UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

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



Generación de recombinantes del virus de la poliedrosis nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV)

Cristina B. M^cCarthy Tesis Doctoral La Plata, 2005 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.

Lic. Cristina B. M^cCarthy Tesista Dr. Víctor Romanowski Director

A mi Creador... Por darme la vida, Por ser mi esperanza, Por ser mi inspiración, ... por darme la fuerza para salir.

A mi Mamá y Papá... Por ser mi columna vertebral; Por ser Su mano derecha en mi vida; Por siempre estar, en todo momento y en cada situación, ... mis Viejitos.

> Sin Ustedes esto hubiera sido imposible. Los amo con todo mi ser.

Agradecimientos

Reconocimientos

- A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por permitirme realizar el Doctorado.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por las becas que permitieron la realización de esta tesis.
- Al Departamento de Ciencias Biológicas y al Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) por permitirme desarrollar el presente trabajo en este ámbito.

Agradecimientos

Esta parte la dejé para lo último. Era una de las que más me costaba (increíble, no?)... ¿cómo ordenar los agradecimientos? ¿a quiénes poner primero? ¿y si me olvido de alguien? ¿cómo puedo escribirlo de la mejor manera?... Así que, disculpen los olvidos y las imperfecciones... "errarum humanum est", como diría alguno de los romanos en Astérix y Obélix.

El primero, por supuesto, tiene que ser mi director, Víctor Romanowski. Gracias por haber aceptado a esta bióloga (zoóloga) del Museo, que, además, no tenía ni idea de lo que era la Biología Molecular (creo que no sabías en lo que te metías, no?). Gracias por haberme dejado crecer, experimentar, buscar, perderme y encontrar nuevamente el rumbo. Gracias porque esto me ayudó a entender un poco más acerca de este "mundo de la investigación". Gracias por soportar con tranquilidad mis planteos, generalmente enérgicos y demandantes. Qué becaria cabrona te tocó, eh!. Gracias por acompañarme a lo largo de este TORTUOSO camino que ha sido mi tesis, con todos sus resultados inesperados. Gracias por guiarme y re-direccionar mis razonamientos y conclusiones cuando éstos se embotaban. Creo que al final de esta huella transitada nos hemos llegado a conocer y entender más, no?.

Gracias a mi Catuchi. Gracias por ayudarme con TANTAS cosas. Por estar siempre ahí cuando necesitaba algo. Por escucharme. Por bancarme en tantas situaciones difíciles. Por poner el lomo para que pudiera sacar las cosas adelante. Por ser tan excelente y detallista en lo que hacés. Gracias por tus abrazos fuertes, tus besos y tus preocupaciones. Gracias por todo el cariño que me brindaste. Gracias por haber sido mi sol en el IBBM.

A mis compañeros de lab, desde los primeros hasta los últimos (hablo de tiempo transcurrido, eh?). Mi amigo, Ale Parola. Voy a ser ordenada: por enseñarme a trabajar con radiactivo... cosa fea si las hay; sin duda fuiste la persona indicada para hacerlo. Por siempre estar para escucharme y para darme tu punto de vista (generalmente diferente al mío). Por ayudarme a ver la salida en las situaciones difíciles. Por compartir karaokeadas, comidas, cervezas, vinos, cumpleaños... Ante todo, por tu amistad. Diego, por haber sido mi banca del Museo antes de que llegaran los nuevos. Ale Tortorici y Ale Manzán por sus aportes en mis primeros pasos en el IBBM. Alina Goldberg, por su excelente onda y disposición. Eloísa Arana, por ese abrazo tan necesario cuando falleció mi abuelita. Ramiro Méndez, aunque estuvo poco, fue un compañero de fierro. Gracias por tu ecuanimidad y generosidad. Por haber aportado la estrategia alternativa para la construcción de pIERUPOD. Y, a los más nuevos, gracias por cambiar la onda del lab y hacer más llevadera esta última etapa. A Marina Biedma, por organizar el lab (y creo que el IBBM también...), por facilitarle tanto las cosas a tus compañeros... espero no haberme aprovechado demasiado... A Agustín Ure, por ayudarme con todo lo informático y por tu buen humor (pobre, vos me tuviste que aguantar cuando recién llegaste al lab...). A Leticia Ferrelli, por darse tanto, a nivel personal y laboral. A Sole, por su estoicidad y buena onda. Ricky Salvador y Hugo Merlo, vinieron para reivindicarnos!!! Ahora somos más!!! ¿Qué otra cosa puedo decir de mis compañeros de Facultad? Siempre la misma onda excelente.

A Alicia Cap, por haberme ayudado a buscar salidas plausibles a esta maraña. Por enseñarme a trabajar con larvas, a diseñar los ensayos, por darme una mano y por el material brindado. Gracias por tu generosidad.

A Daniela Hozbor, por su apoyo moral, emocional y laboral a lo largo de diferentes aristas difíciles que presentó este trabajo. Gracias por SIEMPRE darme un huequito de tu tiempo para escucharme y darme ideas que me ayudaban a seguir albergando esperanza, a pesar de SIEMPRE estar atestada de trabajo.

Y al resto de los Ibbemeños:

Especiales gracias a Rubencito, por todas las veces que me cebó mate. Si supieras las fuerzas que me diste para seguir trabajando... A Carlitos, por sus charlas filosóficas, por siempre estar para arreglar las cosas que se rompían (y se rompen), diciéndome que no le tenía que decir "Gracias". Por ser un ejemplo de cómo hay que ponerle garra a las cosas.

A los "virus verdes" (voy por orden cronológico): a Selma, por compartir liberalmente del enorme acervo de su conocimiento. A Verónica El Mujtar y Laurita, por todo lo que ayudaron con las secuencias. A Gonzalo Legarreta, por aportar con su excelente humor a las reuniones extra-laborales. A Oscar Grau, María Laura García, Silvia Moya, Martin Sarachu, César Sommer. A Cecilia, Carina y Eduardo, gracias por su buen humor, por bancar las infinitas electroporadas, por prestarme competentes cuando no me quedaban, soluciones cuando no tenía; en fin, por siempre estar dispuestos a sacarme del paso. A Ricardo Gómez. A los Rizobieros en su totalidad: Tony Lagares, Aníbal Lodeiro, Florencia del Papa, "El Picho", "El Negro" Mariano, Federico, Julieta, Tirso, Pity, Elías, Ma. Julia, Julieta (de R4), Nacho, Mario Aguilar, Cecilia, Katy, Pablito, Daniel Grasso (el otro "Negro"), Mónica Collavino, Eitel, Nieves (y perdón por el resto de los nuevos, pero no me acuerdo los nombres de todos). A Omar Riva, por las charlas compartidas "para arreglar el mundo" y por estar para las festicholas.

Gracias a Ceci Milazzo, por bancarme tanto en Química Orgánica en esta etapa de escritura de la tesis. Gracias por tu comprensión y apoyo.

A mis viejitos... Gracias por entregarse de lleno a Dios y a su familia. Gracias por formar a cada uno de sus hijos con esta necesidad de saber más. Gracias por estimularnos a la superación. Gracias por todo su esfuerzo y sacrificio para que cada uno de nosotros tenga lo mejor, en todo aspecto. Gracias por rodearnos y llenarnos de su amor. Gracias por su generosidad inconmensurable. En lo personal, gracias por acompañarme en cada etapa de esta tesis. Gracias por alegrarse con mis logros, por preocuparse cuando las cosas no salían, por alentarme y ayudarme cuando ya no tenía más ganas. Gracias por ser los brazos que siempre estuvieron para rodearme, sostenerme y protegerme. Gracias por siempre facilitarme las cosas. Gracias, viejita, por hacerme las compras para que yo pudiera seguir escribiendo la tesis, y tanto más. Gracias a los dos por siempre estar al pie del cañón.

A Priscilla, que está en casa y ha compartido muy de cerca esta última etapa nada fácil. Gracias por haberme acompañado, comprendido y sostenido en TOOODO este tiempo. Gracias por ser el rayo de luz que necesitaba... y necesito. Por llegar y llenar tu espacio en mi vida. Por tener tanta confianza en mi. Por tus mimos, por tus palabras, por tu protección de hermana mayor. Gracias por venir conmigo a Laguna Toro!!!

A Irene y Andrés... hemos compartido y compartimos TANTAS cosas... entre otros, la militancia, la Facultad, la ideología "zurdita"... y, somos los tres más chicos!!! Gracias porque, además de mis hermanos, son mis amigos. Gracias porque sé que siempre están. Gracias por bancarse mis expresiones de amor, generalmente ruidosas y desinhibidas, en cualquier momento, en cualquier lugar y en cualquier situación (espero haber aprendido a ser un poco más recatada...). Su presencia y su amor son muy importantes para mí, más de lo que se imaginan. Ustedes son mi orgullo.

A Esteban... mi hermano TAN lleno de cariño. Gracias por tus abrazos, fuertes, fuertes. Por ser tan sensible y generoso. Gracias por sostenerme la mano y no soltarla. Gracias por ser tan intenso y completo en todo lo que hacés y en todo lo que das. Gracias por hacer el esfuerzo de llevarme a buscar esa cama espectacular!!!

A Antonio, gracias por tus consejos y aportes a lo largo de esta tesis. Gracias por el ejemplo que siempre has sido de perseverancia, dedicación y esfuerzo. Gracias por la confianza que siempre estimulaste en mí.

A David, mi hermano mayor. Gracias por siempre querer lo mejor para mí y cada uno de tus hermanos. Gracias por tu preocupación y por no bajar los brazos.

A mis HERMOSAS/OS sobrinas/os: Priscilla, Clarita, Vicky, Christopher, Ian, Benjamin (además, mi ahijado), Jazmín, Patrick, Malcolm, Felipe y Sofía; Lucía, Jennifer y Bernardo.

A mi familia ampliada: tío (gracias por estar tan cerca), tías, primas, cuñadas/o. A mi tiíta Elba, por sus almuerzos ESPECTACULARES y todos sus mimos.

A mis amigas del alma que me han apoyado, sostenido, que se han preocupado por mí, que han rezado por mí, que me han ayudado, que me han protegido, que me han ayudado a despejarme cuando ya no daba más; lo que pueda escribir y agradecer NUNCA va a ser suficiente (el orden de los factores no altera el producto, eh!): Nati, gracias por tus notitas, regalitos, llamadas... por dar todo lo que tenés... que es demasiado; Alcira, gracias por quedarte conmigo cuando no podía estar sola, por cuidarme, por tus masajes espectaculares; Romi, por tu cariño y cuidado. A Andrea y Sara (mis amilas), gracias por todo lo vivido y por todo lo que hicieron.

A Viole e Inés, mis amistades desde la militancia. Gracias por los momentos compartidos en y fuera de ese ámbito (lo cual es mucho). Gracias por su apoyo y cariño.

A Daniela Russo, Mariana Muzzopappa, Mariana Barboza y Gabriela Naum, mis amigas desde lo laboral. Por tantas charlas y comidas y momentos de calidad compartidos. Gracias por su amistad, por sus consejos, por sus aportes y por su cariño.

A Naluchi (por ese pedazo de corazón que tenés...) y Andriana, por los momentos de reflexión que hemos podido compartir en estos últimos meses.

A Betsi, gracias por tu dulzura y por siempre estar pendiente.

A Raúl y Patricia, gracias por haberme acompañado en esta última etapa, a pesar de todo lo propio.

Todos, de alguna u otra manera y desde diferentes lugares, han formado parte de este trabajo. Por eso, gracias.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	10
PRESENTACIÓN DE LA INFORMACIÓN	14
GLOSARIO	16
Abreviaturas y siglas Nombres y abreviaturas de los baculovirus nombrados en esta tesis Lista de genes y sus abreviaturas	16 18 18
OBJETIVOS	20
Sección I. Introducción	21
SECCIÓN II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
CAPÍTULO 1. Elección de la secuencia de corte para la generación del recombinante AgMNPV-2D con sitios únicos de restricción.	69
CAPÍTULO 2. Construcción del vector de transferencia de primera generación (pAg-I <i>Ppo</i> I): Introducción secuencial de sitios I- <i>Ppo</i> I en pAgPHZ3.	75
CAPÍTULO 3. Optimización de la eficiencia de corte de I-PpoI.	82
CAPÍTULO 4. Aislamiento del virus recombinante AgMNPV-2D con sitios únicos de restricción (AgMNPV-I <i>PpoI</i>).	96
CAPÍTULO 5. Desarrollo de un método simple y rápido para la detección de baculovirus recombinantes.	116
CAPÍTULO 6. Aislamiento del virus recombinante AgMNPV-2D con sitios únicos de restricción: Segunda etapa de la purificación y caracterización de los AgMNPV-I <i>Ppo</i> I aislados.	125
CAPÍTULO 7. Construcción del vector de transferencia de segunda generación (pIERUPOD).	133
CAPÍTULO 8. Generación de virus recombinantes a partir de pIERUPOD.	149
CAPÍTULO 9. Construcción de una versión alternativa del plásmido de transferencia de segunda generación (pIERUPOD-P _{p10}).	179
CAPÍTULO 10. Generación de virus recombinantes a partir de la una versión alternativa del plásmido original (pIERUPOD- P_{p10}).	183

	CAPÍTULO 11. Construcción de otras versiones alternativas del plásmido original (pEUPOD y pRUPOD).	202		
	CAPÍTULO 12. Generación de virus recombinantes a partir de otras versiones alternativas del plásmido original (pEUPOD y pRUPOD).	208		
	CAPÍTULO 13. Análisis comparativo de los recombinantes obtenidos con las diferentes versiones de plásmidos de transferencia (pIERUPOD-21, pIERUPOD-47, pIERUPOD-p10, pEUPOD y pRUPOD).	218		
	CAPÍTULO 14. Estrategias alternativas para mejorar la infectividad de AgMNPV- 2D.	258		
SECCIÓN III. RESUMEN DE RESULTADOS, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS				
SECCIÓN IV. MATERIALES Y MÉTODOS				
SECCIÓN V. BIBLIOGRAFÍA				
SECCIÓN VI. APÉNDICE				

RESUMEN

Los baculovirus sólo infectan artrópodos, en su mayoría, insectos del Orden *Lepidoptera*. Se caracterizan por producir dos fenotipos diferentes a lo largo del ciclo de infección: viriones brotantes y viriones incluidos en una matriz proteica (o cuerpos de oclusión). Estos últimos, que son de formas poliédricas y se acumulan en el núcleo de las células, dando lugar al nombre que identifica al género *Nucleopolyhedrovirus* de la familia *Baculoviridae*.

Los baculovirus son insecticidas altamente específicos que no presentan toxicidad para organismos no blanco (Granados y Federici, 1986). Sin embargo, su aplicación como pesticidas microbianos no ha alcanzado su potencial en el control de plagas, con la excepción del virus de la poliedrosis nuclear del defoliador de la soja, *Anticarsia gemmatalis* MNPV (AgMNPV), que es aplicado sobre más de un millón de hectáreas en Brasil. Algunos de los problemas que han limitado el uso más extendido de los baculovirus incluyen su rango de hospedadores estrecho, tiempo letal medio extendido, dificultades técnicas y económicas en la producción comercial en cultivo celular, régimen de aplicación basado en monitoreos frecuentes, eficiencia a campo variable debido a condiciones climáticas, y actitud de los productores frente al control de plagas, que basado tradicionalmente en la aplicación de insecticidas químicos de rápida acción (Moscardi, 1999).

Una de las maneras de realizar investigación básica y aplicada de estos virus involucra la modificación de sus genomas. El método convencional para modificar los genomas de los baculovirus utiliza la recombinación homóloga. Para ello, se construye un plásmido de transferencia que lleva la modificación deseada flanqueada por las secuencias virales del sitio blanco. La cotransfección de las células de insecto con el plásmido de transferencia y el DNA viral, genera virus recombinantes que han adquirido la modificación a través de la recombinación homóloga. Sin embargo, la proporción de recombinantes en la progenie viral es baja (1 a 0.1%) (Smith *et al.*, 1983; Martens *et al.*, 1995). Más aún, la mayoría de los recombinantes son simples recombinantes que incluyen la totalidad del plásmido de transferencia, integrado al genoma viral (O'Reilly *et al.*, 1992).

Una manera excelente de vencer estos problemas es usar DNA viral linealizado en el sitio blanco antes de la transfección (Kitts *et al.*, 1990). Este tratamiento disminuye

drásticamente la proporción de virus parental (sólo el DNA circular es infectivo) y de simples recombinantes en la progenie viral obtenida luego de la cotransfección. Uno de los métodos más utilizados para linealizar los DNAs de los baculovirus, consiste en introducir sitios de restricción únicos en la región de interés del genoma viral. El DNA viral recombinante puede entonces ser linealizado por digestión con la enzima correspondiente. La presencia de múltiples sitios "únicos" de restricción incrementa la eficiencia de producción de recombinantes (Kitts y Possee, 1993; Martens *et al.*, 1995; Yang y Miller, 1998), probablemente porque es menos probable encontrar moléculas no digeridas, al menos una vez, cuando existen más de un sitio de corte.

En este plan de investigación nos propusimos crear un sistema de recombinación homóloga eficiente con el fin de evaluar la posibilidad de incrementar la eficiencia de AgMNPV mediante cambios dirigidos en el genoma sin incluir genes de toxinas.

Como paso previo, para aumentar la eficiencia en la recuperación de recombinantes, se incorporaron sitios de restricción únicos en el genoma de AgMNPV, mediante el uso de un esquema de mutagénesis dirigida, utilizando un vector de transferencia de primera generación (pAg-I*PpoI*). Así se logró optimizar la frecuencia de generación de virus recombinantes.

Para el diseño del vector de transferencia de segunda generación (pIERUPOD), entre otros, se tuvo en cuenta la perspectiva ecológica en cuanto al impacto ambiental de un organismo modificado genéticamente. En este sentido, se eligieron genes heterólogos que fueran lo más inofensivos posibles para el medio, no sólo en cuanto a su acción sobre posibles organismos no blanco, sino también en caso de una eventual transferencia lateral de material genético. Las secuencias foráneas elegidas fueron las del gen *enhancin 1* de LdMNPV (*E1*), las del gen *DsRed1* de *Discosoma*, las del sitio interno de entrada del ribosoma (*internal ribosome entry site* o IRES) del virus de la encéfalo miocarditis (ECMV) y las señales de poliadenilación de SV40. El IRES de ECMV permite la traducción de dos ORFs consecutivos a partir del mismo RNA mensajero (Rees *et al.*, 1996; Jang *et al.*, 1990) y las señales de poliadenilación de SV40.

Los *enhancins* son proteínas que fueron encontradas inicialmente en los cuerpos de oclusión de los GV, y se observó que tienen la habilidad de intensificar la infectividad de algunos NPVs. También se los ha denominado factores sinérgicos o de intensificación viral (*viral enhancing factors* o *vef*). Se han propuesto dos funciones para los *enhancins*, incremento de los eventos de fusión entre el virus y las células

hospedadoras y rotura o desorganización de la membrana peritrófica. *Lymantria dispar* MNPV es un baculovirus patogénico para *L. dispar*. Debido a que el genoma de LdMNPV es significativamente más grande que el de la mayoría de los baculovirus, contiene varios marcos de lectura abiertos propios (ORFs) como también algunos que presentan homología con los ORFs de GVs. El primer homólogo de GV que se encontró en LdMNPV fue el gen *enhancin 1 (E1)*, y éste fue también el primer *enhancin* que se encontró en NPVs (Bischoff y Slavicek, 1997). El *enhancin* de LdMNPV afecta la potencia viral ya que ya que la proteína por sí sola es capaz de incrementar aproximadamente 10 veces la potencia viral (relativo a virus que no presentan genes *enhancin*) (Popham *et al.*, 2001). Por todas las características mencionadas anteriormente (su capacidad de incrementar la potencia viral y el hecho de que se trata de un *enhancin* identificado en un NPV) decidimos utilizar el *E1* de LdMNPV en nuestra construcción.

Por otra parte, la proteína verde fluorescente (GFP) se ha convertido en una herramienta invalorable en estudios biológicos básicos y aplicados (Sullivan y Kay, 1999). Las mutagénesis en el gen salvaje generaron diferentes variantes mejoradas tales como la GFP intensificada (EGFP) (Heim *et al.*, 1995; Cormack *et al.*, 1996) y variantes de colores tales como las proteínas fluorescentes cian (CFP) y amarilla (YFP) (Heim y Tsien, 1996; Miyawaki *et al.*, 1997). Recientemente se describió una familia de proteínas fluorescentes relacionadas con la GFP. La más útil de estas proteínas nuevas es la DsRed, derivada del coral *Discosoma*. DsRed tiene una fluorescencia naranja-roja con un máximo de emisión a 583 nm. Decidimos utilizar DsRed1 en lugar de GFP, porque consideramos que la posibilidad de excitarlo con luz de longitud de onda de 558 nm representa una ventaja insuperable a la hora de trabajar con sistemas biológicos, en contraposición con el uso de luz UV que resulta perjudicial para los mismos, e imprescindible cuando se trabaja con GFP.

Para la construcción del vector de transferencia de segunda generación (pIERUPOD), se eligió la estrategia *Splice Overlap Extension PCR* (SOE PCR). Ésta consistió en la amplificación independiente de pares de fragmentos con cebadores diseñados de manera tal de agregarle secuencias del otro fragmento. En una posterior amplificación se utilizaba como molde una mezcla de ambos fragmentos para levantar a ambos fragmentos en uno solo; en esta amplificación, las secuencias del otro fragmento que poseía cada producto de amplificación, servían para que las hebras de ssDNA se unieran en los extremos internos, quedando así el molde final para la amplificación de ambos fragmentos en uno.

Una vez finalizada la construcción de este vector, se procedió a la generación de los recombinantes correspondientes. Sin embargo, como éstos no tenían la estructura genómica buscada, se construyeron versiones alternativas del plásmido de transferencia de segunda generación (pIERUPOD-p10, pEUPOD y pRUPOD), buscando solucionar esta problemática. En el primer caso (pIERUPOD-p10), se cambió uno de los promotores de *poliedrina* por el de *p10*, otro promotor muy tardío. En los otros dos casos (pEUPOD y pRUPOD), se eliminaron algunas secuencias del vector. En el caso de pEUPOD, se quitaron las secuencias IRES y del gen *DsRed1*. En el caso de pRUPOD, se eliminaron las secuencias IRES y del gen *E1*. A pesar de estos intentos, la generación de virus recombinantes a partir de cada versión alternativa resultó aberrante.

