativos (ver tabla 8.6).

Tabla 8.6. Orden de genes en los granulovirus secuenciados completamente. El gen *p49* no se ha incluido en este gráfico por que su secuencia se obtuvo recientemente. Sin embargo, su inclusión no genera variaciones en el perfil de paridad dado que se encuentra en una región colineal (entre *odv-e56* y *odv-e18*).

| EpapGV | Epap | Número de ORF ^a | | | | Posición relativa ^b | | | |
|-------------------|------|----------------------------|------|-----|-----|--------------------------------|------|----|------|
| | | Cp | Phop | Px | Xc | Cp | Phop | Px | Xc |
| <i>granulina</i> | 1 | 1 | 1 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>n1</i> | 2 | 127 | 119 | A | A | 30 | 26 | -4 | -5.5 |
| <i>lap-3</i> | 3 | 17 | A | A | A | 7 | -3 | -4 | -5.5 |
| <i>dUTPase</i> | 4 | A | A | A | A | 0 | -3 | -4 | -5.5 |
| <i>efp</i> | 5 | 31 | 27 | 26 | 27 | 11 | 7 | 7 | 7 |
| <i>Xc17</i> | 6 | 20 | 19 | 20 | 17 | 10 | 6 | 6 | 6 |
| <i>Ac29</i> | 7 | 19 | 17 | 17 | 16 | 9 | 5 | 5 | 5 |
| <i>odv-e56</i> | 8 | 18 | 16 | 16 | 15 | 8 | 4 | 4 | 4 |
| <i>odv-e18</i> | 9 | 14 | 12 | 13 | 12 | 6 | 3 | 3 | 3 |
| <i>gp37</i> | 10 | 13 | A | A | 107 | 5 | -3 | -4 | 19 |
| <i>cath</i> | 11 | 11 | A | A | 58 | 4 | -3 | -4 | 12 |
| <i>chl</i> | 12 | 10 | A | A | 103 | 3 | -3 | -4 | 18 |
| <i>ie-1</i> | 13 | 7 | 6 | 10 | 9 | 12 | 8 | 8 | 8 |
| <i>Xc29</i> | 14 | 33 | 29 | 28 | 29 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| <i>odv-e66</i> | 15 | 37 | 33 | 30 | 149 | 13 | 9 | 9 | 28 |
| <i>lef-2</i> | 16 | 41 | 37 | 32 | 35 | 14 | 10 | 10 | 9 |
| <i>Ac22</i> | 17 | 48 | 44 | 37 | 45 | 15 | 11 | 11 | 10 |
| <i>Xc47</i> | 18 | 50 | 46 | 38 | 47 | 16 | 12 | 12 | 11 |
| <i>lef-1</i> | 19 | 74 | 66 | 55 | 82 | 17 | 13 | 13 | 13 |
| <i>Ac98</i> | 20 | 88 | 80 | 70 | 96 | 18 | 14 | 14 | 14 |
| <i>Ac96</i> | 21 | 89 | 81 | 71 | 97 | 19 | 15 | 15 | 15 |
| <i>helicase-1</i> | 22 | 90 | 82 | 72 | 98 | 20 | 16 | 16 | 16 |
| <i>odv-e25</i> | 23 | 91 | 83 | 74 | 99 | 21 | 17 | 17 | 17 |
| <i>vp39</i> | 24 | 96 | 88 | 79 | 111 | 22 | 18 | 18 | 20 |
| <i>gp41</i> | 25 | 104 | 97 | 87 | 121 | 23 | 19 | 19 | 21 |
| <i>vif-1</i> | 26 | 106 | 99 | 89 | 123 | 24 | 20 | 20 | 22 |
| <i>Ac76</i> | 27 | 107 | 100 | 91 | 125 | 25 | 21 | 21 | 23 |
| <i>dna-pol</i> | 28 | 111 | 103 | 93 | 132 | 26 | 22 | 22 | 24 |
| <i>fgf</i> | 29 | 123 | 116 | 104 | 144 | 27 | 23 | 23 | 25 |
| <i>exo-alk</i> | 30 | 125 | 114 | 106 | 145 | 28 | 24 | 24 | 26 |
| <i>helicase-2</i> | 31 | 126 | 113 | 107 | 146 | 29 | 23 | 23 | 27 |
| <i>Cp129</i> | 32 | 129 | A | A | A | 31 | -3 | -4 | -5.5 |
| <i>vp1054</i> | 33 | 138 | 126 | 115 | 175 | 32 | 27 | 26 | 29 |
| <i>egt</i> | 34 | 141 | 129 | 118 | A | 33 | 28 | 27 | -5.5 |
| <i>me53</i> | 35 | 143 | 130 | 120 | 180 | 34 | 29 | 28 | 30 |

^a A= ausente

^b Los cuadros donde se encuentran los ORFs ausentes se han grisado y, además, se les ha asignado un número negativo para facilitar la visualización en la figura 8.9.

Abreviaturas: XcGV, Xc; PxGV, Px; CpGV, Cp; PhopGV, Po y EpapGV, Epap.

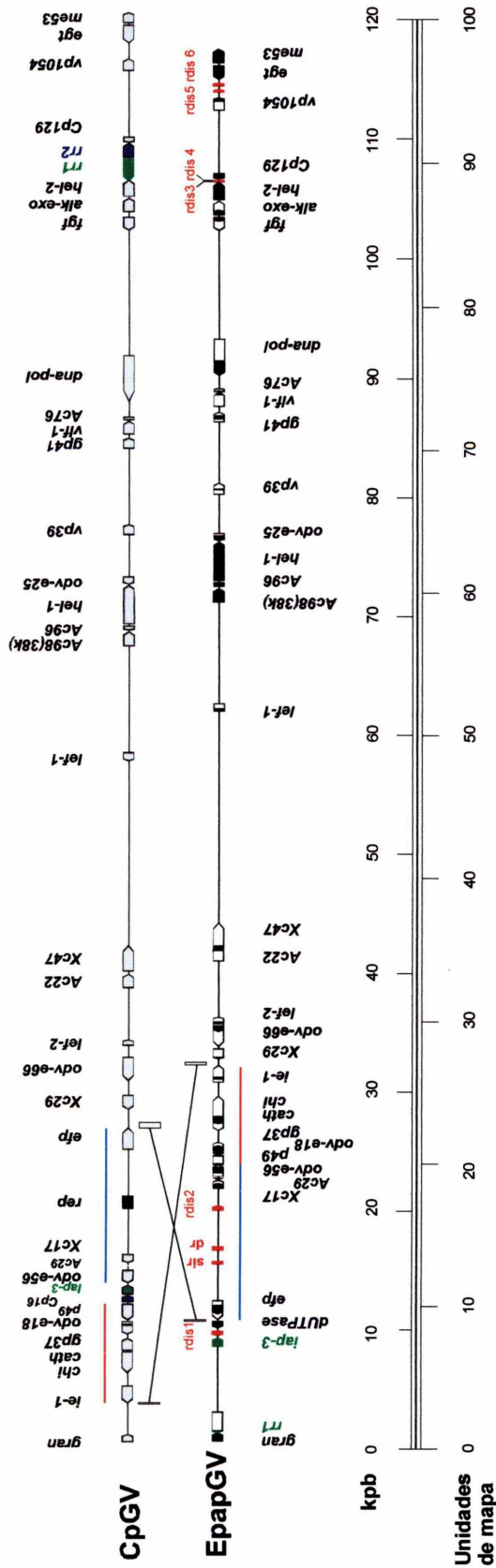


Figura 8.10. Comparación del Orden genómico entre EpapGV y CpGV. Se graficó la posición de los ORFs de homólogos entre los genomas de EpapGV y CpGV. Para ambos casos el nucleótido +1 del mapa se definió como el primer nucleótido del codón ATG de ORF de granulina. Las cajas con flechas indican la localización y la dirección de transcripción de los ORFs encontrados en EpapGV con sus nombres correspondientes. Los tamaños de los ORFs de EpapGV que no han sido completamente secuenciados se asumieron iguales a sus homólogos en CpGV. Las porciones de los ORFs de EpapGV que han sido secuenciadas se pintaron en negro. En CpGV las negras representan una región de repeticiones. En EpapGV, las cajas rojas representan repeticiones directas (dr) y elementos inversamente repetidos de forma simple (sir) y las flechas rojas indican las repeticiones dispersas (rdis). Las líneas finas representan los sitios posibles de recombinación que llevaron a la inversión. Las líneas finas debajo del mapa de EpapGV y por encima del mapa de CpGV resaltan las posiciones en donde los ORFs de EpapGV y en CpGV mantienen distancias y polaridades similares.

Análisis de reordenamientos

Posición de la subunidad mayor del gen de la ribonucleótido reductasa (*rr1*)

La posición del gen *rr1* en EpapGV (*downstream* a granulina) es sustancialmente diferente a sus homólogos en CpGV (Fig. 8.10) y en PhopGV. De acuerdo con los datos de la tabla 8.7, la región del genoma de CpGV que contiene al bloque de genes de *rr1-rr2a* (Cp127 y Cp128) se encuentra flanqueado por *hel-2* (Cp126) y por el ORF Cp129. En cambio, en EpapGV no se ha detectado ningún gen entre los genes homólogos a Cp126 (*hel-2*) y Cp129 (Manzán *et al.*, 2002b). En PhopGV *rr1* está adyacente a *rr2a*, pero se encuentra flanqueado por Phop118 y *lef 8* (Cp131), además en este genoma no se han localizado *Px108* y Cp129.

Tabla 8.7. Orden de genes en la región de *hel-2*. Entre paréntesis se indica el número del ORF en el genoma correspondiente. En negrita se indican los ORFs con homólogos en al menos un genoma.

| Genomas | Orden de genes |
|---------|---|
| EpapGV | <i>hel-2</i> (Cp126) <i>Cp129</i> |
| CpGV | <i>hel-2</i> (Cp126) <i>rr1</i> (Cp127) <i>rr2a</i> (Cp128) <i>Cp129</i> <i>Px108</i> (Cp130) <i>lef 8</i> (Cp131) |
| PhopGV | <i>Phop118</i> <i>rr1</i> (Phop119) <i>rr2a</i> (Phop120) <i>lef 8</i> (Cp121) |

Con el objeto de clarificar los eventos que dieron origen a la traslocación de *rr1* desde la región *hel-2-Cp129* hasta la región *downstream* a granulina, se analizó la presencia de secuencias repetidas en esta región de EpapGV. Los resultados de estos análisis detectaron la presencia de dos repeticiones dispersas (*rdis5* y *rdis6*) en la región intergénica entre *hel-2* y *Cp129* (Fig. 8.10). El análisis de esta región en otros genomas reveló que en PhopGV la repetición N°12 se encuentra entre *rr2a* y *lef-8*, y que en CpGV la repetición N° 13 interrumpe el marco de *lef-8*, pero se encuentra a 3 kpb de *rr2a*. De acuerdo con las múltiples evidencias de repeticiones que flanquean regiones que han sufrido recombinaciones, es probable que en la traslocación de los genes *rr1* y *rr2a* hayan estado involucradas las repeticiones dispersas 5 y 6.

Región invertida *efp-ie-1*

Aparentemente, el tamaño de la inversión *efp-ie-1* en EpapGV (22 kpb) es muy superior a todos los reordenamientos genómicos mapeados en otros genomas de baculovirus, hasta la fecha de presentación de esta tesis (diciembre de 2003). Esta

inversión posee dos segmentos en las cuales el ordenamiento y distancia entre los genes es similar en EpapGV y CpGV (Fig. 8.10). Con la determinación de la secuencia de *p49* se ha ampliado uno de los segmentos identificados en Parola *et al.* (2002) (Fig. 8.11). Además, esta región contiene repeticiones invertidas (*sir*) y directas (*dr*) que ocupan posiciones similares en ambos virus, pero que poseen secuencias diferentes.

Se analizaron las regiones flanqueantes a la inversión con el objeto de buscar secuencias similares que pudieran haber estado involucradas en la inversión del *cassette efp-ie-1* por recombinación homóloga. El análisis intensivo de las regiones flanqueantes al *cassette efp-ie-1* no reveló secuencias similares entre sí en EpapGV. Por otra parte, las regiones flanqueantes al *cassette efp-ie-1* de EpapGV no son similares a sus correspondientes en CpGV.

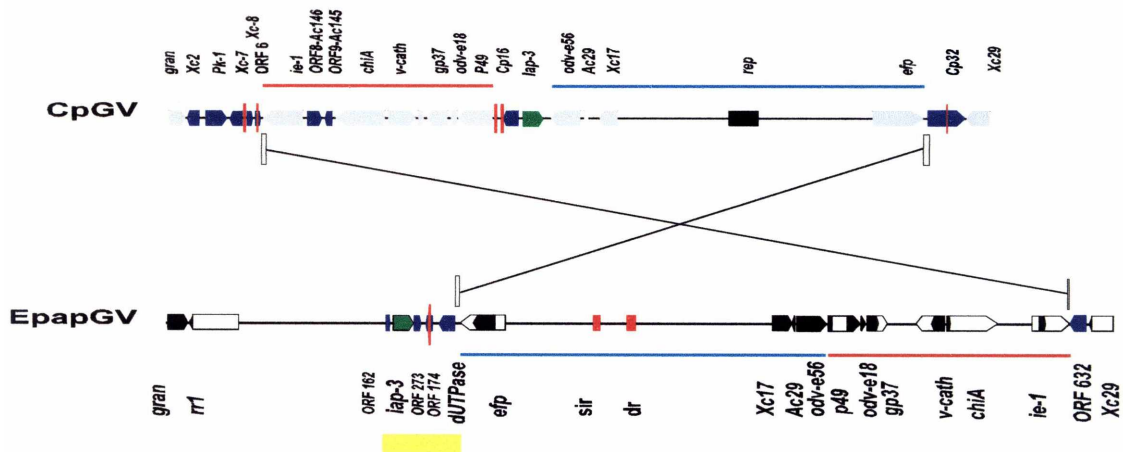


Figura 8.11. Posición de los genes del *cassette ie-1-efp* y del gen *iap-3* en EpapGV y en CpGV. Esta figura amplía la información de la figura 8.10 puesto que se han añadido genes exclusivos de cada genoma y regiones repetidas. Las flechas gruesas indican la posición y dirección de transcripción de los ORFs de EpapGV y en CpGV, con sus nombres correspondientes. Se asumió que los tamaños de los ORFs de EpapGV que no han sido completamente secuenciados eran equivalentes a sus homólogos de CpGV. Las porciones de los ORFs de EpapGV que fueron secuenciados y que son homólogas a ORFs de CpGV están pintados de negro y los ORFs no comunes entre ambos genomas en amarillo, en verde se indica el gen *iap-3*. Las cajas rojas (sin flechas) representan repeticiones directas (*dr*) y elementos de inversión simple (*sir*) y las líneas verticales rojas alargadas las repeticiones dispersas de ambos genomas. Los rectángulos en gris unidos por líneas finas representan los posibles sitios de recombinación que han dado origen a esta inversión. Las barras finas debajo de EpapGV y por sobre CpGV resaltan las regiones que mantienen distancias y polaridades iguales en ambos genomas. La caja amarilla debajo del genoma de EpapGV resalta una región que será analizada en profundidad en la figura 8.12 del apartado "Posición del gen *iap-3*".

Sin embargo, tal como se menciono anteriormente en las proximidades de *efp*, entre *iap-3* y *dUTPase*, se localizó una repetición dispersa (**rdis1**) (Fig. 8.11). Notoriamente, algunas de las repeticiones del genoma de CpGV se encuentran en ambos extremos del *cassette efp-ie-1* (Luque *et al.*, 2001) (Fig. 8.11).

Pese a lo expuesto anteriormente, no todos los reordenamientos en genomas de baculovirus muestran secuencias repetidas flanqueantes. Por ejemplo, los ORFs homólogos a HaSNPV 61-67 se encuentran en una posición inversa en los genomas de SeMNPV, AcMNPV y BmNPV. Mientras que en estos últimos genomas la región está flanqueada por *hrs*, en HaSNPV no lo está. De forma similar, el *cassette efp-ie-1* en CpGV está limitado por secuencias repetidas en tanto que en EpapGV no. Es probable que secuencias repetidas de EpapGV, involucradas en la recombinación homóloga, estuvieran presentes en el antecesor de EpapGV y hayan dado origen al ordenamiento actual, perdiéndose luego. Una variante de la hipótesis anterior consiste en asumir que la **rdis1** intervino en un evento de recombinación homóloga y se invirtió, posteriormente se habría perdido la repetición dispersa del otro lado del *cassette*. Por otra parte, no es posible descartar la hipótesis que la inversión *efp-ie-1* se hubiera producido por recombinación no homóloga.

La hipótesis de la inversión de la región *efp-ie-1* mediada por **rdis** en EpapGV se vería apoyada en el hecho que **rdis1** es la única repetición de EpapGV que se encuentra invertida con respecto al resto. Además como un vestigio de esa inversión, se ha localizado un marco de lectura interrumpido de 27 aa que presenta un 70% identidad aminoacídica con la porción del carboxilo terminal de *ie-1* de *Cryptophlebia leucotreta* GV. Pese que el marco es muy pequeño, el mismo presenta igual sentido que su homólogo de CpGV. Curiosamente este marco se solapa casi totalmente con un palíndromo imperfecto de la Tabla 8.8.

Tabla 8.8. Análisis de secuencias repetidas en un región adyacente al gel *iap-3* de EpapGV mediante DOT PLOT por el programa DNA for windows. A: secuencia repetida con un *core* de repetición directa, se ha marcado en gris los nucleótidos idénticos. B: palíndromo imperfecto, en gris se marcaron las secuencias 100% complementarias con la secuencia inversa complementaria. Los nucleótidos de han numerado considerando el nucleótido +1, al primer nucleótido de este *contig* (Fig. 8.12).

| Secuencias repetidas | | Posición |
|-------------------------------------|------------------------------|----------|
| A | | |
| Secuencia repetida de forma directa | | |
| 5´ | TTTTTTTACATAC TTTGATTTATTTT | 3´ |
| 5´ | TTTTTTTACATATTCATTTATTAATTTT | 3´ |
| B | | |
| Palíndromo imperfecto | | |
| 5´ | ACAAAATGACCAATTTTGT | 3´ |

Posición del gen *iap-3*

El gen *iap-3* ocupa diferentes posiciones en EpapGV y en CpGV (Fig. 8.10). En CpGV este gen se encuentra en la región comprendida por los genes *p49* y *odv-e56*, mientras que en EpapGV se ubica adyacente al gen de *dUTPase*, pero con igual orientación a su homólogo de CpGV. Los genomas de los GVs, incluido EpapGV, difieren en el contenido de genes de la región *p49-odv-e56* (Tabla 8.9, Fig. 8.11), indicando que esta región ha sufrido reorganizaciones, incluyendo inserciones/delecciones, que podían ser útiles a la hora de analizar la filogenia de EpapGV.

Tabla 8.9. Orden de genes en la región de *p49-odv-e56*. En negrita se indican los ORFs con homólogos en al menos un genoma. Se ha invertido el orden de los genes *p49-odv-e56* en EpapGV para facilitar el análisis de esta región.

| Genomas | Orden de genes |
|---------------|---------------------------------------|
| EpapGV | <i>p49 odv-e56</i> |
| CpGV | <i>p49 Cp16 iap-3 odv-e56</i> |
| PhopGV | <i>p49 Cp16 Phop15 odv-e56</i> |
| PxGV | <i>p49 ie-0 odv-e56</i> |
| XcGV | <i>p49 ie-0 odv-e56</i> |

Con el objeto de comprender los eventos que dieron lugar a las reorganizaciones genómicas de la región *p49-odv-e56* se analizó la presencia de secuencias repetidas tanto en EpapGV y en otros GVs para esta región. Mientras que en CpGV se encontraron dos palíndromos imperfectos de 70 pb (o secuencias repetidas dispersas) entre el gen *p49* y *Cp16* (*Ld138*), en la región equivalente de EpapGV no se han secuencias repetidas. En PhopGV, la región *odv-e56-p49* que contiene a *Cp16* y *PhopGV 15* no presenta repeticiones, por otra parte este genoma carece del gen *iap-3*.

La presencia de secuencias repetidas en el genoma de CpGV en regiones para las cuales en EpapGV hay traslocaciones o delecciones parece notoria (regiones adyacentes al *cassette* de 22, región cercana a *rr2a* y dentro de la región delimitada por *p49-odv-e56*), sugiriendo que ellas han estado involucradas de manera directa en estas reorganizaciones.