Sin embargo, se divisaban patrones conservados en las diferentes especies recombinantes obtenidas a lo largo de la segunda parte de este trabajo de tesis. Diversos ensayos realizados sobre todas estas especies recombinantes, que incluyeron hibridaciones con un juego de sondas, confirmaron estos patrones y permitieron clasificarlos en dos grupos, denominados *I* y *II*, en base a las similitudes observadas. En el *grupo I* se dedujo que hubo inserciones y/o duplicaciones, mientras que en el *grupo II* se dedujo la presencia de deleciones.

Estos resultados, al igual que los datos aportados por Wu *et al.* (1999), sugieren que el mecanismo de replicación del DNA de los baculovirus podría ser promiscuo en cuanto a la elección de molde y/o a la elección del *partner* de recombinación. Wu *et al.* (1999) explican la existencia de baculovirus recombinantes inestables que no pueden ser aislados por placa (Lu *et al.*, 1996), debido a la replicación e integración del DNA cotransfectado al genoma viral. Estos resultados también son relevantes en cuanto a la seguridad en el uso de baculovirus modificados genéticamente como biopesticidas o como vectores en terapia génica.

Finalmente, los resultados obtenidos hasta el momento no descartan la posibilidad de lograr AgMNPVs recombinantes en futuros experimentos. Para ello, deberán diseñarse los vectores de transferencia en base al conocimiento de la secuencia nucleotídica del genoma viral completo y eliminando todas las secuencias cortas con cierta homología para evitar que ocurran reorganizaciones del DNA por recombinación intramolecular.

PRESENTACIÓN DE LA INFORMACIÓN

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

La primer sección corresponde a una "Introducción" en la que se brinda una actualización sobre la Biología Molecular de los baculovirus. En una segunda parte de la misma, se describe la importancia del cultivo de soja en Argentina, sus principales plagas, incluida la "oruga de las leguminosas", *Anticarsia gemmatalis*. Se abordan también nociones de Manejo Integrado de Plagas y Control Biológico.

La segunda sección corresponde a "Resultados y Discusión" y se encuentra dividida en Capítulos. El primer capítulo describe la elección de la secuencia de restricción única para la generación de un AgMNPV con sitios únicos de restricción. El segundo capítulo se refiere a la generación del vector de transferencia de primera generación (pAg-IPpoI) correspondiente. El tercer capítulo describe la optimización de la eficiencia de corte de la enzima de restricción elegida (I-Ppol). El cuarto capítulo se encuentra dividido en tres partes. La primera describe la generación de un simple recombinante con sitios únicos de restricción, la segunda analiza la estabilidad del mismo y la tercera su eficiencia en la producción de recombinantes. El quinto capítulo describe una metodología desarrollada para la identificación de baculovirus a partir de cultivo celular, en particular de placas de lisis. El sexto capítulo detalla la generación del doble recombinante AgMNPV con sitios únicos de restricción. El capítulo siete desarrolla la construcción del vector de transferencia de segunda generación, pIERUPOD. El octavo capítulo describe la generación de recombinantes a partir del vector de transferencia de segunda generación. El noveno capítulo detalla la construcción de una versión alternativa del vector de transferencia de segunda generación, pIERUPOD-P_{p10}. El décimo capítulo describe la generación de recombinantes a partir de pIERUPOD-P_{p10}. El capítulo 11 detalla la generación de otras dos versiones alternativas del plásmido de transferencia de segunda generación, pRUPOD y pEUPOD. La generación de recombinantes a partir de estas versiones alternativas del plásmido se desarrolla en el capítulo 12. El capítulo 13 hace un análisis de todas las especies aberrantes obtenidas a lo largo de este trabajo de tesis. El capítulo 14 describe estrategias alternativas para aumentar la infectividad de AgMNPV-2D.

pág. 15

En la tercer sección se realiza un resumen de los resultados y de las conclusiones generales y se discuten las perspectivas del presente trabajo.

La cuarta sección describe los materiales empleados y las metodologías utilizadas en el desarrollo de este trabajo de tesis.

La quinta sección contiene la lista de las referencias bibliográficas de los trabajos citados.

En la sexta sección se incluye un apéndice con una lista de las cotransfecciones mencionadas en este trabajo de tesis, con su nomenclatura correspondiente, para facilitar su interpretación en el cuerpo del texto.

GLOSARIO

Abreviaturas y siglas

% p/v	porcentaje peso en volumen
% v/v	porcentaje volumen en volumen
μCi	microcurie
μg	microgramo (s)
ul	microlitro (s)
иM	micromolar
AcNa	acetato de sodio
ΔΤΡ	adenosina 5'-trifosfato
background	ruido de fondo, señal de fondo: conocimiento: bagaie
Bisacrilamida	N N'-metilenbisacrilamida
BSA	albúmina sérica bovina
Buffer	solución reguladora del pH
BV	Budded Virus o viriones brotantes
Cánside	cubierta proteica que protege los ácidos nucleicos de un virus
C·IAA	cloroformo: isoamílico
cf	cotransfección
	2'-desoxiadenosina 5'-trifostato
	Defective Interfering virus or particle o partícula defectiva interferente
Digestiones "estrella"	fenómeno que ocurre cuando una enzima de restricción digiere sitios
Digestiones estrena	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%
	ácido 2' desovirribonucleico
DNA	DNA dependiente del fago $T7$ (que infecta a E coli)
DNA pol	DNA dependiente del lago 17 (que línecia a L. com)
	desovirribonucleasa
	2' dosovirribonucleásidos 5 trifosfoto
	densidad ántica
Doblata	handas do DNA con doble intensidad que una simple
	DNA de deble cadena
	órido otilon diamino totracótico
Epitonos	porción de una proteína que reacciona con un anticuerno.
Enizootias	infecciones que acontecen sobre poblaciones de insectos
E-C-IAA	fenal cloraforma isoamílica
FD	Few Polybedra o nocos noliedros
a	aramo/s
GV A	Granulovirus
h	borals
hr	homologous regions o regiones homólogos
IRES	Internal Ribosome Entry Site o sitio interno de entrada del ribosoma
kh	kilo pares de bases
kDa	kilo Daltons
I	litro
I B	Luria Beltrani (medio de cultivo)
I TR	Long Terminal Repeat o repetición terminal larga
M	marcador de peso molecular
M	molar
MF	microscopía electrónica
Meltina	"fusión" desnaturalización de ácidos nucleicos
ma	miligramo/s
min	minuto/s
MIP	Maneio Integrado de Plagas
ml	mililitro/s
mM	milimolar
MNDV	MultiNucleoPolyhedroVirus

MNPV	multiple nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus
MOI	<u>Multiplicity Of Infection o multiplicidad de infección</u>
MP	Many Polyhedra o muchos poliedros
MP	Membrana Peritrófica
mRNA	RNA mensaiero
	número multiplicado por la conferención de la grevedad
NXG	numero multiplicado por la aceleración de la gravedad
Nal	ioduro de sodio
NC	<u>n</u> ucleo <u>c</u> ápside
ng	nanogramo/s
nm	nanómetro/s
NPV	Nucleopolyhedrovirus o nucleopoliedrovirus
nt	nucleótido/s
Nucleacéncide	Nacionaldo
	ver capsice
OB	occlusion body, cuerpo de inclusion u oclusion
ODV	Occlusion Derived Virions o virus derivados de cuerpos de inclusión
ON	<i>overnight</i> o toda la noche
ORF	Open Reading Frame o marco de lectura abierto
ori	origin of viral DNA replication u origen de replicación de DNA viral
n.i.	post-infección
nh	pares de bases
	pares de bases
PCR	polymerase chain reaction, reaccion en cadena de la polimerasa
PEG	polientilenglicol
PFM	<u>P</u> olyhedron <u>F</u> ormation <u>M</u> utants o mutantes en la formación de
	poliedros
PGE	Posición General de Equilibrio
PIB	Polyhedral Inclusion Body o cuerpo de inclusión poliédrico
PM	neso molecular
nmolos	nico moles
philoles	polioprilomido
	polimerizacion
polylinker	región de un plásmido que contiene un alto número de sitos de
P _{p10}	Promotor del gen <i>p10</i>
Ppolh	Promotor del gen de poliedrina
Primers o cebadores	molécula de DNA que actúa como iniciador o cebador de la
p7FrO-2 [™]	plásmido comercial (Invitrogen CA EE UU)
r n m	revoluciones por minuto
DN	Poio Noutro
seg	segundo/s
Sample buffer	$bu\pi er$ empleado para sembrar muestras en geles de agarosa o
SDS	sodium dodecil sulfate (dodecil sulfato de sodio)
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
Sf9	células de cultivo de Spodoptera frugiperda
Sf21	células de cultivo de S. frugiperda
SNPV	Single nucleocapsid polyhedrovirus
SOF PCR	Splice Overlap Extension PCR
	DNA de simple cadena
SSDNA T7	DIVA de Simple Cadena
77	secuencia de DINA que deriva del promotor de la RINA polimerasa
	temperatura ampiente
TAE	Tris-acetato-EDTA
<i>Taq</i> pol	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
ТСА	ácido tricloroacético
TE	buffer Tris-EDTA
TEMED	N N N' N'-tetrametiletilen-diamina
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
	Umbral de Daño Económico
UF-LAG-286	celulas de cultivo de A. gemmatalis
UV	ultravioleta
V	Volts
Virión	nucleocápside envuelta de una membrana lipoproteica
Virión ocluido	virión rodeado por una masa proteica
VS	Versus

Nombres y abreviaturas de los baculovirus nombrados en esta tesis

NPVs

Anticarsia gemmatalis MNPV Autographa californica MNPV Bombyx mori MPV Choristoneura fumiferana MNPV Culex nigripalpus NPV Epiphyas postvittana NPV Galleria melonella MNPV Helicoverpa armigera SNPV Helicoverpa zea SNPV Heliothis armigera SNPV Lymantria dispar MNPV Mamestra brassicae MNPV Mamestra configurata NPV Orgyia pseudotsugata MNPV Orgyia pseudotsugata SNPV Rachiplusia ou MNPV Spodoptera exigua MNPV Spodoptera frugiperda MNPV Spodoptera littoralis NPV Thysanoplusia orichalcea MNPV Trichoplusia ni MNPV Trichoplusia ni SNPV

GVs

Choristoneura fumiferana GV Cydia pomonella GV Epinotia aporema GV Helicoverpa armigera GV Phthorimaea operculella GV Plutella xylostella GV Pseudaletia unipuncta GV Trichoplusia ni GV Xestia c-nigrum GV AgMNPV AcMNPV **BmNPV CfMNPV** CuniNPV **EppoNPV** GmMNPV HearSNPV o HaSNPV **HzSNPV HeliarSNPV** LdMNPV MbMNPV MacoNPV **OpMNPV OpSNPV RouNPV** SeMNPV SfMNPV SpliNPV ThorMNPV **TnMNPV TnSNPV**

CfGV CpGV EpapGV HaGV PhopGV PxGV PuGV TnGV XcGV

Lista de genes y sus abreviaturas

Nombre	Abreviatura
Exonucleasa alcalina	alk-exo
"Per os infection factor"	pif (Ac22)
Antígeno de proliferación nuclear (<i>proliferating cell nuclear antigen</i>)	pcna (etl)
Catepsina	cath o v-cath
Conotoxina	ctl
Desmoplaquina	desmoplakin
Desoxi UTPasa	dUTPase
DNA ligasa	dna-lig
DNA polimerasa	dna-pol

náa	10
pay.	19

Ecdisona glucosil transferasa	egt	
Enhancin 1	E1	
Factor de crecimiento de fibroblastos	fgf	
Factor de expresión muy tardío (Very late expression factor)	vlf-1	
Factor inductor de relocalización de actina	arif-1	
Factores de expresión tardíos (late expression factors)	lef	
Gen temprano inmediato 1 (<i>immediately early 1</i>)	ie-1	
Glicoproteína gp41	gp41	
Glicoproteína viral, proteína fusogénica gp64	gp64	
Granulina	gran	
Helicasa	hel-1	
Inhibidor de apoptosis	iap	
Metaloproteasa	mpnase	
Poliedrina	polh	
P10	p10	
Polinucleótido ligasa	pnl	
Polinucleótido quinasa	pnk	
Proteína de fusión (envelope fusion protein)	efp (Ld130)	
Proteína poliédrica de envoltura (polyhedral envelope protein)	PEP	
Proteína quinasa	pk	
Proteína tirosina fosfatasa	ptp	
Proteínas del virión	p12, p40, p45, p47, p6.9,	
	p74	
Proteínas derivadas de cuerpos de oclusión (Occlusion	odv-e18, odv-e25, odv-	
derived virus proteins)	e56, odv-e66, odv-ec27	
Proteínas virales del virión (Viral polyhedra protein)	vp1054, vp39, vp91/p95	
Quitinasa	chi, chiA o v-chiA	
Ribonucleótido reductasa, sububidades 1 y 2	rr1, rr2	
Spindilina (<i>spinidlin</i>)	gp37	
Superóxido dismutasa	sod	
Transactivador de transcripción general	gta	
Ubiquitina	ubi	
Viral enhancing factor	vef	

OBJETIVOS

GENERAL

• Generación de recombinantes del virus de la poliedrosis nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV-2D).

PARTICULARES

- Incorporación de sitios únicos de restricción al genoma de AgMNPV-2D para optimizar la frecuencia de generación de virus recombinantes.
- Construcción de plásmidos de transferencia para la expresión de dos o más genes (*polh*, *E1* y *DsRed1*), basado en el uso de dos promotores virales y secuencias IRES.
- Generación de AgMNPV recombinantes a partir de los plásmidos de transferencia construidos, que contengan diferentes combinaciones de ausencia / presencia de los genes *DsRed1*, *E1* y *polh*.
- Análisis comparativo de los recombinantes obtenidos con las diferentes versiones de plásmidos de transferencia.
- Diseño de estrategias alternativas para mejorar la infectividad de AgMNPV-2D.



Introducción

La introducción de esta tesis doctoral está dividida en dos partes. La primera, brinda un informe detallado de la Biología Molecular de los Baculovirus, comúnmente empleados como agentes de control biológico de plagas de lepidópteros. En particular, se profundiza en el estado actual de conocimiento de las secuencias relacionadas con el proceso de replicación. La segunda parte, tiene como propósito describir la importancia del cultivo de la soja en nuestro país y el complejo de plagas de dicho cultivo, en particular la "oruga de las leguminosas" de la soja *Anticarsia gemmatalis (A. gemmatalis)*. Además, en esta parte, se presentan conceptos relacionados con el manejo integrado de plagas y las posibles alternativas de control de *A. gemmatalis* en Argentina, tomando como modelo el uso extendido de AgMNPV como control biológico en Brasil.

Biología molecular de los baculovirus. Estado actual del conocimiento.

Clasificación y descripción general.

Las primeras descripciones de patologías de insectos se encuentran en la literatura china antigua, en la que se detallan infecciones sufridas por los gusanos de seda (Miller, 1997). El primer registro en la literatura occidental, data de un poema escrito en el siglo XVI por un obispo italiano, Marco Vida de Cremona, en el que hace referencia a la enfermedad de los gusanos de seda (Benz, 1986). En los inicios del siglo veinte, esta enfermedad fue atribuida a infecciones virales y finalmente, en 1947, se describieron viriones en forma de bastón, los cuales ahora caracterizan a la familia *Baculoviridae* (Miller, 1996). Hasta la actualidad han sido descriptos al menos 1100 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 cómo 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 la manera en que estos virus se han originado y evolucionado.

Quizás la familia más estudiada es la *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 paracristalina (Fig. I.1). Esta estructura es conocida como cuerpo 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, a su vez, se encuentran envueltas 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, con tamaños que varían entre los 81.7 y 179 kb. La morfología y el tamaño de las inclusiones de los baculovirus han sido usados para clasificar a la familia *Baculoviridae* en dos géneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) y *Granulovirus* (GV).

Los NPVs poseen OBs de mayor tamaño (1 a 15 µm) con una morfología regular, mayoritariamente poliédrica. La proteína que compone la matriz proteica se llama poliedrina. Los virus de este género infectan insectos del orden *Lepidoptera*, *Himenoptera* (abejas y avispas) y *Diptera* (mosquitos). Los *Nucleopolyhedrovirus* pueden tener una o más nucleocápsides por virión y, de acuerdo a esto, se subdividen en dos tipos: nucleocápside

múltiple (MNPV) y nucleocápside simple (SNPV). De acuerdo al estado actual de conocimiento, no existe un correlato filogenético para este carácter.



Figura I.1. 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 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 y Condreay, 1999), en protocolos experimentales de terapia génica (Kost y Condreay, 2002) y como vectores de vacunas (Tami *et al.*, 2000).

La mayor parte del conocimiento de los baculovirus proviene del análisis molecular de los NPVs, ya que resulta muy dificultoso establecer líneas celulares que soporten la replicación de los GVs.

Características generales de los genomas de baculovirus

La determinación de la secuencia completa de 18 genomas de baculovirus, incluyendo uno que infecta a un díptero (CuniNPV), ha brindado una gran cantidad de información a nivel de secuencia (Tabla I.1). Los genomas de los baculovirus son de gran tamaño, sólo comparables a los de Entompoxvirus y Adenovirus. La mayoría de los baculovirus presentan valores dentro del rango de 118 a 139 kb. 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, de uno a 200 nucleótidos. Los ORFs no están agrupados funcionalmente ni de acuerdo a su patrón de expresión génica y las superposiciones entre ellos son poco frecuentes. En general, los genes de los baculovirus 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 en el de la transcripción del gen ie-1 (ie-0), que posee 54 aminoácidos extras en el extremo aminoterminal (Chisholm y 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 I.2). En algunos virus, como AcMNPV y BmNPV, el porcentaje de genes repetidos representa el 4% y 9% del genoma, mientras que en aquellos de genomas más grandes, como LdMNPV y XcGV, llega al 32% y 30%. Entre los genes repetidos se destacan los genes *bro*, que 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*). La secuencia *hr* en los NPVs está formada por repeticiones de 60-80 pb, que contienen un palíndrome imperfecto de unas 28 pb en su región central. El número de secuencias repetidas de 60-80 pb es variable en los distintos genomas y están separadas entre sí por secuencias espaciadoras de 50-115 pb. Se cree que las secuencias *hr*s funcionan como orígenes de replicación (*ori*) y como *enhancers* de la transcripción temprana (ver más adelante) (Cochran & Faulkner, 1983; Guarino & Summers, 1986; Kool *et al.*, 1995; Theilmann & Stewart, 1992; Xie *et al.*, 1995).

Virue	Genoma	% 60	OPEs	Nº de	Poforoncias	Nº de	Número de
VIIUS	(pb)	% GC	UKES	hrs	Referencias	genes bro	acceso
XcGV	178733	41	181	9	Hayakawa <i>et al.</i> , 1999	7	AF162221
LdMNPV	161046	58	166	13	Kuzio <i>et al.</i> , 1999	16	AF081810
MacoNPV-	155060	41 7	169	4	Li O <i>et al</i> 2002	8	AF467808
90/2	100000	,/	100		Li, Q. 01 01., 2002	0	
MacoNPV-	154481	40	168	4	lil etal 2002	8	NC 003529
96B	101101	10	100		Li, Li ot all, 2002	0	
SpltMNPV	139342	42,7	141	17	Pang <i>et al.</i> , 2001	2	AF325155
SeMNPV	135611	44	139	4	IJkel <i>et al.</i> , 1999	-	AF169823
AcMNPV	133894	41	155	9	Ayres <i>et al.</i> , 1994	1	L22858
OpMNPV	131990	55	152	5	Ahrens <i>et al.,</i> 1997	3	U75930
RouNPV	131526	39	146	9	Bonning & Harrison, 2002	-	NC_004323
HaSNPV G4	131403	39	135	5	Chen <i>et al.</i> , 2001	3	AF271059
HzSNPV	130869	39,1	139	5	Chen <i>et al.</i> , 2002	3	AF334030
HaSNPV	130760	38,8	134	5	Zhang &. Jin, 2003.	1	NC_003094
BmNPV	128413	40	143	7	Gomi <i>et al.</i> , 1999	5	L33180
CpGV	123500	45	143	а	Luque <i>et al.</i> , 2001	1	AF53466
PhopGV	119217	35,7	130	а	Croizier L. <i>et al.</i> , 2002	1	AF499596
EppoMNPV	118584	41	136	5	Hyink <i>et al.</i> , 2002	1 (truncado)	AY043265
CuniNPV	108252	50,9	108	4	Afonso <i>et al.</i> , 2001	6	AF403738
PxGV	100999	40	120	4	Hashimoto <i>et al.</i> ,	-	AF270937
					20000		

Tabla I.1. Genomas secuenciados y sus características principales.

^a Los genomas de CpGV y PhopGV no contienen secuencias identificables como *hr*s. Abreviaturas: **NPVs grupo I:** *Autographa californica* MNPV (AcMNPV), *Bombyx mori* MPV (BmNPV), *Choristoneura fumiferana* MNPV (CfMNPV), *Epiphyas postvittana* NPV (EppoNPV), *Orgyia pseudotsugata* MPNV (OpMNPV). *Rachiplusia ou* MNPV (RouNPV). **NPVs grupo II:** *Helicoverpa armigera* NPV (HearSNPV o HaSNPV), *Helicoverpa zea* SNPV (HzSNPV), *Mamestra configurata* NPV (MacoNPV), *Spodoptera exigua* MNPV (SeNPV), *Spodoptera littoralis* NPV (SpliNPV), *Lymantria dispar* LdMNPV (LdMNPV). **GVs:** *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).

pág. 27

Tabla I.2. 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) ctl (30, 136) ptp (9, 10)				
SeMNPV	Ac145/150 (68, 96, 134) odv-e66 (54, 114) p26 (87, 129)				
	Ac145/150 (17, 30) dbp (37, 47) vef (65, 160), bro (32, 33, 71, 72, 73, 74, 75, 112, 113,				
LdMNPV	114, 115, 146, 150, 153, 154, 161) ctl (66, 149) Ld151/162 (151, 162) Ld34/163 (34,				
	163) <i>m</i> (120, 147)				
HaSNPV	bro (59, 60, 105)				
HzNPV	bro (60, 61, 108)				
SpltNPV	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)				
	Ac145/150 (11, 20, 87, 105) p10 (5, 19, 83) vef (150, 152, 154, 166) bro (60, 62, 76,				
XcGV	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, generados en momentos diferentes del ciclo de infección (Fig. I.2). Uno se denomina virión brotante (BV, *budded virion*) y el otro virus ocluido (OV, *occluded virus* u OB, *occlusion body* o cuerpo de inclusión). Cada uno de estos fenotipos desempeña una función diferente. En etapas tempranas de la infección se producen los BV. Estos consisten en nucleocápsides que emergen de la membrana plasmática de la célula y cuya finalidad es propagar rápidamente la infección a las células circundantes (transmisión horizontal). 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. Cuando muere el 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 (transmisión horizontal).