El análisis de la región *iap-3* en EpapGV se amplió analizando con detenimiento la región que se muestra en la figura 8.9, en particular la búsqueda se centró en

secuencias repetidas que pudieran estar involucradas en la ganancia de *iap-3* por parte del genoma de *EpapGV*. La figura 8.12 muestra el resultado de esta búsqueda.

```

CTGTGAGGCAAGACATAATATGCIAGTCC*****ORF162>>>ATGTCCACCTGGCGGAGATTATACAGGGCGTGTGTCGCCAGTTGC
AGGGACACLAGGACCCACACTACTACACCTTCGATAACCCATGATGCGGCTTCATGATGATGCGCGACCACTATATGACATCTACCGTATCAAC
ATCGCCCCACCATAA*****TITAAIAAACATAAAGACGTTTTTTTTTscataccttttgattatTTTTATCAACCTTACCAAGACTAAI
AACCTAATCTATACTTTATATATATCCGCCCTTCCTATATATATGCGCTTCCTCTAAATTAATTTGTTAAATGttaaacttaatt*****i:
p3>>>ATGATGGACCCCTGAACAGCCCTCCCTTAAGCACTTICAAACAATTCGCGCGTGCCTTCTTCATCCCAACTATGCCCGCCAGCCGTTTTF
TTATTTGGTTCGAACACACCAGTCCCTTCCCGTTTTCIAAAGTGAATCATGCGGCTGGGTCCAAGCTCAGCATCCCGCACAGGACCATCCCAAC
TGGGCACCGCAGTGTCCGTTTCTCGCTTCCTGACCGTCCGCGGGCGGGACGAGGTGGTTCGGGCGCGGTGCACACCCCGCCAGCCCAACCTT
GGTACCGGTGGAGCAAGTGCSTCTGCTCACGTTCAAGGACTGGCCGAAGAGTATAAAGCAGAACCAAAGCAGCTTGCAGAGCTGGATTATACATAI
ACGGGCGCGGGTATGACAAAGTSTTTCTACTGTGACGGGGTCTCAAGSTTGGGAGGAAAACGAIATACCGTGGGAGCAACACGCGCTGTTT
GATAAATGCGCATATGTCAAAGTGTCAAAAGGGAGGAATATGTTCAAGAGGTAATTAAGAGCGTGGCGGTTTCAACGGAGCAAGCGCCGCAAC
CGGAGAAATGTTGAGTCCGCGAAAATTTACAACACTAGAGGAGTGAATAATTTGTTGAAAATAATCGTAACGTGTGCTTTGTTCCBTGCGGACF
TGTGTTGGCATGCGCCAAGTCCCTTTAACACGAACACCTGCCCAATGTTAGGCAGAAGTATATAAACCCCTTACCTGTTTACTATTCTT*****
*****ATTAACTTTTACGCTAAATAAATA*****r2a rd1b rd4a ri1b
ATGATCCCTACTCGTAACATAAATTTCTTCTGCTAAGTCCGAGATACAAAACGACCAATTTTGTACCTTATATCAACGTTGTTTTCTAATC
GTAAACCACCGAAAAGTCTGAACTTTAGTCATAITTAAGACCGACACACCTACACAGGAACGCGTGGCAATCAAATACAT*****r5 ri2b
AATGAATTTACGAAATTTGAACTTTGAACSTTGACAGCTTTTACTTTAAACACATAFCAGCTATAGACCGAGGATAA*****AACTGAGC
GTATATTTTTTAAATAATATAAATAAACAACCTTGTAGTITTTATTTATATGGATAACAAAAAC*****TAGATATTTCTGTTGTGTGCI
AGTGAACACTAGTACAGCGAA*****r3a p1b rd4a rd3b rd8 rd4b
AATATCAA*****r3a r3a r3b rd3b
TAATTTTGLAAGGGTTAATAA IACGGTAAATTAIGSAIAAATCACTTAATTTAA*****T
ATPAGTACCGGTTACCCAAACCCCTCCCTCTCCGCGCGATTTGCTGFCAGTGGGAAGTAACCTCIACCAGTGTGGGACAAAAGATTTGTTCACAF
ATTAATGAGCAATCCTGTCCCGCTTATTCAGGACAAAGICTGTGTCGGAATCATTTGAACAGCAGCACTCCACGTTACCCCTTAATCCTCATCGI
TCACACCAGCACCCACGTCATGAAGTGCCTTACCCCTACTCCAGACGCGGGCGGATTCGACCGTAGCATCCACCGGTAATTCACCCGCAAGTC
GGTCATGACCAGCCCTTGCCTSTTTTGAATCACGGTCTCGTAGCCGCTTTGAGATCAAAACCAGCTGCCCTGTCCGATCCCTCTGTTGGGCGF
AAAGCGTTTCGGTTATACGGAAAATTCAGCTGGGTAGTTTTCTTGTGGTCTCTTCAGTGTCTTGATGAGCTGCTGCTGTTCTTAATGGCCI
CTGCGATAGAAAICTGGCAACTTACTTGTCTGCTCIACGCATCGGTCCAGCGTTGGAGTTTTTCGGTGTGTTGTTGAGCGTCCAT<<<duTPas
a*****r7a rd7b
CTGAACTTTTAGTGGGTTGGGATTCTGGCTCATGGGATTTCTGGTGTCT*****XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXefp<<<*****CACTGTGCATTTTAAATTTAATTAATTAATAATAATAGNANGAGAAC
rd5a r7 rd3
ATAATTTACAGATCTCAAACCTTACTTCATTTGCAGGACTGACTCTCTTTAATTTTAAATAATTTCTCTTAATAAGATCT

```

Figura 8.12. Posición de los elementos repetidos y palindrómicos en las regiones adyacentes al gen *EpapGV* *iap-3*. Las secuencias codificantes se han nombrado de acuerdo a la convención previa y no han sido coloreadas. Las regiones intergénicas se marcaron en gris y posteriormente se asignaron las secuencias repetidas. Las repeticiones directas se muestran en celeste (rd). Las secuencias palindrómicas en rojo (p), en distintos tonos de verde se marcan las repeticiones inversas (rd) y en amarillo repeticiones invertidas de forma directa (rid). Las secuencias que presentaron superposiciones con otras secuencias ya asignadas fueron coloreadas parcialmente y la parte que ya había sido asignada se subrayó. En letras minúsculas se muestra una secuencia repetida de forma directa con mayor extensión. Con un cuadro se indica la posición de rdis 1. La secuencia del palíndromo imperfecto de la tabla 8.8 se ha subrayado con puntos. La secuencias del gen *efp* se ha señalado con letras x y su sentido de transcripción se ha indicado con flechas.

La mayoría de las repeticiones se concentró en secuencias intergénicas y en los marcos de lectura de los ORFs 273 y 174. Por el contrario, se han detectado pocas repeticiones dentro de los ORFs 162, *iap-3*, *dUTPase*. Aparentemente, las secuencias detectadas no presentan arreglos entre sí, excepto por las repeticiones directas a ambos lados de *iap-3* (Tabla 8.8A, Fig. 8.12). Por otra parte, tal como se ha mencionado anteriormente en esta región se ha detectado una repetición dispersa (*rdis1*) interrumpiendo el marco de lectura del ORF 174, ubicado entre *iap-3* y *dUTPase* (Fig. 8.11 y 8.12).

En conclusión, las secuencias intergénicas dentro de la región del gen EpapGV *iap-3* presentan múltiples repeticiones, algunas de ellas podrían haber estado involucradas en el reordenamiento de *iap-3* en EpapGV (repeticiones flanqueantes a *iap-3* y la *rdis1* cercana a *dUTPase*). La determinación de la secuencia completa de otros GVs podría brindar nuevas pruebas sobre eventos de recombinación y de traslocación en estos genomas.

Análisis filogenético de alineamientos proteicos concatenados

Durante el proceso de determinación del mapa de restricción, se han obtenido numerosas secuencias de los extremos de los fragmentos clonados. Muchas de estas secuencias codifican para genes presentes en todos los baculovirus secuenciados completamente hasta la fecha.

En capítulos anteriores se analizaron las filogenias de genes individuales (*granulina* e *iap-3*); sin embargo, la filogenia de estos genes no necesariamente se ve reflejada en la historia evolutiva de los baculovirus. En cambio, en este capítulo con el fin de clarificar la historia evolutiva de EpapGV se emplearon las secuencias parciales de veinte proteínas comunes a todos los baculovirus de lepidópteros totalmente secuenciados que han sido identificadas en esta tesis (ver materiales y métodos). En este análisis no se han empleado genes en los cuales el tesista no hubiera sido autor o coautor de trabajos científicos. Las secuencias proteicas escogidas se concatenaron una atrás de la otra en cada genoma, manteniendo las mismas posiciones relativas y generando una matriz que contenía 17 genomas con 20 proteínas cada uno. Posteriormente, la matriz se alineó el producto en CLUSTALX, empleando los

parámetros estándar y la matriz BLOSUM. El alineamiento se analizó con el programa PAUP (Swofford, 2000) empleando el criterio de máxima parsimonia.

El árbol presentado en la figura 8.13, diferenció a los baculovirus en dos géneros bien separados, *Nucleopolyhedrovirus* y *Granulovirus*, subdividiendo además a los NPVs en dos grupos diferentes (I y II). El agrupamiento de los NPVs del grupo I fue similar al descrito por Herniou *et al.* (2001, 2003). Notoriamente, los valores de *Bootstrap* para los nodos del grupo I de NPVs fueron superiores a 99% para todos ellos, apoyando la idea que este grupo ha divergido recientemente del tronco común de la familia *Baculoviridae* (Herniou *et al.*, 2001).

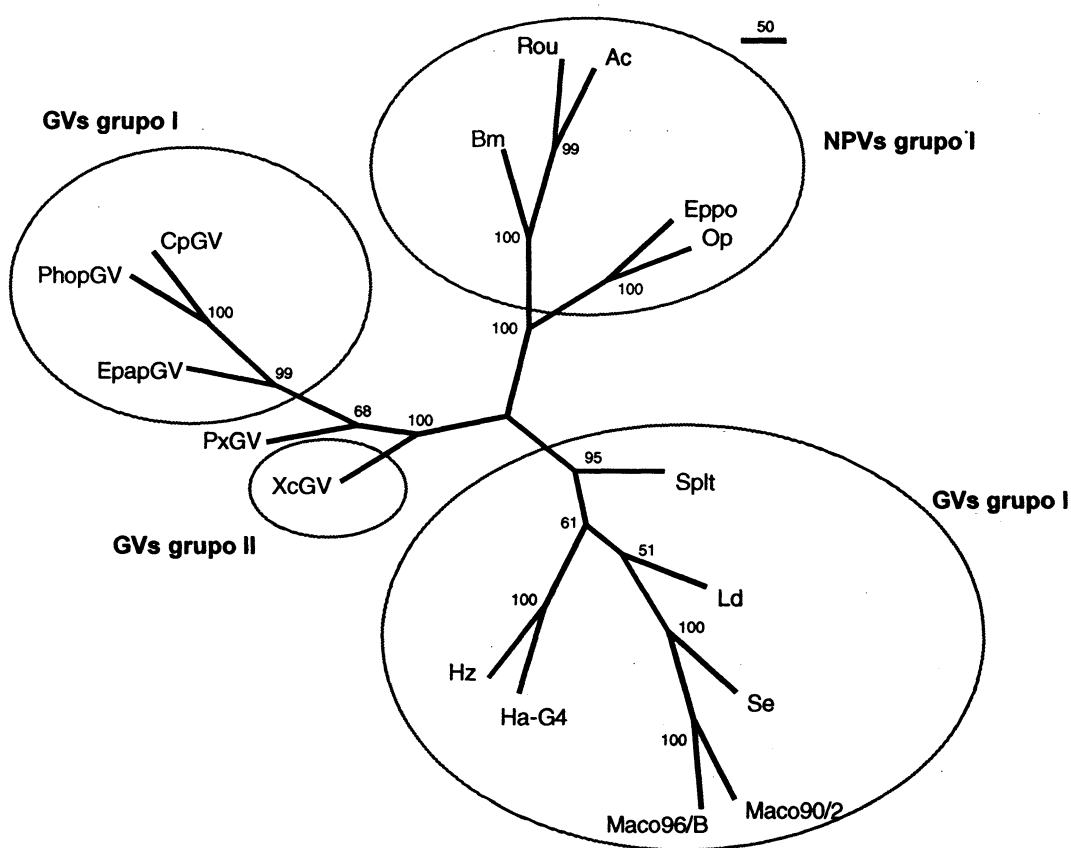


Figura 8.13. Análisis filogenético de alineamientos de 20 genes presentes en EpapGV y conservados todos los baculovirus que infectan lepidópteros. Se muestra el árbol más parsimonioso basado en el análisis de secuencias combinadas de los 20 genes comunes entre los baculovirus totalmente secuenciados y EpapGV. El árbol se construyó de acuerdo al criterio de máxima parsimonia. Los números adyacentes a cada nodo indican el porcentaje de soporte de *bootstrap* para cada nodo a partir de 1000 réplicas. La matriz contenía 6803 caracteres, de los cuales 1409 eran constantes, 517 variables pero parsimoniosamente no informativos. 4877 caracteres fueron parsimoniosamente informativos. La barra superior indica 50 cambios. **Abreviaturas:** Ac (*Autographa californica* MNPV), Bm (*Bombyx mori* NPV), CpGV (*Cydia pomonella* GV), Eppo (*Epiphyas postvittana* MNPV), Ha (*Helicoverpa armigera* SNPV), Hz (*Helicoverpa zea* SNPV), Ld (*Lymantria dispar* MNPV), Maco (*Mamestra configurata* NPV), Op (*Orgyia pseudotsugata* MNPV), PxGV (*Plutella xylostella* GV), Se (*Spodoptera exigua* MNPV), Splt (*S. littura* MNPV), XcGV (*Xestia c-nigrum* GV). De este análisis se ha excluido al gen *p49* por que al momento de determinarse este árbol no se contaba con su secuencia.

Con respecto a la distribución de los miembros del grupo II de los NPVs en las ramas del árbol, nuestro agrupamiento difirió del de Herniou *et al.* (2003) (ver capítulo 1, Fig. 1.12 B-C); sin embargo, ambos árboles mostraron bajos valores de soportes de los nodos, en especial para organismos que no eran variantes de un mismo virus (Maco90/2 y Maco96/2; HsSNPV y HaSNPV). Con esos bajos valores de soporte de nodos para ambos árboles no es posible asegurar cuál de los dos posee más validez. Pese a que Herniou *et al.* (2003) han empleado 30 genes en lugar de 20, los bajos valores de *bootstrap* de los NPVs del grupo II obtenidos por estos autores impiden asegurar que ésta sea la única alternativa evolutiva posible. Es probable que el empleo de los 64 genes comunes a todos los baculovirus en un análisis filogenético aporte árboles cuyos nodos sean consistentes y, por ende, reflejen mejor la evolución de esta familia viral.

Para los GVs la distribución coincidió con la figura 1.12 B-C del capítulo 1, publicada por Herniou *et al.* (2003), en tanto que la posición de PhopGV fue similar a la informada por Croizier, L. *et al.* (2002) obtenida a partir de 64 genes comunes a todos los baculovirus. La cercanía evolutiva de EpapGV y CpGV se ve reflejada en el árbol de la figura 8.13. Este análisis corroboraría la filogenia presentada en el capítulo 6, en el cual se había postulado la existencia de dos grupos de principales de GVs, uno de los cuales incluía a XcGV, TnGV y SpliGV y el otro a EpapGV, CpGV y PhopGV, AoGV, HbGV, CfGV y CIGV. La imposibilidad de agrupar a PxGV en alguno de los grupos anteriores de manera certera, en base a los análisis filogenéticos mediante el gen de granulina, (Fig. 6.14, capítulo 6) se vería reflejada en el árbol de la figura 8.13, por cuanto este genoma se encuentra en una posición intermedia entre el grupo I y II de GVs. Esta observación coincidiría, además, con nuestro postulado de la existencia de tres genomas que formarían cada uno un grupo por separado (LoGV, PxGV y AsGV).

En general, este análisis preliminar, aportó datos valiosos que avalan la posición de EpapGV en el grupo I de GVs

Mapeo del contenido de genes

Sobre la base de la filogenia de la figura 8.13 se ha mapeado la hipótesis más parsimoniosa de adquisición de genes para el género *Granulovirus* (Fig. 8.14), tomando como base el trabajo de Herniou *et al.* (2003).

Los resultados indican que la distribución de los genes *chi*, *cath* y *gp37* supone que los granulovirus poseían estos genes al diferenciarse de los NPVs y que fueron perdidos dos veces de manera independiente, por P_xGV y PhopGV. Apoyando esta hipótesis, recientemente Lange & Jehle (2002) han informado que en la secuencia completa del genoma del granulovirus CIGV, se encuentra presente el gen de *cath* mientras que *chi* está truncado y *gp37* está ausente. Estos mismos autores han posicionado a CIGV muy cercano a CpGV posterior a la divergencia entre PhopGV y CpGV, mediante filogenia por alineamientos concatenados. La aparente "alta frecuencia" con que estos genes son perdidos, estaría relacionada con sus funciones auxiliares (genes no esenciales).

Si bien de acuerdo con la figura 8.14 es evidente que el gen *rr1*, se habría adquirido por el antecesor originó a EpapGV, CpGV y PhopGV, en realidad es posible que el bloque *rr1* + *rr2a* se haya adquirido de una única vez en esta rama. Pese a que en EpapGV aún no se ha detectado a *rr2*, es altamente probable que el mismo esté presente en el genoma, dado que *rr1* nunca ha sido encontrado sin *rr2*. La presencia simultánea de estos dos genes sería necesaria, debido a que ambas genes codifican para distintas subunidades de la misma enzima. Posteriormente, en EpapGV este gen habría sufrido una traslocación a su posición actual y en PhopGV se habrían perdido los genes *Px120* y *Cp129* (Tabla 8.7). Además, de acuerdo con la posición de *rr1* en EpapGV es posible que el bloque *rr1* + *rr2* se habría traslocado hacia su posición actual (*downstream* a granulina).

Con respecto al gen *dUTPase*, en los GVs éste sólo ha sido ubicado en AsGV; sin embargo, y aún no hay análisis filogenéticos disponibles para el mismo que ayuden a comprender su evolución.

A partir de la comparación del orden de genes entre los genomas de los GVs (Fig. 8.11, Tabla 8.9), es posible proponer al menos dos hipótesis que permiten reconstruir la historia evolutiva que ha llevado a *iap-3* y a los genes entre *p49* y *odv-e56* a su posición actual:

- 1) El ancestro de CpGV, PhopGV y EpapGV contenía a *iap-3* flanqueado por los genes *p49* y *odv-e56*. Más tarde, en el ancestro de EpapGV el *cassette efp-ie-1* se invirtió y el gen *iap-3* se traslocó a su posición actual (o viceversa). De esta forma, el segmento limitado por *p49* y *odv-e56* en EpapGV presentaría un tamaño menor que la región correspondiente en CpGV. Posteriormente, el genoma de PhopGV perdió *iap-3*.

2) En otro escenario posible, *iap-3* podría haberse adquirido de forma independiente en CpGV y en EpapGV.

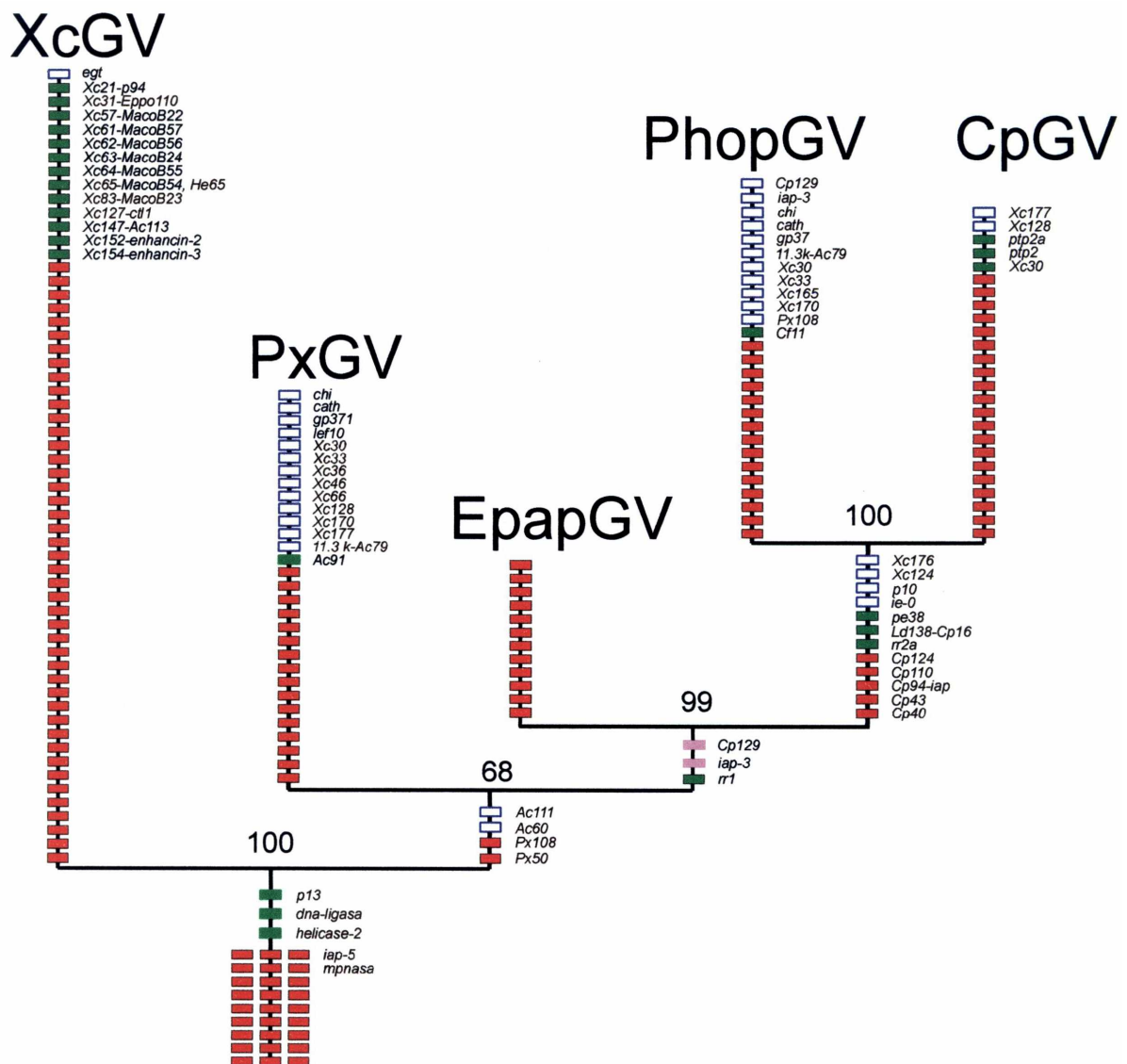


Figura 8.14. Mapeo de contenido de genes de los granulovirus sobre el árbol filogenético más parsimonioso calculado a partir de veinte genes comunes a los baculovirus. Se han mapeado la ganancia y adquisición de genes en el género *Granulovirus*. Las cajas de color rojo indican genes ganados por el linaje en cuestión, en cajas violeta genes ganados y posteriormente perdidos en algún virus linaje en particular (*Cp129* e *iap-3*), en cajas con bordes azules e interior en blanco azules se indican los genes perdidos, en cajas verdes número de genes ganados y que también fueron ganados en otro linaje. Los genes de la familia *bro* se han excluido de este análisis debido a la dificultad de establecer sus ortólogos. Los ORFs exclusivos de EpapGV son sólo provisionarios y han sido localizados en los 36 kpb secuenciados. En el caso de la rama que conduce a CpGV, PhopGV y EpapGV la atribución de Ac111, Ac60, Px50 y Px108 es provisoria debido a que aún el genoma de EpapGV no ha sido secuenciado por completo. Las longitudes de las ramas carecen de significado.