Cuerpos de inclusión (Occlusion Bodies, OBs)

Como se ha mencionado anteriormente, las poliedrinas/granulinas (*polh/gran*) son las proteínas mayoritarias de los OBs. Sus pesos moleculares van desde 25 hasta 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 en cultivo celular (Smith *et al.*, 1983). Los genes que codifican para *polh/gran* no son esenciales cuando las baculovirus se replican en cultivos celulares, pero son de 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 por carbohidratos (Minion *et al.*, 1979) asociados a una proteína de 34 kDa, llamada *pp34/Calyx* (Whitt & Maning, 1988).

Otra proteína, llamada *enhancin*, puede representar hasta el 5% de las proteínas del OB de *Trichoplusia ni* GV (TnGV) (Hashimoto *et al.*, 1991). Los *enhancins* fueron identificados inicialmente 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 (Derksen & Granados, 1988; Hashimoto *et al.*, 1991; Lepore *et al.*, 1996). La MP recubre el intestino de los insectos, y protege a las células del epitelio intestinal de la acción de puntas y/o púas que pudiera contener el material ingerido. *Enhancin* 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, adhiriéndose a las mismas (Wang & Granados 1997) (ver Capítulo 7, Resultados y Discusión, para una descripción más detallada).

También se ha demostrado la presencia de una proteasa alcalina en el OB. Esta proteína se activa a pHs elevados 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 ingiere OBs. En el intestino, la proteína mayoritaria se disgrega, principalmente por la acción del pH alcalino del intestino medio, liberando los virus derivados de cuerpos de inclusión (ODV, *occlusion derived virions*) (Day *et al.,* 1953). Un ODV esta formado por nucleocápsides (NCs) envueltas por una membrana lipoproteica (Fig. I.1). 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. I.1).

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, el *core* nucleoproteico está 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). Se cree que esta proteína interactúa con el complejo del poro nuclear (Pham & Sivasubramanian, 1992; Possee *et al.*, 1991; Vialard & Richardson, 1993). Además, en las NCs se ha detectado la presencia de dos proteínas, una proteína tirosina fosfatasa (PTP) y una proteína quinasa (PK), que podrían estar involucradas en el desenrollamiento del virión.

En el ODV, las nucleocápsides se encuentran recubiertas por una membrana lipoproteica o envoltura. Esta membrana posee una estructura típica de bicapa y facilita 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 P74.

La proteína P74 está localizada sólo en los ODVs y su deleción 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 interactuando 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 (Budded Virus, BVs)

Los BVs contienen una sola nucleocápside envuelta por 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. I.1). En AcMNPV y en otros NPVs del grupo I, estas estructuras están formadas por trímeros de la proteína GP64, que está involucrada en la entrada de los viriones brotantes a través de 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, similar al ORF 130 de LDMNPV (Ld130)] es capaz de disparar el proceso de fusión (ljkel *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2000), teniendo

así un rol homólogo a GP64. En los granulovirus, recientemente se ha caracterizado una proteína similar a Ld130 que promueve la fusión a pH bajo (Parola, 2004; Goldberg *et al.*, 2002a).

Ciclo de infección

La multiplicación de los baculovirus en larvas de insectos se divide en dos etapas: infecciones 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. I.2). En ambas etapas, la infección es iniciada por la unión del virus a la célula blanco. Ambas etapas presentan diferentes características descriptas a continuación.

Entrada de los ODV e infección primaria

En general, los lepidópteros adquieren infecciones por baculovirus al ingerir material contaminado con cuerpos de inclusión. Éstos son transportados hasta el intestino medio. Una vez ahí, la proteína de inclusión se degrada (Day et al., 1953), por un lado, por acción del pH y, por otro, debido a la acción de proteasas. Estos factores actuarán de manera cooperativa, provocando la liberación de los ODVs. Los ODVs atraviesan la membrana peritófica y entran al interior de las células epiteliales por fusión de la membrana viral con la membrana plasmática (Granados, 1978; Horton & Burand, 1993). Dentro de la célula, las NCs son transportadas al núcleo, probablemente a través de la red de microfilamentos de actina, donde liberan su DNA. 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 desenrollamiento y extrusión del DNA de la nucleocápside. Posteriormente, 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. Mientras que en otros, si bien las NCs penetran las células del epitelio, emergen nuevamente y son transportadas por el sistema tragueal hasta otras células blanco (Fig. I.2).

Infección secundaria

A diferencia de los ODVs, los BVs entran a la célula huésped mayoritariamente por endocitosis, probablemente mediada por interacción de GP64 con un receptor aún no identificado (Volkman & Goldsmith, 1985; Wickham *et al.*, 1990; Wickham *et al.*, 1992) (Fig. I.2). 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 que fue tomado de un huésped. Tanto los *Nucleoplyhedrovirus* del grupo II como los *Granulovirus*, no poseen un gen gp64. Aparentemente, en estos baculovirus, la proteína *efp* desempeñaría una función similar.

En el citosol, el endosoma es acidificado provocando la liberación de las NCs por fusión de membranas. Las nucleocápsides migran al núcleo, donde penetran a través de los poros nucleares, y allí el DNA es liberado. Posteriormente, comienza la transcripción y el DNA es replicado y ensamblado en nuevas nucleocápsides. En la fase tardía, las NCs salen del núcleo y migran a la membrana plasmática, donde brotan de la misma manera que en la infección primaria. En la fase muy tardía, las nucleocápsides adquieren su membrana en el núcleo y son recubiertas por una matriz cristalina de poliedrina para formar cuerpos de inclusión maduros. Estos son liberados por lisis celular.



Figura I.2. 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 OBs (fase primaria de la infección). La matriz de poliedrina de un OB ingerido se disuelve en el lumen del intestino medio, liberando un ODV que atraviesa la membrana peritrófica y llega a las células columnares del epitelio intestinal. La membrana de los ODV se fusiona con las membranas de los microvilli, liberando nucleocápsides (NCs) en el citoplasma, donde (a) migrarán al núcleo o (b) emergen nuevamente. 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, adonde 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. Las nucleocápsides se dirigen 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 brotan como BV infecciosos. Durante la fase muy tardía, las nucleocápsides son retenidas en el núcleo, adquieren su membrana y son embebidas en una matriz cristalina de poliedrina para formar OBs. Los OBs maduros son liberados por lisis celular.

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 y Miller, 1995) (Figura I.3).

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 BVs, ocasionando la infección secundaria. Finalmente, durante la fase muy tardía se transcriben a altos niveles proteínas relacionadas con la morfogénesis del OB, entre ellas *poliedrina/granulina*.

inicio de la infección

Fases	Temprana (early)	Tardía (late)	Muy tardía (very late)
Tiempo	0 a 6-8 h	6-8 a 18-24 h	18-24 h a 76 h
Transcripción	RNA polimerasa II	RNA polimerasa viral	
mediada por	celular		
Promotores	ТАТА	(A/G/T)TAAG	(A/G/T)TAAG
utilizados			
Secuencia de	CA(C/G/T)T	Primera A de la	Primera A de la
inicio de		secuencia T <u>A</u> AG	secuencia T <u>A</u> AG
transcripcion			
Motivos de union	(1/A)GATA(A/G)		
a proteinas	CACGIG		
transcrinción			
Replicación del			
DNA			
Genes	ie-0, ie-1, ie-2, pe38,	ie-0, ie-1, iap-1, iap-2,	p10, polh/gran, vp39, v-
transcriptos	me53, dna-pol, dna-hel,	me53, dna-pol, dna-hel,	chi, ubi, p74, gp41,
	etl (pcna), p47, lefs (1,	lef-10, lef-1 (primasa),	odv-e66, odv-ec27,
	3, 5, 6, 7, 8)	lef-2, lef-3 (SSB) lef-4,	odv-e56, etc.
	<i>ар1, ар-2, р35, др64,</i>	lef-8, lef-9, p47, vlf-1,	
	egt, etc.	p6.9, Vp39, gp64, 39K,	
Draducción do		p74, ubi, pp76/83, elc	
BV/s			
DV3			
Producción de			
OBs (cuerpos de			
inclusión)			

Figura I.3. 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 ingresado al núcleo, se transcriben genes cuyos promotores son reconocidos por la RNA polimerasa II celular. La transcripción comienza rápidamente y puede ser detectada a los 15 minutos post-inoculación. Entre los genes transcriptos en esta etapa, se encuentran aquellos que codifican para activadores transcripcionales, la RNA polimerasa viral, factores de replicación del DNA viral y supresores de apoptosis, entre otros. Estas proteínas preparan a la célula para el enorme esfuerzo impuesto por la síntesis de DNA viral y de los componentes estructurales que formarán las partículas virales.

El nivel y sincronización de la expresión de los genes tempranos y tardíos es orquestado para asegurar la formación de las partículas infecciosas BV y OB de manera 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).

La estructura del citoesqueleto es reacomodada drásticamente como consecuencia de la expresión de otros genes tempranos. 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 transcriptos en forma temprana. Aquellos llamados genes inmediatamente tempranos *o immediate early (ie)*, como *ie*-1, que no requieren de proteínas virales ni de elementos *enhancers* para su transcripción. Los genes llamados *delayed-early* o tempranos retrasados, requieren la síntesis de factores virales tales como IE-1 que, unidos a *enhancers*, llevan la transcripción al nivel requerido para el progreso de la infección (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, donde se unen a palíndromes de 28 pb presentes en las secuencias *hr*s (Olson *et al.*, 2002). La interacción del dímero de IE-1 con las *hr*s reclutaría factores de transcripción celulares, actuando así como un *enhancer* transcripcional 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: IE-0, IE-2 (IE-N) y PE38/P34.

Con respecto a los promotores de los genes tempranos, muchos de ellos poseen una caja TATA seguida por un motivo CABT [CA(C/G/T)T] a 20-40 nt *downstream*, que corresponde al inicio de la transcripción. La proteína TBP (TATA *box binding protein*) se uniría a la secuencia TATA, reclutando factores de transcripción. Además, la secuencia CABT desempeña un papel importante en la eficiencia de transcripción, probablemente influyendo en 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 posee 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, 1992).

Transición de la fase temprana hacia tardía

La transición entre estas dos etapas está caracterizada por la replicación viral, la activación de una nueva RNA pol y una dramática disminución en los niveles de mRNAs propios de la célula hésped (Miller y Jewell, 1981; Rice & Miller, 1986). La replicación del DNA parece ser un evento esencial para la transcripción de los genes tardíos.

Fase tardía

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

En 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 a niveles elevados 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 a partir de las 6-12 h p.i., en una región conocida como estroma virogénico (Tjia *et al.*, 1979). La síntesis del DNA continúa hasta al menos la hora 18 y luego decae significativamente. La síntesis del DNA viral es una condición necesaria para la expresión de los genes muy tardíos (Miller y Jewell, 1981; Rice & Miller, 1986).

Los factores esenciales para la replicación viral, se han determinado en ensayos de transfección de porciones del genoma en células de insecto y una 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 cotransfecta 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*) (McDougal & 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 y Miller, 1997). De estos 10 genes, los cinco primeros, junto con *dna-pol*, están presentes en todos los baculovirus (ver más adelante).

Un segundo grupo de genes no conservado en todos los baculovirus, estaría relacionado con la replicación. Algunos de los representantes de este grupo son el antígeno de proliferación nuclear (*pcna*), *dna-ligasa* y una segunda helicasa (*helicasa-2*) con homología 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 la exonucleasa alcalina (*alk-exo*) y a una proteína de la familia de las integrasas resolvasas (*vlf-1*) que están conservadas 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, que es un precursor de dTTP. Al mismo tiempo, impide la incorporación errónea de dUTP en el DNA, el cual tendría efectos mutagénicos.

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 76 h p.i. (aproximadamente) o hasta la lisis celular.

Los genes muy tardíos son transcriptos 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 los 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 en del genoma del 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 & Condreay, 2002).

En los NPVs, el gen *p10* es también expresado a un nivel elevado. 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 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 incorporación de DNA, se llevaría a cabo en el núcleo de la célula infectada en una región electrodensa 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 actúa como envoltorio (*Calyx*). Con respecto al origen de los lípidos que forman la envoltura de los viriones (tanto de los BVs como de los ODVs), su origen aún es desconocido.

Respuesta celular a la infección

Luego de la infección viral, como medida defensiva del organismo, muchos tipos celulares son capaces de inducir una cascada de eventos moleculares que conducen a la apoptosis (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 defensiva 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. Así se facilita el establecimiento y la persistencia de la infección, prolongando la supervivencia de las células infectadas, a fin de incrementar 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.

Genes involucrados en la replicación del DNA de baculovirus

DNA polimerasa. Uno de los genes esenciales para la replicación de DNA presenta homología con las DNA polimerasas (Pearson *et al.*, 1993; Kool *et al.*, 1994a; Ahrens y Rohrmann, 1995). Se han localizado y secuenciado (Tomalski *et al.*, 1988; Bjorson *et al.*, 1992; Cowan *et al.*, 1994; Chaeychormsi *et al.*, 1995; Liu y Carstens, 1995) genes de seis baculovirus que codifican proteínas de alrededor de 1000 aminoácidos (115 kDa), que contienen motivos conservados entre las DNA polimerasas (Wang, 1991). Aunque se demostró en dos estudios independientes que el gen de la *DNA polimerasa* de los baculovirus era esencial para la replicación (Pearson *et al.*, 1993; Kool *et al.*, 1994a), en otro trabajo (Lu y Miller, 1995) fue estimulador de la replicación pero no esencial. Esto sugiere que, bajo diferentes condiciones de ensayo, podría actuar una *DNA polimerasa* de la célula huésped en combinación con otros genes virales de replicación, para replicar el DNA plasmídico transfectado.

p143. P143 es una *helicasa* (Lu y Carstens, 1991; McDougal y Guarino, 2000) y un virus con una mutación sensible a temperatura en *p143* no sintetiza DNA a la temperatura no permisiva (Brown *et al.*, 1979; Gordon y Carstens, 1984; Lu y Carstens, 1991).

ie-1. En AcMNPV el gen temprano *ie-1* codifica una proteína de 67 kDa (Guarino y Summers, 1987) que presenta dominios de activación transcripcional y de unión a DNA (Kovacs *et al.*, 1992) y, en la región C-terminal, se encuentra un patrón de aminoácidos similar al motivo SSB de unión a DNA (Kool *et al.*, 1994a). En los baculovirus es posible que *ie-1* sea esencial, porque activa la expresión de los otros genes de replicación a niveles suficientes como para producir cantidades detectables de DNA replicado. Alternativamente, podría estar involucrado directamente en la replicación de DNA, uniéndose a un origen y catalizando pasos tempranos que llevarían al ensamble de un complejo de replicación.

lef-1 y lef-2. El producto de *lef-1*, LEF-1, es una DNA *primasa*, y LEF-2 podría ser una proteína accesoria de la DNA *primasa* (Mikhailov y Rohrmann, 2002). Estos genes esenciales para la replicación, son llamados "factores de expressión tardía" (lef, *late expression factors*). Varios estudios indican que estos genes están directamente involucrados en la replicación de AcMNPV y OpMNPV (Kool *et al.*, 1994a; Ahrens y Rohrmann, 1995a; Lu y Miller, 1995).

lef-3. La proteína LEF-3 comparte muchas de las características de las SSBs, tales como preferencia por unirse a DNA de simple cadena e inespecificidad al unirse al DNA. También contiene secuencias similares a un motivo SSB cerca de su región N-terminal (Ahrens *et al.*, 1995b). Los SSB son componentes esenciales en la replicación de DNA. Contribuyen a la apertura y desenrollamiento del DNA de doble cadena (dsDNA) en los orígenes de replicación a temperaturas más bajas que la T_m normal. También sustentan el desenrollamiento de dsDNA iniciado por la acción de las helicasas en las horquillas de replicación, y podrían influenciar la actividad de otras proteínas de replicación (Kornberg y Baker, 1992).

p35. La replicación fue estimulada grandemente por el gen *p35* en un estudio (Kool *et al.*, 1994a), y en otro, que se realizó bajo diferentes condiciones (Lu y Miller, 1995), resultó esencial para la replicación. P35 es un inhibidor de la apoptosis inducida por AcMNPV en células de *S. frugiperda* (Clem *et al.*, 1991). Otros estudios sugieren que también podría actuar como un activador transcripcional de genes tempranos (Gong y Guarino, 1994). Sin embargo, su rol principal podría ser el de inhibir la apoptosis, impidiendo que las células transfectadas mueran durante el ensayo de replicación. Esta teoría está avalada por el hecho de que OpMNPV, que presenta un alto grado de homología con AcMNPV, carece de un homólogo del gen *p35* (Gombart *et al.*, 1989). Sin embargo, codifica un análogo funcional de *p35* Ilamado *Op-iap* (inhibidor de apoptosis) que no presenta ninguna identidad a nivel de secuencia con *p35*, pero que tiene la capacidad de inhibir la apoptosis inducida por AcMNPV en células de *S. frugiperda* (Birnbaum *et al.*, 1994). Un gen relacionado (*Cp-iap*) con propiedades similares, se encuentra en el genoma de *Cydia pomonella* GV (Crook *et al.*, 1993). Tanto *Op-iap* como *Cp-iap* pueden sustituir a *p35* en ensayos de replicación transiente (Lu y Miller, 1995).

ie-2 y pe-38. Una eficiente replicación del DNA en ensayos transientes requiere de genes adicionales que la estimulen. Dos de estos genes estimuladores, *ie-2* (Carson *et al.*, 1988) y *pe-38* (Krappa y Knebel-Mörsdorf, 1991), son transactivadores de otros genes virales (Lu y Carstens, 1993; Wu *et al.*, 1988).

lef-7. Se determinó que estimula la replicación de DNA (Lu y Miller, 1995). LEF-7 contiene motivos de unión a DNA de simple cadena (Lu y Miller, 1995), pero su actividad como

proteína de unión a DNA de simple cadena aún no se ha determinado en larvas o en cultivo celular.

Orígenes de replicación de los baculovirus.

La evidencia actual sugiere que la replicación del genoma de AcMNPV requiere de elementos que actúan en *cis* y en *trans*. Se han utilizado dos estrategias diferentes para la identificación de potenciales orígenes de replicación en baculovirus. Una de ellas aprovechó la generación de partículas defectivas interferentes (DIs) con grandes deleciones genómicas, pero que retienen secuencias *cis* esenciales para la replicación de DNA. La otra estrategia ensayó la capacidad de replicación de secuencias clonadas de baculovirus, una vez transfectadas en células infectadas.

Genomas deficientes. Varios investigadores observaron que el pasaje seriado de AcMNPV sin diluir en células de *S. frugiperda*, producía progenie viral con genomas alterados (Kumar y Miller, 1987; Kool *et al.*, 1991, 1993a; Wickham *et al.*, 1991; Lee y Krell, 1992, 1994). El aislamiento por placas de estos mutantes y subsiguiente análisis de su DNA, indicaron que habían ocurrido inserciones de DNA celular o pequeñas deleciones en regiones del genoma que no eran esenciales para la replicación del virus, en cultivo celular (Burand *et al.*, 1980; Miller y Miller, 1982; Kumar y Miller, 1987; Friesen y Nissen, 1990). Estas mutaciones frecuentemente fueron localizadas en el *locus* FP (m.u. 33,6-37,2) (Potter *et al.*, 1976; Fraser y Hink, 1982; Fraser *et al.*, 1983; Kumar y Miller, 1987), el *locus* del gen de la ecdisona glucosil transferasa (*egt*) (m.u. 7,6-13,1) y en el fragmento *Pst*I-I (m.u. 14,4-17,9) (Kumar y Miller, 1987).

En estos estudios iniciales no se encontraron otros baculovirus con grandes deleciones genómicas que se generaban por pasaje seriado en cultivo celular, porque esos dependían de un virus ayudante (*helper*) para su replicación y, por lo tanto, no podían ser aislados por placa. Posteriormente, se observó que, luego de infectar células de insecto, la producción de baculovirus y proteínas recombinantes estaba acompañada por la acumulación de DIs (Huang y Baltimore, 1970; Kool *et al.*, 1991; Wickham *et al.*, 1991). Estas DIs se generan por pasaje múltiple por cultivo celular a altas multiplicidades de infección (MOI), y ellas son responsables del llamado "efecto pasaje" que se observa en biorreactores (Van Lier *et al.*, 1992). Este fenómeno impide el desarrollo y explotación de sistemas de producción continuos en biorreactores de células de insecto y dificulta el escalado de baculovirus y proteínas recombinantes en cultivo celular. La naturaleza y origen de estas DIs no es bien conocida. Los genomas de las DIs sólo retienen secuencias esenciales para la replicación del genoma que actúan en *cis*, y también posiblemente necesarias para su empaquetamiento, mientras que los factores que actúan en *trans* son provistos por el virus

helper intacto (Brockman *et al.*, 1973; Graham *et al.* 1978; Gutai y Nathans, 1978; Vlazny y Frenkel, 1981; Holland, 1990). Las DIs interfieren con la replicación del virus salvaje, posiblemente compitiendo por factores de replicación provistos por el virus *helper*. Las secuencias *cis* retenidas actúan como orígenes de replicación.

Las DIs probablemente tienen una ventaja replicativa como resultado de su tamaño más pequeño y por presentar una mayor densidad de orígenes de replicación de DNA, compitiendo exitosamente por factores *trans* esenciales (Krell, 1996). Luego de 81 pasajes de AcMNPV-E2 por células Sf21, se generaron genomas DI compuestos mayoritariamente por repeticiones de una secuencia genómica corta (Lee y Krell, 1992, 1994) que contenía un probable origen de replicación (Kool *et al.*, 1994). Se ha demostrado la actividad en larvas de este origen de replicación no-*hr* (Habib y Hasnain, 2000).

Luego del pasaje seriado de AcMNPV-E2 por células Sf21, Kool *et al.* (1991) observaron la acumulación de DIs con una deleción genómica mayor de 43% (d43). La región delecionada del genoma contenía genes que se considera están involucrados en la replicación, tales como *lef-1*, *lef-2*, *lef-3* y *DNA polimerasa* (Kool *et al.*, 1995; Lu y Miller, 1995). También se encontró que las DIs de BmNPV, un baculovirus cercano a AcMNPV en cuanto a orden y homología génicas, presentaban deleciones que abarcaban esta región (Hashimoto *et al.*, 1993; Yanase *et al.*, 1998). Esto implica que la acumulación de DIs con grandes deleciones es un fenómeno generalizado. Estudios recientes han demostrado que las DIs se generan rápidamente en cultivo celular y que pueden persistir en insectos (Pijlman *et al.*, 2001).