Tabla 8.8. Detalles de la posible adquisición y pérdida de genes durante la evolución de los baculovirus.

| Descripción del linaje Resumen de las adquisiciones / pérdidas de genes ^a | Adquisiciones | Pérdidas |
|--|--|--|
| Baculoviridae^b 30 <input type="checkbox"/> 32 <input type="checkbox"/> 13 <input type="checkbox"/> (6 + 7) | <input type="checkbox"/> <i>ief-1</i> (Ac14), <i>ief-2</i> (Ac6), <i>dnapol</i> (Ac65), <i>helicase</i> (Ac95), <i>p47</i> (Ac40), <i>ief-8</i> (Ac50), <i>ief-9</i> (Ac62), <i>vif-1</i> (Ac77), <i>ief-4</i> (Ac90), <i>ief-5</i> (Ac99), <i>Ac23</i> (<i>Id130</i>), <i>gp41</i> (Ac80), <i>odv-ec27</i> (Ac144), <i>odv-e56</i> (Ac148), <i>p6.9</i> (Ac100), <i>p74</i> (Ac138), <i>vp91/p95</i> (Ac83), <i>vp39</i> (Ac89), <i>vp1054</i> (Ac54), <i>alk-exo</i> (Ac133), <i>38K</i> (Ac98), <i>Ac22</i> (<i>pfif2</i>), <i>Ac68</i> , <i>Ac81</i> , <i>Ac92</i> , <i>Ac96</i> , <i>Ac109</i> , <i>Ac115</i> , <i>Ac119</i> , <i>Ac142</i> <input type="checkbox"/> <i>dbp1</i> (Ac25), <i>ief-3</i> (Ac67), <i>ie-1</i> (Ac147), <i>me53</i> (Ac139), <i>Pp31/39K</i> (Ac36), <i>ief-6</i> (Ac28), <i>ief-11</i> (Ac37), <i>fp25K</i> (Ac61), <i>odv-e18</i> (Ac143), <i>odv-e25</i> (Ac94), <i>odv-e66</i> (Ac46), <i>pk1</i> (Ac10), <i>polh</i> (Ac8), <i>igf</i> (Ac32), <i>ubiquitin</i> (Ac35), <i>38.7K</i> (Ac13), <i>Ac29</i> , <i>Ac38</i> , <i>Ac53</i> , <i>Ac66</i> (<i>desmoplakin</i>), <i>Ac75</i> , <i>Ac76</i> , <i>Ac78</i> , <i>Ac82</i> , <i>Ac93</i> , <i>Ac106</i> , <i>Ac110</i> , <i>Ac145</i> , <i>Ac146</i> , <i>p40</i> (Ac101), <i>p12</i> (Ac102), <i>p45</i> (Ac103) <input type="checkbox"/> <i>11.3K</i> (Ac79), <i>Ac150</i> , <i>ie0</i> (Ac141), <i>p10</i> (Ac137), <i>p24</i> (Ac129), <i>Ac111</i> , <i>sod</i> (Ac31), <i>egt</i> (Ac15), <i>chitinase</i> (Ac126), <i>cathepsin</i> (Ac127), <i>gp37</i> (Ac64), <i>ief10</i> (Ac53a), <i>Ac60</i> , <i>Xc172-173</i> , <i>Xc178</i> <input type="checkbox"/> <i>Xc30</i> , <i>Xc33</i> , <i>Xc36</i> , <i>Xc46</i> , <i>Xc66</i> , <i>Xc124</i> , <i>Xc128</i> , <i>Xc165</i> , <i>Xc170</i> , <i>Xc176</i> , <i>Xc177</i> <input type="checkbox"/> <i>DNAIigase1</i> (<i>Xc141</i>), <i>helicase2</i> (<i>Xc146</i>), <i>p13</i> / <i>Xc43</i> <input type="checkbox"/> <i>enhancin1</i> (<i>Xc150</i>), <i>enhancin4</i> (<i>Xc166</i>), <i>Xc104-106</i> , <i>Xc108</i> , <i>Xc115</i> , <i>Xc117</i> , <i>Xc129</i> , <i>Xc138</i> , <i>Xc153</i> , <i>Xc155-158</i> , <i>Xc161-164</i> , <i>Xc166-168</i> , <i>Xc179</i> , <i>Xc181</i> , <i>Xc20</i> , <i>Xc22-24</i> , <i>Xc28</i> , <i>Xc38</i> , <i>Xc4</i> , <i>Xc41-42</i> , <i>Xc44</i> , <i>Xc48-49</i> , <i>Xc59</i> , <i>Xc6</i> , <i>Xc69-74</i> , <i>Xc37</i> | |
| Granulovirus^c 27 <input type="checkbox"/> 11 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> <i>iap5</i> (<i>Xc137</i>), <i>metalloproteinase</i> (<i>Xc40</i>), <i>Xc2</i> , <i>Xc7-8</i> , <i>Xc17-19</i> , <i>Xc25-26</i> , <i>Xc29</i> , <i>Xc34</i> , <i>Xc39</i> , <i>Xc47</i> , <i>Xc54</i> , <i>Xc85-86</i> , <i>Xc90</i> , <i>Xc113</i> , <i>Xc116</i> , <i>Xc136</i> , <i>Xc142-143</i> , <i>Xc169</i> , <i>Xc172-173</i> , <i>Xc178</i> <input type="checkbox"/> <i>Xc30</i> , <i>Xc33</i> , <i>Xc36</i> , <i>Xc46</i> , <i>Xc66</i> , <i>Xc124</i> , <i>Xc128</i> , <i>Xc165</i> , <i>Xc170</i> , <i>Xc176</i> , <i>Xc177</i> <input type="checkbox"/> <i>DNAIigase1</i> (<i>Xc141</i>), <i>helicase2</i> (<i>Xc146</i>), <i>p13</i> / <i>Xc43</i> <input type="checkbox"/> <i>enhancin1</i> (<i>Xc150</i>), <i>enhancin4</i> (<i>Xc166</i>), <i>Xc104-106</i> , <i>Xc108</i> , <i>Xc115</i> , <i>Xc117</i> , <i>Xc129</i> , <i>Xc138</i> , <i>Xc153</i> , <i>Xc155-158</i> , <i>Xc161-164</i> , <i>Xc166-168</i> , <i>Xc179</i> , <i>Xc181</i> , <i>Xc20</i> , <i>Xc22-24</i> , <i>Xc28</i> , <i>Xc38</i> , <i>Xc4</i> , <i>Xc41-42</i> , <i>Xc44</i> , <i>Xc48-49</i> , <i>Xc59</i> , <i>Xc6</i> , <i>Xc69-74</i> , <i>Xc37</i> | |
| Xc 45 <input type="checkbox"/> 13 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 0 | <input type="checkbox"/> <i>Xc21</i> <i>p94</i> ; <i>Xc31-Eppo110</i> ; <i>Xc57-Macco-B22</i> ; <i>Xc61-Macco-B57</i> ; <i>Xc62-Macco-B56</i> ; <i>Xc63-Macco-B24</i> ; <i>Xc64-Macco-B54</i> ; <i>Xc65-Macco-B55</i> , <i>Ha65</i> ; <i>Xc66-Macco-B23</i> , <i>Ha57</i> ; <i>Xc127</i> <i>chl-1</i> ; <i>Xc147</i> <i>Act113</i> ; <i>Xc152</i> <i>enhancing-2</i> ; <i>Xc154</i> <i>enhancing-3</i> . | o <i>egt</i> |
| Px + Cp + Po (excluyendo a Epap) ^d 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 0 | <input type="checkbox"/> <i>Px50</i> <input type="checkbox"/> <i>Px108</i> | o <i>Ac60</i> , <i>Ac111</i> |
| Px 16 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 13 <input type="checkbox"/> 0 | <input type="checkbox"/> <i>Px1</i> , <i>Px3</i> , <i>Px18-19</i> , <i>Px22</i> , <i>Px27</i> , <i>Px33</i> , <i>Px39</i> , <i>Px48</i> , <i>Px58</i> , <i>Px68</i> , <i>Px77</i> , <i>Px81</i> , <i>Px105</i> , <i>Px111</i> , <i>Px119</i> <input type="checkbox"/> <i>Ac91</i> | o <i>11.3K</i> (<i>Ac79</i> , <i>Xc75</i>), <i>chitinase</i> , <i>cathepsin</i> , <i>gp37</i> , <i>ief-10</i> , <i>Xc30</i> , <i>Xc33</i> , <i>Xc36</i> , <i>Xc46</i> , <i>Xc66</i> , <i>Xc128</i> , <i>Xc170</i> , <i>Xc177</i> . |
| Epap + Cp + Po 2 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> <i>iap-3</i> , <i>Cp129</i> <input type="checkbox"/> <i>rr1</i> | |
| Cp + Po 5 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 0 | <input type="checkbox"/> <i>Cp40</i> , <i>Cp43</i> , <i>Cp94</i> (<i>iap</i>), <i>Cp110</i> , <i>Cp124</i> <input type="checkbox"/> <i>Cp128</i> (<i>rr2a</i>), <i>Cp16</i> (<i>Id138</i>), <i>Cp24</i> (<i>pe38</i>) | o <i>p10</i> , <i>ie-0</i> , <i>Xc124</i> , <i>Xc176</i> |
| Cp 20 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 0 | <input type="checkbox"/> <i>Cp6</i> , <i>Cp12</i> , <i>Cp21</i> , <i>Cp25-28</i> , <i>Cp32</i> , <i>Cp36</i> <i>Cp44</i> , <i>Cp51</i> , <i>Cp61</i> , <i>Cp67</i> , <i>Cp70</i> , <i>Cp72</i> , <i>Cp78</i> , <i>Cp109</i> , <i>Cp124</i> , <i>Cp139</i> , <i>Cp142</i> <input type="checkbox"/> <i>plp2a</i> (<i>Cp98</i>), <i>plp2</i> (<i>Cp66</i>) | o <i>Xc177</i> , <i>Xc128</i> |
| Po 15 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 12 <input type="checkbox"/> 0 | <input type="checkbox"/> <i>Po10-11</i> , <i>Po15</i> , <i>Po18</i> , <i>Po22-23</i> , <i>Po28</i> , <i>Po32</i> , <i>Po57-59</i> , <i>Po68</i> , <i>Po70</i> , <i>Po90-91</i> <input type="checkbox"/> <i>Po64</i> (<i>CGV11</i>) | o <i>Cp129</i> , <i>iap-3</i> , <i>chitinase</i> , <i>cathepsin</i> , <i>gp37</i> , <i>11.3K</i> (<i>Ac79</i> , <i>Xc75</i>), <i>Xc33</i> , <i>Xc165</i> , <i>Xc170</i> , <i>Px108</i> |

^a 7 Número de genes ganados por este linaje, 1 número de genes específicos a este virus, 3 número de genes ganados por este linaje y posteriormente perdidos en algún virus linaje en particular, 1 o número de genes perdidos por este linaje, 3 número de genes ganados por este linaje y que también fueron ganados por otro linaje. Abreviaturas: XcGV, Xc; PxGV, Px; CpGV, Cp; PhopGV, Po y EpapGV, Epap.
^b En fuxia se indican los genes presentes en todos los baculovirus y en azul aquellos genes encontrados en los baculovirus de lepidópteros solamente. De los 12 genes que se pierden en algunos linajes de los baculovirus de lepidópteros 6 de ellos (en gris) sólo se pierden en algún linaje de los granulovirus.
^c Los baculovirus habrían adquirido 27 genes exclusivos para su grupo además de los 62 genes localizados en todos los genomas de baculovirus de lepidópteros. ^d Se excluyó a EpapGV por que aún su genoma no se encuentra secuenciado totalmente.

Recientemente muchos genes que se creían exclusivos de XcGV han sido encontrados en MacoNPV 96-B; sin embargo, los genes exclusivos del género GV han permanecido sin reducciones, pese al incremento de la información proveniente de la secuenciación de nuevos genomas. La mayoría de estos ORFs se encuentran adyacentes en bloques de a dos genes (dato no mostrado) y, en su mayoría, a ambos extremos de la región que contiene al gen de helicasa, también llamada la “región central” de los baculovirus (Heldens *et al.*, 1998).

En conclusión, basado en análisis filogenético de alineamientos concatenados de genes, contenido parcial de genes, y orden de genes. EpapGV se agruparía dentro del llamado grupo I de GVs, alejándose de los del grupo II (SpliGV, TnGV y XcGV) para los cuales sólo el genoma de XcGV está totalmente secuenciado. Sin embargo, EpapGV posee una estructura genómica diferente del resto de los granulovirus conocidos.

Los resultados presentados en este capítulo, proveen el marco para estudios más detallados sobre el genoma de EpapGV y deberían facilitar las investigaciones que tengan por objetivos la comprensión de la biología molecular de los granulovirus. Sin embargo, cuando más información sobre diferentes genomas de GVs esté disponible, eventualmente será posible establecer cuales productos génicos o sus isoformas están involucradas en la determinación de determinados patrones patogénicos.

Conclusiones

- Mediante la comparación de las secuencias de fragmentos de DNA clonado de EpapGV se han asegurado las contigüidades de fragmentos en el mapa de restricción. En total se han identificado veintiocho (28) ORFs potenciales con homólogos en otros baculovirus.
- Los ORFs detectados se han caracterización en base a sus secuencias. Esta caracterización comprende el análisis del contenido GC, potenciales promotores, sitios de poliadenilación y motivos proteicos característicos.
- Varias regiones repetidas dispersas se han detectado en el genoma, así como numerosas secuencias repetidas en forma directa e inversa, cuyas funciones son aún desconocidas.
- El análisis del ordenamiento de potenciales genes de EpapGV con respecto a otros baculovirus ha determinado que la organización genómica del baculovirus EpapGV es distinta a los *Nucleopolyhedrovirus* totalmente secuenciados pero muy similar a los otros *Granulovirus*, en especial a CpGV.
- Se han detectado y analizado tres reordenamientos genómicos: inversión del *cassette* de 22 kpb, traslocación de *iap-3* y reordenamiento de *rr1*.
- Con los ORFs comunes a todos los baculovirus totalmente secuenciados, se ha efectuado un análisis filogenético por concatenación de genes. Este análisis ha posicionado a EpapGV dentro del grupo I de GVs y muy cercano a CpGV.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN GENERAL

Caracterización morfológica de EpapGV por microscopía y a nivel proteico

La caracterización mediante microscopía electrónica indicó que los cuerpos de inclusión del virus de *E. aporema* presentaban una morfología ovoide. Este cuerpo de inclusión contenía sólo una nucleocápside con forma de bastón y las dimensiones del gránulo fueron de 469 (\pm 37) nm x 242 (\pm 22) nm. En el análisis del perfil proteico se destacó la presencia de una proteína mayoritaria cuya secuencia amino terminal resultó altamente similar con extremos amino-terminales de otras granulinas. Estos datos juntos a las observaciones de la sintomatología de las larvas infectadas, permitieron confirmar que el agente infeccioso de *E. aporema* es un virus del género *Granulovirus* perteneciente a la familia *Baculoviridae*. Este virus fue llamado entonces **EpapGV**.

Desarrollo de una técnica de ELISA para la detección de OBs

Se puso a punto una técnica de ELISA de captura en base a anticuerpos anti-granulina de EpapGV obtenidos a partir de la inoculación de esta proteína en conejos. De acuerdo con los ensayos de *Western blot*, el anticuerpo generado fue específico para granulina. La técnica empleada fue altamente sensible, detectándose hasta 26,5 pg/fosa de granulina, equivalentes a 1×10^4 OB por fosa y específica para la granulina de EpapGV. El ensayo de ELISA se utilizó además, para determinar el progreso de la infección en larvas, detectándose la presencia de granulina desde las 24 h pos infección (pi) y un incremento de la misma de manera continua hasta la muerte de la larva. El inicio de la detección de granulina coincidió con el perfil de expresión de esta proteína, característico de las proteínas muy tardías de la infección (posterior a las 18 h pi). El ensayo de ELISA se empleó para detectar y cuantificar OB en formulados bioinsecticidas, detectado cuerpos de inclusión de EpapGV en diluciones que contenían hasta $1,0 \times 10^5$ OBs/ml ó 5×10^3 OBs por μ g de formulado bioinsecticida.

Determinación del mapa de restricción

El tamaño del genoma de EpapGV se precisó en 120,1 kpb, éste resultó muy similar a las dimensiones de los genomas de CpGV (Luque *et al.*, 2001) y PhopGV (Croizier, L., 2002), a partir de la suma de los fragmentos obtenidos por digestión con diferentes enzimas de restricción. En base a experimentos de digestión simples y combinadas del DNA genómico y experimentos de *Southern blot* se construyó un mapa de

restricción de EpaGV. Éste fue confirmado luego por el secuenciamiento de los extremos de los fragmentos clonados y por experimentos de PCR sobre las uniones de clones EcoRI y BamHI. El punto cero del mapa fue establecido en el ATG del gen de granulina, cuya posición se estableció en paralelo con la determinación del mapa de restricción.

Ubicación en el genoma de los genes *granulina* e *iap-3* y caracterización de sus secuencias

Los genes *granulina* e *iap-3* se ubicaron en el mapa de restricción mediante ensayos de *Southern blot* con sondas heterólogas derivadas del genoma de CpGV. El gen de *granulina* fue clonado y secuenciado, en tanto que la secuencia de *iap-3* se obtuvo mediante la secuencia completa un fragmento genómico identificado por *Southern blot*.

El gen de *granulina* codifica para una proteína de 248 aminoácidos altamente similar a otras proteínas de la familia. La granulina de EpaGV posee un peso teórico de 29,1 kDa muy similar al estimado por SDS-PAGE ($28,5 \pm 0,5$ kDa). La secuencia aminoacídica amino-terminal deducida de la secuencia nucleotídica fue concordante con los datos obtenidos por microsecuenciamiento de péptidos. Se caracterizó la secuencia proteica y se analizaron, además, las regiones *upstream* y *downstream*. En la región promotora del gen de granulina se describió la presencia del promotor tardío ATAAG, y de un nuevo motivo consenso cercano al ATG (WCARNA) sin funciones asignadas aún.

El gen *iap-3* codifica para una proteína de 256 aminoácidos de largo, similar a los miembros de la familia IAP-3 de inhibidores a apoptosis. EpaGV IAP3 contiene dos motivos característicos de estos inhibidores de apoptosis (dos BIR y un RING-Finger). La filogenia de IAP-3 agrupó a esta proteína con los miembros las proteínas IAP-3 de baculovirus y lepidópteros. La presencia de otros genes *iaps* fue explorada empleando sondas heterólogas, con resultados negativos. Sin embargo, hasta que la secuencia de EpaGV no esté determinada por completo, no es posible asegurar que otros miembros de esta familia no están presentes en el mismo.

Análisis de la secuencia parcial del genoma de EpapGV

Las secuencias generadas a partir de los extremos de los fragmentos clonados junto con las aportadas por otros autores, se emplearon para completar la descripción de EpapGV.

En total, aproximadamente el 30% del genoma ha sido secuenciado, identificándose en esta tesis a 28 ORFs con homólogos en otros organismos. Además, se ha analizado otros 8 ORFs ubicados por otros autores. Las secuencias de los marcos de lectura abiertos, fueron caracterizados empleando herramientas bioinformáticas. Esta caracterización comprendió la descripción del contenido GC, de potenciales motivos promotores, sitios de poliadenilación y de motivos proteicos.

Los genes encontrados serán útiles para comprender en parte la biología de EpapGV y sus interacciones con su huésped. Algunos genes poseen potencial interés debido a que podrían modular el rango de huéspedes, como aquellos involucrados en la transcripción y replicación viral. La presencia de algunos ORFs contribuyó a correlacionar comportamientos fenotípicos como la liquefacción después de la muerte, con la presencia de genes *cath* y *chi*. Además, se han encontrado secuencias del tipo palíndromes imperfectos o secuencias repetidas dispersas (rdis), así como secuencias repetidas en forma directa (dr) e inversa (sir), algunas de ellas con posibles roles transcripcionales. Las rdis de EpapGV son similares a las repeticiones de CpGV y PhopGV en cuanto a sus tamaños y a que todas presentan características del tipo palíndromo imperfecto; sin embargo no exhiben similitud a nivel de secuencia.

La organización genómica de EpapGV es distinta a la de los *Nucleopolyhedrovirus* totalmente secuenciados, pero muy similar a los *Granulovirus*, en especial, a la de CpGV. Si bien la mayoría de los genes de los GVs poseen posiciones constantes, el genoma de EpapGV muestra reordenamientos no descritos con anterioridad como la inversión del *cassette* de 22 kpb (*efp-ie-1*) y la posición de los genes *iap-3* y *rr1*.

Análisis filogenéticos

La filogenia de EpapGV analizada a partir del gen de granulina sugirió que EpapGV se encontraría dentro del grupo I de granulovirus, junto a CpGV y PhopGV, entre otros. Los resultados de este análisis coincidieron con lo observado para el contenido de genes y la posición de los mismos en el genoma. Un posterior análisis filogenético empleando un alineamiento concatenado con veinte ORFs comunes a todos los

baculovirus secuenciados, ubicó a EpapGV cercano a PhopGV y CpGV, confirmando la filogenia generada a partir del gen de granulina.

Sobre el árbol filogenético se graficó la hipótesis más parsimoniosa para la ganancia y pérdida de genes. Nuestro análisis del contenido de genes está de acuerdo con la historia evolutiva propuesta por Herniou *et al.* (2001), quienes han postulado que los genes *gp37*, *quitinasa* y *catepsina* se perdieron en la rama que condujo a PxGV, y que el gen *rr1* fue ganado por el linaje de CpGV. Con respecto a inversión del *cassette efp-1*, esta traslocación podría haber ocurrido luego que el genoma antecesor de EpapGV se separó del antecesor de CpGV y PhopGV.

Perspectivas

Una vez que el genoma de EpapGV esté completamente secuenciado, el análisis de sus ORFs podrá ser encarado mediante herramientas bioinformáticas, microarrays, sistemas proteómicos, análisis transcripcionales clásicos y experimentos de *knock out* génico. Estos análisis permitirán conocer la función de los genes codificados por EpapGV y ayudarán a comprender la regulación del rango de huéspedes, el tropismo celular y la patogenicidad. También, deberán aportar a la comprensión de los procesos de expresión regulada de grupos de genes, ayudar a entender las interacciones de los productos génicos virales con componentes celulares, como así también la fisiología de los insectos. Estos conocimientos permitirán el diseño de estrategias para la modificación genética de los baculovirus, orientada al desarrollo de insecticidas biológicos que puedan competir exitosamente con los productos químicos tóxicos de acción rápida.

Al inicio de este trabajo de tesis sólo se tenía conocimiento que un virus afectaba al “barrenador del brote” y que el mismo podía ser un buen candidato para el control biológico de esta plaga. Los resultados presentados aquí, en conjunto con otros trabajos realizados en el marco de la colaboración IBBM-IMYZA, permiten definir el género al cual pertenece el virus de la granulosis de EpapGV y describir una serie de características a nivel genómico. Estos estudios sientan las bases que permitirán el registro de este virus para su uso en agricultura.

El fin... o ¿el principio?