Secuencias de repetición homólogas (*hr*) como orígenes de replicación de baculovirus (*oris*). AcMNPV contiene ocho *hr*s llamados *hr*1, *hr*1a, *hr*2, *hr*3, *hr*4a, *hr*4b, *hr*4c y *hr*5. Los *hr*s están compuestos por números variables de secuencias repetidas altamente conservadas, de aproximadamente 70 pb [ver figura I.4(a)]. Cada repetición contiene un palíndrome de 30 pb flanqueado por aproximadamente 20 pb de una repetición directa a ambos lados [ver figura I.4(b)]. Si se convirtiese al palíndrome de 30 pb en una estructura cruciforme, tendría dos posiciones no coincidentes fuera de una secuencia central altamente conservada de 12 pb, que contiene un sitio *Eco*RI en el centro [ver figura I.4(c)].



Figura I.4. Regiones homólogas de AcMNPV. (a) Diagrama de la estructura de un *hr*. El palíndrome imperfecto de 30 pb está flanqueado por secuencias de 22 y 20 pb. Juntos, forman la secuencia repetitiva *core* de 72 pb. Estas unidades de 72 pb están organizadas como repeticiones en *tandem* separadas por 0 a 131 pb. **(b)** Alineamiento de las 20 secuencias *hr* más conservadas que flanquean al palíndrome. La posición del palíndrome (P) está indicada. **(c)** Alineamiento de 35 secuencias palindrómicas. El sitio *Eco*RI

conservado está subrayado. Los rectángulos verticales encuadran las regiones que muestran la mayor variación a nivel de secuencia. Las 3 secuencias en la parte inferior de la figura presentan diferencias de secuencia que no se encuentran en las otras 32 secuencias. Las secuencias de *hr*1, *hr*3 y *hr*4a se encuentran invertidas para su alineamiento en (b) y en (c). El número después del nombre de cada *hr*, hace referencia a su posición en la repetición. El número entre paréntesis corresponde a la frecuencia de cada palíndrome. Figura tomada de Kool *et al.*, 1995.

Todos los *hr*s demostraron tener habilidad replicativa cuando se los transfectó en células de *S. frugiperda* infectadas con AcMNPV (Leisy y Rohrmann, 1993; Kool *et al.*, 1993b). Se ha demostrado que los *hr*s son *enhancers* o estimuladores en *cis* de la transcripción de genes tempranos de baculovirus, incluyendo a *39K*, *ie-2*, *p35* y *helicasa* (Guarino y Summers, 1986b; Nissen y Friesen, 1989; Carson *et al.*, 1991; Lu y Carstens, 1993).

Se han encontrado secuencias similares a los *hr*s de AcMNPV en BmNPV, una especie cercana a AcMNPV (Maeda y Majima, 1990; Majima *et al.*, 1993). El genoma de CfMNPV (Arif y Doerfler, 1984; Kuzio y Faulkner, 1984), que está menos relacionado con el de AcMNPV, tiene por lo menos un conjunto de palíndromes repetidos, algunos de los cuales presentan más de un 75% de homología con los *hr*s de AcMNPV, pero que carecen del sitio *Eco*RI en la porción central (Xie *et al.*, 1995). Un conjunto de palíndromes imperfectos no relacionados con los *hr*s de AcMNPV, pero que se comportan como orígenes de replicación, también se encuentran presentes en el genoma de *Spodoptera exigua* NPV (SeNPV). El único *hr* de OpMNPV que se ha secuenciado, presenta aproximadamente un 50% de homología con los *hr*s de AcMNPV, pero carece de palíndromes (Theilmann y Stewart, 1992). LdMNPV también contiene *hr*s localizados en ocho regiones de su genoma (Pearson y Rohrmann, 1995). Se han caracterizado dos de estos *hr*s y están compuestos de repeticiones de aproximadamente 80 pb que incluyen una serie de palíndromes no relacionados con los de AcMNPV, que contienen sitios *Mlu*l y sitios superpuestos *Xho*l y *Sac*I.

Orígenes no-hr. Además de las regiones *hr*, inicialmente se caracterizaron dos orígenes probables que no contienen secuencias *hr*, el fragmento *Hin*dIII-K de AcMNPV (Kool *et al.*, 1993b, 1994b; Leisy y Rohrmann, 1993; Lee y Krell, 1994) y el fragmento *Hind*III-N de OpMNPV (Pearson *et al.*, 1993). Se infirió que las secuencias de *Hind*III-K funcionarían como origen de replicación, debido a la observación de que genomas defectivos de AcMNPV generados después de 81 pasajes seriados sin diluir, retenían menos del 2,2% del genoma parental y que estas secuencias provenían del fragmento *Hind*III-K (Lee y Krell, 1992) (ver figura I.5).



Figura I.5. Localización de los genes involucrados en la replicación y de las regiones homólogas (*hrs*) en el genoma de AcMNPV. Los números indican la cantidad de repeticiones en cada *hr*. Las flechas grandes y pequeñas indican la orientación relativa de los genes y *hr*s, respectivamente. El fragmento *Hin*dIII-K se encuentra recuadrado en celeste. Figura adaptada de la publicada por Kool *et al.*, 1994.

Posteriormente, se demostró la replicación de plásmidos que contenían a H*ind*III-K en ensayos dependientes de infección (Kool *et al.*, 1993b; Lee y Krell, 1994), aunque un 20% menor que en ensayos realizados con plásmidos que contenían regiones *hr* (Leisy y Rohrmann, 1993). El *ori* no-*hr* de AcMNPV está localizado dentro del marco de lectura abierto de *p94*, un gen temprano de función desconocida (Friesen y Miller, 1987), que probablemente ha co-evolucionado con el gen adyacente *p35*, inhibidor de apopotosis (Clem *et al.*, 1994). El baculovirus relacionado, BmNPV, carece de un marco de lectura abierto homólogo al de *p94*, pero ha retenido 151 pb de este gen, que contienen las regiones esenciales no-*hr* II y III (Kool *et al.*, 1994). Los *ori*s no-*hr* se han identificado en muchos otros baculovirus y comparten similitudes estructurales más que homología a nivel de secuencia (Heldens *et al.*, 1997; Pearson *et al.*, 1993; Huang y Levin, 1999; Luque *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 1998; Jehle, 2002). En SeMNPV se demostró que el *ori* no-*hr* no era esencial para la replicación viral en cultivo celular y en larvas. Aún más, la deleción del *ori* no-*hr* condujo a

una mayor estabilidad genómica, dado que impidió que los DIs se volvieran predominantes luego de pasajes seriados por cultivo celular (Pijlman *et al.*, 2003).

Posteriormente, se encontró que existen regiones no-*hr* de promotores tempranos con una probable función *ori* (Wu y Carstens, 1996); además, estos ensayos demostraron que otros no-*hr*s, con similitudes estructurales a *ori*s eucarióticos, podrían tener una función *ori* (Heldens *et al.*, 1997; Huang y Levin, 1999; Kool *et al.*, 1994; Pearson *et al.*, 1993). Los DIs de AcMNPV estaban enriquecidos en estos *ori*s no-*hr* (Lee y Krell, 1992, 1994), lo cual sugiere un rol prominente de los mismos en la generación de estas partículas defectivas.

Especificidad de los orígenes de replicación de baculovirus. Diferentes baculovirus contienen probables orígenes de replicación que pueden diferir en estructura dentro del mismo virus y entre diferentes virus. Aunque los baculovirus son similares en cuanto a organización y estructura genómica, las secuencias de DNA que constituyen un origen de replicación y las proteínas virales y / o de las células huésped que reconocen e interactúan con estas secuencias, pueden diferir significativamente.

La forma del DNA replicado. Kool et al. (1993b) demostraron que una topología circular es un pre-requisito para que se repliquen los plásmidos que contienen orígenes de replicación. El DNA lineal no era replicado aunque contuviera un origen. Estos resultados son consistentes con la naturaleza circular del genoma de los baculovirus y sugiere que el DNA de los baculovirus se replica según un modelo que involucra un intermediario $\theta \Box \Box$ (theta) o de círculo rodante (rolling circle). El plásmido con secuencias hr replicado en células infectadas con AcMNPV era de alto peso molecular, sugiriendo que la replicación no genera una réplica exacta del DNA plasmídico circular incorporado. La digestión parcial del DNA replicado, con una enzima de restricción que linealizaba el plásmido, llevó a la producción de un patrón en escalera de fragmentos, consistente con una organización del DNA en forma lineal concatenada, conteniendo múltiples copias del plásmido (Leisy y Rohrmann, 1993). Los genomas defectivos que consisten de secuencias concatenadas del fragmento HindIII-K (Lee y Krell, 1992, 1994), también avalan un modelo de círculo rodante de replicación del DNA de baculovirus. De acuerdo a este modelo, un único evento de iniciación de replicación conduciría a la producción de múltiples copias del genoma. Se desconoce el mecanismo por el cual esta estructura se resolvería a segmentos genómicos unitarios circulares, pero podría involucrar corte y religación para formar círculos monoméricos, antes o durante el empaquetamiento.

Se ha observado la replicación de plásmidos derivados de pUC sin insertos de baculovirus, cuando son cotransfectados con DNA viral en células de insecto (Guarino y Summers, 1988; Kool *et al.*, 1994). Wu *et al.* (1999) describieron la replicación de DNA plasmídico bacteriano

en células de insecto y su relación con el proceso de replicación de DNA viral. Sus datos demostraron que la replicación del plásmido es independiente de la presencia de secuencias virales en *cis*, pero es iniciada por la maquinaria de replicación viral. El plásmido replicado tiene una estructura concatenada que puede ser incorporada al genoma viral, donde es empaquetada en viriones maduros y donde, luego de cada ronda subsiguiente de replicación, sufre pasajes continuos junto con el DNA viral.

El posible rol de múltiples orígenes de replicación. Se han identificado ocho posibles orígenes en el genoma de AcMNPV. Se desconoce el rol individual de estos orígenes durante la replicación y si son activos simultáneamente. Es posible que la presencia de múltiples secuencias *hr* en el genoma de AcMNPV tenga que ver con su rol como *enhancers* de genes tempranos. La expresión acelerada de genes tempranos podría ser esencial para el establecimiento exitoso de una infección. Sin embargo, la existencia de múltiples orígenes también podría facilitar una rápida amplificación inicial de moldes circulares a través de un modelo *theta* de replicación. Si ocurre replicación de círculo rodante, la iniciación podría necesitar un único origen, conduciendo a la producción de múltiples genomas. Si los factores requeridos para la replicación son limitantes, la formación de un complejo de iniciación sería poco frecuente y la selección de qué origen iniciaría la replicación sería azarosa. En estas circunstancias, la presencia de orígenes funcionalmente redundantes podría incrementar la probabilidad de formación de un complejo funcional de preiniciación, y así se incrementaría la velocidad del ciclo de infección.

La presencia de orígenes múltiples también se reportado para herpes-virus y virus Chilo iridiscente (CIV) (Roizmann y Sears, 1990; Longnecker y Roizmann, 1986; Polvino-Bodnar *et al.*, 1987; Igarashi *et al.*, 1993; Handermann *et al.*, 1992).

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. Estos no son esenciales, pero aportan ventajas selectivas a los virus en términos de relaciones epizoóticas con los insectos huéspedes (O 'Reilly, 1997) (Tabla I.3). A continuación se detallan las funciones de algunos de estos genes.

Las conotoxinas (*ctl*), originariamente aisladas del veneno de caracoles marinos cazadores de peces (del género *Conus*), son péptidos pequeños conocidos por su acción antagonista

pág. 48

de canales de sodio y calcio. A partir de análisis de asociación funcional, Herniou *et al.* (2003) han postulado que las *ctl* estarían involucradas 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.

Gen auxiliar	Abreviatura	Función y posible rol en el ciclo de infección	
Superóxido dismutasa	sod	Cataliza la conversión de anión superóxido (O ₂ -) en	
		peróxido (H ₂ O ₂) y oxígeno gaseoso (O ₂). Posiblemente	
		actúe detoxificando a la célula infectada.	
Proteína quinasa	pk	Quinasa, rol desconocido.	
Proteína tirosina fosfatasa	ptp	Fosfatasa, rol desconocido.	
Factor de proliferación de	fgf	Rol desconocido.	
fibroblastos			
Antígeno de proliferación	pcna	Rol aún no atribuido.	
nuclear			
Proteína Tirosína fosfatasa	ptp	Fosfatasa, rol desconocido.	
Ubiquitina	ubi	En eucariotas está involucrado en vías de degradación de	
		proteínas, en los baculovirus su rol no ha sido demostrado.	
Péptido similar a conotoxina	ctl	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	v-cath	Proteasa, degrada tejidos celulares facilitando la liberación	
		de los OBs al ambiente.	
Quitinasa	v-quiA	Degrada quitina, acelerando la liberación de los OBs.	
Ecdisona glucosil transferasa	egt	Inactiva a la hormona ecdisona, inhibiendo la muda.	
Factor inductor de	arif-1	Promueve cambios en la localización de actina, su rol en	
relocalización de actina		los baculovirus no ha sido dilucidado.	
Viral enhancing factor	vef	Metaloproteasa, facilita el pasaje de los ODV por la	
		membrana peritrófica.	
Exonucleasa alcalina	exo-alk	Hidroliza nucleótidos de una cadena de DNA, posiblemente	
		involucrada en mecanismos de reparación de DNA y en	
		recombinación homóloga.	
p10	p10	Proteína estructural, forma grandes masas fribrilares	
		involucradas en la maduración del OB.	

Tabla I.3. Genes auxiliares de los baculovirus, funciones y posibles roles.

La proteína GP37 (también conocida como p34,8) es similar a las *spheroidin* de los *entomopoxvirus* (Yuen *et al.*, 1990) y, en esa 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.

Se ha sugerido que el antígeno de proliferación nuclear (*pcna*) podría estar involucrado en la replicación, transcripción y reparación del DNA viral, así como en el arresto del ciclo celular, consecuencia de la infección. Sin embargo, este gen no es esencial para la replicación y aún no se han descripto análisis funcionales (O 'Reilly, 1997).

Además de las interacciones que acontecen en la célula, 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 ecdisteroides, inactivándolos (O'Reilly & Miller, 1990). Los ecdisteroides son hormonas esteroides que regulan la muda de los insectos. Con esta inactivación el virus inhibe la muda. De esta manera, 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 así los virus ocluidos al 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 de la quitinasa (*v-chi*). Estas enzimas cooperan en degradar los tejidos y el exoesqueleto de los insectos muertos, acelerando así la liberación de los OBs. En los Granulovirus se ha descripto 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).

Adquisición y reordenamiento de genes

A partir del análisis de los genomas de diferentes baculovirus se deduce que éstos han podido incorporar y/o perder genes. Algunos de éstos se habrían mantenido gracias a la presión de selección del medio ambiente, por otorgar ventajas evolutivas. 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 descriptos en detalle. Por otra parte, se ha documentado el reordenamientos de genes en los genomas de los baculovirus. Mediante estos eventos algunos genes se perderían, otros se duplicarían y otros presentarían ventajas por las nuevas posiciones que ocupan. La adquisición de genes y el reordenamiento de los mismos contribuirían a la generación de la diversidad genómica de los baculovirus.

A continuación, se describen los posibles mecanismos de incorporación de nuevos genes y de recombinación en estos genomas (ver también Introducción del Capítulo 13, Resultados y Discusión).

Adquisición de genes nuevos, orígenes

El análisis de la similitud que presentan 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 I.4).

La incorporación de elementos transponibles procedentes del huésped podría ser una de las vías de adquisición de nuevos genes (Jehle *et al.*, 1998). Mediante esta forma se habrían adquirido genes de insectos tales como *egt*, *sod*, *iaps*, *vlf-1*, entre muchos otros. La adquisición de genes bacterianos (*quitinasa*) o procariotas (*pnk/pn*), podría tener su origen en las bacterias simbiontes 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 I.4. 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 Possee & Rohrmann (1997).

Gen	Nombre	Localización del homólogo conocido	
Ac145/15		Similar a proteína con motivos de unión a	
0		quitina de entomopoxvirus	
alk-exo	Exonucleasa alcalina	Eucariotas y procariotas	
cath	Catepsina	Eucariotas	
ctl	Conotoxina	Eucariotas (caracoles marinos, del género	
		conus)	
dna-lig	DNA ligasa	Poxvirus	
dna-pol	DNA polimerasa	Eucariotas, procariotas y otras familias virales	
dUTPase	Desoxi UTPasa	Eucariotas, procariotas, otras familias virales.	
egt	Ecdisona glucosil transferasa	Insectos	
fgf	Factor de crecimiento de fibroblastos	Mamíferos e Insectos	
gp37	Spindilina	Similar a <i>la proteína Spindilin</i> de los	
		entomopoxvirus (<i>Poxviridae</i>).	
gp64	Glicoproteína viral, proteína fusogénica	Glicoproteína del virus Thogoto	
		(Orthomyxoviridae)	
gta	Transactivador de transcripción general	Eucariotas	
hel-2	Helicasa	Helicasa mitocondrial de levaduras	
iaps	Inhibidor de apoptosis	Eucariotas	
pcna	Antígeno de proliferación nuclear	Eucariotas	
pk2	Proteína quinasa, similar a F2 alfa	Eucariotas	
pnk/pnl	Polinucleótido quinasa y ligasa	Fagos, levaduras, plantas	
ptp	Proteína tirosina fosfatasa	Eucariotas, procariotas y poxvirus	
rr1, rr2	Ribonucleótido reductasa, sububidades	Eucariotas, procariotas y otras familias de virus	
	1 y 2		
sod	Superóxido dismutasa	Eucariotas, procariotas y otras familias de virus	
ubi	Ubiquitina	Eucariotas y procariotas	
chi	Quitinasa	Eucariotas y procariotas	
vlf-1	Integrasa/resolvasa	Levaduras y procariotas	

No sólo se ha documentado la posible adquisición de genes por parte de los baculovirus, sino que también se ha propuesto que al menos un gen de los baculovirus 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 este

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, TCl4.7 y TCp3.2.

El primer transposón detectado en un baculovirus, el elemento TED, fue encontrado en el genoma de AcMNPV (Miller & Miller, 1982; Friesen & Nissen, 1990). TED es propio de lepidópteros, tiene un tamaño de 7,5 kb y contiene tres ORFs superpuestos, flanqueados por repeticiones terminales largas (LTRs) en los extremos 5' y 3'. Dos de los genes codificados por TED, presentan homología 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) en larvas de *C. leucotreta* (Jehle *et al.*, 1995). Este transposón de 4,7 kb de largo, posee un ORF que codifica para una proteína muy similar a una transposasa del tipo Tc-1, flanqueada por repeticiones invertidas de 29 nt en ambos extremos.

En CpGV también se ha encontrado otro elemento móvil TCp3.2 (Jehle *et al.*, 1997). Tcp3.2 es originario del genoma de *Cydia pomonella* y presenta 3,2 kb de largo con repeticiones inversas terminales (ITR) de 756 pb y un gen de transposasa con un marco de lectura discontinuo. Recientemente, se encontró que este elemento se invirtió en el genoma de CpGV a través de 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).

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, a pesar de severas reorganizaciones en otros sectores de estos genomas. Esta región contenía a la *helicasa*, entre otros genes. Lamentablemente, aún no se han determinado los

parámetros funcionales que, por un lado, mantienen constante la organización génica en los baculovirus en determinadas regiones, y 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 *et al.*, 1995; Senkevich *et al.*, 1996). Estos patrones de organización comunes posiblemente sean un reflejo de un modo común de replicación y evolución en estos virus a DNA (Heldens *et al.*, 1998).

Los mecanismos fundamentales que gobiernan las reorganizaciones en los herpesvirus podrían ser similares a los de los baculovirus (Davison & McGeoch, 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. Cuanto más avance el mecanismo *theta* de replicación, 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 recombinación 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 *hr*s homólogas y entre genes homólogos. Los genomas de los baculovirus se caracterizan por poseer ORFs repetidos (por ejemplo, los genes *bro*) y secuencias *hr*s. Hayakawa *et al.* (2000) han sugerido que los *hr*s podrían ser sitios de recombinación dentro o entre genomas de baculovirus.

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 *hr*s, en líneas generales, está conservada. Las pocas diferencias que se observan se deben a inversiones de regiones genómicas, que están acompañadas por secuencias *hr*s 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). El ORF24 (*fgf*) de BmNPV también 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).

En relación a los genes *bro*, en el genoma de MacoNPV, estos flanquean diversas regiones: 1) aquellas que presentan nuevos genes, 2) otras en las cuales el orden génico muestra inversiones e inserciones, o 3) donde las direcciones transcripcionales están invertidas en comparación con otros baculovirus. Por ejemplo, los genes *bro* a, b, y c de MacoNPV 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 *et al.* (2002) encontraron que los genes *bro* se presentan en tres regiones diferentes, 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). Por otra parte, López-Ferber *et al.* (2001) han demostrado el intercambio de genes *bro* por recombinaciones intraespecíficas documentadas o por análisis de genomas de diferentes variantes de BmNPV.

Con respecto a los GVs, a pesar de que 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 de tamaños similares (5,6 y 4,7 kb) con respecto al genoma de CpGV. 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). PhopGV presenta dos secuencias repetidas, una de ellas (la repetición N° 5) se encuentra 2 kb *upstream* del ORF 56 y otra (la N° 6) dentro de la inversión de PhopGV. Una segunda inversión en el genoma de 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 descripto reorganizaciones (inversiones) intragenómicas, sin embargo, recientemente, Li *et al.* (2002), notaron 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 en el mismo huésped. Estas reorganizaciones parecen haberse producido en adyacencia a genes *bro* y/o por regiones *hr*s o estar flanqueadas por las mismas.

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

El cultivo de la soja en Argentina y el complejo de plagas. Características de *A. gemmatalis*

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. I.6). Estas generalmente son de color amarrillo claro y casi esféricas (Fig. I.6). Alcanzan la madurez 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 I.6. Aspecto de la soja. En la fotografía de la izquierda se puede ver una planta de soja y, en la de la derecha, granos de soja.

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 margarinas 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 I.5), 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. I.7), que poseen los valores de rendimiento por hectárea más elevados a escala nacional.



Figura I.7. Área sembrada de soja en Argentina. Fuente: Programa "Atlas Permanente del Desarrollo Territorial de la Argentina" Rivadavia 1823 9º (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. de N.A. y Brasil. La importancia de este cereal para la economía argentina es cada vez mayor. Además, nuestro país es 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 e 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 y 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.

Las ventas de **harina** a la Unión Europea (UE) 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 (UE), que constituye nuestro segundo comprador.

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	12.606,84	2.803	34.818,55
20003/04 ª	14.100	2.500	34.700

Tabla I.5. Evolución de variables productivas del cultivo de soja en Argentina. Fuente:http://www.elsitioagricola.com.