CAPÍTULO 10

BIBLIOGRAFÍA

Referencias bibliográficas

- Aasland, R., Gibson, T. J. & Stewart, A. F. (1995).** The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 56-59.
- 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**, 11157-11165.
- Ahrens, C. A., Leisy, D. J. & Rohrmann, G. F. (1996).** Baculovirus DNA Replication. In *DNA Replication in Eukaryotic Cells*. Edited by M., De Pamphillis. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ahrens, C. H., Russell, R. L., Funk, C. J., Evans, J. T., Harwood, S. H. & Rohrmann, S. H. (1997).** The sequence of the *Orgyia pseudotsugata multinucleocapsid* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* **229**, 381-399.
- Akiyoshi, D. E., Chakerian, R., Rohrmann, G. F., Nesson, M. H. & Beaudreau, G. S. (1985).** Cloning and sequencing of the granulin gene from the *Trichoplusia ni* granulosis virus. *Virology* **141**, 328-332.
- Alba, M. M., Das, R., Orengo, C. A. & Kellam, P. (2001).** Genomewide function conservation and phylogeny in *Herpesviridae*. *Genome Research* **11**, 43-54.
- Albariño, C. G. (1997).** Caracterización molecular de variantes del virus Junín con diferentes grados de virulencia. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997).** "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402.
- Aragón, J. R., Molinari, A. & Lorenzatti, S. (1998).** Manejo integrado de plagas. In *El cultivo de la soja en Argentina*, pp. 247-288. Edited by L. Giorda & H. Baigorri. Argentina: INTA.
- Arends, H. M. & Jehle, J. A. (2002).** Homologous recombination between the inverted terminal repeats of defective transposon TCp3.2 causes an inversion in the genome of *Cydia pomonella* granulovirus. *Journal of General Virology* **83**, 1573-1578.
- Arif, B. M. (1984).** The entomopoxviruses. *Advances in Virus Research* **29**, 211-217.
- Ayres, M. D., Howard, S. C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M. & Possee, R. D. (1994).** The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **202**, 586-605.
- Bal, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J. W. & Elledge, S. J. (1996).** SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**, 263-274.
- Benson, G. (1999).** "Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences". *Nucleic Acid Research* **27**, 573-580.
- Benz, G. A. (1986).** Introduction: historical perspective. In *The Biology of Baculoviruses*, pp. 1-35. Edited by R. R. Granados & B. A. Federici. Boca Raton, Florida: CRC.
- Bergold, G. H. (1947).** Die Isolierung des polyeder-virus und die natur der polyeder. *Z Naturforsch Teil B*; **2b**:122-143.
- Bergold, G. H. (1964).** Insect viruses. In *Techniques in Experimental Virology*, Chap. 4. Edited by Harris, R. J. C. New York: Academic Press.

- 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**, 1933-1945.
- Birnbaum, M. J., Clem, R. J. & Miller, L. K. (1994).** An apoptosis inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polipeptide with Cys/His sequence motifs. *Journal of Virology* **68**, 2521-2528.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513.
- Blissard, G. W. (1996).** Baculovirus-insect cell interactions. *Cytotechnology* **20**, 73-93.
- Blissard, G. W., Black, B., Crook, N., Keddie, B. A., Possee, R., Rohrmann, G., Theilmann, D. & Volkman, L. (2000).** Family Baculoviridae, p. 195-202. In *Taxonomy of Viruses: VII Report of the International Committee on Virus Taxonomy*. Edited by M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle & R. B. Wickner. London: Academic Press.
- Bonning, B. C. & Harrison, R. L. (2002).** The *Rachiplusia ou* multiple nucleopolyhedrovirus genome sequence. GenBank, direct submission. Accesion NC_004323.
- Boore, J. L., Collins, T. M., Stanton, D., Daehler, L. L. & Brown, W. M. (1995).** Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. *Nature* **376**, 163-165.
- Bourque, G. & Pevzner, P. A. (2002).** Genomescale evolution: reconstructing gene orders in ancestral species. *Genome Research* **12**, 26-36.
- Braunagel, S. C., Parr, R., Belyavskiy, M. & Summers, M. D. (1998).** *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection results in Sf9 cell cycle arrest at G2/M phase. *Virology* **244**, 195-211.
- Bulach, D., Kumar, C. A., Zaia, A., Liang, B. & Tribe, D. (1999).** Group II *Nucleopolyhedrovirus* Subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. *Journal of Invertebrate Pathology* **73**, 59-73.
- Casabona, J. C., Parola, A. D. & Romanowski, V. (2002).** Sequence and phylogenetic analysis of two *Epinotia aporema* (EpapGV) Granulovirus ORFs. XXXV Annual meeting of the Society of Invertebrate Pathology (SIP). Foz do Iguacu, Brazil.
- Charlton, C. A. & Volkman, L. E. (1991).** Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of Virology* **65**, 1219-1227.
- Charlton, C. A. & Volkman, L. E. (1993).** Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf21 cells induces actin cable formation. *Virology* **197**, 245-254.
- Chen, F. & Suttle, C. A. (1996).** Evolutionary relationships among large double stranded DNA viruses that infect microalgae and other organisms as inferred from DNA polymerase genes. *Virology* **219**, 170-178.
- Chen, X., IJkel, W. F., Tarchini, R., Sun, X., Sandbrink, H., Wang, H., Peters, S., Zuidema D., Lankhorst, R. K., Vlak, J. M. & Hu, Z. (2001).** The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology* **82**, 241-257.
- Chen, X., Zhang, W. J., Wong, J., Chun, G., Lu, A., Mc Cutchen, B. F., Presnail, J. K., Herrmann, R., Dolan, M., Tingey, S., Hu, Z. H. & Vlak, J. M. (2002).** Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology* **83**, 673-684.
- Chisholm, G. E. & Henner, D. J. (1988).** Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. *Journal of Virology* **62**, 3193-3200.
- Christian, P. D., Gibb, N., Kasprzak, A. B. & Richards, A. (2001).** A rapid method for the identification and differentiation of *Helicoverpa* nucleopolyhedroviruses (NPV *Baculoviridae*) isolated from the environment. *Journal of Virological Methods* **96**, 51-65.

- Clem, R. & Fechheimer, J. M. & Miller, L. K. (1991).** Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* **254**, 1388-1390.
- Clem, R. J. (1997).** Regulation of programmed cell death and apoptosis. In *The Baculoviruses*, pp. 237-266. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.
- Cochran, M. A. & Faulkner, P. (1983).** Localization of homologous DNA sequences interspersed at five regions in the baculovirus AcMNPV genome. *Journal of Virology* **45**, 961-970.
- COSAVE (COMITE DE SANIDAD VEGETAL DEL CONE SUR),** <http://www.cosave.org.py/serietecnica/serietecnica-rt0199esp.htm#soja>.
- Croizier, L., Taha, A., Croizier, G. & López-Ferber, M. (2002).** Sequence analysis of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* granulovirus. XXXV Annual meeting of the Society of Invertebrate Pathology (SIP). Foz do Igauçu, Brazil.
- Crook, N. & Payne, C. (1980).** Comparison of three methods of ELISA for baculovirus. *Journal of General Virology* **46**, 29-37.
- Crook, N. E., James, J. D., Smith, I. R. L. & Winstanley, D. (1997).** Comprehensive physical map of the *Cydia pomonella* granulovirus genome and sequence analysis of the granulin gene region. *Journal of General Virology* **78**, 965-974.
- Crouch, E. A. & Passarelli, A. L. (2002).** Genetic Requirements for Homologous Recombination in *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* **76**, 9233-9334.
- Dall, D., Luque, T. & O'Reilly, D (2001).** Insect-virus relationships: sifting by informatics. *Bioessays* **23**, 184-93.
- Day, M. F., Common, I. F. B., Farrant, J. L. & Potter, C. (1953).** A polyhedral virus disease of pasture caterpillar, *Pterolocera amplicornia* Walker (Anthelidae). *Australian Journal of Biological Sciences* **6**, 574-579.
- Denhardt, D. T. (1966).** A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochemical and Biophysics Research Communication* **23**, 641.
- Derksen, A. C. G. & Granados, R. R. (1988).** Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculovirus and enhancement of viral infection. *Virology* **16**, 242-250.
- Diaz, B. & Diez, S. (1989).** Presencia de un virus de la granulosis en larvas de *Epinotia aporema* (Wals.), en cultivos de soja. In *IV Conferencia Mundial de Investigación en soja*, Vol. III, pp. 1588-1592. Buenos Aires: Argentina,
- Dixon, D. (1999).** DNA for Windows Version 2.2. Provided by the author.
- Eppstein, D. A. & Thoma, J. A. (1975).** Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infecting the cabbage looper. *Biochemical and Biophysics Research Communication* **62**, 478-484.
- Faulkner, P., Kuzio, J., Williamst, G. V. & Wilson, J. A. (1997).** Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity in vivo. *Journal of General Virology* **78**, 3091-3100.
- Federici, B. A. (1986).** Ultrastructure of Baculoviruses. In *The biology of baculoviruses*, Vol. I, pp. 61-88. Edited by R. R. Granados & B. A. Federici. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Federici, B. A. & Stern V. M. (1990).** Replication and occlusion of a granulosis virus in larval and midgut epithelium of the western grape leaf skeletonizer, *Harrisina brillians*. *Journal of Invertebrate Pathology* **56**, 401-414.
- Federici, B. A. (1997).** Baculovirus pathogenesis. In *The baculoviruses*, pp. 33-59. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983).** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* **132**, 6-13.

- Felsenstein, J. (1995).** PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington.
- Fraser, M. J. (1986).** Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* **95**, 189-195.
- Friesen, P. D. & Nissen, M. S. (1990).** Gene organization and transcription of TED, a lepidopteran retrotransposon integrated within the baculovirus genome. *Molecular Cell Biology* **10**, 3067-3077.
- Friesen, P. D. (1993).** Invertebrate transposable elements in the baculovirus genomes: characterization and significances, In *Parasites and pathogens of insects: parasites*, vol 2 pp.147-178. Edited by N. E. Beckage, S. N. Thompson & B. A. Federici. London: Academic Press.
- Friesen, P. D. & Miller, L. K. (2001).** Insect Viruses. In *Fields Virology*, Fourth edition. Edited by B.N., Fields & D.M., Knipe, et al. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Funk, C. J. & Consigli, R. A. (1993).** Phosphate cycling on the basic protein of *Plodia interpunctella* granulosis virus. *Virology* **193**, 396-402.
- Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. (1996).** SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applied Biosciences* **12**, 543-548.
- Ghiringhelli, P. D., Parola A., Posik, D. M., Sciocco de Cap, A. & Romanowski, V. (1996).** Caracterización Molecular de Virus de Insectos (*Baculoviridae*). XXXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica.
- Giacca, M., Gutierrez, M. I., Menzo, S., Di Fagagna, F. D. & Falaschi, A. (1992).** A human binding site for transcription factor USF/MLTF mimics the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **186**, 133-147.
- Glen, D. M. & Payne, C. C. (1984).** Production and field evaluation of codling moth granulosis virus for control of *Cydia pomonella* in the United Kingdom. *Annals of Applied Biology* **104**, 87-98.
- Goldberg, A., Manzán, M. A., Ghiringhelli, P. D., Sciocco-Cap, A. & Romanowski, V. (2002a).** Identification and sequence analysis of a putative EpapGV envelope fusion protein. XXXV Annual meeting of the Society of Invertebrate Pathology (SIP). Foz do Iguacu, Brazil.
- Goldberg, A., Romanowski, V., Federici, B. & Sciocco de Cap, A. (2002b).** Effects of the Epap granulovirus on its host, *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **80**, 148-159.
- Goldberg, A. V. (2003).** Estudio biológico y molecular del proceso de infección de un virus de la granulosis de *Epinotia aporema* y evaluación de su potencial como agente de control biológico. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina.
- Gomi, S., Ecale Zhou, C., Yih, W., Majima, K. & Maeda, S. (1997).** Deletion analysis of eighteen late gene expression gene homologues of the baculovirus BmNPV. *Virology* **230**, 35-47.
- Gomi, S., Majima, K., & Maeda, S. (1999).** Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* **80**, 1323-1337.
- Gompels, U. A., Nicholas, J., Lawrence, G., Jones, M., Thomson, B. J., Martin, M. E., Efstathiou, S., Craxton, M. & Macaulay, H. A. (1995).** The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* **209**, 29-51.
- Grace, T. D. C. (1962).** Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature* **195**, 788-789.
- Granados, R. R. (1978).** Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. *Virology* **90**, 170-174.

- Green, G. L., Leppla, N. C. & Dickerson, W. A. (1976).** Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology* **69**, 487-488
- Groner, A. (1989).** Safety to nontarget invertebrates of baculoviruses. In *Safety of Microbial Insecticides*, pp. 135-147. Edited by Lacey, L. & Davison. E.U. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Guarino, L. A. & Summers, M. D. (1986).** Interspersed homologous DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhances delayed early gene expression. *Journal of Virology* **60**, 215-223.
- Guarino, L. A. & Dong, W. (1991).** Transient expression of an enhancer-binding protein in insect cells transfected with the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE1 gene. *Journal of Virology* **65**, 3676-3680.
- Guarino, L. A. & Smith, M. (1992).** Regulation of delayed-early gene transcription of dual TATA boxes. *Journal of Virology* **66**, 3722-3739.
- Guarino, L. A., Xu, B., Jin, J. & Dong, W. (1998a).** A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus – infected cells. *Journal of Virology* **72**, 7985-7991.
- Guarino, L. A., Jin, J. & Dong, W. (1998b).** Guanylyltransferase activity of the LEF-4 subunit of baculovirus RNA polymerase. *Journal of Virology* **72**, 10003-10010.
- Habib, S. & Hasnain, S. E. (2000).** Differential activity of two non-*hr* origins during replication of the ubiquitin variant encoded by the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Journal of Virology* **74**, 5182-5189.
- Hannenhalli, S., Chappay, C., Koonin, E. V. & Pevzner, P. A. (1995).** Genome sequence comparison and scenarios for gene rearrangements a test-case. *Genomics* **30**, 299–311.
- Hashimoto, Y., Corsaro, B. & Granados, 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**, 2645-2651.
- Hashimoto, Y., Hayakawa, T., Ueno, Y., Fujita, T., Sano, Y. & Matsumoto, T. (2000).** Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. *Virology* **275**, 358-372.
- Hawtin, R. E., Arnold, K., Ayres, M. D., Zanutto, P. M., Howard, S. C., Gooday, G. W., Chappell, L. H., Kitts, P. A., King, L. A. & Possee, R. D. (1995).** Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* **212**, 673-685.
- Hayakawa, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S., Goto, C. & Maeda, S. (1999).** Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology* **262**, 277-297.
- Hayakawa, T., Rohrmann, G. & Hashimoto, Y. (2000).** Patterns of Genome Organization and Content in Lepidopteran Baculoviruses. *Virology* **278**, 1-12.
- Heldens, J. G. M., 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. *Journal of General Virology* **78**, 1497-1506.
- Heldens, J. G. M., Liu, Y., Zuidema, D., Goldbach, R. & Vlak J. M. (1998).** A highly conserved genomic region in baculoviruses: Sequence analysis of an 11.3 kpb DNA fragment (46.5-55.1 m.u.) of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Research* **55**, 187-198.
- Hengen, P. N. (1994).** Ghost plasmid of pBluescript. *Trends in Biochemical Sciences* **19**, 139-140.
- Henikoff, S. & Henikoff, J. G. (1994).** Protein family classification based on searching a database of blocks. *Genomics* **19**, 97-107.
- 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**, 8117-8126.

- Herniou, E. A., Olszewski, J. O., Cory, J. S. & O'Reilly, D. R. (2003). The Genome Sequence and Evolution of Baculoviruses. *Annual Review of Entomology* **48**, 211–234.
- Hink, W. F. & Vail, P. V. (1973). A plaque assay for titration of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus in a cabbage looper TN-368 cell line. *Journal of Invertebrate Pathology* **22**, 168-174.
- Hink, W. F. (1970). Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Nature* **226**, 466–467.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual Review of Genetics* **30**, 405-439.
- Hom, L. G. & Volkman, L. E. (2000). *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus chiA is required for processing of V-CATH. *Virology* **277**, 178-183.
- Hom, L. G., Ohkawa, T., Trudeau, D. & Volkman, L. E. (2002). *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus ProV-CATH is activated during infected cell death. *Virology* **296**, 212-218.
- Hoopes, R. R. & Rohmann, G. F. (1991). In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 4513-4517.
- Horton, H. M. & Burand, J. P. (1993). Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *Journal of Virology* **67**, 1860-1868.
- Hu, Z. H., Arif, B. M., Jin, F., Martens, J. W. M., Chen, X. W., Sun, J. S., Zuidema, D., Goldbach, R. W. & Vlak, J. M. (1998). Distinct gene arrangement in the *Buzura suppressaria* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology* **79**, 2841-2851.
- Hunter-Fujita, F. R., Entwistle, P. F., Evans, H. F., Crook, N. E. (1998). A world survey of virus control of insect pests. In *Insect Viruses and Pest Management*, pp. 189-200. Edited by F. R. Hunter-Fujita, P. F. Entwistle, H. F. Evans & N. E. Crook. Baffins Lane, Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Hyink, O., Graves, S., Fairbairn, F. M. & Ward, V. K. (1998). Mapping and polyhedrin gene analysis of the *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology* **78**, 2853-2862.
- Hyink, O., Dellow, R. A., Olsen, M. J., Caradoc-Davies, K. M., Drake, K., Herniou, E. A., Cory, J. S., O'Reilly, D. R. & Ward, V. K. (2002). Whole genome analysis of the *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* **83**, 957-971.
- Ianone, N., Parisi, R., & Dagoberto, E. (1987). Incidencia del "barrenador de los brotes" *Epinotia aporema* (Wals.), en soja. *Boletín de divulgación EEA-INTA Pergamino Informe Técnico* **209**, 1-24.
- Ijkel, W. F. J., van Strien, E. A., Heldens, J. G., Broer, R., Zuidema, D., Goldbach, R. W. & Vlak, J. M. (1999). Sequence and organization of the *Spodoptera exigua multicapsid* nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology* **80**, 3289-3304.
- Ijkel, W. F., Westenberg, M., Goldbach, R. W., Blissard, G. W., Vlak, J. M. & Zuidema, D. (2000). A novel baculovirus envelope fusion protein with a proprotein convertase cleavage site. *Virology* **275**, 30-41.
- Ikeda, M. & Kobayashi, M. (1999). Cell-cycle perturbation in Sf9 cells infected with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Virology* **258**, 176–188.
- Iyer, L. M., Aravind, L. & Koonin, E. V. (2001). Common origin of four diverse families of large eukaryotic DNA viruses. *Journal of Virology* **75**, 11720-11734.
- Jehle, J. A. & Backhaus, H. (1994). The granulins gene region of *Cryptophlebia leucotreta* granulosis virus: sequence analysis and phylogenetic considerations. *Journal of General Virology* **75**, 3667-3671.

- Jehle, J. A., Fritsch, E., Nickel, A., Huber, J. & Backhaus, H. (1995). TCI4.7: a novel lepidopteran transposon found in *Cydia pomonella* granulosis virus. *Virology* **207**, 369-379.
- Jehle, J. A., van der Linden, I. F., Backhaus, H. & Vlak, J. M. (1997). Identification and sequence analysis of the integration site of the transposon TCp3.2 in the genome of *Cydia pomonella* granulovirus. *Virus Research* **50**, 151-157.
- Jehle, J. A., Nickel, A., Vlak, J. M. & Backhaus, H. (1998). Horizontal escape of the novel Tc1-like lepidopteran transposon TCp3.2 into *Cydia pomonella* granulovirus. *Journal of Molecular Evolution* **46**, 215-224.
- Jehle, J. A. (2002). The expansion of a Hypervariable, non-*hr ori*-like region in the genome of *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus provides in vivo evidence for the utilization of baculovirus non-*hr oris* during replication. *Journal of General Virology* **83**, 2025-2034.
- Jiang, C., Baehrecke, E. H. & Thummel, C. S. (1997). Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **124**, 4673-4683.
- Kang, W., Tristem, M., Maeda, S., Crook, N. E. & O'Reilly, D. R. (1998). Identification and characterization of the *Cydia pomonella* granulovirus cathepsin and chitinase genes. *Journal of General Virology* **79**, 2283-2292.
- Kawanishi C. Y., Egawa, K., & Summers (1972). Solubilization of *Trichoplusia ni* Granulosis Virus Proteinic Crystal. II. Ultrastructure. *Journal of Invertebrate Pathology* **20**, 95-100.
- Kitts, P. A. & Green, G. (1999). An immunological assay for determination of baculovirus titers in 48 hours. *Analytical Biochemistry* **268**, 173-178.
- Ko, R., Okano, K., & Maeda, S. (2000). Structural and functional analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus matrix metalloproteinase. *Journal of Virology* **74**, 11240-4664.
- Kool, M., Goldbach, R. W. & Vlak, J. M. (1994a). A putative non-*hr* origin of DNA replication in the HindIII-K fragment of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* **75**, 3345-3352.
- Kool, M., Ahrens, C. H., Goldbach, R. W., Rohrmann, G. F. & Vlak, J. M. (1994b). Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 11212-11216.
- Kool, M., Ahrens, C. H., Vlak, J. M. & Rohrmann, G. F. (1995). Replication of baculovirus DNA. *Journal of General Virology* **76**, 2103-2118.
- Kost, T. A. & Condreay, J. P. (1999). Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Current Opinion in Biotechnology* **10**, 428-433.
- Kost, T. A. & Condreay, J. P. (2002). Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends in Biotechnology Sciences* **20**, 173-80
- Kovacs, G. R., Guarino, L. A., Graham, B. L & Summers, M. D. (1991). Identification of spliced baculovirus RNAs expressed late in infection. *Virology* **185**, 633-643.
- Kozlov, E. A. N. V. Rodnin, T. L. Levitina, M. M. Gusak, N. F. Radomskij, and L. J. Palchikovskaya. (1992). The amino acid sequence determination of a granulins and polyhedrin from two baculoviruses infecting *Agrotis segetum*. *Virology* **189**, 320-323.
- Kuzio, J., Pearson, M. N., Harwood, S.H., Funk, C. J., Evans, J. T., Slavicek, J. M. & Rohrmann, G. F. (1999). Sequence analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology* **253**, 17-34.
- LaCount, D. J., Hanson, S. F., Schneider, C. L. & Friesen, P. D. (2000). Caspase inhibitor P35 and inhibitor of apoptosis Op-IAP block in vivo proteolytic activation of an effector caspase at different steps. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 15657-15664.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lange, M. & Jehle, J. A., (2002).** The genome of the *Cryptophlebia leucotreta* Granulovirus (CrleGV). XXXV Annual meeting of the Society of Invertebrate Pathology (SIP). Foz do Igauçu, Brazil.
- Langridge, W. H. R., Granados, R. R. & Greenberg, J. F. (1981).** Detection of baculovirus protein in cell culture and insect larvae by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology* **54**, 443-448.
- Lee, H. Y. & Krell, P. J. (1992).** Generation and analysis of defective genomes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* **66**, 4339-4347.
- Lee, H. Y. & Krell, P. J. (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., Rasmussen, C., Kim, H. T. & Rohmann, G. F. (1995).** The *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus homologous region 1a: Identical sequences are essential for DNA replication activity and transcriptional enhancer function. *Virology* **208**, 742-752.
- Lepore, L. S., Roelvink, P. R. & Granados, R. R. (1996).** Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *Journal of Invertebrate Pathology* **68**, 131-40.
- Letunic, I., Goodstadt, L., Dickens, N. J., Doerks, T., Schultz, J., Mott, R., Ciccarelli, F., Copley, R. R., Ponting, C. P. & Bork, P. (2002).** Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Research* **30**, 242-244.
- Li, L., Donly, C., Li, Q., Willis, L. G., Keddie, B. A., Erlandson, M. A. & Theilmann, D. A. (2002).** Identification and genomic analysis of a second species of nucleopolyhedrovirus isolated from *Mamestra configurata*. *Virology* **297**, 226-244.
- Li, Q., Donly, C., Li, L., Willis, L. G., Theilmann, D. A. & Erlandson, M. (2002).** Sequence and organization of the *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus genome. *Virology* **294**, 106-121.
- Longworth, J. F. & Carey, G. P. (1980).** The use of an indirect Enzyme-linked immunosorbent assay to detect baculovirus in larvae and adults of *Oryctes rhinoceros* from Tonga. *Journal of General Virology* **47**, 431-438.
- Lopez Ferber, M., Argaud, O., Croizier, L. & Croizier, G. (2001).** Diversity, distribution, and mobility of bro gene sequences in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes* **22**, 247-254.
- Lu, A. & Miller, L. K. (1995).** Differential requirements for baculovirus late expression factor genes in two cell lines. *Journal of Virology* **69**, 6265-6272.
- Lu, A. & Miller, L. K. (1997).** Generation of recombinant baculoviruses by direct cloning. *BioTechniques* **21**, 63-67.
- Lung, O., Westenberg, M., Vlak, J. M., Zuidema, D. & Blissard, G. W. (2002).** Pseudotyping *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV): F proteins from group II NPVs are functionally analogous to AcMNPV GP64. *Journal of Virology* **76**, 5729-36.
- Lupiani, B., Raina, A. K. & Huber, C. (1999).** Development and use of PCR assay for detection of the reproductive virus in wild populations of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **73**, 107-112.
- Luque, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D. R. & Winstanley, D. (2001).** The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. *Journal of General Virology* **82**, 2531-2547.
- Maguire, T., Harrison, P., Hyink, O. Kalmakoff, J. & Ward, V. (2000).** The inhibitors of apoptosis of *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* **81**, 2803-2811.
- Malik, H. S., Henikoff, S. & Eickbush, T. H. (2000).** Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses. *Genome Research* **10**, 1307-1318.