^a estimado según Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca de Argentina, Mayo 2004.

Complejo de plagas de la soja

Un organismo se transforma en una plaga cuando su población 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. No necesariamente se limita a insectos dado que en él se incluye a roedores, nemátodos y cualquier tipo de planta o animal que cumpla con el requisito mencionado anteriormente.

El incremento en la densidad poblacional de un organismo hasta niveles en los que se considera una plaga, varía con el tiempo y de una región a otra. En muchos casos los sistemas de monocultivo favorecen la proliferación de los insectos plaga. Esto ocurre, principalmente, debido al aumento de alimento disponible y a la baja proporción de enemigos naturales.

Las plagas principales de la soja pueden ser agrupadas en las categorías de orugas defoliadoras, barrenadores de brotes y chinches.

Entre las **orugas defoliadoras** 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 de la oruga de las leguminosas (A. gemmatalis).

El virus de la poliedrosis nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) es un patógeno específico de la "oruga de las leguminosas" (*Anticarsia gemmatalis*). *A. gemmatalis* es una plaga que afecta leguminosas de importancia económica como la soja, el maní y la alfalfa, entre otros. La oruga de las leguminosas pertenece a la familia *Noctuidae* del orden *Lepidoptera*, que abarca aproximadamente 20000 especies.

Las orugas de *A. gemmatalis* son activas y, si son molestadas, saltan de la planta y se mueven rápidamente. Se arrastran realizando movimientos ondulatorios. El ciclo de vida de la oruga de las leguminosas dura cerca de 4 semanas durante el verano pero es más extenso en otoño (ver figura I.8). La cantidad de generaciones que se suceden depende de la dispersión y de la llegada de los adultos.



Figura I.8. Representación del ciclo de vida de *A. gemmatalis.* En la parte superior y central derecha se puede apreciar el daño que causan las larvas al follaje y a las vainas. En la parte derecha está representado el estado adulto, en la parte central izquierda el estado pupa y en la parte inferior el estado larval.

Huevo: Los huevos de *A. gemmatalis* son blancos, levemente ovales y aplanados en la cara inferior y de 1 a 2 mm de diámetro. Los huevos son profundamente acanalados y blancos hasta que salen las larvas, momento en el que se tornan rosados. Se oviponen individualmente en el envés de las hojas, aunque durante grandes infestaciones se pueden encontrar en la parte superior de las mismas, en los petíolos y hasta en los tallos (Watson, 1916). El estado de huevo dura aproximadamente 3 días durante el verano pero una semana o más en el otoño.

Larva: Las larvas que recién han salido de los huevos, se alimentan del cascarón del huevo del cual han emergido, dejando solo la porción adherida a la hoja. Generalmente el estado de larva de A. gemmatalis presenta 6 estadios. Las larvas son extremadamente variables a lo largo de los diferentes estadios en cuanto a coloración y marcas. La mayoría presenta prominentes líneas longitudinales oscuras y delgadas líneas blancas, amarillas o rosas. El primer estadio dura aproximadamente 2 días y crecen en largo de 2.5 mm a 6 o 7 mm antes de mudar. La cabeza es de color marrón claro, redondeada y bilobulada. El cuerpo de la larva de primer estadio es de color verde claro uniforme y no posee rayas longitudinales. Las patas de los segmentos abdominales 3 y 4 son más pequeñas que las que aparecen en los segmentos 5 y 6. Durante el segundo estadio aparece un límite negro en la línea lateral y el primer par de patas abdominales tiene aproximadamente un cuarto del largo del tercer par. El segundo par tiene la mitad del largo del tercer par. El segundo estadio dura de 3 a 4 días y crece hasta un largo de 9 mm. El tercer estadio también dura 3 a 4 días y la larva puede crecer hasta los 16 mm. Los estadios cuarto y quinto duran 3 a 4 días y pueden crecer hasta los 25 mm de longitud. Durante el sexto estadio la larva de A. gemmatalis se estira gradualmente y puede alcanzar 48 mm de largo (figura I.9). Este estadio dura de 5 a 25 días, dependiendo de la época del año. En el estadio de prepupa las larvas se encogen hasta alcanzar un largo de 25 mm y se vuelven de color marrón caoba con pocas líneas longitudinales, si es que alguna (Watson, 1916).



Figura I.9. Fotografía de larvas de sexto estadio.

Pupa: La pupa de *A. gemmatalis* es de color verde claro durante el primer día, finalizado el cual se vuelve marrón. La pupa es de aspecto liso y promedia los 18 a 20 mm de largo y 4 a 6 mm de ancho. Se encuentra directamente debajo de la superficie del suelo, a una

profundidad aproximada de 2 cm, en celdas frágiles y sueltas de tierra. Lee y Johnson (1990) encontraron que las pupas se encuentran sobre y debajo de la tierra pero nunca sobre la planta. La mayoría (84.5%) se encontró a menos de 2 cm por debajo de la superficie. El estado de pupa generalmente dura alrededor de 7 días en el verano y 11 días en el otoño.

Adulto: La polilla adulta es variable en cuanto a patrones y coloración y tiene una envergadura (de las alas) de 30 a 38 mm. Las alas anteriores varían de gris ceniza a marrón amarillento claro o marrón rojizo oscuro. Las alas posteriores son de color marrón claro con una fila de motas claras cerca del margen. Una línea diagonal oscura se extiende a través de ambos pares de alas cuando éstas están completamente extendidas.

Como es característico para los noctuídeos, el adulto de *A. gemmatalis* necesita alimento suplementario luego de pasar a este estado (Wei *et al.* 1998). La fuente primaria de alimento de los lepidópteros adultos es el néctar de las flores, y la disponibilidad del mismo se ha correlacionado frecuentemente con brotes de plagas de lepidópteros (Jensen *et al.* 1974). Los adultos de *A. gemmatalis* se alimentan de noche.

Daño y modo de ataque de A. gemmatalis en la soja

La oruga de las leguminosas consume follaje. Las larvas recién salidas del huevo se alimentan de la hoja, comenzando con la epidermis y mesófilo, y continúan hasta finalizar el segundo estadio, momento en el que la oruga comienza a reducir la hoja, comiéndose todo el material tierno y dejando intactas sólo las nervaduras (Watson, 1916). Luego del segundo estadio, la oruga de las leguminosas consume toda la hoja. Una vez que las hojas superiores e inferiores han sido consumidas, el follaje medio y bajo es consumido y puede producirse defoliación total (Roberts y Guillebeau 1999). *A. gemmatalis* también puede atacar tallos tiernos, brotes y vainas pequeñas. Sin embargo, el ataque principal se localiza en la parte superior de las plantas.

Una larva puede consumir entre 100 y 110 cm2 de hoja, principalmente en los dos últimos estadios, también pueden dañar, total o parcialmente, vainas tiernas (figura I.8).

Ciclo vital y época de ataque de A. gemmatalis

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.

El momento crítico de ataque de *A. gemmatalis* va desde plena floración a comienzo de la maduración de granos.

Manejo integrado de plagas (MIP)

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 de manera compatible todos los medios apropiados disponibles (técnicas de cultivo, control biológico, genético, químico, etc.), para mantener las poblaciones de plagas por debajo de los niveles que ocasionan daños significativos (Aragón et al., 1998). El umbral de daño económico (UDE), una herramienta imprescindible en el MIP, indica el tiempo oportuno para decidir una acción de prevención. El umbral de daño económico se define como la densidad a la cual deben iniciarse las medidas de control a fin de evitar un incremento en la población plaga tal 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 en minimizar el uso de insecticidas de origen químico. Parte de la base de que los cultivos pueden soportar determinados niveles de daño 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 determinadas plagas. El tratamiento de las plagas para reducir sus poblaciones por debajo del umbral de daño, incluye estrategias de control biológico o manejos agrícolas que impliquen un cambio en el ambiente haciéndolo desfavorable a la plaga. El MIP no deshecha el 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, 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

pág. 64

poblacional de una plaga a lo largo del tiempo sin la intervención del hombre. Con respecto al nivel de daño económico, éste puede estar por debajo o por encima de la PGE.

Entre los agentes comúnmente utilizados para el control biológico de plagas se pueden mencionar: parasitoides, predadores, patógenos (protozoos, nemátodos, 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 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 así facilitar el ataque por predadores u 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 conjunta con otros agentes de control, por ejemplo hongos con virus, o agentes de control biológico con insecticidas químicos.

En general, son nulos los niveles de toxicidad para el ser humano de los agentes de control biológico, 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 de AgMNPV 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 *A. gemmatalis*. Implementación inicial del programa para el uso de AgMNPV en Brasil.

Durante las temporadas de 1980/1981 y 1981/1982, el gobierno brasileño estableció un programa piloto de utilización de AgMNPV en 21 granjas en los estados de Paraná y Río Grande do Sul. El resultado fue un control eficiente de las poblaciones de *A. gemmatalis* en las parcelas tratadas con el formulado de baculovirus, comparándolas con las que habían sido tratadas con insecticidas químicos y con las que no habían sido tratadas (Moscardi y Correa Ferreira, 1985; Moscardi, 1989; Moscardi, 1999).

Posteriormente, la implementación del programa se inició en la temporada 1982/1983, momento en el que fueron tratadas 2000 ha cultivadas con soja. Inicialmente se produjeron cantidades menores de AgMNPV en larvas criadas con dieta artificial. Las larvas muertas por infección con AgMNPV fueron congeladas y sirvieron no sólo para demostrar la eficacia del tratamiento ante las autoridades competentes, sino también para la producción de virus para la siguiente temporada. Esto demostró el valor de AgMNPV como bioinsecticida.

Consolidación del programa para el uso de AgMNPV como control biológico en Brasil.

Inicialmente AgMNPV se aplicó como una preparación cruda a partir de macerados de larvas muertas.

La consolidación del programa se produjo en 1986 cuando se desarrolló una formulación viral en forma de polvo con base de caolina (Moscardi, 1989; Moscardi, 1999). Este producto está registrado ante las autoridades brasileñas.

A mediados del '90, el uso de AgMNPV alcanzó alrededor de 1000000 de ha anuales y, en la temporada 2001/2002, el área tratada abarcó más de 1500000 ha, equivalentes al 11% de la soja cultivada en Brasil. Más aún, la demanda llegó a ser de aproximadamente 4000000 ha, superando ampliamente la disponibilidad del producto en el mercado.

El incremento en la demanda se dio principalmente en el área central de Brasil, en los estados de Mato-Grosso, Mato-Grosso do Sul y Goiás, donde se produce más del 50% del

total de soja del país. El uso de AgMNPV en Paraguay también ha sido importante y, actualmente, representa unas 150000 ha anuales.

El virus ya es producido por varias empresas privadas bajo un convenio con la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA). El único método de producción del virus es en parcelas productoras de soja. Se realiza una aplicación del virus con una importante infestación de *A. gemmatalis* y posteriormente se recolectan las larvas infectadas. Éstas se almacenan en cámaras entre -4 y -8 °C, hasta el momento de su procesamiento y formulación. Se emplean alrededor de 30000 ha de soja para la producción del virus (Caballero *et al.*, 2001).

Problemas que limitan el uso de AgMNPV en nuestro país

El éxito del programa brasileño se debe a la conjunción de varios factores, que se resumen a continuación:

 Existencia previa de un exitoso MIP que facilitó la aceptación del virus por parte de los productores

 AgMNPV es altamente virulento de manera que sólo se requieren bajas dosis para controlar la plaga

 Las bajas dosis de aplicación en conjunción con el sistema de producción a campo, proveen un producto de menor costo que los insecticidas químicos y que se encuentra al alcance de agricultores de bajos recursos

 El follaje, que representa el alimento de *A. gemmatalis*, es fácilmente contaminado con AgMNPV

• En general es la única especie plaga de importancia económica presente en el cultivo

El cultivo puede tolerar niveles considerables de defoliación sin perder rendimiento

 El apoyo gubernamental, mediante extensionistas y vinculación con los productores, ha sido fundamental para el desarrollo exitoso del programa y para su aceptación por parte de los productores (Moscardi, 1999)

Si bien se han realizado aplicaciones preliminares del formulado viral en Argentina, Bolivia y Uruguay, su aplicación en la actualidad es despreciable (Moscardi, 1999).

En el caso particular de Argentina, en 1986 se iniciaron las experiencias tendientes a la producción y utilización del AgMNPV para el control de *A. gemmatalis* en cultivos de soja en Santa Fe y el NOA. Éstas fueron conducidas inicialmente por organismos oficiales y luego

por una empresa privada. La falta de control de calidad de las preparaciones virales y del ajuste en la metodología de aplicación de acuerdo a las diferentes dinámicas poblacionales en las distintas zonas ecológicas, influyeron en el fracaso del programa de incorporación de esta herramienta de biocontrol en el manejo de plagas de la soja (Sosa-Gómez y Moscardi, 1996). Sin embargo, lo que más limitó la utilización de AgMNPV, fue su baja velocidad de acción. Con temperaturas medias inferiores a las de Brasil (20 a 25°C, dependiendo de la región), el tiempo requerido por el virus para ejercer su acción letal es de 8-10 días, significativamente mayor que los 5-6 días registrados en Brasil. Como consecuencia de estas condiciones climáticas, el desarrollo de la planta también es más lento y, por consiguiente, el cultivo no es capaz de tolerar los niveles de defoliación producida por el insecto en el tiempo que transcurre entre la aplicación del virus y el cese de la alimentación, sin perder rendimiento. Además, las erupciones de insectos son más frecuentes.

Si se tienen en cuenta los beneficios económicos, ecológicos y sociales que ha generado la utilización de AgMNPV en Brasil, es de esperar que, si se logran superar los aspectos negativos que condujeron al fracaso de la aplicación de AgMNPV en Argentina, este virus constituya un excelente componente en una estrategia de MIP para un cultivo tan extendido como lo es el de la soja en nuestro país.

A modo de ejemplo, desde el comienzo del programa para el uso de AgMNPV implementado por EMBRAPA, se evitó la aplicación de más de 17 millones de litros de insecticidas químicos (Silva y Moscardi, 2002). Otro aspecto importante fue su contribución a un cambio en el tipo de insecticidas utilizados para el control de *A. gemmatalis* en soja. En el estado de Paraná, mediante estudios conducidos por agencias gubernamentales a lo largo de 5 zafras (1992/1993 a 1996/1997), se evidenció un cambio general en el perfil de sustancias empleadas, de insecticidas muy tóxicos de amplio espectro, al de productos basados en la utilización de AgMNPV en conjunción con reguladores de crecimiento de insectos.

Los beneficios se han extendido a zonas sojeras del litoral de nuestro país. En los últimos años, debido al intenso uso de AgMNPV en las regiones tropicales vecinas, se ha detectado una menor o tardía migración de las poblaciones de adultos hacia estas zonas más templadas y, por consiguiente, niveles inferiores de ataques en comparación con las temporadas anteriores (<u>www.e-campo.com</u>).

En este contexto se enmarcaron los objetivos del presente trabajo de Tesis Doctoral. A fin de abordar el problema de la acción lenta de AgMNPV, se planteó el desarrollo de un sistema eficiente para la generación de AgMNPV recombinantes con el propósito de introducir modificaciones genéticas que apuntaran a optimizar sus cualidades insecticidas.





CAPÍTULO 1

Elección de la secuencia de corte para la generación del recombinante AgMNPV-2D con sitios únicos de restricción.

INTRODUCCIÓN

Los baculovirus son insecticidas altamente específicos que no presentan toxicidad para organismos no blanco (Granados y Federici, 1986). Sin embargo, su aplicación como pesticidas microbianos no ha alcanzado su potencial en el control de plagas, con la excepción del virus de la poliedrosis nuclear del defoliador de la soja, Anticarsia gemmatalis MNPV (AgMNPV), que es aplicado sobre más de un millón de hectáreas en Brasil (ver "Sección I: Introducción"). Algunos de los problemas que han limitado el uso más extendido de los baculovirus incluyen su rango de hospedadores estrecho, tiempo letal medio extendido, dificultades técnicas y económicas en la producción comercial en cultivo celular, régimen de aplicación basado en monitoreos frecuentes, eficiencia a campo variable debido a condiciones climáticas, y actitudes de los productores frente al control de plagas, que se basa en la aplicación de insecticidas químicos de rápida acción (Moscardi, 1999).

La manipulación de los genomas de estos virus es una de las maneras en que se pueden estudiar en forma básica y aplicada. El método convencional para modificar los genomas de los baculovirus utiliza la recombinación homóloga. Para esto, primero se construye un plásmido que lleva la modificación deseada flanqueada por las secuencias virales del sitio blanco. La cotransfección de las células de insecto con el plásmido de transferencia y el DNA viral, genera virus recombinantes que han adquirido la modificación a través de la recombinación homóloga. Sin embargo, la proporción de recombinantes en la progenie viral es baja (1 a 0.1%) (Smith *et al.*, 1983; Martens *et al.*, 1995). Más aún, la mayoría de los recombinantes son simples recombinantes, en los que la totalidad del plásmido de transferencia se ha integrado al genoma viral (O'Reilly et al., 1992).

Una manera excelente de vencer esta limitante, es usar DNA viral que ha sido linealizado en el sitio blanco antes de la transfección (Kitts et al., 1990). Este tratamiento disminuye drásticamente la proporción de virus parental y de simples recombinantes en la progenie viral (ver figura 1.1). Uno de los métodos más utilizados para linealizar el DNA de los baculovirus, consiste en introducir sitios de restricción que no se encuentran en la secuencia salvaje del virus, en la región de interés del genoma viral. El DNA viral recombinante puede entonces ser linealizado por digestión con la enzima correspondiente. La presencia de múltiples sitios únicos de restricción incrementa la frecuencia de producción de recombinantes (Kitts y Possee, 1993; Martens *et al.*, 1995; Yang y Miller, 1998), probablemente porque se logra una linealización más completa del DNA viral cuando existen múltiples sitios (ver figura 1.1).



Figura 1.1. Objetivo de la inserción de sitios únicos de restricción en el genoma viral. En la parte izquierda de la figura se encuentra representada la producción de especies luego de una cotransfección con DNA viral circular. En la parte derecha se esquematiza una cotransfección en la que se utiliza DNA viral lineal, que presenta sitios únicos de restricción en la región de interés. Como se puede apreciar en la figura, el virus lineal sólo puede volver a ser circular (para así ser replicado) a través de dos eventos de recombinación homóloga con el plásmido de transferencia. Por esto la frecuencia teórica de recuperación de recombinantes es del 100%. El plásmido de transfección que se indica en la figura es sólo ejemplificador.

Dado que aún no se ha publicado la secuencia de AgMNPV-2D, la elección de una enzima de restricción que no digiriese su genoma se debió realizar de manera empírica. Para esto

se realizaron ensayos de restricción con DNA de AgMNPV-2D utilizando endonucleasas de corte poco frecuente. Esta característica (de corte poco frecuente) se debía al mayor número de pares de bases (pb) que abarcaban sus sitios de reconocimiento.

RESULTADOS

Con el fin de seleccionar una enzima de restricción que no cortase el genoma de AgMNPV-2D, para generar el recombinante con sitios únicos de restricción, se sometió su DNA a ensayos de restricción con las siguientes endonucleasas:

Enzima	Enzima Sitio de reconocimiento	
<i>Bsu</i> 36l	5´ CC ' TNAGG 3´	
	3´ GGANT <u>a</u> CC 5´	
Notl	5′ GC ^Y ggccgc 3′	
	3´ CGCCGG _A CG 5´	
I-Ppol	5´ CTCTCTTAA ' GGTAGC 3´	
	3′ GAGAG _A AATTCCATCG 5′	

El DNA digerido se marcó radiactivamente utilizando el fragmento Klenow y α [³²P]dATP (Sambrook *et al.*, 1989) y se resolvió en geles de agarosa de 0,3% y 2%, a fin de detectar con alta sensibilidad la presencia o ausencia de corte. Para identificar si las enzimas que se estaban ensayando presentaban sitios de corte en AgMNPV-2D, en cada digestión se incorporó la enzima *Bg/*II, cuyo patrón de digestión en AgMNPV-2D está publicado (ver figura 1.2) (Johnson y Maruniak, 1989). El razonamiento detrás de esto era que, si la enzima que se estaba analizando presentaba uno o más sitios de corte en AgMNPV-2D, esto generaría un patrón de restricción diferente al de *Bg/*II. Por esto, para cada enzima analizada, se digería el DNA de AgMNPV-2D solamente con *Bg/*II (para tener el patrón de referencia), con *Bg/*II y la enzima en estudio (para comparar este patrón con el de corte de la enzima).

A partir de estos ensayos se identificó la ausencia de corte de I-*Ppo*I, una enzima codificada en un intron (*intron encoded endonuclease*, Promega) cuyo sitio de reconocimiento abarca 15 pb, en el genoma salvaje de AgMNPV-2D. Las otras enzimas analizadas (*Not*I y *Bsu*36I) evidenciaron dos sitios de corte cada una (ver figura 1.2).
D

E

21914 17805



Figura 1.2. Patrón de restricción de AgMNPV-2D con *Bg/*II. Autorradiografías de las digestiones de AgMNPV-2D realizadas con *Bsu*36I, *Not*I e I-*Ppo*I. En la parte superior de la figura se encuentra una tabla que indica el patrón de restricción de AgMNPV-2D con *Bg/*II. En las autorradiografías, los fragmentos recuadrados en naranja corresponden a aquellos que evidenciaron sitios de corte de *Bsu*36I. Los fragmentos recuadrados en verde claro corresponden a aquellos que evidenciaron sitios de corte de *Bsu*36I. Los fragmentos recuadrados en verde claro la autorradiografía se indica qué enzima se estaba analizando (*Bsu*36I, *Not*I o I-*Ppo*I). En la parte inferior de las autorradiografías se encuentran las referencias correspondientes.

Las autorradiografías de la figura corresponden a las corridas electroforéticas realizadas en los geles 0.3%. No se incluyeron las autorradiografías correspondientes a los geles 2%, pero éstas confirmaban los datos presentados aquí.

En la figura, las dos autorradiografías de la izquierda corresponden al análisis que se hizo con *Bsu*36I. La diferencia entre ambas es el tiempo de exposición. Se incluyeron las dos autorradiografías para mostrar, a modo de ejemplo, cómo el tiempo de exposición puede evidenciar algunas bandas y entorpecer la visualización de otras, ya que esto mismo sucedió con las otras enzimas analizadas. Es así que la banda de aproximadamente 15 kb que aparece en la digestión de AgMNPV-2D solamente con *Bsu*36I, se aprecia mejor en la autorradiografía que estuvo expuesta durante más tiempo (la más interna de las dos), mientras que la banda que aparece en la digestión con *Bg/II+Bsu*36I, de aproximadamente 9 kb, se aprecia mejor en la autorradiografía que estuvo expuesta durante más tiempo (la más interna de las dos).

La autorradiografía que se encuentra en el centro de la figura corresponde al análisis que se hizo con *Not*I. En la digestión conjunta (*Bg*/II + *Not*I) aparecen dos bandas nuevas de 9 y 12 kb aproximadamente, y en la digestión con *Not*I únicamente, aparece solamente una banda nueva de aproximadamente 19 kb.

La autorradiografía de la derecha corresponde al análisis que se hizo con I-*Ppo*I. Como se puede apreciar en la digestión conjunta (*Bg*/II + I-*Ppo*I), el patrón de restricción es equivalente al de la digestión con *Bg*/II solamente. En la digestión de AgMNPV-2D con I-*Ppo*I no se observó ninguna banda nueva. Estos resultados indicaron que I-*Ppo*I no presentaba sitios de corte en AgMNPV-2D.

DISCUSIÓN

Este análisis del genoma de AgMNPV-2D fue lo suficientemente sensible como para identificar dos sitios de corte correspondientes a las enzimas *Bsu*36l y *Not*l y la ausencia de corte de la endonucleasa I-*Ppo*I, cuyo sitio de reconocimiento abarca 15 pb. Esto permitió continuar con los objetivos planteados para la presente tesis.



CAPÍTULO 2

Construcción del vector de transferencia de primera generación (pAg-I*Pp*ol): Introducción secuencial de sitios I-*Pp*ol en pAgPHZ3.

INTRODUCCIÓN

Para la construcción del vector de transferencia de primera generación (pAg-I*Ppo*I) se utilizó como plásmido base un vector construido por otro miembro del laboratorio (pAgPHZ3) (Arana *et al.*, 2002). En este último, se habían clonado 828 pb de las secuencias *upstream* del gen de poliedrina, que incluían a su promotor, y 883 pb de las secuencias *downstream* del mismo gen. Estas secuencias flanqueaban al gen *lacZ* de *E. coli* de 3736 pb, el cual se podía liberar por digestión con *Hin*dIII y *Bam*HI (ver figura 2.2).

La estrategia para la construcción de pAg-I*Ppo*I consistió en la introducción secuencial de dos sitios I-*Ppo*I flanqueando al gen *lacZ* de *E. coli*, a través de la digestión y posterior ligación del plásmido base con *adapters* que contenían sitios I-*Ppo*I.

RESULTADOS

Se diseñaron cuatro oligonucleótidos (U-H, L-H, U-B y L-B) que contenían la secuencia de restricción de I-*Ppo*I. **U-H y L-H** fueron hibridados para formar el **adapter I-H**. **U-B y L-B** fueron hibridados para formar el **adapter I-B** (Sambrook *et al.*, 1989; ver "Sección IV: Materiales y Métodos"). I-H fue diseñado de manera tal de poder ser ligado en el sitio *Hin*dIII de pAgPHZ3. Para esto, en sus extremos presentaba la secuencia del sitio *Hin*dIII. Sin embargo, estos sitios se perdieron en la ligación con el plásmido (ver figura 2.1). I-B fue diseñado para poder ser ligado en el sitio *Bam*HI. Con este fin, en sus extremos presentaba sitios *Bam*HI. En la ligación se conservó uno de los sitios *Bam*HI, mientras que el otro se perdió (ver figura 2.1).



Figura 2.1. Diseño de los oligonucleótidos y generación de los *adapters*.

Como se puede apreciar en la figura, los oligonucleótidos fueron diseñados de manera que los *adapters* correspondientes tuvieran extremos pegajosos (*sticky*). Esto permitió que los *adapters* fueran ligados directamente (sin necesidad de digerirlos previamente) al plásmido base digerido con la enzima adecuada.

En la **primer etapa** de la introducción secuencial de los sitios I-*Ppo*I en pAgPHZ3, este plásmido se digirió con *Hind*III y posteriormente se ligó el producto de esta digestión con el *adapter* correspondiente (I-H). Esta ligación se usó para transformar bacterias DH5- α . A partir de esta transformación se identificaron siete clones positivos (**pAg-IH**) por *colony blot* y PCR (ver figura 2.2).



Figura 2.2. Autorradiografía del colony blot realizado para identificar posibles colonias positivas. Las estrías con una clara señal positiva están indicadas con círculos amarillos. Aunque se observaron más estrías con una posible señal positiva, sólo se eligieron aquellas con mayor señal, ya que las de menor señal se podían deber a pegado inespecífico.

La estrategia utilizada para la introducción secuencial de los sitios I-*Ppo*I en pAgPHZ3 se encuentra esquematizada en la figura 2.3. Si se observa con detalle la secuencia del *adapter* I-H en la figura 2.3, se podrá apreciar que, en la ligación con pAgPHZ3, éste puede incorporarse de la manera esquematizada en la figura o exactamente al revés. Por esto, en la PCR diseñada para identificar los posibles clones recombinantes, se utilizaron ambos oligonucleótidos (U-H y L-H) en dos PCRs diferentes, como los *primers* (o cebadores) que hibridarían en la cadena superior (*upper*) de DNA. En ambas PCRs se utilizó phn-Back como el *primer* que hibridaría en la cadena inferior (*lower*) de DNA. En la figura también se puede ver que, luego de la ligación, no se reconstituyó ninguno de los sitios *Hin*dIII.

Previo a obtener la secuencia de los clones **pAg-IH** identificados por *colony blot*, la confirmación de los mismos por digestión con I-*Ppo*I resultó una tarea muy dificultosa, porque inicialmente esta enzima no los digería. Esto aportó muchos falsos negativos difíciles de establecer como tales. Sin embargo, y contrario a lo anticipado según la bibliografía publicada, se logró ajustar una condición experimental en la que la enzima funcionó satisfactoriamente (ver capítulo 3, Resultados y Discusión). Esto permitió demostrar que la ausencia de corte de los plásmidos pAg-IH se debía a una condición experimental inadecuada y no a la inexistencia del sitio de restricción o a mutaciones en el mismo.

En la **segunda etapa**, uno de los clones pAg-IH se digirió con **BamHI** y el producto de esta digestión se ligó con el *adapter* correspondiente (**I-B**). Aquí también el *adapter* I-B se podía ligar en cualquiera de los dos sentidos (ver figura 2.3). La ligación se usó para transformar bacterias DH5- α y se identificaron 6 colonias positivas por PCR. Como se puede observar en la figura 2.3, sólo uno de los sitios *Bam*HI se reconstituyó luego de la ligación. La identidad de los clones positivos (**pAg-I***Ppo***I**) se verificó por PCR, digestión enzimática y secuenciación (ver figura 2.3).



Figura 2.3. Construcción del vector de transferencia de primera generación (pAg-*IPpol*). En la parte superior de la figura se encuentra representada la primer etapa en la introducción secuencial de los sitios de corte de I-*Ppo*I en pAgPHZ3. Aquí, el *adapter* I-H generado previamente se ligó con pAgPHZ3 digerido con *Hin*dIII. Se obtuvieron 7 clones positivos identificados por *colony blot* y por PCR. Los cebadores utilizados en las PCRs fueron prom-i / prom-f, como PCR control [amplificaba secuencias del promotor de poliedrina (P_{polh}) en pAgPHZ3 y pAg-I*Ppo*I], prom-i / U-H (U-H identificaba secuencias del sitio I-*Ppo*I incorporadas en uno de los dos sentidos y prom-i identificaba secuencias de P_{polh}) y prom-i / L-H (L-H identificaba secuencias del sitio I-*Ppo*I incorporadas en el sentido opuesto y prom-i identificaba secuencias de P_{polh}). El control positivo de la PCR que amplificaba secuencias de P_{polh} en pAgPHZ3 y pAg-I*Ppo*I (prom-i / prom-f), fue pAgPHZ3. No existía control positivo para las reacciones de PCR que identificaban secuencias recombinantes (prom-i / U-H y prom-i / L-H).

Uno de los clones pAg-IH fue utilizado en la segunda etapa para generar la versión final del plásmido de transferencia. Para esto, pAg-IH primero se digirió con *Bam*HI y luego se ligó con el *adapter* I-B. Se obtuvieron 6 clones positivos (pAg-I*Ppo*I), identificados por PCR y digestión.

Las digestiones y/o PCRs confirmatorias de cada etapa se encuentran incluidas en la figura. Los fragmentos con su tamaño correspondiente se encuentran resaltados.

DISCUSIÓN

La primer etapa en la introducción secuencial de los sitios I-*Ppo*I en pAgPHZ3, que generó la versión previa pAg-IH, resultó un importante escollo en el desarrollo de este trabajo de tesis, debido a la falta de corte que presentó la endonucleasa I-*Ppo*I. Este problema presentaba dos aristas: la primera tenía que ver con la construcción de pAg-I*Ppo*I (plásmido de transferencia de primera generación) y la segunda, con la linealización del recombinante de AgMNPV-2D con sitios únicos I-*Ppo*I que se generaría a partir de este plásmido de transferencia. Si la causa de la ausencia de corte de I-*Ppo*I no lograba encontrarse y resolverse, se iba a tener que volver a las etapas iniciales: búsqueda de una enzima de restricción que no digiriera el genoma de AgMNPV-2D y las etapas subsiguientes correspondientes.

La ausencia de corte de I-Ppol podía deberse a dos factores: a la secuencia del plásmido (ausencia del sitio o mutaciones en el mismo) o a la enzima. La integridad de la endonucleasa I-Ppol se confirmó digiriendo un plásmido control provisto con la enzima [pGEM®-9Zf(-), que presenta sitios de corte de la misma]. Descartada esta posibilidad y dado que es una enzima que digiere con alta especificidad una secuencia de reconocimiento de 15 pb, inicialmente se especuló que la enzima no cortaba debido a que su sitio de reconocimiento tenía mutaciones puntuales en los clones pAg-IH. Se consideraba que eran mutaciones puntuales, ya que éstas no afectarían el pegado de la sonda en el ensayo de colony blot (que había identificado 7 colonias positivas) y tampoco impedirían su amplificación por PCR (las PCRs habían confirmado los resultados del colony blot). A pesar de la alta probabilidad de que fuera ésta la causa del problema y antes de continuar con la búsqueda de nuevos clones pAg-IH, se exploró la posibilidad de que la falta de corte se debiera a condiciones experimentales inadecuadas. Esto se hizo aunque las indicaciones del proveedor aseguraban que las condiciones recomendadas (que se habían utilizado en todos los ensayos de restricción realizados hasta el momento) eran las óptimas. Los resultados de estos ensayos permitieron confirmar que la ausencia de corte de I-Ppol se debía a condiciones de reacción inadecuadas (ver Capítulo 3).

Fue así que se resolvió la falta de corte de I-*Ppo*I y esto permitió continuar con los pasos siguientes de este trabajo de tesis. Esto también facilitó la segunda etapa en la introducción secuencial de los sitios de corte de esta enzima, en la que se utilizó uno de los clones pAg-IH como plásmido base. De esta manera se finalizó el plásmido de transferencia de primera generación, **pAg-I***Ppo*I.



CAPÍTULO 3

Optimización de la eficiencia de corte de I-Ppol.

INTRODUCCIÓN

En este Capítulo se describirán los diferentes ensayos que se realizaron para resolver la ausencia de corte de I-*Ppo*I, limitante encontrada en la primera etapa de la construcción del plásmido de transferencia de primera generación (pAg-I*Ppo*I). En la presente Introducción se hará un resumen de las características generales de las endonucleasas codificadas por intrones y, en especial, de las particularidades encontradas para I-*Ppo*I.

Las endonucleasas dirigidas o *homing endonucleases* pertenecen a una familia muy variada de proteínas encontradas en eucariotas unicelulares, *Archaea y Eubacteria*. La mayoría está codificada por marcos de lectura abiertos (ORFs) contenidos en intrones auto-empalmantes (*self-splicing*) del grupo I, otros se han encontrado en inteínas (proteínas intrónicas auto-empalmantes, *self-splicing protein introns*) y otros simplemente como ORFs independientes (*free-standing*) (Belfort y Roberts, 1997). Las endonucleasas dirigidas son capaces de promover la transferencia lateral - o *homing* - del intrón que contiene el marco de lectura abierto de la endonucleasa, a sitios blanco de 15 a 40 pb – *homing sites* - generando cortes de doble cadena en copias del sitio blanco que carecen del intrón móvil (Belfort y Roberts, 1997; Jurica y Stoddard, 1999; Dujon, 1989; Lambowitz y Belford, 1993; Muscarella y Vogt, 1989; Ellison y Vogt, 1993; Lowery *et al.*, 1992; Flick *et al.*, 1998). La reparación del corte de doble cadena implica la transferencia de una copia del intrón al alelo cortado y la interrupción del sitio blanco, haciéndolo así resistente a ciclos adicionales de corte (ver figura 3.1) (Belfort y Perlman, 1995).

CUANDO UN GEN QUE CONTIENE UN INTRÓN O UNA INTEÍNA SE ENCUENTRA CON UNA COPIA DEL MISMO GEN QUE NO TIENE (EL INTRÓN O LA INTEÍNA):



Figura 3.1. Esquema de la propagación de las endonucleases dirigidas. Estas endonucleasas están codificadas por elementos genéticos móviles, tales como los intrones del grupo I y las inteínas. Estos últimos (intrones del grupo I e inteínas) se propagan a través de la actividad de sus endonucleasas. Reconocen sitios que normalmente se encuentran en genes que no contienen intrones o inteínas, y allí producen cortes de doble cadena (*double-strand breaks* o DSBs). La reparación de estos DSBs, a través de la recombinación homóloga con un gen que contiene un intrón o una inteína, resulta en la inserción de un intrón o de una inteína en los sitios donde ocurrieron los DSBs. Figura adaptada de www.cellectis.com/homing.html. Estas endonucleasas dirigidas (*homing endonucleases*) han sido agrupadas en cuatro familias de acuerdo a los siguientes motivos de secuencias conservadas: LAGLIDADG, caja His-Cys (*His-Cys box*), GIY-YIG, y HNH. I-*Ppo*I fue el primer miembro identificado de la familia "Caja His-Cys". Está codificado por un intrón móvil del grupo I que se encuentra en el gen del rRNA 23S nuclear de *Physarum polycephalum* (Ellison y Vogt, 1993; Muscarella *et al.*, 1990; Muscarella y Vogt, 1989). Los motivos de secuencia de la "caja His-Cys" son responsables de la formación de dos sitios estructurales de unión a zinc por monómero. La actividad de esta enzima depende de cationes divalentes (generalmente magnesio). I-*Ppo*I es un homodímero que reconoce y corta una secuencia de 15 pb (5'-CTCTCTTAAGGTAGC-3'), dejando extremos 3' extendidos de simple cadena 5'-TTAA-3' (Ellison y Vogt, 1993; Lowery *et al.*, 1992; Wittmayer y Raines, 1996).

A diferencia de los sitios de restricción clásicos, los sitios *homing* admiten variaciones en muchas posiciones puntuales de la secuencia de reconocimiento. I-*Ppo*I requiere al menos 14 de las 15 pb de su secuencia de reconocimiento para unirse eficientemente y cortar y, en experimentos de *footprinting*, se vio que protege hasta cuatro pares de bases a ambos lados del sitio *homing* (de aquí en más llamadas **secuencia contexto**) (Flick *et al.*, 1998; Argast *et al.*, 1998). Aunque tolera sustituciones en varias posiciones de su sitio *homing*, I-*Ppo*I tiene una marcada preferencia por bases AT en las cuatro posiciones centrales.

Wittmayer *et al.* (1998) analizaron la especificidad de I-*Ppo*I. Ensayaron la actividad catalítica de I-*Ppo*I utilizando sitios de reconocimiento que presentaban mutaciones incluidas en la secuencia de las 23 pares de bases del *footprint*. Encontraron que I-*Ppo*I tolera cierto grado de degeneración en su sitio de reconocimiento, ya que pocas sustituciones puntuales impidieron que la enzima cortara el sitio. Muchas secuencias con dos sustituciones fueron cortadas con una eficiencia equivalente o levemente menor que la de la secuencia salvaje. En contraposición a las sustituciones, las inserciones o deleciones puntuales en el sitio de reconocimiento de I-*Ppo*I perjudicaron significativamente su actividad catalítica, indicando que era esencial un adecuado espaciamiento a lo largo de la interfase proteína-DNA para asegurar una adecuada actividad catalítica.

También encontraron que la secuencia contexto podía afectar la actividad de I-*Ppo*I. Las sustituciones puntuales no afectaron la actividad catalítica de I-*Ppo*I (esto es, fueron cortadas con la misma eficiencia que la secuencia salvaje). Adicionalmente, encontraron que se podía incrementar el efecto perjudicial de una sustitución puntual en el sitio de reconocimiento, cuando se lo combinaba con una sustitución en la secuencia contexto.

Sin embargo, las sustituciones múltiples en la secuencia contexto tenía efectos variados sobre la actividad catalítica de I-*Ppo*I. De las siete secuencias que presentaban

sustituciones múltiples en la secuencia contexto, cinco mostraron una reducción leve del clivaje (secuencias 15, 54 y 71) y dos mostraron una reducción moderada (secuencias 4 y 39). En el caso de **pAg-I***Ppo*I (el plásmido de transferencia de primera generación de este trabajo de tesis; Capítulo 2 de Resultados y Discusión), las sustituciones múltiples en la secuencia contexto disminuyeron dramáticamente la actividad catalítica de I-*Ppo*I (ver tabla 3.1).

Tabla 3.1. Efecto sobre la actividad catalítica de I-*Pp*ol que tienen las sustituciones en la secuencia contexto (tabla adaptada de la publicada por Wittmayer *et al.*, 1998).

	Nombre	Secuencia (5´⇒3´)	Reducción en la eficiencia de digestión de l- <i>Ppo</i> l
Sustituciones	salvaje	ATGACTCTCTTAAGGTAGCCAAA	Ninguna
multiples	34	T <mark>TGA</mark> CTCTCTTAAGGTAGC <mark>C</mark> TAA	Ninguna
	55	ATG <mark>T</mark> CTCTCTTAAGGTAGCCAAC	Ninguna
	15	ATG <mark>T</mark> CTCTCTTAAGGTAGCCA <mark>G</mark> A	Leve
	54	ATCACTCTCTTAAGGTAGCTAAA	Leve
	71	A <mark>GGACTCTCTTAAGGTAGC</mark> TAA	Leve
	4	G<mark>TGA</mark>CTCTCTTAAGGTAGCAAAG	Moderada
	39	T<mark>TG</mark>CCTCTCTTAAGGTAGCCAGA	Moderada
	pAg-l <i>Ppo</i> l	AGCTCTCTTAAGGTAGCAGCT	Muy significativa
Sustituciones	5	ATGT <mark>CTCTCTTAAGGTAGC</mark> CGAA	Ninguna
puntuales	67	ATG <mark>TCTCTCTTAAGGTAGC</mark> CAAA	Ninguna
	72	ATGA <mark>CTCTCTTAAGGTAGC</mark> CA <mark>G</mark> A	Ninguna

Nota: las cuatro bases en los extremos 5' y 3' indican la secuencia contexto. Las bases resaltadas en celeste indican la secuencia contexto salvaje aguas arriba (*upstream*). Las bases resaltadas en amarillo claro indican la secuencia salvaje del sitio de restricción. Las bases resaltadas en naranja claro indican la secuencia contexto salvaje aguas abajo (*downstream*). Las bases sustituidas están indicadas en negrita y no tienen color de fondo.

La reducción en la eficiencia de digestión de I-*Ppo*I, se basó en ensayos realizados con plásmidos incubados durante 1 h a 37°C en *buffer* 25 mM CAPS-CHES pH 10, 10 mM MgCl2, 1 mM DTT y la endonucleasa I-*Ppo*I (1.0 nM, 0.010 mM o 0.10 mM).

Estos resultados indicaron que las sustituciones múltiples en la secuencia contexto pueden regular la actividad catalítica de I-*Ppo*I. Pero en este trabajo de tesis, en contraste con las observaciones de Wittmayer *et al.* (1998), encontramos que una determinada combinación de sustituciones múltiples en la secuencia contexto, puede disminuir dramáticamente su capacidad de corte.

Por otro lado, se pudo superar esta limitación cambiando las condiciones de reacción respecto de las recomendadas por el proveedor de la enzima.

RESULTADOS

Estrategias para mejorar el desempeño de I-Ppol: Construcción de dos plásmidos

Se examinaron dos enfoques diferentes para mejorar el desempeño deficiente de I-*Ppo*I debido a secuencias contexto desfavorables. El primer enfoque se basó en la utilización de **pAg-I***Ppo*I (ver capítulo 2, Resultados y Discusión), que presentaba sitios I-*Ppo*I en un contexto desfavorable (ver figura 3.2), para encontrar una condición experimental en la que la enzima funcionara satisfactoriamente.



Figura 3.2. Secuencia contexto desfavorable de pAg-I*Ppo***I.** La figura indica la secuencia contexto desfavorable de ambos sitios I-*Ppo*I en pAg-I*Ppo*I.

El segundo enfoque se basó en la utilización de otro plásmido que habíamos construido (**pZ**-**IPpoI**), en el que se insertaron dos sitios I-*Ppo*I en una secuencia contexto favorable, de acuerdo a la información provista por Wittmayer *et al.* (1998). (ver figura 3.3).



Figura 3.3. Construcción de pZ-I*Ppo***I: inserción de una secuencia contexto favorable a los sitios I-***Ppo***I.** En la parte superior de la figura se encuentra representada la estrategia de PCR que se utilizó para la construcción de este plásmido. También está indicada la secuencia contexto favorable de los sitios I-*Ppo***I**. Se purificó el fragmento de amplificación correspondiente y se lo ligó en pZErO[™]-2 digerido con *Eco*RV en una relación inserto:vector 10:1. Luego se transformaron bacterias con esta ligación. Se obtuvieron 3 clones positivos.

Las digestiones y/o PCRs confirmatorias de cada fase se encuentran incluidas en la figura. Los fragmentos y sus tamaños correspondientes están resaltados.

Ensayos de restricción utilizando a pAg-I*Ppo*I como sustrato (secuencia contexto desfavorable)

Datos previos indican que I-*Ppo*I es óptimamente activa a pH básico (pH 10) (Lowery *et al.*, 1992) y que es levemente menos activa a pH más neutro (pH 7.5) (Wittmayer y Raines, 1996). Con el fin de encontrar una condición experimental en la que la enzima funcionara satisfactoriamente, ensayamos la capacidad de I-*Ppo*I de digerir el DNA de pAg-I*Ppo*I (sitios de restricción en una secuencia contexto desfavorable) en diferentes condiciones de pH y fuerza iónica (ver tabla 3.2).