- Manji, G. & Friesen, P. D. (2001).** Apoptosis in Motion. An apical, P35-Insensitive Caspase mediates programmed cell death in insect cells. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 16704-16710.
- Manzán, M. A., Lozano, V. M. E., Sciocco-Cap, A., Ghiringhelli, P. D. & Romanowski, V. (2002a).** Identification and characterization of the ecdysteroid UDP-glycosyltransferase gene of *Epinotia aporema* granulovirus. *Virus Genes* **24**, 115-116.
- Manzán, M. A., García, A., Arana, E., Ghiringhelli, P. D., Sciocco-Cap, A. & Romanowski, V. (2002b).** Identification and Molecular characterization of *Epinotia aporema* granulovirus helicase genes. XXXV Annual meeting of the Society of Invertebrate Pathology (SIP). Foz do Iguacu, Brazil.
- Maruniak, J. E., (1986).** Baculovirus Structural Proteins and Protein Synthesis. In *The Biology of Baculoviruses*. Vol. I., Chap. 6 pp. 130-138. Edited by R. R. Granados & B. A. Federici. Boca Raton, FL: C.R.C. Press.
- Maruniak, J. E., Summers, M. D., Falcon, L. A. & Smith, G. E. (1979).** *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-structural proteins compared from *in vivo* and *in vitro* sources. *Intervirology* **11**, 82-88
- Mathews, C. K., van Holde, K. E. (1995).** Biochemistry. Menlo Park, California: The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc.
- Matsudaira, P. (1987).** Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 10035-10038.
- McDougal, V. V. & Guarino, L. A. (1999).** *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase: measurements of processivity and strand displacement. *Journal of Virology* **73**, 4908-4918.
- McGeoch, D. J., Dolan, A., Ralph, A. C. (2000).** Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *Journal of Virology* **74**, 10401-10406.
- Miller, D. P., Luque, T., Crook, N. E., Winstanley, D. & O' Riley, D. R. (2002).** Expression of the *Cydia pomonella* granulovirus *iap3* gene. *Archives Virology* **147**, 1221-1236.
- Miller, D. W. & Miller, L. K. (1982).** A virus mutant with an insertion of a copia-like transposable element. *Nature* **299**, 562-564
- Miller, L. K. & Jewell, J. E. (1981).** Baculovirus Induction of a DNA Polymerase. *Journal of Virology* **40**, 305-308.
- Miller, L. K. (1996).** Insect viruses. In *Fields Virology*, pp. 533-556. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- 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.
- Moraes, R. R., Maruniak, J. E. & Funderburk, J. E. (1999).** Methods for detection of *Anticarsia gemmatalis* *Nucleopolyhedrovirus* DNA in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **6**, 2307-2311.
- Morse, M. A., Marriott, A. C. & Nuttall, P. A.. (1992).** The glycoprotein of Thogoto virus (a tick-borne orthomyxo-like virus) is related to the baculovirus glycoprotein GP64. *Virology* **186**, 640-646.
- Moscardi, F. (1999).** Assessment of the application of baculovirus for control of lepidoptera. *Annual Review of Entomology* **44**, 257-289.
- Moser, B. A., Becnel, J. J., White, S. E., Afonso, C, Kutish, G, Hanker, S., & Almira, E. (2001).** Morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family *Baculoviridae*. *Journal of General Virology* **82**, 283-297.

- Nataraju, B., Sivaprasad, V., Datta, R. K., Gupta, S. K. & Shamim, M. (1994).** Colloidal textile dye-based dipstick immunoassay for the detection of nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) of silkworm *Bombix mori* L. *Journal of Invertebrate Pathology* **63**, 135-139.
- Nikaido, M., Kawai, K., Cao, Y., Harada, M., Tomita, S., Okada, N. & Hasegawa, M. (2001).** Maximum likelihood analysis of the complete mitochondrial genomes of eutherians and a reevaluation of the phylogeny of bats and insectivores. *Journal of Molecular Evolution* **53**, 508–516.
- O'Brien, V. (1998).** Viruses and apoptosis. *Journal of General Virology* **79**, 1833-1845.
- Olson, V. A., Wetter, J. A. & Friesen, P. D (2002).** Baculovirus transregulator IE1 requires a dimeric nuclear localization element for nuclear import and promoter activation. *Journal of Virology* **76**, 9505-9515.
- O'Reilly, D. R. & Miller, L. K. (1990).** Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDP glucosyl transferase gene. *Journal of Virology* **64**, 1321-1324.
- O'Reilly, O. R., Miller, L. K. & Luckow, V. A. (1992).** Baculovirus expression vectors. In *A laboratory Manual*, pp. 340. Edited by W.H. Freeman & Co. Oxford, New York: Oxford University Press.
- O'Reilly, D. R. (1997).** Auxiliary genes of baculoviruses. In *The Baculoviruses*, pp. 267-300. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.
- Orkin, S. H. (1992).** GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* **80**, 575-581.
- Page, R. D. M. (1996).** TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357-358.
- Pang, Y., Yu, J., Wang, L., Hu, X., Bao, W., Li, G., Chen, C., Han, H., Hu, S. & Yang, H. (2001).** Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Virology* **287**, 391-404.
- Parola, A. D., Manzan, M. A., Lozano, M. E., Ghiringhelli, P. D., Sciocco-Cap, A. & Romanowski, V. (2002).** Physical and genetic map of *Epinotia aporema* granulovirus genome. *Virus Genes* **25**, 327-339.
- Parola, A. D., Glikmann, G., Sciocco-Cap, A. & Romanowski, V. (2003).** An immunochemical method for quantitation of *Epinotia aporema* granulovirus (EpapGV). *Journal of Virological Methods* **112**, 13-21.
- Pascual, J., Martinez-Yamout, M., Dyson, H. J. & Wright, P. E. (2000).** Structure of the PHD zinc finger from human williams-beuren syndrome transcription factor. *Journal of Molecular Biology* **304**, 723-729.
- Passarelli, A. L. & Miller, L. K (1993).** Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: ie-1, ie-n, and lef-2. *Journal of Virology* **67**, 2149–2158.
- Patton, E. E., Willems, A. R., Sa, D., Kuras, L., Thomas, D., Craig, K. L. & Tyers, M. (1998).** Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes and Development* **12**, 692-705.
- Payne, C. C. & Mertens, P. C. C. (1983).** Cytoplasmic polyhedrosis viruses. In *The Reoviridae*. Edited by W.K. Joklik, pp. 425-504. New York: Plenum Press.
- Pearson, M. N, Bjornson, R. M, Pearson, G. D. & Rohrmann, G. F. (1992).** The *Autographa californica* baculovirus genome: evidence for multiple replication origins. *Science* **257**, 1382-1384.
- Pearson, M. & Rohrmann, G. F. (1995).** *Lymantria dispar* nucleopolyhedrosis virus homologous regions: Characterization of their ability to function as replication origins. *Journal of Virology* **69**, 213-221.
- Pearson, M. N. & Rohrmann, G. F. (1998).** Characterisation of a baculovirus-encoded ATP-dependent DNA ligase. *Journal of Virology* **72**, 9142–9149.

- Pearson, M. N., Groten, C. & Rohrmann, G. F. (2000).** Identification of the *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein provides evidence for a phylogenetic division of the *Baculoviridae*. *Journal of Virology* **74**, 6126-6131.
- 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 Virology* **76**, 5301-5304.
- Peden, K. W. C., Pipas, J. M., Pearson-White, S. & Nathans, D. (1980).** Isolation of mutants of an animal virus in bacteria. *Science* **209**, 1392-1396.
- Pellock, B. J., Lu, A., Meagher, R. B., Weise, M. J. & Miller, L. K. (1996).** Sequence, function and phylogenetic analysis of an ascovirus DNA polymerase gene. *Virology* **216**, 146-157.
- Pennock G. D., Shoemaker, C. & Miller, L. K. (1984).** Strong and regulated expression of *Escherichia coli* B-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Molecular and Cellular Biology* **4**, 399-406.
- Pham, D. Q. D. & Sivasubramanian, N. (1992).** In-vivo transcriptional analysis of three baculovirus genes: evidence of homology between viral and host transcripts. *Virology* **190**, 288-297.
- Phanis, C. G., Miller, D. P., Cassar, S. C., Tristem, M., Thiem, S. M. & O'Reilly, D. R. (1999).** Identification and expression of two baculovirus *gp37* genes. *Journal of General Virology* **80**, 1823-1831.
- Pijlman, G. P., Pruijssers, A. J. & Vlak, J. M. (2003).** Identification of pif-2, a third conserved baculovirus gene required for per os infection of insects. *Journal of General Virology* **84**, 2041-2049.
- Possee, R. D., Sun, T. P., Howard, S. C., Ayres, M. D., Hill-Perkins, M. & Gearing, K. L. (1991).** Nucleotide sequence of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis 9.4 k1bp EcoRI-I and -R polyhedrin gene region. *Virology* **185**, 229-241.
- Posee, R. D. & Rohrmann, G. F. (1997).** Baculovirus genome and Evolution. In *The Baculoviruses*, pp. 125. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.
- Pullen, S. S. & Friesen, P. D. (1995).** The CAGT motif functions as an initiator element during early transcription of the baculovirus transregulator *ie-1*. *Journal of Virology* **69**, 3575-3583.
- Rapp, J. C., Wilson, J. A. & Miller, L. K. (1998).** Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression. *Journal of Virology* **72**, 10197-10206.
- Reichard, P. (1993).** From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* **260**, 1773-1777.
- Rice, W. C. & Miller, L. K. (1986).** Baculovirus transcription in the presence of inhibitors and in nonpermissive *Drosophila* cells. *Virus Research* **6**, 155-172.
- Richards, A. R., & Christian P. D. (1999).** A rapid bioassay screen for quantifying nucleopolyhedroviruses (*Baculoviridae*) in the environment. *Journal of Virological Methods* **82**, 63-75.
- Ripa, R. (1982).** Presencia de dos nuevos patógenos en *Epinotia aporema* Wals. *Agricultura Técnica* (Chile) **41**, 55-56.
- Roberts, P. L. & Naser, W. (1982).** Characterization of Monoclonal Antibodies to the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *Virology* **122**, 424-430.
- Rohrmann, G. F. & Karplus, P. A. (2001).** Relatedness of baculovirus and gypsy retrotransposon envelope proteins. *BMC Evolutionary Biology*, **1** :1.
- Rohrmann, G. F. (1986).** Polyhedrin structure. *Journal of General Virology* **67**, 1499-1513.
- Rohrmann, G. F. (1992).** Baculovirus structural proteins. *Journal of General Virology* **73**, 749-761.

- Roncarati, R. & Knebel-Mrsdorf, D. (1998). Identification of the early actin-rearrangement-inducing factor gene, arif-1, from *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* 1997 **71**, 7933–7941 [published erratum *Journal of Virology* 1998; **72**, 7888–7889].
- Rychlik, W. & Rhoads, R. E. (1989). A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* **17**, 8543-8551.
- Rychlik, W., Spencer, W. J. & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research* **18**, 6409-6412.
- Sadler, T. J., Glare, T. R., Ward, V. K., & Kalmakoff, J. (2000). Physical and genetic map of the *Wiseana* nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology* **81**, 1127-1133.
- Sambrook, J. E., Fritsch, F. & Maniatis. T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, second edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saurin, A. J., Borden, K. L., Boddy, M. N. & Freemont, P. S. (1996). Does this have a familiar RING? *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 208-214
- Saville, G. P., Thomas, C. J., Possee, R. D. & King, L. A. (2002). Partial redistribution of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chitinase in virus-infected cells accompanies mutation of the carboxy-terminal KDEL ER-retention motif. *Journal of General Virology* **83**, 685-694.
- Sayers, J. R., Evans, D. & Thomson, J. B. (1996). Identification and eradication of a denatured DNA isolated during alkaline lysis-based plasmid purification procedures. *Analytical Biochemistry* **241**, 186-189.
- Schägger, H. & G. Von Jagow. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**, 368-379.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Science* **95**, 5857-5864.
- Sciocco-Cap, A., Parola, A. D., Goldebrg, A. V., Ghiringhelli, P. D. & Romanowski, V. (2001). Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 3702-3706.
- Senkevich, T.G., Bugert, J. J., Sisler, J. R., Koonin, E. V., Darai, G. & Moss, B. (1996). Genome sequence of a human tumorigenic poxvirus: prediction of specific host response-evasion genes. *Science* **273**, 813-816.
- Shamim, M., Baig, M., Datta, R. K., & Gupta, S. K. (1994). Development of monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of nuclear polyhedrosis virus infection in *Bombix mori* l. *Journal of Invertebrate Pathology* **63**, 151-156.
- Sicheritz-Ponten, T. & Andersson, S. G. E. (2001). A phylogenomic approach to microbial evolution. *Nucleic Acids Research* **29**, 545–552.
- Sigrist, C. J., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., Bairoch, A. & Bucher, P. (2002). PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Briefings in Bioinformatics* **3**, 265-274.
- Smith, G. E. & Summers, M. E. (1978). Analysis of baculoviruses genomes with restriction endonucleases. *Virology* **89**, 517-527.
- Smith, G. E., Fraser, M. J. & Summers, M. D. (1983). Molecular engineering of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *Journal of Virology* **46**, 584-593.
- Smith, O. J., Hughes, K. M., Dunn, P. H. & Hall, I. M. (1956). A granulosis virus disease of the western grape leaf skeletonizer and its transmission. *Can Entomology* **88**, 507–515.

- Stark, D. M., Purcell, A. H., & Mills, N. J. (1999).** Natural Occurrence of *Ametadoria misella* (Diptera: Tachinidae) and the Granulovirus of *Harrisina brillians* (Lepidoptera: Zygaenidae) in California. *Environmental Entomology* **28**, 868-875.
- Steinhaus, E. A. (1947).** Principles of insect pathology. New York: McGraw-Hill.
- Steller, M. & Grether, M. E. (1994).** Programmed cell death in *Drosophila*. *Neuron* **13**, 1269-1274.
- Stern, V. M., Smith, R. F., van den Bosch, R. & Hagen, K. S. (1959).** The integrated control concept. *Hilgardia* **29**, 81-101.
- Stothard, P. (2000).** The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques* **28**, 1102-1104.
- Summers, M. D. (1971).** Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. *Journal of Ultrastructural Research* **35**, 606-625.
- Summers, M. E. & Smith, G. E. (1975).** *Trichoplusia ni* Granulosis Virus Granulin: a Phenol-Soluble, Phosphorylated Protein. *Journal of Virology* **16**, 1108-1116.
- Summers, M. E., & Smith, G. E. (1978).** Baculovirus Structural Polypeptides. *Virology* **84**, 390-402.
- Summers, M. D. & Smith, G. E. (1987).** A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin, No. 1555.
- Sutherland, D., Samakovlis, C. & Krasnow, M. A. (1996).** *Branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* **87**, 1091-1101.
- Swofford, D. L. (2000).** PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), 4.0 edn. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Taha, A., Nour-el-Din, A., Croisier, L., López-Ferber, M. & Croizier, G. (2000).** Comparative analysis of the granulin regions of the *Phthorimaea operculella* and *Spodoptera littoralis* granuloviruses. *Virus Genes* **331**, 147-155.
- Tami, C., Farber, M., Palma, E. L. & Taboga, O. (2000).** Presentation of antigenic sites from foot-and-mouth disease virus on the surface of baculovirus and in the membrane of infected cells. *Archives in Virology* **145**, 1815-1828.
- Tatusova, T. A. & Madden, T. L. (1999).** "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences". *FEMS Microbiology Letter* **174**, 247-250.
- Theilmann, D. A. & Stewart, S. (1992).** Molecular analysis of the transactivating IE-2 gene of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **187**, 84-96.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W, improving the sensitivity of progressive sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Tjia, S. T., Carstens, E. B. & Doerfler, W. (1979).** Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. The viral DNA and the kinetics of its replication. *Virology* **99**, 391-409.
- Todd, J. W., Passarelli, A. L. & Miller, L. K. (1995).** Eighteen baculovirus genes including lef-77, p35, 39k and p47 support late gene expression. *Journal of Virology* **69**, 968-974.
- Tweeten, K. A., Bulla, L. A. & Consigli, R. A. (1980).** Characterization of an extremely basic protein derived from granulosis virus nucleocapsid. *Journal of Virology* **33**, 866-876.
- Tweeten, K. A. L. A. Bulla, & R. A. Consigli. (1981).** Applied and molecular aspects of insect granulosis viruses. *Microbiology Reviews* **45**, 379-408.
- Ucker, D. S. (1991).** Death by suicide: one way to go in mammalian cellular development? *New Biology* **3**, 103-109.

- 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**, 213-217.
- Vaux, D. L. & Haeccker, G. (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* **76**, 777-779.
- Vaux, D. L. & Strasser, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 2239-2244.
- Vialard, J. E., Yuen, L. & Richardson, C. D. (1990). Identification and characterization of a baculovirus occlusion body glycoprotein which resembles spheroidin, an entomopoxvirus protein. *Journal of Virology* **64**, 5804-5811.
- Vialard, J. E. & Richardson, C. D. (1993). The 1629-nucleotide open reading frame located downstream of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene encodes nucleocapsid-associated phosphoprotein. *Journal of Virology* **67**, 5859-5866.
- Vlak, J. M., Klinkenberg, F. A., Zaal, K. J. M., Usmany, M., Klinge-Roode, E. C., Geervliet, J. B. F., Roosien, J. & Van Lent, J. W. M. (1988). Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-b-galactosidase fusion gene. *Journal of General Virology* **69**, 765-776.
- Volkman, L. E. & Goldsmith, P. A. (1985). Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology* **143**, 185-195.
- Volkman, L. E. & Keddie, B. A. (1990). Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. *Seminars in Virology* **1**, 288-297.
- Vucic, D., Kauser, W. J., Harvey, A. J. & Miller, L. K. (1997). Inhibition of reaper-inducer apoptosis by interaction with inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). *Proceeding of the national Academy of Sciences* **94**, 10183-10188.
- Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobe, G. C. & Kerr, J. F. R. (1988). Patterns of cell death. *Methods Achievement in Experimental Pathology* **13**, 18-54.
- Wang, C. H., Yang, H. N., Liu, H. C., Kou, G. H. & Lo, C. F. (2000). Nested polymerase chain reaction and in situ hybridization for detection of nucleopolyhedrosis. *Journal of Virological Methods* **84**, 65-75.
- Wang, P. & Granados, R. R. (1997). An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 6977-6982.
- Werren, J. H. (1997). Wolbachia run amok. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **94**, 11154-11155.
- Whitford, M. & Faulkner, P. (1992). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* **66**, 4763-4768. Erratum **67**, ~427; 1993.
- Whitt, M. A. & Manning, J. E. (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**, 33-42
- Wickham, T. J., Granados, R. R., Wood, H. A., Hammer, D. A. & Shuler, M. L. (1990). General analysis of receptor-mediated viral attachment to cell surfaces. *Biophysics Journal* **58**, 1501-1516.
- Wickham, T. J., Shuler, M. L., Hammer, D. A., Granados, R. R. & Wood, H. A. (1992). Equilibrium and kinetic analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus attachment to different insect cell lines. *Journal of General Virology* **73**, 3185-3194.
- Williams, G. V., Rohel, D. Z., Kuzio, J. & Faulkner (1989). A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion-deletion mutants. *Journal of General Virology* **70**, 187-202.

- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are a useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535.
- Winstanley, D. & Crook N. E. (1973).** Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures. *Journal of General Virology* **74**,1599-1609.
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M.L. (1990).** Towards a natural system of organisms-proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 4576-4579.
- Wormleaton, S. & Winstanley, D. (2001).** Phylogenetic analysis of conserved genes within the *ecdysteroid UDP-glucosyltransferase* gene region of the slow-killing *Adoxophyes orana* granulovirus. *Journal of General Virology* **82**, 2295-2305.
- Wu, Y. & Carstens, E. B. (1996).** Initiation of baculovirus DNA replication: Early promoter regions can function as infection-dependent replicating sequences in a plasmid-based replication assay. *Journal of Virology* **70**, 6967-6972.
- Xie, W. D., Arif, B., Dobos, P. & Kreell, P. J. (1995).** Identification and analysis of a putative origin of DNA replication in the *Choristoneura fumiferana* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* **209**, 409-419.
- Yamafuji, K., Yoshihara, F. & Hirayama, K. (1958).** Protease and desoxyribonuclease in viral polyhedra crystal. *Enzymologia* **19**, 53.
- Yamafuji, K., Mukai, J. & Yoshihara, F. (1960).** Desoxyribonuclease and protease in polyhedral viral particles, *Enzymologia* **22**, 1-12.
- Yang, S., & Miller, L. K. (1998).** Expression and mutational analysis of the baculovirus very late factor 1 (vlf-1) gene. *Virology* **245**, 99-109.
- Young, J. C., Mackinnon, E. A. & Faulkner, P (1993).** The architecture of the virogenic stroma in isolated nuclei of *Spodoptera frugiperda* cells in vitro infected by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Structural Biology* **110**, 141-153.
- Yuen, L. Dionne, J., Arif, B. & Richardson, C. (1990).** Identification and sequencing of the spheroidin gene of *Chorisoteura biennis* entomopoxvirus. *Virology* **175**, 427-433.
- Zanotto, P. M., Kessing, B. & Maruniak, J. E. (1993).** Phylogenetic interrelationships among Baculoviruses: Evolutionary rates and host associations. *Journal of Invertebrate Pathology* **62**, 147-164.
- Zeddani, J. L., Pollet, A., Mangoendiharjo, S., Ramadahan, T. H. & Lopez Ferber, M. (1999).** Occurrence and virulence of a granulosis virus in *Phthorimaea operculella* (Lep., Gelechiidae) Populations in Indonesia. *Journal of Invertebrate Pathology* **74**, 48-54.
- Zhang, C. X. & Jin, W. R. (2003).** *Helicoverpa armigera* nuclear polyhedrosis virus, complete genome. GenBank, direct Submission: NC_003094.

CAPÍTULO 11

APÉNDICES

Introducción

Este capítulo tiene como propósito brindar información complementaria para los lectores que deseen ampliar los análisis efectuados en capítulos anteriores. Para no abundar en texto este capítulo se ha dividido en dos partes. En la primera parte (parte A), se presentan los ensayos de infección de líneas celulares Sf21 con viriones de EpapGV. Estos experimentos tuvieron como objetivo la búsqueda de líneas celulares permisivas para EpapGV. Del capítulo 5 se amplía la información sobre clones espurios y la determinación de la polaridad de dos fragmentos genómicos empleando PCR. Se muestran además, árboles filogenéticos de la familia *Baculoviridae* generados a partir de las proteínas mayoritarias del cuerpo de inclusión (poliedrinas y granulinas) que se han extraído del capítulo 6. La información del capítulo 8 se amplió con el análisis de las regiones flanqueantes a la inversión *efp-ie-1*.

La segunda parte (parte B) de este capítulo no se han impreso, pero se adjunta en la versión electrónica de esta tesis. Esta sección describe las secuencias repetidas de EpapGV, muestra las secuencias disponibles del genoma de EpapGV, los ORFs ubicados en el genomas y la comparación de secuencias por BLAST.

Apéndices parte A, versión impresa

Apéndices cultivos celulares e infección de líneas celulares Sf21 con EpapGV

Selección de líneas celulares permisivas a EpapGV

Si bien EpapGV fue aislado a partir de una única larva (Sciocco-Cap *et al.*, 2001), en determinadas condiciones pueden presentarse mezclas de genomas de distintas subespecies, dificultando así la caracterización y estudio de sus genes. La obtención de una línea celular permisiva para un virus de la granulosis es de suma importancia a fin de emplearlos en una caracterización génica.

La replicación *in vitro* de baculovirus ha estado restringida a un pequeño número de líneas celulares que soportan la replicación de algunos virus de poliedrosis nuclear



(NPV), pero se han presentado grandes dificultades para encontrar líneas celulares permisivas a virus de granulosis. En general los *Granulovirus* (GVs), a diferencia de los NPVs, demuestran un tropismo limitado en cuanto a tejidos replicándose preferentemente en tejido graso. Los intentos por establecer líneas celulares de tejidos en los cuales la replicación de GVs es conocida (cuerpo graso, intestino y epidermis) no han tenido éxito hasta el momento. Sin embargo, Winstanley & Crook (1993) observaron que las células embrionarias constituyen una mejor fuente de líneas celulares permisivas para los granulovirus.

Dado que nuestro laboratorio posee una línea proveniente de ovarios de oruga militar tardía (*Spodoptera frugiperda*) (Sf21), se decidió evaluar la capacidad de esa línea para sostener la replicación viral del EpapGV. Los experimentos consistieron en la incubación de células Sf21 con viriones brotanes y con medio de cultivo TC-100 sin virus, como control negativo. Las células inoculadas con TC-100 no presentaron retardo en el crecimiento ni cambios morfológicos anormales al ser observadas al microscopio óptico. Por el contrario las células Sf21 infectadas con hemolinfa proveniente de *Sf* (infectada con SfMNPV) (control positivo) presentaron cambios morfológicos que se correspondieron con el desarrollo de una infección por baculovirus. Entre estos cambios podemos citar variaciones en la morfología celular, aparición de pequeños cuerpos con una refringencia mayor en el interior de las células (cuerpos de inclusión de SfMNPV) y cese de la división celular. Respecto de las células Sf21 inoculadas con hemolinfa de larvas de *E. aporema* infectadas con EpapGV, las mismas presentaron una pérdida de coloración (birrefringencia), también se observó la existencia de granulaciones en su interior. Estas granulaciones podrían deberse a efectos citotóxicos causados por una excesiva exposición al oxígeno del aire durante el procedimiento de inoculación. A diferencia de los controles positivos ninguna de las células infectadas con hemolinfa de *E. aporema* presentó cuerpos de inclusión de EpapGV. En conclusión, en las condiciones experimentales analizadas las células Sf21 no son huéspedes permisivos para EpapGV.

Apéndices del capítulo 5

Análisis de "clones espurios"

En esta sección se muestra el análisis de los "clones espurios" como un elemento más para completar el panorama del mapa y también para discutir sobre los posibles problemas que se plantean al efectuar un mapa de restricción. Los "clones espurios" se han definido como aquellos clones que resultaran del clonado de productos de digestiones parciales, religaciones, clones posiblemente provenientes de variantes virales minoritarias o resultado del clonado de DNAs exógenos o contaminantes.

Análisis de "clones espurios" EcoRI

A continuación se indica un análisis de los clones EcoRI 47, 22, 34 y 105.

Clon EcoRI 47

Determinación de la presencia del fragmento EcoRI I (343 pb)

Mediante experimentos de digestión con la enzima EcoRI se determinó que el clon EcoRI 47 poseía dos fragmentos genómicos ligados, uno de ellos presentaba un peso similar al fragmento EcoRI F (13,4 kpb), en tanto que el tamaño del otro rondaba los 0,30-0,35 kpb. Esta información indicaba que era probable que este clon contuviera el fragmento EcoRI I (0,35 kpb) unido al fragmento EcoRI F (13,4 kpb). Para validar esta hipótesis, se secuenciaron los extremos del clon EcoRI 47 y de su posible análogo EcoRI 46 (fragmento EcoRI F) empleando *primers* genéricos (T7 y Sp6). De las secuencias obtenidas se eliminaron primero las secuencias del vector y luego se compararon con las secuencias de GenBank empleando BLASTX (Altschul *et al.*, 1990). Los resultados de la tabla 11.1 confirmaron la presencia del fragmento EcoRI I y determinaron el tamaño de éste en 0,343 kpb (Fig. 11.1).

A continuación se muestra el análisis de las secuencias de ambos extremos del clon EcoRI 47.

Análisis de la secuencia del extremo T7 del clon EcoRI 47

A partir de esta secuencia se confirmó la presencia del inserto EcoRI I y se aseveró su tamaño de 343 pb (Fig. 11.1). Esta secuencia presentó homología con el gen de la DNA polimerasa (*dna-pol*) viral de *Cydia pomonella* GV (CpGV). De acuerdo con los resultados de las comparaciones de BLAST, este fragmento no proviene de digestión incompleta de esta región del genoma, sino que es un producto de religación de fragmentos genómicos.

```

Clon EcoRI 47 extremo T7
TGGGCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTGCCCACTCTTAACAAC
AAAGTGGTACCCACGCAATTGTTTTAAAAACCAAGTAATGAATTGGAGCAAACACCTCAAGATTATATGTACAT
TTTTGAATGATATCCTGTCTATGGTGGGCAACGACACGCTGTTTGTGTGCGCGTTTTAACGACATTTGCTCGTA
TTTACAACAGCGCCAAAAGTGTGATATTAGCTATCCGGTGCTTAAGAAGATGACCGACGCTCGCTCCAAGGAT
ATTGTGTCAAAGAGCTCCATATCAAGAAAAAGACaGACTTGGACAATAAAGAGTTTCGTGAGATTCTTGATT
CGCGTGAACATAAATTTAAGCaTTTTTACGAATTCACAGTGGGGCATNCCTTGCTTCCANAAGGCCNCCCN
NGAACAGCCAATCCTCAGTTAAAATTNCGNTGCCTTTACGTTNTCCTTTNNTTANCGCCTTGCGGGTTNATN
NANNCCNCANTTANTCTGTCTGGTTATGTCCCAANCCTGTTTAAAAGAANATTNGTNTCCCCCCCCNTTNT
TTAATANTGTCCCNTTGGGCCCNCCCNNGTTNGGTNCCCC
  
```

Figura 11.1. Secuencia del clon EcoRI 47 extremo T7. En negrita fragmento EcoRI I, la secuencia del vector pZErO-2™ se ha grisado. Subrayado doble: sitio EcoRI. En color negro sin resaltar, región no asignada a ninguna secuencia homóloga, posiblemente debido a la baja calidad de secuencia.

Análisis de la secuencia del extremo Sp6 del clon EcoRI 47

A partir de la comparación de la secuencia del clon EcoRI 47, extremo Sp6, (Fig. 11.2) con el GenBank y con la secuencia de vector pZErO-2™, se determinó que este extremo presentaba homología con el gen de la *dna-pol* de CpGV (CpGV *dna-pol*) entre los aminoácidos 877 a 834. Sin embargo, posterior a la secuencia del gen de la DNA pol se encontraba una secuencia que presentaba homología con una región Plac-*lacO* del plásmido en cuestión que se encuentra detrás del *primer Sp6* (Fig. 11.3 y 11.4). Estas observaciones indicarían que el vector sufrió un reordenamiento en una de las regiones del *polylinker*. El mapa de este plásmido quedó establecido tal como se muestra en la figura 11.5.

```

clon EcoRI 47 extremo Sp6
GACCATATGCNATATGGTCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGNCGCCAGTGTGggGGA
ATTCTNAACCACGAGAAGANAGGGTATTCTGTNCNCCGACGAGGGAATGTAATTNGTGTGTCNGTCTATT
NCCATCATCATGTTTAACTNACATGCNCTGGTGACGGANGATGTCTATCTCCCNNGTGCNCCTCTCGG
TNTCCCNACANTCTGAGAACCGGAANCNTANACTNTANNNCCAGCGGTNCCTNCTNAGTGGAGCTAACT
CCCATANTTNCGTTGCNCCNACTGCCNCTTTCCANTCNGGAAACCTNTCCTGCCAGCTTGCATTAATG
AATCNGCCAACNCGGGGAAAAGCNGTTTGCCTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCGCTCACTAACTACTCG
CTTGCNCTCGGTCGTTCCGGCTTGCAGCCAACNGGTATCCAACCTCACTCAAAGGCNGTAAATTTCNGTTANC
CCCACAAATCAANGGGGANNCCCCCNGAAAAACTTTTACCANAAAANGCCCTCCAAAAGGCCACTA
ACCTTCAAAAAGGCCCTTTCCCTNGGTTTTTNCCAAAGCCCCCCCCCCCC
    
```

Figura 11.2. Secuencia del fragmento EcoRI 47 extremo Sp6. En letras resaltadas de gris se indica la secuencia del vector pZErO-2™; en negrita secuencia con similitud al gen de *dna-pol* de CpGV. Subrayado simple, sitio HindIII; subrayado doble, sitio EcoRI; subrayado con puntos, sitio BamHI. En negro, región no asignada a ninguna secuencia homóloga. En minúscula se indican los nucleótidos que no coinciden con la secuencia del vector pZErO-2™.

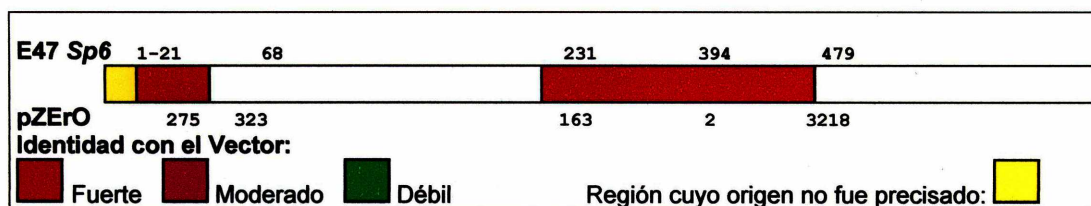


Figura 11.3. Resultado de la comparación de la secuencia efectuada con el primer Sp6 sobre el clon EcoRI 47 con el plásmido pZErO-2™. Los números indican la posición de los nucleótidos del inserto así como del vector.

```

Phc-lacO region
95 GCGCAACGCA ATTAATGTGA GTTAGCTCAC TCATTAGGCA CCCCAGGCTT TACACTTTAT lacZa ORF
M13 Reverse primer
155 GCTTCCGGCT CGTATGTTGT GTGGAATTGT GAGCGAATAA CAATTCACA CAGGAAACAG CT ATG
Sp6 Promoter:Priming site Met Nsi I *
220 ACC ATG ATT ACG CCA AGC TAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC TCA AGC TAT GCA
Thr Met Ile Thr Pro Ser Tyr Leu Gly Asp Thr Ile Glu Tyr Ser Ser Tyr Ala
Hind III Asp 718 I Kpn I Sac I BamH I/Bst I Spe I Eco RI
274 TCA AGC TTG GTA CCG AGC TCG GAT CCA CTA GTA ACG GCC GCC AGT GTG CTG GAA
Ser Ser Leu Val Pro Ser Ser Asp Pro Leu Val Thr Ala Ser Val Leu Glu
Pst I EcoRV Not I Xho I Sph I Nsi I * Xba I Apa I
328 TTC TGC AGA TAT CCA TCA CAC TGG CCG CCG CTC GAG CAT GCA TCT AGA GGG CCC
Phe Cys Arg Tyr Pro Ser His Trp Arg Pro Leu Glu His Ala Ser Arg Gly Pro
T7 Promoter:Priming site M13 (-20) Forward priming site
382 AAT TCG CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAC AAT TCA CTG GCC GTC GTT TTA CAA CGT
Asn Ser Pro Tyr Ser Glu Ser Tyr Tyr Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg
    
```

Figura 11.4. Región del polylinker del plásmido pZErO-2™. Figura extraída del manual del vector pZErO-2™ (Invitrogen, CA).

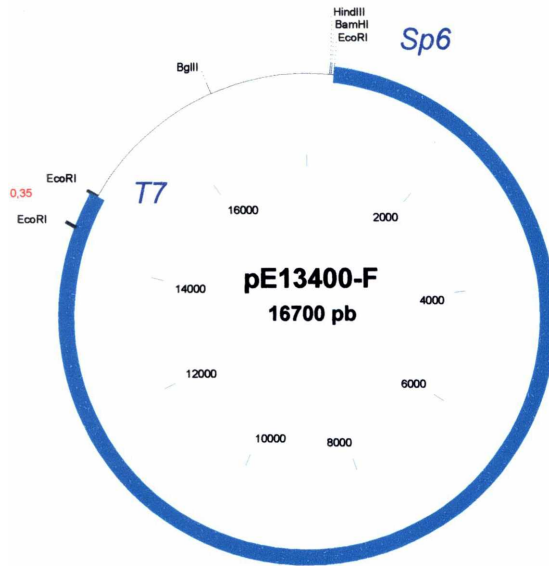


Figura 11.5. Mapa de restricción del clon EcoRI 47 (EcoRI F + EcoRI I).

13.4

Tabla 11.1. Resultado de las comparaciones de secuencias de clones EcoRI en BLASTX.

| Clon | Primer | Proteína homóloga ^a | Expect ^b | Región de alineación ^c (en aa) | Proteína homóloga Tamaño en aa | ID/S ^d (%) | Fragmento genómico, observaciones |
|------|--------|--------------------------------|---------------------|---|--------------------------------|-----------------------|--|
| 46 | T7 | <i>fgf</i> CpGV | - | 95-111 178-197 | 400 | 58/81 45/55 | EcoRI F |
| 46 | Sp6 | <i>dna-pol</i> CpGV | 4e-38 | 879-766 | 1051 | 66/76 | EcoRI F |
| 47 | T7 | <i>dna-pol</i> CpGV | 9e-30 | 996-883 | 1051 | 54/72 | EcoRI I |
| 47 | Sp6 | <i>dna-pol</i> CpGV | 0,004 | 877-834 | 1051 | 47/56 | Similar a EcoRI F (clon EcoRI 46) extremo Sp6. Este extremo presentó un reordenamiento del vector. |

^a *fgf*: fibroblast growth factor o factor de crecimiento de fibroblastos, CpGV *dna-pol*: DNA polimerasa de CpGV.

^b *Expect*: probabilidad de encontrar al azar esta secuencia en el GenBank.

^c Está referida a los aminoácidos de la proteína homóloga que alinean con la secuencia del extremo analizado.

^d ID: identidad, S: similitud.

Clones EcoRI 22 y 34

Se analizaron dos clones EcoRI que presentaban características distintas a los demás fragmentos conocidos. Los tamaños de los insertos de los clones EcoRI 22 y EcoRI 34 fueron similares a los fragmentos genómicos, pero sus perfiles de restricción no se asemejaban a los fragmentos ya mapeados. La digestión con la enzima EcoRI indicó que el clon EcoRI 22 presentaba un inserto de aproximadamente 5,2-5,6 kpb (Fig. 11.6). Este fragmento poseía solamente un sitio interno BglII, de tal modo que al cortar con EcoRI más BglII se generaban fragmentos 1,9 y 3,1 kpb pertenecientes a este

respectivamente (Fig. 11.7), no coincidiendo estos tamaños con ningún fragmento de digestión simple EcoRI sobre el genoma de EpaGV. Al efectuarse una búsqueda en BLASTN, se determinó que la secuencia de este clon no coincidía con la de ningún gen viral conocido, sin embargo presentaba un 96% de identidad y un "Expect" de $2e^{-12}$ con una región reguladora de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*. Por los argumentos antes mencionados, se dedujo que el clon EcoRI 105 era el resultado del clonado de un DNA contaminante.

Clon EcoRI 105 (0,3 kpb)

```

CATTGGGCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCAAGCCTGCGTT
CGGCCAGCGTGGTTTAACGGGGCGCCTGAGATCAAGATCACAAGCAGAGCAAGATCAAGAGCGGCTCGCTT
CGCATCGTGGTTACCTGGGGCGGCACATTTGATATCTCTGTCGATTGAACGGCCGCCATCGCAGGCAAGCC
AGCTCCACAGTTGGAGCCCGGGTGTGGGAGATAGGCATCGGCTGGCAGGCTGCCACGGAGGGCAGCG
TCGTACTGGAATTCGTACAGATATCTATGACTCTCGCAAGCCAGGCCAGCCCTGATTGAAGCCTCTGCAA
ATCCAACCGAAGTTTCNGCAACCGGACACAGTCTGATATAAGAATCCAACACGGGTTTTCCCCACATACAT
GCCNANTCAATGAATTCACCCACACTNGCGGGCNGTTACTATTTGANTTCCAACCCGGTTCCAACCTT
GAATCCTACCTTNATTTTNC

```

Figura 11.7. Secuencia nucleotídica del clon EcoRI 105, a partir del primer T7. En letras grisadas se indica la secuencia del vector, en negrita secuencia del inserto y en subrayado doble los sitios de restricción EcoRI.

Análisis de restricción de clones espurios HindIII

A partir del análisis de las digestiones de clones HindIII con más de un inserto y de acuerdo con los datos de las secuencias de dichos fragmentos, se han generado mapas para estos clones (Fig. 11.8). En la tabla 11.2 se muestra además la polaridad de los extremos de los fragmentos clonados. Se ha definido a la polaridad como la posición de los extremos de un fragmento clonado respecto a un punto de referencia, por ejemplo el gen de granulina en el mapa lineal. Por otra parte también llamamos polaridad a la orientación de los extremos antes mencionados dentro del plásmido; así por ejemplo el extremo más cercano al gen de granulina de un fragmento X, puede estar ubicado cercano al sitio HindIII o al primer Sp6, o a otro punto de referencia del vector.

Tabla 11.2. Análisis de clones HindIII religantes. Análisis de fragmentos clonados en el vector pZErO-2TM, atribución a fragmentos genómicos y resumen de los resultados obtenidos a partir de secuencias de los extremos de los fragmentos clonados.

| Clon | Fragmento genómico | Tamaño de los insertos (en kpb) | Polaridad de los extremos ^a | ORFs ^b | Sitios de restricción | | |
|------|--------------------|---------------------------------|--|--------------------------|-----------------------|---|---|
| k | H / L / I | 5,13/2,1/3,7 | H, T7: d I, Sp6: d | H, T7: - I, Sp6: gp37 | | | |
| f | H/N | 5,13/0,9 | H, Sp6: i N, T7: i | H, Sp6: - N, T7: p25 | + | + | + |
| e | K/ M | 3,5/1,3 | K, Sp6: i M, T7: i | K, Sp6: gp41 M, T7: - | - | - | + |

^a polaridad de los extremos de los fragmentos (llamados según el *primer* de la secuencia adyacente (T7, Sp6); i, próximo al gen de granulina; d, más lejano al gen de granulina.

^b Clon, extremos secuenciados y ORFs atribuidos a los mismos (gp37, p25 y gp41). En un capítulo posterior se analizarán estos genes. Además, se indica la posición de los extremos de los fragmentos respecto de los *primers* de secuencia de pZErO-2TM.