Composición 1X del <i>buffer</i> de restricción ^(b)										
Nombre	рН	Tris- HCl	Tris- acetato	CAPS CHES	MgCl₂	acetato Mg	NaCl	ксі	acetato K	DTT
I	10.0			25	2					1
	7.9	10			10		50			1
	7.9	50			10		100			1
	7.9		20			10			50	1
	7.5	6			6		6			1
	7.5	6			6		50			1
	7.9	6			6		150			1
E	7.5	6			6		100			1
	7.5	90			10		50			
	7.5	10			7			50		1
	7.4	10			10			150		
	7.8		25			10			100	1

Tabla 3.2. Ensayo para determinar la capacidad de I-*Ppo*I de digerir a pAg-I*Ppo*I en *buffers* de diferente pH y fuerza iónica. ^(a)

^(a) pAg-I*Ppo*I fue digerido con I-*Ppo*I en las diferentes condiciones mencionadas en la tabla 3.2. La condición que resultó en ca. 100% de plásmido digerido, está resaltada en naranja claro (*buffer* E). La condición resaltada en verde claro indica al *buffer* I, en el que el plásmido no fue digerido a niveles detectables.

^(b) las concentraciones corresponden a mM.

En estos ensayos se encontró que la enzima funcionaba óptimamente en *buffer* E con una composición 1X de 6mM Tris-HCl, 6mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM DTT, pH 7.5, en oposición al buffer comercial provisto con la enzima por el fabricante, con una composición 1X de 25mM CHES, 25mM CAPS, 2mM MgCl₂, 1mM DTT and pH 10.0. La enzima no presentó actividad estrella bajo las nuevas condiciones experimentales.

Ensayos de restricción usando a pZ-I*Ppo*I como sustrato (secuencia contexto favorable)

En el caso de pZ-I*Ppo*I se buscaba confirmar que la presencia de una secuencia contexto favorable mejoraría la eficiencia catalítica de la enzima en la condición experimental indicada por el fabricante (*buffer* I). Esto fue confirmado por los resultados (ver figura 3.4).

También se apuntaba a analizar el desempeño de la enzima con pZ-I*Ppo*I como sustrato, en ambas condiciones experimentales (*buffers* E e I) y cambiando otras variables. Se vio que el

desempeño de I-*Ppo*I fue siempre mayor en *buffer* E, aunque satisfactorio en ambos *buffer* (ver figura 3.4).

Ensayos comparativos utilizando a pAg-I*Ppo*I y pZ-I*Ppo*I como sustratos: modificaciones en las variables tiempo, concentración de enzima y masa de DNA

Para confirmar que los resultados observados tanto en pAg-I*Ppo*I como en pZ-I*Ppo*I no se debían al efecto de diferentes factores tales como tiempo, cantidades de DNA y concentración de enzima, se realizaron ensayos adecuados para cada una de estas variables (ver figura 3.4) (remitirse a Materiales y Métodos para una descripción detallada de las diferentes condiciones de reacción).





Figura 3.4. Ensayos comparativos utilizando a pAg-I*Ppol* y pZ-I*Ppol* como sustratos. Las calles numeradas como 1 corresponden a pZ-I*Ppol* sin digerir. Las calles numeradas como 2 corresponden a pAg-I*Ppol* sin digerir. Aquellas numeradas como 3, al marcador λ /*Hind*III, y aquellas numeradas como 4 corresponden al marcador pcDNAII/*Hind*III+*Hinf*I. Los bloques de color celeste indican las reacciones en las que pAg-I*Ppol* fue utilizado como sustrato. Los bloques violeta claro indican las reacciones en las que pZ-I*Ppol* fue utilizado como sustrato. Los bloques naranja claro indican las reacciones llevadas a cabo en *buffer* E (nuevas condiciones experimentales). Los bloques verde claro indican las reacciones llevadas por el fabricante). En la parte superior de la fotografía, los triángulos de color amarillo claro indican las variaciones en tiempo, unidades de enzima (U enzima) o concentración de DNA. También se indican los paneles que corresponden a las diferentes condiciones de reacción.

pAg-I*Ppo*I digerido con I-*Ppo*I libera dos fragmentos de 3.7 kb (lacZ) y 4.6 kb (el resto del plásmido). pZ-I*Ppo*I digerido con I-*Ppo*I libera dos fragmentos de 0.9 kb (*DsRed1*, Clontech) y 3.3 kb (pZErO-2[™], Invitrogen).

<u>Nota</u>: En las reacciones en las que la concentración de DNA fue una variable se cargaron cantidades equivalentes en el gel (300 ng), aunque las cantidades (de DNA) en cada reacción fueron diferentes (las últimas 3 calles a la derecha).

Los objetivos de los diferentes ensayos fueron los siguientes:

Diferentes *buffers*: confirmar que I-*Ppo*I digería más eficientemente en *buffer* E (paneles 1 a 4 en la figura 3.4).

2. **Diferentes tiempos de incubación:** establecer una curva de actividad *vs* tiempo, a fin de observar cómo el tiempo afectaba la eficiencia de corte (paneles 1 a 4 en la figura 3.4)

3. **Diferentes cantidades de enzima:** asegurar que la mayor eficiencia de corte no se debía a un exceso de enzima (paneles 5 y 6 en la figura 3.4)

4. **Diferentes concentraciones de DNA:** asegurar que la eficiencia de corte de I-*Ppo*I en *buffer* E era independiente de la concentración de DNA (paneles 7 y 8 en la figura 3.4). Una unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para digerir completamente 1 μ g de DNA del plásmido control de I-*Ppo*I (provisto por el fabricante) en 1 h a 37°C, en una reacción de 50 μ I con el buffer recomendado por el fabricante y BSA acetilada a una concentración final de 0.1 mg/ml.

Los resultados de estos ensayos confirmaron nuestros resultados iniciales.

Las variaciones en el tiempo de incubación y en las condiciones de buffer para ambos plásmidos (pAg-IPpol y pZ-IPpol), arrojaron los siguientes resultados: En el caso de pAg-**IPpol**, un tiempo extendido de reacción aumentaba la eficiencia de corte de I-Ppol en buffer E pero no tenía ningún efecto en buffer I. Esto es, cuando el ensayo se realizó en la condición experimental recomendada por el fabricante (buffer I), un incremento en el tiempo de reacción no fue una condición suficiente para superar el efecto perjudicial de la secuencia contexto desfavorable. En el caso de **pZ-IPpol**, el desempeño de la enzima fue óptimo en buffer E y, en esta condición experimental, un incremento en el tiempo de reacción no tuvo efecto sobre su desempeño. Esto es, en una secuencia contexto favorable, la nueva condición experimental (buffer E) fue condición suficiente para asegurar un desempeño óptimo de la enzima, y un aumento en los tiempos de reacción no tuvo efecto visible sobre el mismo. Sin embargo, cuando pZ-IPpol se digirió en buffer I, el desempeño de la enzima no fue óptimo (en comparación con su desempeño en buffer E) y un incremento del tiempo de reacción mejoró su eficiencia de corte. Esto es, en una secuencia contexto favorable y la condición experimental indicada por el fabricante (buffer I), fue necesario un incremento en el tiempo de reacción para optimizar el desempeño de la enzima.

Los ensayos en los que se varió la concentración de enzima y la cantidad de DNA fueron realizados en la nueva condición experimental (*buffer* E). Una variación en la **concentración de enzima** arrojó los siguientes resultados: En el caso de **pAg-I***Ppo***I**, la frecuencia de corte de la secuencia blanco de I-*Ppo*I aumentó progresivamente con un aumento del número de unidades de enzima. Esto es, en una secuencia contexto desfavorable eran necesarias más unidades de enzima para asegurar un corte más eficiente. En el caso de **pZ-I***Ppo*I el desempeño de la enzima fue siempre óptimo. Esto es, en una secuencia contexto favorable, el corte fue eficiente aún con la menor cantidad de enzima ensayada.

Con respecto a los ensayos en los que se varió la **concentración de DNA**, se vio, tanto para **pAg-I***Ppo***I** como para **pZ-I***Ppo***I**, que los cambios en esta variable no afectaban el desempeño óptimo de I-*Ppo*I. En estos ensayos la enzima fue agregada en exceso (18 U). Esto es, en secuencias contexto favorables y desfavorables el desempeño de I-*Ppo*I (en exceso con respecto a la definición de unidad de enzima) es independiente de variaciones en la masa de DNA.

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se vio que las sustituciones múltiples en las secuencias contexto podían disminuir significativamente la eficiencia de corte de I-*PpoI*. Sin embargo, también se encontró que esta limitación podía ser superada cambiando las condiciones de reacción.

En el análisis comparativo de la actividad catalítica de I-*Ppo*I sobre su sitio blanco en una secuencia contexto favorable y otra desfavorable, se encontró que I-*Ppo*I siempre digería más eficientemente en condiciones de pH más neutras (pH 7.5) que lo recomendado como óptimo (pH 10).

Estos resultados sugieren que el pH y la concentración de NaCl del *buffer* E, probablemente afectan la estructura de la enzima de tal manera que las interacciones DNA-proteína, esenciales para que haya reconocimiento y corte, están restringidas a la secuencia de reconocimiento de 15 nucleótidos. A la inversa, el *buffer* I (provisto con la enzima por el fabricante), de alto pH y nula concentración salina, extendería el sitio blanco de 15 nucleótidos, incluyendo secuencias adicionales flanqueantes como requisito para cortar eficientemente. Estos resultados se corresponderían con aquellos publicados por Wittmayer y Raines (1996), quienes encontraron que la interacción DNA / I-*Ppo*I se debilita en presencia de concentraciones crecientes de cationes monovalentes.

Los ensayos en los que se variaron los factores tiempo, cantidad de enzima y concentración de DNA, permitieron alcanzar algunas conclusiones generales.

En cuanto a la **secuencia contexto desfavorable** y la condición experimental indicada por el fabricante (*buffer* I), un incremento en el tiempo de incubación no fue suficiente para mejorar el desempeño de I-*Ppo*I. Sin embargo, bajo la nueva condición experimental (*buffer* E), un incremento en el tiempo de reacción y en la cantidad de enzima, mejoraron el desempeño de I-*Ppo*I.

Por otro lado, en presencia de una **secuencia contexto favorable** y la condición experimental recomendada por el fabricante (*buffer* I), un incremento en el tiempo de incubación mejoró el desempeño de I-*Ppo*I. Sin embargo, bajo la nueva condición experimental (*buffer* E), el desempeño de la enzima siempre fue óptimo y, consecuentemente, éste no se vio afectado visiblemente por variaciones en el tiempo de incubación y en la cantidad de enzima.

Tanto en presencia de secuencias contexto favorables como desfavorables y la nueva condición experimental (*buffer* E), variaciones en la **concentración de DNA**, con un exceso de enzima, no tuvieron efectos visibles sobre el desempeño de la misma.



CAPÍTULO 4

Aislamiento del virus recombinante AgMNPV-2D con sitios únicos de restricción (AgMNPV-I*Ppo*I)

Finalizada la construcción del vector de transferencia de primera generación, pAg-I*Ppo*I, el paso siguiente era la generación del virus recombinante con sitios únicos de restricción (AgMNPV-I*Ppo*I), a través de la cotransfección en células de insecto de AgMNPV-2D y el plásmido de transferencia (pAg-I*Ppo*I).

CAPÍTULO 4. PARTE A.

Primera etapa de la purificación y caracterización de los AgMNPV-I*Ppol* aislados.

INTRODUCCIÓN

Como ya se ha mencionado, el método clásico para introducir cambios dirigidos en el genoma de un baculovirus es a través de la recombinación homóloga con un vector de transferencia. En este caso, la recombinación homóloga ocurriría entre AgMNPV-2D y pAg-I*Ppo*I. Dos eventos de recombinación homóloga intercambiarán las secuencias en el plásmido de transferencia por las del DNA viral salvaje, generando así un doble recombinante. Un único evento de recombinación homóloga integra la totalidad del plásmido de transferencia al genoma viral, generando un simple recombinante. Normalmente, los virus recombinantes representan 0.1% - 1% de la población viral y la mayor proporción corresponde a simples recombinantes (ver figura 4.1).



Figura 4.1. Posibles eventos de recombinación homóloga después de una cotransfección. La figura indica, a modo ejemplificador, las diferentes especies resultantes del ensayo de cotransfección entre el DNA de AgMNPV-2D (el gen de poliedrina está resaltado en verde) y el DNA de pAg-I*Ppo*I. En este último, el gen marcador *lacZ* (resaltado en celeste) se encuentra flanqueado por las secuencias no-codificantes *upstream* (UP) y *downstream* (DW) del gen de poliedrina.

Se produce una sustitución alélica cuando ocurren dos eventos independientes de recombinación homóloga entre ambas moléculas (AgMNPV-2D y pAg-I*Ppo*I): uno en cada una de las regiones de DNA viral que están flanqueando al gen heterólogo en el plásmido de transferencia y al gen de poliedrina en el virus. En este caso, la especie resultante será un doble recombinante. Sin embargo, es mucho más alta la probabilidad de que ocurra un solo evento de recombinación homóloga. Es así que las especies más comunes que se encuentran en la progenie viral son simples recombinantes, en los que se ha integrado la totalidad del plásmido de transferencia. Dependiendo en cuál de las regiones virales flanqueantes ocurra el único evento de recombinación homóloga, se producirá un simple recombinante UP o DW. En estas especies, un segundo evento de recombinación intramolecular es altamente probable debido a la repetición de secuencias homólogas. Dependiendo de dónde ocurra el segundo evento de recombinación (esta vez, intramolecular), el simple recombinante dará lugar a una verdadera sustitución alélica (esto es, a un doble recombinante) o revertirá al virus parental.

La metodología propuesta por O'Reilly *et al.* (1992) para el análisis y selección de los recombinantes obtenidos a partir de los ensayos de cotransfección, establece dos procedimientos posibles, el ensayo de placas y la dilución terminal (*end-point dilution*). Esta última consiste en la inoculación de múltiples cultivos celulares con diferentes diluciones del sobrenadante de cotransfección, hasta encontrar aquella en la que haya un único cultivo infectado. Se asume que en esta última hay un clon viral.

En cuanto al método del ensayo de placas, se infectan células con diferentes diluciones del sobrenadante de cotransfección. Luego se cubre a las monocapas celulares infectadas con medio solidificado, para poder observar el desarrollo de las placas de lisis. La selección de los posibles recombinantes se basa en una cuidadosa y crítica selección visual de las placas de lisis, que generalmente depende de un fenotipo determinado (ver "Sección IV: Materiales y Métodos"). Se asume que cada placa de lisis aislada ha sido generada por un único clon viral. Este tipo de selección presenta dos grandes desventajas: por un lado y como ya se ha mencionado, un sólo evento de recombinación es mucho más probable que dos, y, por el otro, simples y dobles recombinantes poseen el mismo fenotipo. Cabe aclarar que, aunque los simples recombinantes también poseen el fenotipo parental, éste muchas veces está encubierto por el fenotipo recombinante. Ambas desventajas implican que, de la totalidad de las placas de lisis seleccionadas, la mayoría no tendrá el genotipo deseado.

El procesamiento de las placas de lisis propuesto por O'Reilly *et al.* (1992) para su análisis por PCR, requiere una amplificación previa por cultivo celular de 2 a 3 días, y, en nuestra experiencia, los resultados fueron inconsistentes. Por esta razón no se utilizó esta metodología en las siguientes etapas del plan de investigación.

Alternativamente, las posibles placas recombinantes pueden ser sometidas a posteriores rondas de amplificación por cultivo celular para aislar su DNA y así poder analizarlo por ensayos de restricción y PCR. La ventaja que presenta el análisis por PCR de estos extractos de DNA, es que el grado de pureza de los mismos implica que los resultados serán inequívocos. La desventaja que presenta este procedimiento, es que demanda más tiempo (aproximadamente diez días).

En esta primer etapa, se eligió la última metodología descripta ya que no se contaba con una más adecuada y, aunque implicara más tiempo, se priorizó la confiabilidad de los resultados. Dadas las limitaciones inherentes al trabajo en cultivo celular, se podían elegir pocas placas por ensayo para realizar reaislamientos por placa y, si las elecciones (al azar, excepto por el fenotipo) resultaban incorrectas, se debía comenzar a reaislar nuevas placas luego de semanas de trabajo infructuoso.

RESULTADOS

Trabajando según el esquema tradicional, los DNAs purificados de AgMNPV-2D y de pAg-I*Ppo*I se cotransfectaron en células de insecto de acuerdo al siguiente esquema (la lista y nomenclatura de las cotransfecciones mencionadas en este Capítulo se encuentra en la "Sección VI: Apéndice"):

	COTRANSFECCI	medio sin	Tfx™-10	Vf	
Nº	AgMNPV-2D	pAg-I <i>Ppo</i> I	suero		
1	440 μl ~4 μg	5 μl ~5 μg	249 μl	6 μl	700µl
2	200 μl ~2 μg	10 μl ~10 μg	484 μl	6 μl	700µl
3	200 μl ~2 μg	10 μl ~10 μg	487.5 μl	2.5 μl	700µl
4	Control (-) sir	700 μl	-	700µl	

Se ensayaron diferentes relaciones de DNA (viral y plasmídico) y lípidos catiónicos para optimizar la eficiencia de la cotransfección. La que produjo mayor proporción de recombinantes fue la Nº 2.

Los sobrenadantes de cotransfección se cosecharon a los seis días post-cotransfección. Posteriormente, se infectaron monocapas de células de insecto con diferentes diluciones del sobrenadante de cotransfección. En este caso, el fenotipo recombinante se visualizaba mediante la hidrólisis del X-gal que se agregaba a las monocapas infectadas. Esta reacción era catalizada por la β -galactosidasa codificada por el gen *lacZ* de *E. coli* que presentaban las especies recombinantes. Las formas hidrolizada y no hidrolizada de X-Gal son azul e incolora, respectivamente. Cuando se comenzaron a visualizar las placas de lisis, se picaron las placas más aisladas que presentaban el fenotipo recombinante (placas de lisis azules). Éstas se sometieron a tres reaislamientos sucesivos por placa.

Por último, se tituló el producto de elución de una placa azul resultante del tercer pasaje. Se extrajo el DNA viral correspondiente (mediante el método *miniprep*; ver "Sección IV: Materiales y Métodos") y se lo sometió a ensayos de PCR y de restricción con diferentes enzimas (*Hin*dIII, *Bam*HI e I-*Ppo*I). Los resultados demostraron que se trataba de un simple recombinante UP que resultó ser mucho más estable que lo esperado, en función de la bibliografía publicada (ver Parte 4.b).

DISCUSIÓN

En esta primer etapa se aisló un simple recombinante con sitios únicos de restricción (SR-*IPpoI*). Considerando que estas especies normalmente se resuelven en una única ronda de amplificación por cultivo celular (a parental, a doble recombinante o a una mezcla de ambos), este resultado fue totalmente inesperado, ya que el sobrenadante de esta cotransfección había sido sometido a cuatro rondas de aislamiento (equivalentes a amplificaciones por cultivo celular) y SR-*IPpoI*, en particular, a tres rondas de amplificación posteriores.

A pesar de su inusual estabilidad, SR-I*Ppo*I no iba a poder ser utilizado como virus parental para la generación de futuros recombinantes, debido a que su genoma había incorporado la totalidad del plásmido de transferencia. La repetición de regiones homólogas y las secuencias del plásmido base (pBS) en su genoma, implicaban un alto grado de incertidumbre en cuanto a la posible estructura genómica de las especies resultantes de esas cotransfecciones. Sin embargo, debido a su inusual estabilidad se decidió seguir analizándolo.

CAPÍTULO 4. PARTE B.

Evaluación de la estabilidad del simple recombinante AgMNPV-2D con sitios únicos de restricción (SR-I*Ppo*I).

INTRODUCCIÓN

En esta parte del Capítulo 4 se describe el análisis que se realizó de la estabilidad de SR-I*Ppol*. Para esto, se hicieron diez pasajes sucesivos por cultivo celular, se extrajo el DNA viral de cada uno y se los digirió con el fin de comparar sus patrones de restricción. También se realizó un ensayo de *Southern blot* sobre estas especies digeridas.

En esta Introducción se hace un resumen de algunos de los fenómenos observados en baculovirus, principalmente en cultivo celular, que ayudan a comprender las conclusiones que se presentan al final.

Lo que se describe en la literatura y que se ha mencionado previamente, es que la vida media de un simple recombinante es muy corta dado que, por recombinación intramolecular de las secuencias homólogas repetidas, se espera que vuelva a su genotipo parental (en este caso, AgMNPV-2D), que se convierta en un doble recombinante o que en la población de la progenie se alcance un equilibrio entre los dos genotipos mencionados (Kitts, 1996). Sin embargo, los eventos de replicación y recombinación homóloga, que se encuentran íntimamente relacionados pero de los cuales se conoce poco, son muy complejos e involucran muchos procesos que ocurren naturalmente y que alejan los resultados plausibles de este esquema (para un análisis más detallado ver "Sección I: Introducción" y Capítulo 13 de Resultados y Discusión). Entre ellos, la recombinación, mutación y/o transposición son eventos comunes en los baculovirus. La transposición podría ser responsable de la presencia de 20 o más genes de probable origen eucariótico y procariótico encontrados en los genomas de baculovirus (Blissard y Rohrmann, 1990; Hayakawa *et al.*, 2000; Kuzio *et al.*, 1999; Possee y Rohrmann, 1997). También se ha observado la integración de DNA plasmídico al DNA de AcMNPV a través de recombinación no homóloga en cultivo celular (Wu et al., 1999). La recombinación entre diferentes especies de baculovirus con alta a moderada homología a nivel de secuencia, se ha observado en cultivos de células de insecto (Croizier y Ribeiro, 1992; Hajós et al., 2000; Kondo y Maeda, 1991; Lee y Miller, 1979; Muñoz et al., 1997; Smith y Summers, 1980; Summers et al., 1980) y en larvas (Merryweather-Clarke et al., 1994; Muñoz et al., 1997). La proliferación de partículas defectivas interferentes (DIs) luego del pasaje seriado de baculovirus a altas multiplicidades de infección (MOIs), también sugiere que la recombinación es un evento frecuente (Kool *et al.*, 1991; Pijlman *et al.*, 2001; Wickham *et al.*, 1991).