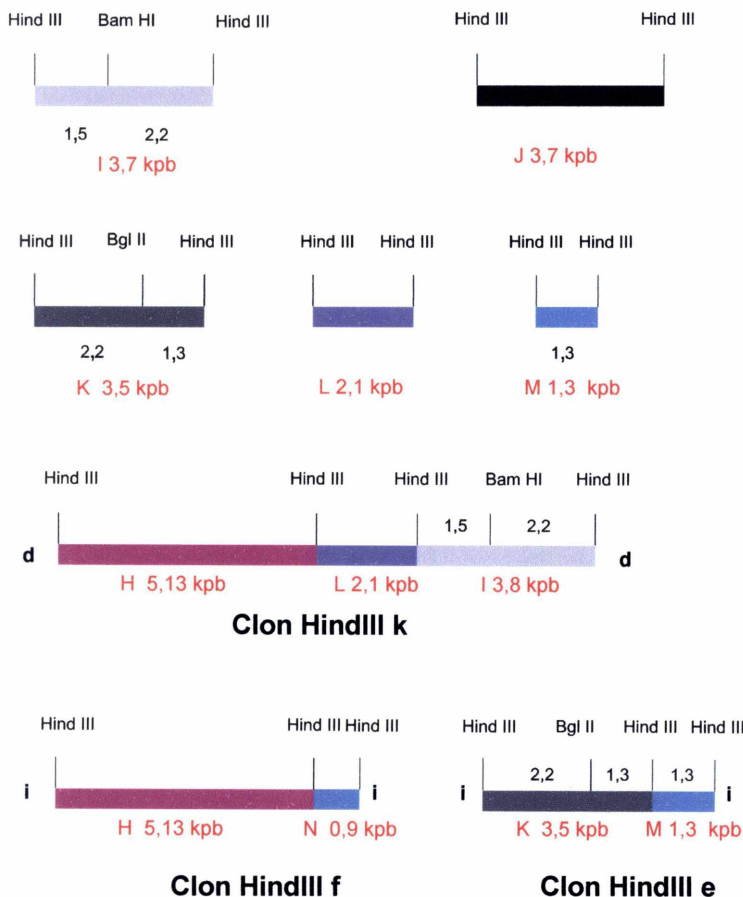


Figura 11.8. Mapas de restricción de clones HindIII. (A), clones con un solo inserto. (B), clones producto de religaciones. Se indican los nombres de los fragmentos genómicos y en caso de clones con más de un inserto se indica el nombre del clon por debajo de su mapa. Además, para estos últimos, se indica la polaridad de los extremos de los insertos con una i o una d. Esta posición es relativa al punto cero del mapa (gen de granulina) para un mapa lineal. La i refiere al extremo más próximo a granulina y d al extremo más alejado.

Análisis de clones espurios BgIII

El clon BgIII 68 se analizará exhaustivamente debido a que es el único clon que contiene al fragmento genómico BgIII K. Al finalizar esta sección, se muestra de forma resumida el análisis de otros clones espurios en una tabla.

Fragmento BgIII 68 (12,1 kpb)

La digestión del clon BgIII 68 (12,1 kpb) con la enzima BgIII determinó que este clon presentaba dos fragmentos, uno de 9,4 kpb y el otro de 2,7 ó 2,6 kpb. El mapa de este clon se muestra en la figura 11.9 y fué similar al fragmento BgIII F, excepto por el segundo inserto de 2,7 ó 2,6 kpb. En general los clones con más de un inserto pueden originarse por el clonado de un producto de digestión parcial o por el clonado de un producto de ligación de dos fragmentos BgIII no necesariamente adyacentes en el genoma. De acuerdo con los análisis de digestiones de un clon EcoRI solapado con BgIII 68, este último se habría originado por el clonado de fragmentos no adyacentes en el genoma. En particular el fragmento genómico EcoRI G (clon EcoRI 5G) que se solapa con BgIII F carece del fragmento BgIII-BgIII de 2,7 kpb. De ser un producto de digestión incompleta, el fragmento BgIII-BgIII de 2,7 kpb debería haber sido encontrado en el fragmento EcoRI antes citado.

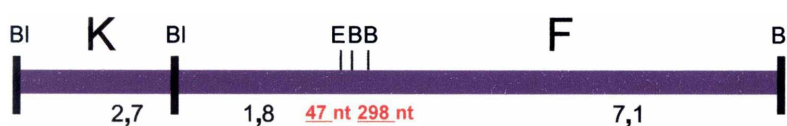


Figura 11.9. Mapa del fragmento BgIII 68. Debajo de la figura se indica el tamaño de los fragmentos de restricción y en rojo se indican los tamaños determinados por secuencia.

Polaridad del clon BgIII 68

Para precisar la polaridad de los extremos de este fragmento respecto del gen de granulina se secuenciaron los extremos de este clon y se compararon con otras secuencias disponibles. En particular, se determinaron las secuencias de los extremos del fragmento genómico BgIII F (clones BgIII 35 y 57) y se obtuvo la secuencia de un extremo del fragmento BgIII K a partir de un *primer* contiguo al mismo (Fig. 11.10).

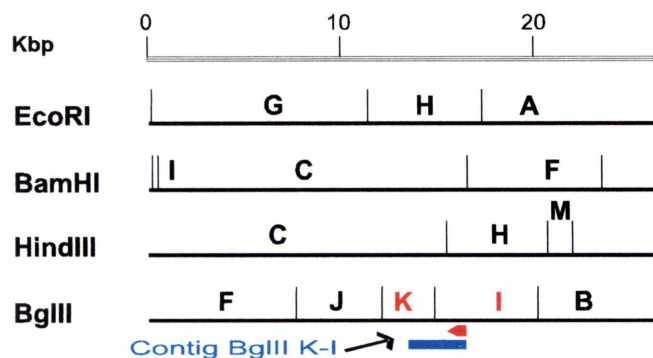


Figura 11.10. Región del genoma de EpapGV en la que se encuentran los fragmentos BglIII K e I.

Esta última secuencia se determinó con un *primer* del fragmento genómico adyacente (BglIII I), generando así una secuencia que abarcaba ambos fragmentos y que se llamó "contig BglIII K-I" (Fig. 11.10). Las secuencias se compararon entre sí, empleando el algoritmo "BLAST-2 sequences" (BLAST-2S) y con el GenBank usando BLASTX (Tabla 11.3). A partir de estos datos, se determinó que el extremo R (o *Sp6*) del clon BglIII 68 equivalía al extremo d del fragmento genómico BglIII K, indicando que esta secuencia pertenecía al fragmento de 2,7 kpb. El extremo D (o *T7*) del clon BglIII 68 era idéntico al extremo R del fragmento BglIII F (Fig. 11.9), que se orientó más cercano al gen de granulina.

Tabla 11.3. Resultado del análisis de las secuencias de clones BglIII empleando los algoritmos BLASTX y BLAST-2. Las secuencias de los extremos de los insertos clonados en los clones BglIII 35 y 68 fueron comparadas entre sí y con el "contig" BglIII K-I.

| Clon y fragmento | Secuencia obtenida con <i>primers</i> M13 ^a | Resultado de BLAST | Orientación del extremo en el genoma ^b |
|----------------------|--|--|---|
| BglIII 35 (BglIII F) | D | se encontró el gen <i>egt</i> ^c | i |
| BglIII 35 (BglIII F) | R | similar a 68 D | d |
| BglIII 68 | D | similar a 35 R | i |
| BglIII 68 | R | Se solapa con el contig K-I | d |

^a *primers* universales: M13R: Reverso; M13D: Directo (*Forward*). Los *primers* *T7* y M13F se encuentran del mismo lado respecto del sitio BamHI, en tanto que *Sp6* y M13R se encuentran del lado opuesto.

^b i, próximo al gen de granulina; d más lejano al gen de granulina; Nd, no determinado.

^c *ecdisona glucosil transferasa*.

Análisis de otros clones BglIII espurios

Pese a las múltiples digestiones de clones y de las hibridaciones muchos clones no pudieron ser asignados a fragmentos genómicos. Un resumen de los datos obtenidos por digestión e hibridación se muestran en la tabla 11.4

Tabla 11.4. Clones BglII no ubicados en el genoma de EpapGV.

| Clon | Tamaño del plásmido (kpb) | Número de insertos | Fragmentos de digestión (kpb) | | Observaciones |
|------|---------------------------|--------------------|-------------------------------|-----------------------------|---|
| | | | BglII-BglII | EcoRI-HindIII | |
| 32 | 7,0 | 1 | 5,5 | 3,3 ; 2,5; 2,0 | Patrón de digestión desconocido |
| 43 | 9,6-8,7 | 3 | 4,0; 2,7; 2,0 | 6,3; 3,3^a | La banda de 2 kpb (BglII-BglII) no presentó hibridación con el genoma viral. |
| 18 | 11,6-12,2 | 2 | 6,2; 4,0 | 6,0; 3,3 ; 1,8; 0,55 | El perfil de digestión no se asemeja a bandas genómicas conocidas. Algunas bandas se parecen a otras de los clones 17, 14 y 65 para la digestión EcoRI + HindIII. |
| 24 | 13,9-15,8 | 3 | 7,0; 5,0; 1,9 | 6,3; 5,5; 3,3 ; 0,7 | Los fragmentos de digestión no son similares a bandas genómicas conocidas. |
| 68 | 16-15,3 | 2 | 12; 4,0 | 7,5; 4,5; 3,3 | Sólo el fragmento de 4,5 kpb presentó hibridación positiva para la sonda de EpapGV. |

^a Con negrita se indican aquellos fragmentos que corresponden al vector pZErO-2TM linealizado.

Empleo de estrategias de PCR para la determinación de la orientación de los fragmentos BglII H (clon BglII 20) y BglII I (clon BglII 17)

Con el objeto de definir la orientación de los extremos de los fragmentos BglII H (clon 20) y BglII I (clon 17) en el genoma viral, se efectuaron reacciones con pares de *primers* que amplificaban fragmentos de cada uno de los extremos de dichos clones. Los *primers* se denominaron en función de los extremos a partir de los cuales se generaron las secuencias, r: M13 Reverso y d: M13 directa (Fig. 11.11).

| |
|---|
| <p>Reacción H d Clon BglII 20 (fragmento BglII H), <i>primer</i>: BI H d -5: 5'-CGATAGATCCTAACGTCAGT-3' Clon BglII 20 (fragmento BglII H), <i>primer</i>: BI H d -3: 5'-CGACAGTGATATGTCGTGAT-3' Tamaño esperado: 231 pb</p> <p>Reacción H r Clon BglII 20 (fragmento BglII H), <i>primer</i>: BI H r -5: 5'-TCCGTGTCCAACGAAACCGT-3' Clon BglII 20 (fragmento BglII H), <i>primer</i>: BI H r -3: 5'-AACACCGAGGATCTGTTGAT-3' Tamaño esperado: 146 pb</p> <p>Reacción I d Clon BglII 17 (fragmento BglII I), <i>primer</i>: BI I d -5: 5'-TCTTCGAACTCAGCAGAG-3' Clon BglII 17 (fragmento BglII I), <i>primer</i>: BI I d -3: 5'-CCTCTGAACTTATAAGGGT-3' Tamaño esperado: 178 pb</p> <p>Reacción I r Clon BglII 17 (fragmento BglII I), <i>primer</i>: BI I r -5: 5'-TTGTGGATGGTACAGCCCCAG-3' Clon BglII 17 (fragmento BglII I), <i>primer</i>: BI I r -3: 5'-CAGCGGCCGGATCAGTATAT-3' Tamaño esperado: 206 pb</p> |
|---|

Figura 11.11. Secuencia de los *primers* empleados en la determinación de las polaridades de los fragmentos BglII H (clon BglII 20) y BglII I (clon BglII 17). Se muestran las secuencias de los *primers* y los tamaños esperados de los fragmentos de amplificación. Los *primers* han sido denominados originariamente de acuerdo al nombre del clon del cual deriva su secuencia, en este apartado su denominación ha sido cambiada para que reflejen la identidad del fragmento genómico. Por ejemplo, el *primer* BglII I D, se corresponde con BglII 17 D.

Los *primers*, ubicados tal como se muestra en figura 11.12, se hicieron reaccionar primero con DNA genómico de EpapGV a modo de control. Los resultados de la figura 11.13 indicaron que los pares de *primers* BgIII: I d, I r y H r produjeron bandas del tamaño esperado (178, 206 y 146 pb, respectivamente). Mientras que, a diferencia de los anteriores, el par de *primers* BgIII H d (BgIII H d-3 y d-5) presentó reacción negativa tanto con el DNA genómico como con el DNA del clon EcoRI A. Es posible que el *primer* presentase algún error en su diseño o que las condiciones de "annealing" teóricas no correspondieran con la temperatura de "annealing" real.

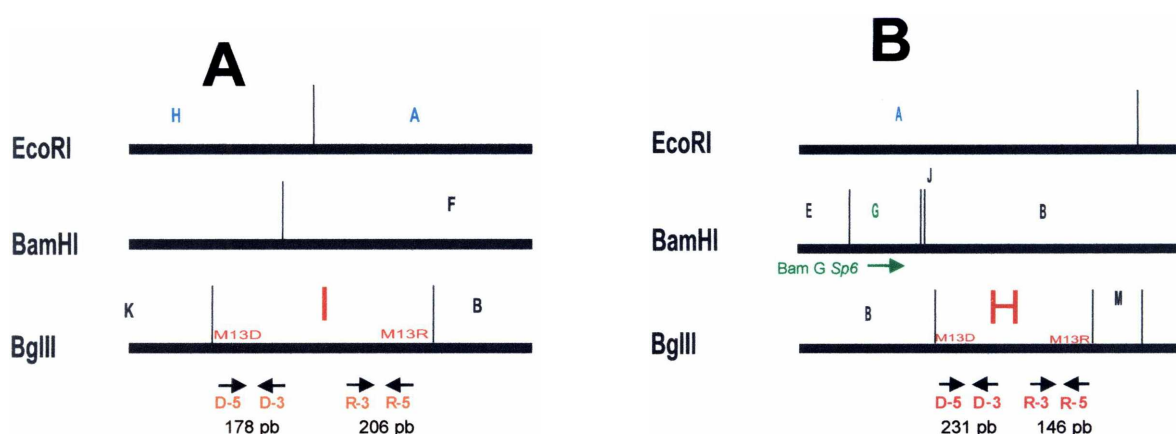


Figura 11.12. Determinación de la polaridad de clones BgIII. (A), se muestra como diagrama la orientación de los fragmentos BgIII I y (B), BgIII H. Se muestra la ubicación de los *primers* empleados y por debajo de ellos se indican los tamaños teóricos de los fragmentos de amplificación.

Si bien la polaridad del fragmento BgIII I se había determinado por digestión, estos experimentos intentaron demostrar que para algunos casos especiales en los cuales un fragmento no poseyera sitios internos de restricción y careciera de ORF en sus extremos, su polaridad podía ser determinada por estrategias de PCR. La estrategia experimental consistió en hacer reaccionar pares de *primers* de cada uno de los extremos del fragmento BgIII I con DNA de los fragmentos EcoRI H y A de manera separada (Fig. 11.12). De acuerdo con los resultados de las calles 10 y 11, los *primers* BgIII I d amplificaron correctamente sobre el DNA genómico y sobre el DNA del fragmento EcoRI H (clon 5 NN), demostrando que el extremo en donde se encuentran los *primers* BI I d se solapa con el fragmento EcoRI H. Por otra parte los *primers* BI I r amplificaron el fragmento predicho sobre el DNA del fragmento EcoRI A, indicando que ese extremo se encontraba dentro de EcoRI A. La débil banda que se observa en la calle 14 se debería a un defecto en la siembra de la muestra en el gel.

Para determinar la polaridad del fragmento BgIII H se intentó amplificar un fragmento con el *primer* del clon BamHI G contiguo (*primer* BamHI G Sp6; Fig. 11.12) y alguno de los *primers* que apuntaban hacia el lado externo del fragmento BgIII H (BI H d-3 ó BI H r-3). La ausencia de reacción entre los *primers* BgIII H r y BamHI G Sp6 (Fig. 11.13, calles 3 y 4), no logró confirmar que el extremo BgIII H r no era contiguo con el extremo Sp6 del clon BamHI G (Fig. 11.12) debido a que el par de *primers* BgIII H d no funcionó correctamente (Fig. 11.13, calles 1 y 2).

La posición del fragmento BgIII H surgió a consecuencia del análisis de las secuencias de los extremos de los fragmentos clonados BgIII H y BgIII M (Fig. 11.12). Tiempo después, la tarea se facilitó ya que la polaridad del fragmento BgIII M había sido determinada por solapamiento de uno de sus extremos con el contig EcoRI A-B. Al comparar las secuencias de los extremos en BLAST, se observó que el extremo BgIII H, M13 r y el extremo BgIII M (clon 29) Sp6, compartían un ORF que presentaba similitud con el ORF 47 del granulovirus de *Xestia c-nigrum*. Por ende debían ser colindantes. Un análisis más detallado se efectúa en el capítulo 8.

| Calle | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|-----------------------|------------------------------|---|-----|---|-----|---|----|---|------------------|----|----|------------------|----|----|----|----|
| Molde ^a | G | A | G | A | G | A | | G | A | H | G | A | | H | G | A |
| <i>Primers</i> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B G Sp6 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BI H d-3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BI H d-5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BI H r-3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BI H r-5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BI I d-3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BI I d-5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BI I r-3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BI I r-5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Objetivo ^b | Orientación del extremo BI H | | C + | | C + | | C+ | | Orientación BI I | | | Orientación BI I | | | | |

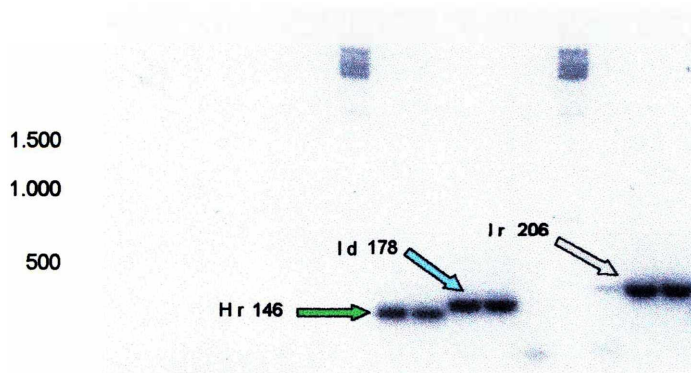


Figura 11.13. Reacción de PCR para definir la orientación de los fragmentos BgIII H (clon BgIII 20) y BgIII I (clon BgIII 17). Se señalan con flechas de color los pares de *primers* empleados y el tamaño de los mismos en pb. ^a Moldes: G, DNA genómico de EpapGV; H, fragmento EcoRI A (clon 8); I, fragmento EcoRI H (clon 5NN); ^b C+: control positivo; C-, control negativo. A la izquierda se aprecia el tamaño las bandas de bajo peso molecular, "1 kb ladder" (Promega).

Apéndices del capítulo 6

Los árboles filogenéticos que se muestran aquí (Fig. 11.14, 11.15, 11.16 y 11.17) han sido extraídos de la sección "Análisis filogenético de los GVs" del capítulo 6.

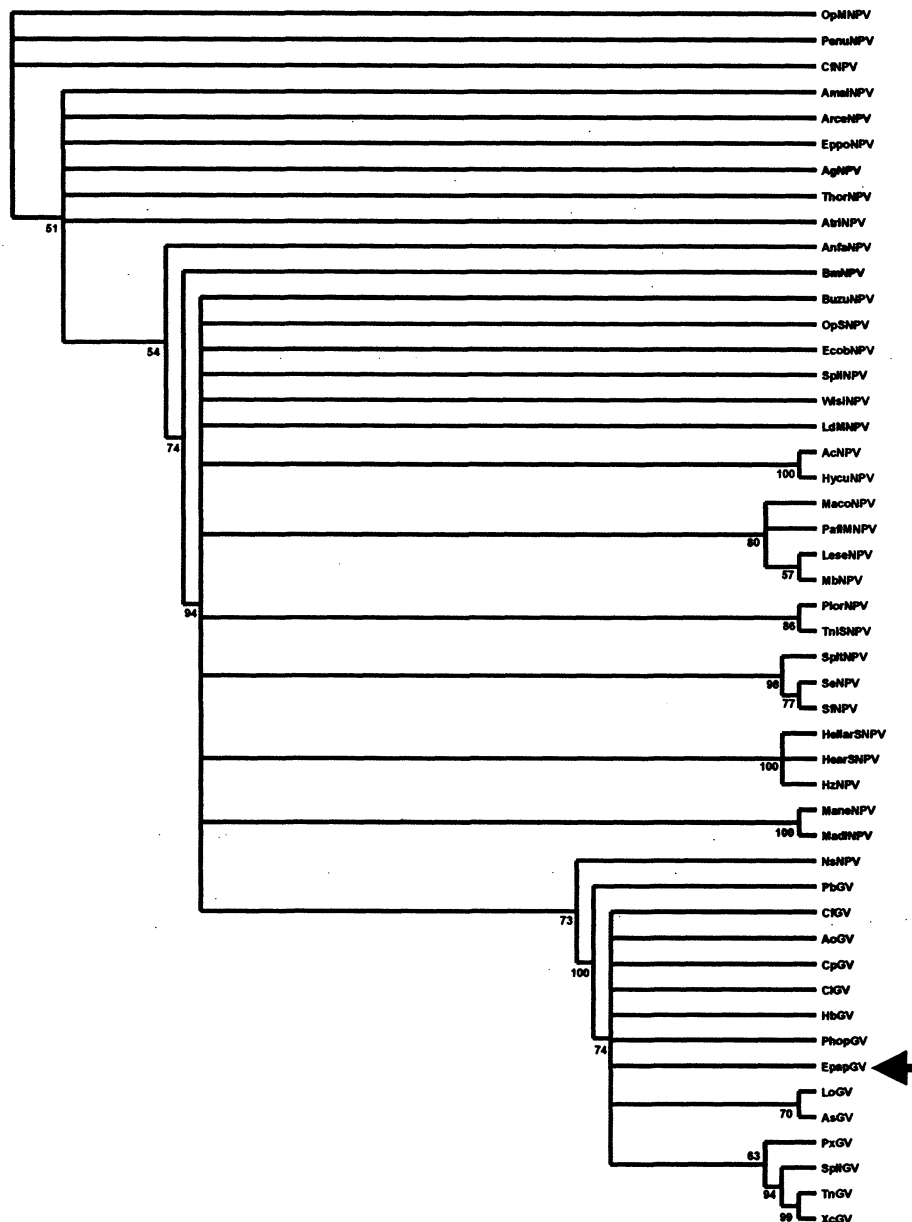


Figura 11.14. Análisis filogenético de secuencias aminoacídicas de poliedrinas y granulina, empleando el criterio de máxima parsimonia, efectuado con el programa PAUP. Un árbol filogenético basado en la secuencia aminoacídica de genes de granulina y poliedrina disponibles en GenBank fue construido con el programa PAUP empleando el criterio de Máxima Parsimonia. La figura muestra el consenso estricto en el cual los números debajo de los nodos indican los valores de *bootstrap* como porcentajes sobre 100 réplicas. Los valores por debajo de 50% han sido omitidos; el gen de poliedrina de NsSNPV fue usado como *outgroup*. Los números de acceso de las secuencias almacenadas en bases de datos, se encuentran en el capítulo Materiales y métodos. Con una flecha se señala la posición de EpapGV.

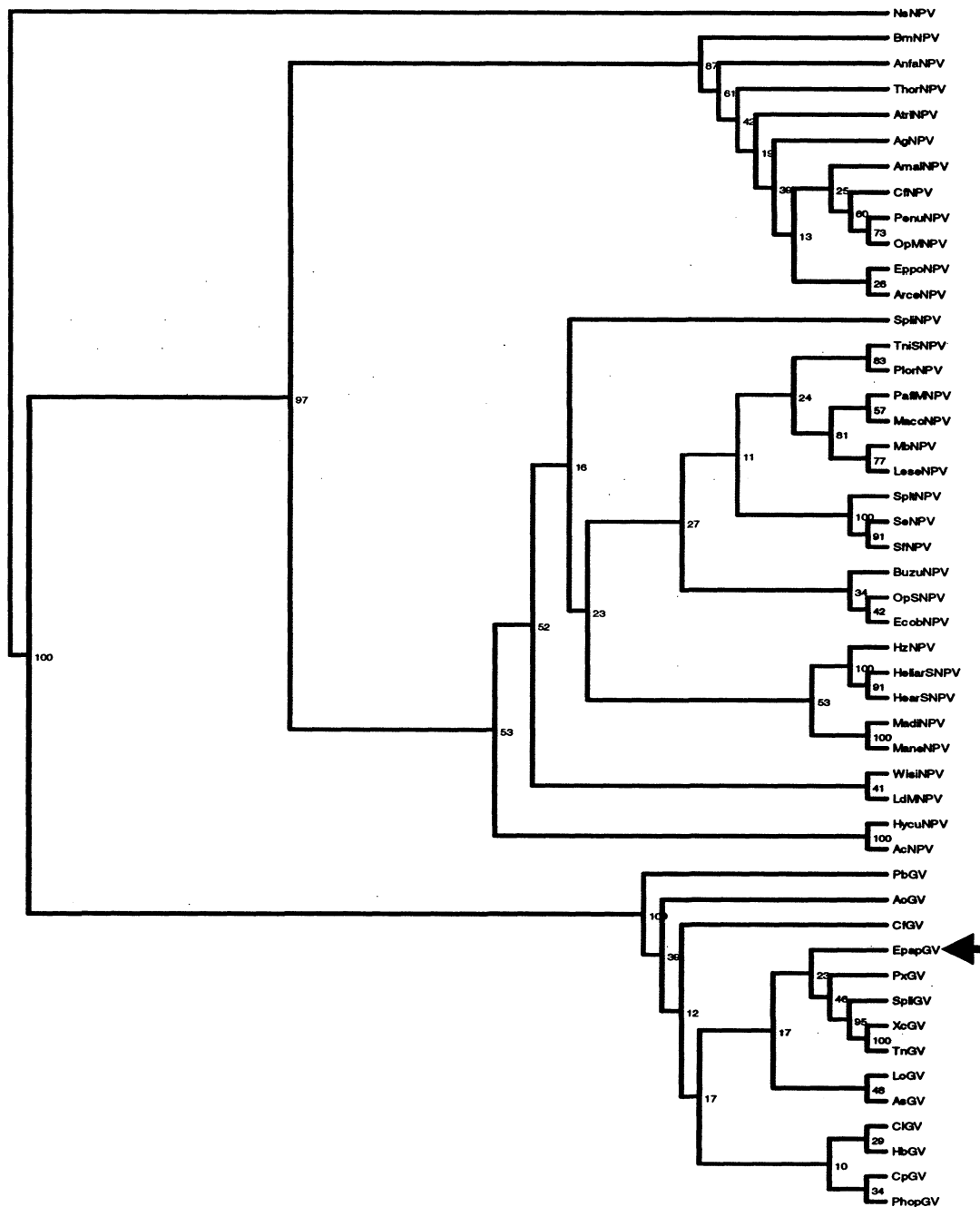


Figura 11.15 Análisis filogenético de secuencias aminoacídicas de poliedrinas y granulinas empleando el criterio de Máxima Parsimonia, por el programa PHYLIP. El árbol filogenético fue construido con las secuencias de granulinas y poliedrinas disponibles en GenBank. Se partió de un alineamiento efectuado en CLUSATLX y el árbol se construyó empleando las rutinas SEQBOOT, PROTPARS y CONSENSE del paquete de programas PHYLIP. Los números indican los valores de *bootstrap* para 100 réplicas. La secuencia aminoacídica del gen de poliedrina de NsNPV fue usada como *outgroup*. Los números de acceso de las secuencias almacenadas en bases de datos, se encuentran en el capítulo Materiales y métodos. Con una flecha se señala la posición de EpapGV.

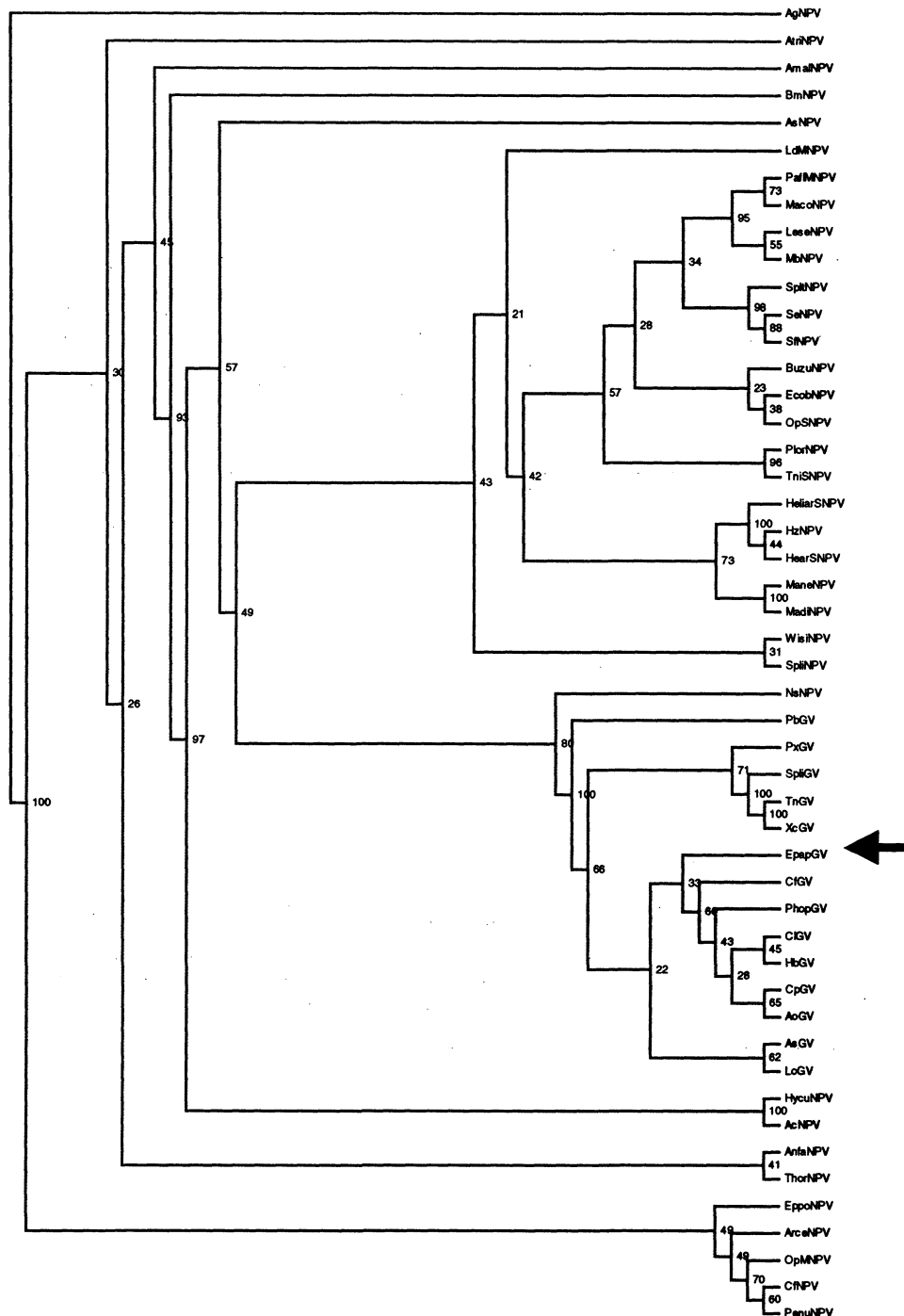


Figura 11.16. Análisis filogenético de secuencias aminoacídicas de poliedrinas y granulinas empleando un criterio de distancia (FITCH) de acuerdo con el programa PHYLIP. El árbol filogenético fue construido con las secuencias de granulinas y poliedrinas disponibles en GenBank. Se partió de un alineamiento efectuado en CLUSTALX y el árbol se construyó empleando las rutinas SEQBOOT, PROTDIST, FITCH y CONSENSE del paquete de programas PHYLIP. Los números indican los valores de *bootstrap* para 100 réplicas. La secuencia aminoacídica del gen de poliedrina de NsNPV fue usada como *outgroup*. Los números de acceso de las secuencias almacenadas en bases de datos, se encuentran en el capítulo Materiales y métodos. Con una flecha se señala la posición de EpapGV.

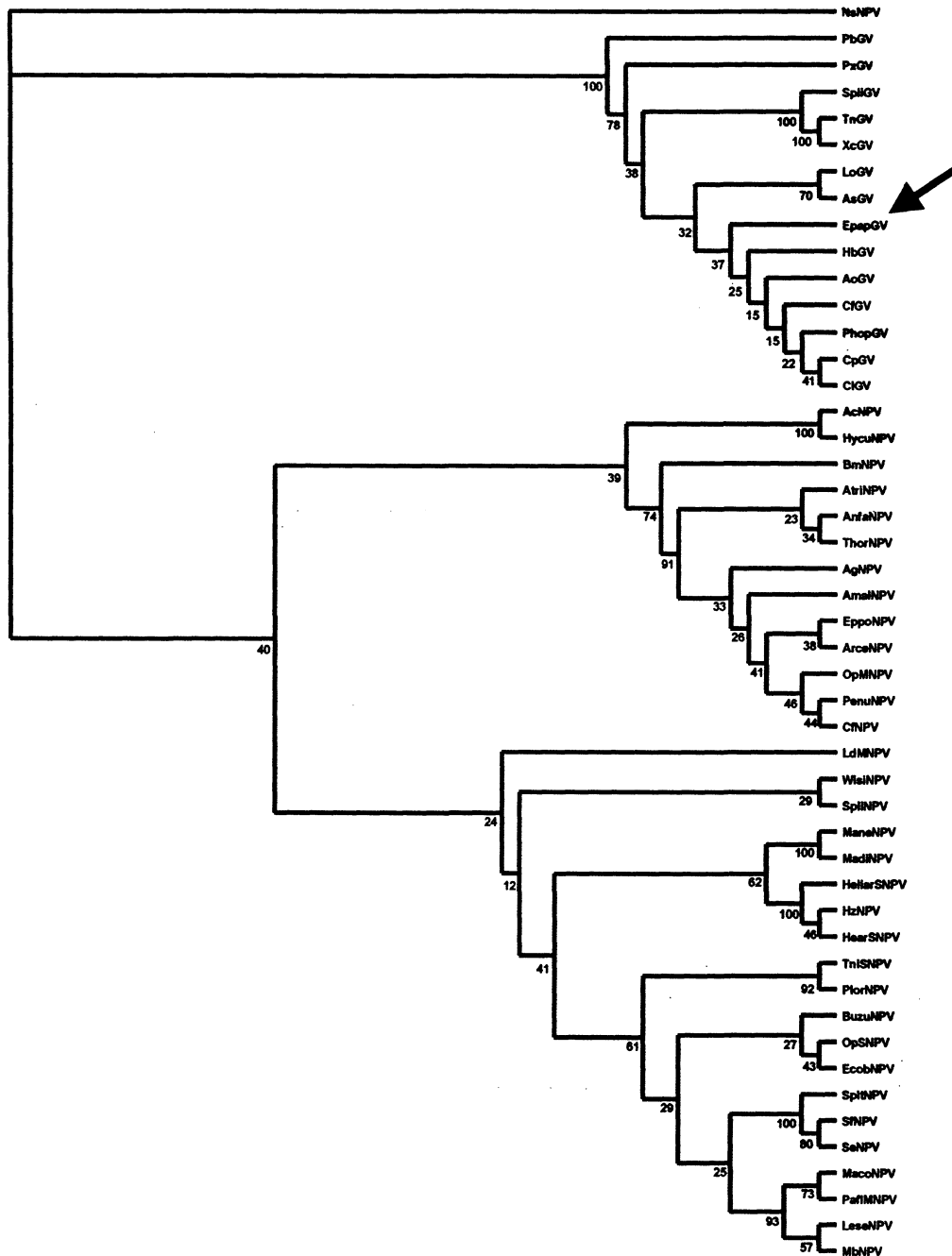


Figura 11.17. Análisis filogenético de secuencias aminoacídicas de poliedrinas y granulina empleando un método de distancia, *Neighbor Joining* (NJ) y el programa PHYLIP. El árbol filogenético fue construido con las secuencias de granulinas y poliedrinas disponibles en GenBank. Se partió de un alineamiento efectuado en CLUSTALX y el árbol se construyó empleando las rutinas SEQBOOT, PROTDIST, NEIGHBOUR y CONSENSE del paquete de programas PHYLIP. Los números indican los valores de *bootstrap* para 100 réplicas. La secuencia aminoacídica del gen de poliedrina de NsSNPV fue usada como *outgroup*. Los números de acceso de las secuencias almacenadas en bases de datos, se encuentran en el capítulo Materiales y métodos. Con una flecha se señala la posición de EpapGV.

Apéndices del capítulo 8

Análisis de las regiones flanqueantes a la inversión *efp-ie-1*

Se analizaron las regiones flanqueantes al *cassette efp-ie-1* de 22 kpb con el objeto de localizar secuencias que pudieran haber estado involucradas en la inversión de esta región mediante recombinación homóloga. Además, se analizó la presencia de marcos de lectura parciales en los extremos del *cassette*.

Análisis de secuencias repetidas en las regiones flanqueantes al *cassette efp-ie-1*

Los resultados del análisis de las secuencias *upstream* al ORF 162 hasta la región *downstream* al gen *efp* y las secuencias del contig BamHI E-G, mediante BLAST 2-seq indicaron la presencia de varias secuencias similares. Sin embargo, el tamaño de ellas es pequeño y sus valores de aparición al azar (*Expect value*) son sumamente elevados indicando que probablemente las similitudes observadas acontecen por azar (Fig. 11.18).

| | |
|--|--|
| <p>Score= 29.5 bits (15), E= 8064 Identities= 17/18 (94%) Strand = Plus/Plus Q: 1641 ttttttaaaaatatataa 1458 S: 134 ttttttagaaatatataa 151</p> | <p>Score= 21.8 bits (11), E=6136100I identities= 11/11 (100%) Strand = Plus/Minus Q: 1314 tcatatttaag 1324 En el ORF 273 S: 43 tcatatttaag 33 Al final de <i>ie-1</i></p> |
| <p>Score= 29.5 bits (15), E=29699 Identities= 17/18 (94%) Strand = Plus/Plus Q:1473 ttttttaaaaatatataa 1490 Entre 273 y 174 S:134 ttttttagaaatatataa 151 En ORF 639</p> | <p>Score= 21.8 bits (11), E=6136100 Identities= 13/14 (92%) Strand = Plus/Minus Q: 191 atttaataaacaat 204 S: 214 atttaataaaaaat 201</p> |
| <p>Score= 19.9 bits (10), E=7760783 Identities= 12/13 (92%) Strand = Plus/Plus Q: 1366 cataaaaaaatat 1378 S: 393 catcaaaaaaatat 405</p> | <p>Score= 23.8 bits (12), E=1618473 Identities= 14/15 (93%) Strand = Plus/Minus Q: 1393 aaaatttcatttgaa 1407 En el ORF 273 S: 782 aaaatttaatttgaa 768 En la reg. intergénica de <i>ie-1</i></p> |
| <p>Score= 19.9 bits (10), E=7760783 Identities= 14/16 (87%) Strand = Plus/Plus Q: 319 aaattaattgttaaat 334 S: 771 aaattaatttttaaat 786</p> | <p>Score= 19.9 bits (10), E=7760783 Identities= 14/16 (87%) Strand = Plus/Minus Q: 971 taaaatttgtttgaa 986 S: 783 taaaatttaatttgaa 768</p> |

Figura 11.18. Resultado de la comparación de las secuencias flanqueantes al *cassette* de 22 kpb mediante el programa BLAST 2-seq. Referencias: Q, primer secuencia comparada (región ORF 162-región *downstream* a *efp*); S, segunda secuencia comparada.

Análisis de la presencia de ORFs con homólogos en otros organismos en las regiones flanqueantes al cassette *efp-ie-1* de 22 kpb

El análisis de la región *upstream* al cassette de 22 kpb detectó que una porción del marco de lectura del ORF 164 (11 aminoácidos) presenta similitud con la región carboxilo terminal del ORF Cp32 (Fig. 11.19A). En CpGV este ORF se encuentra adyacente al gen *efp* mientras que en EpapGV este gen no ha sido encontrado en las secuencias analizadas. Análisis posteriores no encontraron similitudes significativas entre los ORFs EpapGV 164 y el ORF 32 de CpGV.

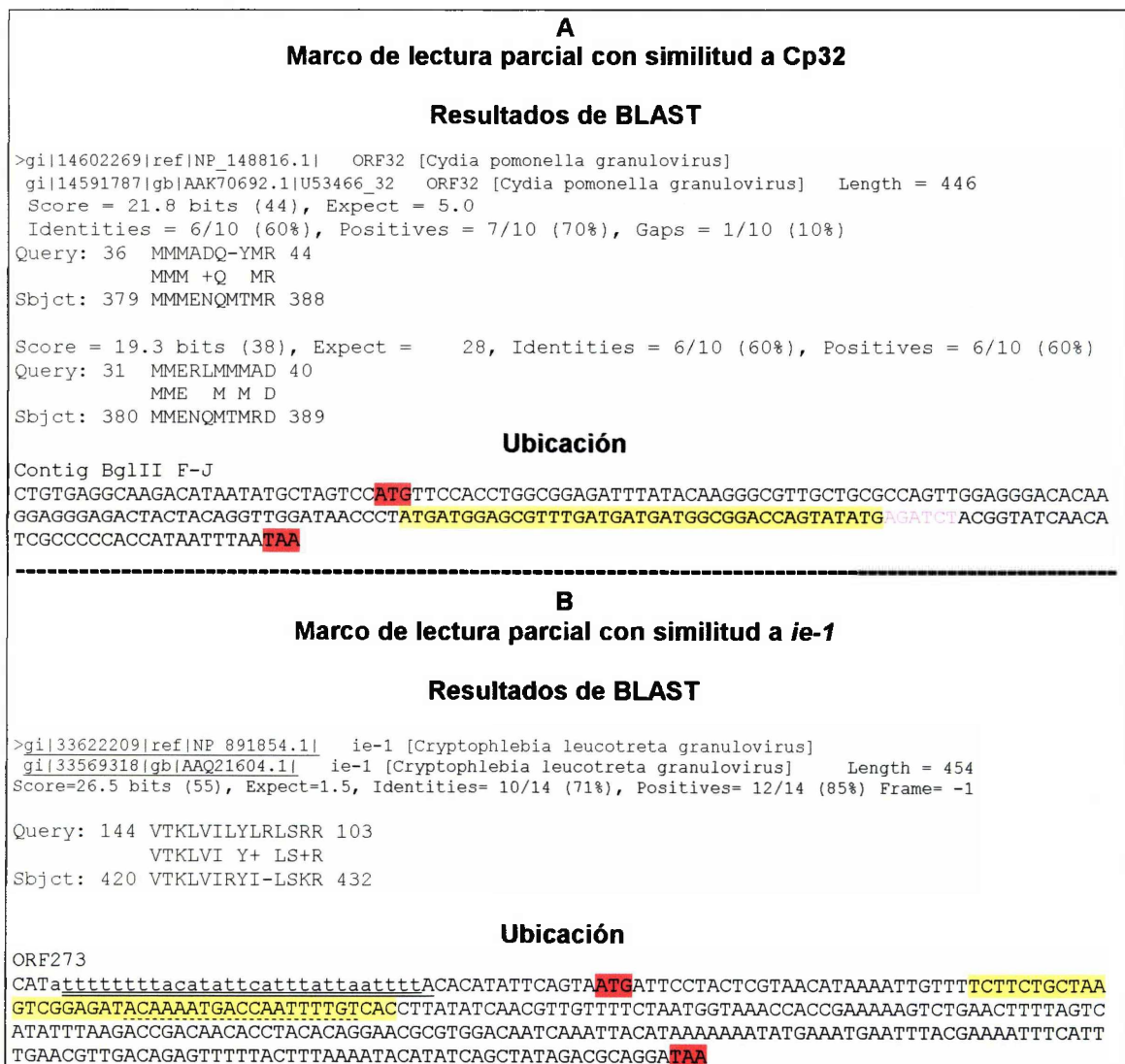


Figura 11.19. Resultado del análisis de BLAST de la región flanqueante al cassette *efp-ie-1*. (A), marco de lectura con similitud a Cp32. (B), marco de lectura con similitud a *Cryptophlebia leucotreta* GV (CIGV) *ie-1*. Los marcos de lectura con similitud a Cp32 y a CIGV *ie-1* se indican en color amarillo. En rojo se han señalado los codones de inicio y final de los ORF 164 y 273. En la figura B, previo al ORF 273, se señala con subrayado doble una secuencia *downstream* al gen *iap*-muy similar a otra *upstream* del mismo gen. Con subrayado de puntos se indica y una secuencia de tipo palíndrome imperfecto.

Además, se detectó la presencia de un pequeño marco de lectura que codifica para 14 aminoácidos ubicado entre el gen *iap-3* y *dUTPase*. Este marco tiene un 85% de similitud con la región carboxilo terminal del gen *ie-1* del granulovirus de *Cryptophlebia leucotreta* (CIGV) (Fig. 11.19B). Notoriamente esta región se encuentra interrumpiendo al ORF 273 y se superpone con la secuencia de un palíndromo imperfecto.

La presencia de estos marcos lectura con similitud a genes que en otros virus flanquean el *cassette* de 22 kpb podrían representar secuencias remanescentes de una recombinación homóloga o bien haber acontecido por azar.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

CB. CAPITULO 11
57398
NOIOMBOC

Fe de Erratas