Cambios genómicos producidos en los baculovirus por pasaje seriado en cultivo celular

El pasaje seriado de baculovirus en cultivo celular conduce a importantes cambios genómicos (Miller, 1986). El mutante más común y de rápida acumulación que se ha detectado, es el que cambia de un fenotipo salvaje de muchos poliedros por célula (MP) a uno de pocos poliedros por célula (FP). Estos mutantes se caracterizan por producir pocos poliedros, ocluir muy pocas nucleocápsides y liberar una cantidad más elevada de viriones brotantes (BVs), entre otros (MacKinnon et al., 1974; Hink y Strauss, 1976; Potter et al., 1976; Fraser y Hink; 1982; Slavicek et al., 1992; Harrison y Summers, 1995b). Como consecuencia de un incremento en la producción y liberación de BVs, los mutantes FP pasan a formar el virus predominante después de pocos pasajes por cultivo celular. Los mutantes FP se han descripto en varios baculovirus, incluyendo AcMNPV (Hink y Vail, 1973), TnMNPV (Potter et al., 1976), GmMNPV (Fraser et al., 1983), LdMNPV (Slavicek et al., 1992), OpMNPV (Russell y Rohrmann, 1993) y HaSNPV (Chakraborty y Reid, 1999). Las causas genéticas para la existencia del fenotipo mutante FP son variadas. Sin embargo, todas las que se han estudiado hasta el momento, involucran la deleción o mutación de genes que están implicados en la formación de poliedrina o en la oclusión de viriones (Fraser et al., 1983; Fraser, 1987; Bischoff y Slavicek, 1997).

Se han identificado mutaciones frecuentes dentro de una región específica (unidades de mapa [m.u.] 35 a 37) en los mutantes FP de AcMNPV (Beames y Summers, 1988, 1989; Fraser *et al.*, 1983) y de GmMNPV (Fraser *et al.*, 1985, 1983). Esta región contiene al gen *25K FP*, que codifica para una proteína de 25 kDa esencial para la oclusión de viriones y la formación de poliedros (Beames y Summers, 1988, 1989; Wang *et al.*, 1989). La mayoría de las mutaciones FP fueron detectadas por análisis de restricción y se correlacionaron con grandes inserciones de DNA del hospedador o con deleciones del genoma viral (0,1-2,8 kb) (Beames y Summers, 1988, 1989; Fraser *et al.*, 1985, 1983; Wang *et al.*, 1989). Las mutaciones FP de LdMNPV fueron excepciones a esto (Bischoff y Slavicek, 1997; Slavicek *et al.*, 1995). Estos mutantes de LdMNPV presentan las características fenotípicas de los mutantes FP; sin embargo, el análisis de restricción no correlacionó el fenotipo FP observado con inserciones o deleciones de DNA que pudieran ser detectadas por este método. Bischoff y Slavicek (1997) más tarde reportaron inserciones de 1 pb o pequeñas

deleciones (8 a 24 pb) en el gen *25K FP* de los mutantes FP de LdMNPV, sugiriendo que el mecanismo de mutación en LdMNPV podría ser diferente al de AcMNPV.

Otros mutantes en la formación de poliedros

Se han descripto cuatro mutantes en la formación de poliedros (PFMs) de AcMNPV, que contienen mutaciones puntuales o inserciones en el gen de poliedrina. Células infectadas con el mutante m-29 de AcMNPV, generan pequeñas partículas formadas por la proteína poliedrina que carecen de una matriz paracristalina (Duncan y Faulkner, 1982; Duncan *et al.*, 1983; Carstens *et al.*, 1987). El mutante m-5 produce pocos poliedros cuboides y anormalmente grandes en células infectadas, y estos prácticamente carecen de nucleocápsides virales (Brown *et al.*, 1980; Carstens, 1982; Carstens *et al.*, 1986). Células infectadas con el mutante M276 generan pequeñas condensaciones amorfas de poliedrina, tanto en el núcleo como en el citoplasma (Carstens *et al.*, 1992). Células infectadas con M934 generan grandes masas amorfas de poliedrina que carecen de una envoltura poliédrica normal (Carstens *et al.*, 1992). Tanto M276 como M934 generan poliedros cuboides virales.

Genes involucrados en la oclusión de viriones y formación de poliedros

Es muy probable que la oclusión de viriones y formación de poliedros sean procesos complejos que involucran varios genes virales. Cualquier gen necesario para llevar a cabo procesos virales básicos, tales como la replicación y la transcripción, también lo es para la formación de poliedros y oclusión de viriones. Algunos genes virales tales como poliedrina y *25K FP* codifican para proteínas específicas para la formación de poliedros y oclusión de viriones. Algunos y rales específicas para estos procesos.

El gen 25K FP es esencial para una correcta formación de poliedros y oclusión de viriones, y su deleción genera el fenotipo mutante FP (Beames y Summers, 1988, 1989). En años recientes, se han realizado estudios para determinar el rol de la proteína de 25 kDa en el ciclo de infección de los baculovirus. Sin embargo, los estudios que se han realizado para dilucidar la función de esta proteína no son concluyentes (Beniya *et al.*, 1998; Braunagel *et al.*, 1999; Harrison y Summers, 1995a, b). Se ha demostrado que la proteína 25K FP es una proteína estructural tanto en las nucleocápsides de los BV como en los viriones ocluidos (ODV), pero que una importante fracción de las proteínas 25K FP permanece en el citoplasma a lo largo de la infección (Braunagel *et al.*, 1999; Harrison y Summers, 1995a). Es poco clara la relación entre la localización del producto génico de 25K FP y el fenotipo

causado por las mutaciones de este gen. Considerando los efectos variados que produce su mutación, es plausible especular que tiene más de una función durante la invasión y el proceso de infección. Otros estudios también sugieren que la proteína 25K FP podría ser necesaria para una eficiente acumulación y tráfico de proteínas a través de la regulación de la transcripción, estabilidad del mRNA, traducción o estabilidad de una o muchas proteínas virales modificadas, lo cual directa o indirectamente afecta la morfogénesis de la oclusión (Beniya *et al.*, 1998; Braunagel *et al.*, 1999).

La proteína poliédrica de envoltura (PEP) y p10 están involucradas en la formación de poliedros o forman parte del poliedro. PEP es un componente mayoritario de la envoltura poliédrica, y el gen que codifica para esta proteína está presente en LdMNPV, AcMNPV y OpMNPV (Whitt y Manning, 1988; Gombart *et al.*, 1989; Russell y Rohrmann, 1990; Bjorson y Rohrmann, 1992). Sin embargo, la deleción del gen *PEP* de los genomas de AcMNPV y OpMNPV, produjo virus capaces de generar poliedros y de ocluir nucleocápsides virales (Zuidema *et al.*, 1989; Gross *et al.*, 1994). P10 también se encuentra en el poliedro, y es necesaria para una formación normal de la envoltura poliédrica (Vlak *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1989). Sin embargo, la deleción del gen *p10* de los genomas de AcMNPV y OpMNPV, tampoco impidió la formación de poliedros a niveles salvajes ni la oclusión de viriones (Rohrmann, 1992; van Oers *et al.*, 1993).

Coeficientes de selección: una herramienta para la estimación de la aptitud fenotípica y replicativa de las cepas modificadas en presencia de las parentales

La estimación de coeficientes de selección cuando se co-cultivan cepas parentales y modificadas bajo condiciones *standard* de cultivo celular, puede ser un indicador útil del efecto que tienen las alteraciones genéticas introducidas sobre la aptitud fenotípica y el éxito replicativo del genotipo modificado en presencia del progenitor. Un análisis detallado del proceso de selección en co-infecciones seriadas de cultivos celulares con AcMNPV-E2 salvaje y Ac-360-β-gal (una especie recombinante de AcMNPV equivalente a un doble recombinante AgMNPV-I*PpoI*), demostró que la cepa salvaje era claramente dominante sobre la cepa genéticamente modificada, aún cuando inicialmente constituía el componente minoritario del inóculo (Huang *et al.*, 1991).

RESULTADOS

Después de aislar el simple recombinante (SR-IPpol), se analizó su variabilidad genética a través de diez pasajes seriados por cultivo celular. En la etapa en la que se realizaron estos ensayos ya se había aislado el doble recombinante AgMNPV-IPpol (aguí llamado DR-IPpol, para facilitar la nomenclatura de las especies de este Capítulo), por lo tanto se lo incluyó (en los ensayos) con fines comparativos. Se extrajo el DNA viral de cada uno de los 10 pasajes seriados y se lo sometió a análisis de restricción. Los resultados indicaron que SR-IPpol persistía y que alcanzaba un equilibrio con el doble recombinante (DR-IPpol), ya que las bandas nuevas que aparecieron correspondían a las esperadas para los simples y dobles recombinantes (ver figura 4.2). La presencia de AgMNPV-2D (parental) en los pasajes seriados de SR-IPpol no se detectó por este método. Estos datos fueron confirmados por un Southern blot que se realizó con digestiones del segundo y décimo pasajes de SR-IPpol con HindIII (figura 4.2). Como controles se incorporaron AgMNPV-2D y DR-IPpol digeridos con HindIII. La sonda hibridó en los fragmentos característicos de AgMNPV-2D (banda G de 7262 pb), DR-IPpol (banda nueva de 10149 pb) y SR-IPpol (banda nueva de 15539 pb). En el pasaje 10 del simple recombinante, se observó un leve pegado inespecífico de la sonda a diferentes alturas. Sorprendió la ausencia de la cepa parental en ambos pasajes (2do. y 10mo.) de SR-IPpol. Estos resultados indicarían que la cepa no modificada (AgMNPV-2D) estaría en desventaja selectiva frente a co-infecciones en cultivo celular con las cepas modificadas SR-IPpol y DR-IPpol.

FRAGMENTO	Wt/HindIII	DR/HindIII	SR/HindIII
А	19232	19232	19232
В	16446	16446	16446
С	9942	9942	9942
D	8976	8976	8976
E	8540	8540	8540
F	8356	8356	8356
G	7262	10194	15539
Н	6164	6164	6164
Ι	5517	5517	5517
J	4967	4967	4967
K	4080	4080	4080
L	3477	3477	3477
М	3443	3443	3443
N	3222	3222	3222
0	3214	3214	3214
Р	2841	2841	2841
Q	2512	2512	2512
R	2381	2381	2381
S	2381	2381	2381
Т	2267	2267	2267
U	2114	2114	2114
V	2114	2114	2114
W	2104	2104	2104
Х	1082	1082	1082
Y	337	337	337



Figura 4.2. Análisis de la estabilidad genómica del simple recombinante (SR-I*Ppol*). En la parte superior de la figura se encuentran los patrones de restricción con *Hin*dIII de AgMNPV-2D y de los simples y doble recombinantes (ver Capítulo 6 de Resultados y Discusión para un análisis detallado del cálculo). El fragmento resaltado en verde claro corresponde a la banda G de AgMNPV-2D, adonde se está dirigiendo la modificación (wt). La banda resaltada en celeste corresponde a la banda nueva que aparece en el doble recombinante AgMNPV-I*Ppo*I (DR). La banda resaltada en rojo corresponde a aquella que aparece en los simples recombinantes AgMNPV-I*Ppo*I (SR).

La fotografía de la izquierda muestra las digestiones con *Hin*dIII de los diferentes clones recombinantes de AgMNPV y de la cepa salvaje (AgMNPV-2D). La fotografía de la derecha corresponde a un *Southern* hecho a partir del mismo gel 0.6% y marcado con una sonda específica para la zona *downstream* del gen de poliedrina. La numeración de las calles es equivalente a la de la otra fotografía. Los fragmentos característicos y sus tamaños respectivos se encuentran resaltados en ambas fotografías (y unidos por líneas del mismo color).

Los colores de las fotografías y de la tabla se corresponden.

<u>Referencias</u>: **Wf** = salvaje, fragmento G en <u>color verde</u>; **DC** = doble recombinante, fragmento nuevo en <u>color celeste</u>; **SC** = simple recombinante, fragmento nuevo en <u>color rojo</u>.

DISCUSIÓN

Después de aislar el simple recombinante (SR-I*Ppo*I), se analizó su estabilidad genética a través de pasajes seriados por cultivo celular. La recombinación intramolecular esperada entre secuencias virales homólogas repetidas produciría dos especies virales: la parental (en este caso, salvaje o no modificada, AgMNPV-2D) y la doble recombinante (en este caso, DR-I*Ppo*I); además, si no ocurriera recombinación homóloga se mantendría la especie SR-I*Ppo*I. De acuerdo a los resultados de Huang *et al.* (1991), se esperaría que la cepa parental se vuelva progresivamente dominante. Estos autores mostraron que el proceso de selección favorece a la cepa no modificadas en un gen no esencial para la replicación en cultivo celular (que es el caso de DR-I*Ppo*I). Sin embargo, después de diez pasajes seriados por cultivo celular, se vio que SR-I*Ppo*I persistía y alcanzaba un equilibrio con el doble recombinante (DR-I*Ppo*I). Sorprendentemente, la cepa parental no se detectó en ninguno de
los pasajes de SR-I*Ppo*I. Estos resultados indicarían que la cepa no modificada (AgMNPV-2D) presentaría una desventaja selectiva frente a co-infecciones en cultivo celular con las cepas modificadas SR-I*Ppo*I y DR-I*Ppo*I. Para confirmar esta hipótesis se podrían realizar ensayos de co-infección con MOIs conocidas de AgMNPV-2D, DR-I*Ppo*I y SR-I*Ppo*I.

Analizando nuestras observaciones a la luz de los datos aportados por la bibliografía mencionada en la Introducción, en primer lugar, resulta sorprendente que durante los pasajes seriados de SR-I*Ppo*I no se haya detectado en ningún momento DNA parental (AgMNPV-2D), ya que serían equivalentes las probabilidades de que los eventos recombinogénicos en el simple recombinante produzcan el virus parental o el doble recombinante. Esto apoya fuertemente la hipótesis de que nuestra cepa de AgMNPV-2D presenta una importante desventaja selectiva frente a las cepas recombinantes (SR-I*Ppo*I y DR-I*Ppo*I).

Considerando que durante el pasaje seriado de baculovirus en cultivo celular, el mutante más común y de rápida acumulación que se ha detectado es el fenotipo FP, nuestros resultados sugieren que la ventaja selectiva que presentan los recombinantes SR-I*Ppol* y DR-I*Ppol* frente a la cepa parental (AgMNPV-2D) en cultivo celular podría deberse a las similitudes que ambos presentan con el fenotipo FP. El fenotipo FP presenta una disminución en el número de poliedros producidos por célula, pocos o ningún virión ocluidos en el poliedro, una oclusión intranuclear de nucleocápsides alterada y un incremento en el número de viriones brotantes infectivos (BVs) (Harrison y Summers, 1995b). Con respecto a la disminución en el número de poliedros producidos por célula, en el caso de DR-I*Ppol* no hay producción de poliedrina porque este gen ha sido reemplazado por el de *lacZ*. En el caso de SR-I*Ppol*, el gen de poliedrina está presente, pero podría estar siendo expresado a bajos niveles debido a que una segunda copia de su promotor se encuentra a escasas pares de bases de distancia (ver figura 4.1). El incremento en el número de BV de ambos recombinantes (DR-I*Ppol* y SR-I*Ppol*) se deduce del alto título infectivo de los sobrenadantes de cada pasaje.

Los datos obtenidos en esta sección de la tesis, podrían utilizarse como punto de partida en estudios más detallados conducentes a analizar otros aspectos del comportamiento de esta especie viral (SR-I*Ppo*I) en cultivo celular. En este trabajo de tesis no se llevaron a cabo porque superaban los objetivos de la misma.

CAPÍTULO 4. PARTE C.

Evaluación de la eficiencia en la generación de recombinantes utilizando a SR-I*Ppo*I como virus parental.

INTRODUCCIÓN

Dada la inusual estabilidad presentada por este simple recombinante con sitios únicos de restricción, consideramos que aportaría datos interesantes el análisis de la frecuencia de recuperación de recombinantes en ensayos de cotransfección utilizando a SR-I*Ppo*I como virus parental.

RESULTADOS

Para la cotransfección se utilizó DNA de SR-I*Ppo*I y, debido a que aún no se había concluido con la construcción del plásmido de transferencia de segunda generación diseñado para esta tesis, se utilizó un plásmido que presentaba un gen toxina de un ácaro flanqueado por las secuencias *upstream* y *downstream* del gen de poliedrina (pTox) (Arana *et al.*, 2002). Se cotransfectaron células con diferentes combinaciones del DNA de SR-I*Ppo*I linealizado (esto es, digerido con I-*Ppo*I) y circular (sin digerir) y DNA del plásmido control (ver figura 4.3), de acuerdo al siguiente cuadro:

	COTRANSFECCIÓN 14/06/01			medio sin	Tfx™-10	V _f
N°	SR-I <i>Ppo</i> I / I <i>Ppo</i> I	SR-I <i>Ppo</i> l Sin digerir	рТох	suero		
1	10 μl ~3μg		10 μl ~10 μg	674 μl	6 μl	700µl
2		3 μl ~3μg	10 μl ~10 μg	681 μl	6 μl	700µl
3	10 μl ~3μg			684 μl	6 μl	700µl
4		3 μl ~3μg		691 μl	6 μl	700µl
5	Control (-) sin Tfx™10			700 μl	-	700µl



Figura 4.3. Esquema de la cotransfección realizada para analizar la frecuencia de generación de especies virales recombinantes. Como se indica en la figura, en la cotransfección 1 se utilizó DNA viral linealizado y plásmido sin digerir; en la cotransfección 2, se usó DNA viral sin digerir y plásmido sin digerir; en la cotransfección 3 se utilizó solamente DNA viral linealizado; y en la cotransfección 4, se usó solamente DNA viral sin digerir.

Se diseñaron dos ensayos para medir cualitativa y cuantitativamente la eficiencia en la producción de recombinantes. El primero consistió en retirar el sobrenadante de transfección cinco días después de la cotransfección y en reemplazarlo con medio de cultivo con X-gal. Posteriormente se monitoreó por espectroscopía la presencia de actividad de β -galactosidasa. Este ensayo se basó en que la producción de la especie hidrolizada de X-gal (de color azul) es proporcional a la cantidad de virus parental presente, ya que éste expresa el gen *lacZ* de *E. coli*. En las cotransfecciones en las que se utilizó DNA viral circular (cotransfecciones 2 y 4), se obtuvieron niveles significativamente altos de virus parental (lo cual se infiere por la gran proporción de especie hidrolizada de X-gal, indicativa de una elevada actividad de β -galactosidasa). Al mismo tiempo, en aquellas donde se usó DNA viral linealizado (cotransfecciones 1 y 3) la cantidad de DNA parental era casi imperceptible (ver figura 4.4). En este ensayo se observó un aumento de 50 veces en la producción de recombinantes en la cotransfección en la que se utilizó DNA viral linealizado (cotransfección en la que se utilizó DNA viral linealizado (cotransfección 2).



Figura 4.4. Ensayo con X-gal. Los gráficos de color celeste corresponden a las cotransfecciones donde se utilizó DNA viral linealizado (cotransfecciones 1 y 3). Los gráficos de color rojo corresponden a las cotransfecciones donde se utilizó DNA viral circular (cotransfecciones 2 y 4). Los gráficos recuadrados en color amarillo, son aquellos directamente comparables debido a que los datos de los mismos corresponden a las medidas directas. En el caso particular de la cotransfección 4, el nivel colorimétrico de la muestra saturó el equipo de medición. En el gráfico correspondiente, se puede apreciar que los valores de absorbancia llegan hasta 4, mientras que en el resto de los gráficos llegan hasta 3; de lo contrario no se hubiera podido graficar la saturación. Para que el equipo pudiera analizar la muestra y así tener valores comparables, se hizo una dilución 1:8. Por otro lado, en los gráficos correspondientes a las cotransfecciones 1 y 3 (DNA viral linealizado) se tuvieron que hacer expansiones del eje X, ya que estos valores eran tanto menores que los de las cotransfecciones con DNA viral circular que, de otra manera, no se podían visualizar.

El segundo ensayo se basó en PCRs semi-cuantitativas, en las que se estimaba el número de genomas que habían incorporado el gen toxina. Las reacciones de PCR se realizaron sobre los sobrenadantes de las cotransfecciones en las que se utilizó DNA viral (linealizado y circular) y plasmídico (previamente amplificados por pasaje por células para eliminar resultados positivos debidos a la presencia de pTox). Como parámetro se utilizaron varias diluciones de pTox que contenían un número conocido de moléculas y los resultados se compararon con aquellos que se obtuvieron a partir de diluciones de los sobrenadantes de cotransfección. Los resultados fueron coincidentes con los del primer ensayo (ver figura 4.5). En este ensayo se estimó un aumento de 10 veces en la producción de recombinantes de la cotransfección 1 (en la que se usó DNA viral linealizado), respecto de la cotransfección 2 (en la que se usó DNA viral circular).



Figura 4.5. Evaluación de la eficiencia en la recuperación de recombinantes mediante PCRs semi-cuantitativas. En la parte izquierda de la figura se indican las diferentes combinaciones de DNA viral (circular y linealizado) y plasmídico utilizadas. En la parte derecha se muestra la fotografía de las PCRs semi-cuantitativas que se realizaron utilizando como fuente de DNA la progenie viral de las siguientes cotransfecciones:

- 1: DNA viral linealizado (SR-IPpoI) y plásmido (pTox).
- 2: DNA viral circular (SR-I*Ppo*I) y pTox.

Se estimó el número de genomas que adquirieron el gen toxina mediante PCRs semicuantitativas, utilizando cebadores que amplificaban secuencias del gen Tox (ver Materiales y Métodos). Estas reacciones se hicieron sobre los sobrenadantes de cotransfección procesados adecuadamente. Muestras: se utilizaron varias diluciones del pTox que contenían un número conocido de moléculas (pTox); los resultados se compararon con aquellos que se obtuvieron con diluciones de los sobrenadantes de cotransfección (cotf. 1 y cotf. 2).

Los datos de ambos ensayos indicaron que era significativamente superior la proporción de virus recombinantes recuperados a partir de la cotransfección en la que se utilizó el DNA linealizado de SR-I*Ppo*I, que aquella en la que se utilizó el DNA circular de SR-I*Ppo*I.

DISCUSIÓN

Por un lado, SR-I*Ppo*I demostró tener una estabilidad inusual por tratarse de un simple recombinante. Por otro, fue digerido eficientemente con I-*Ppo*I en las nuevas condiciones experimentales (ver Capítulo 3, Resultados y Discusión). Su linealización permitió analizar la eficiencia que presentaba en la producción de recombinantes. En el ensayo con X-gal se observó un aumento de 50 veces con respecto a la cotransfección en la que se usó DNA viral circular. En el ensayo de las PCRs semi-cuantitativas, hubo un aumento de 10 veces respecto de la cotransfección con DNA viral circular.



CAPÍTULO 5.

Desarrollo de un método simple y rápido para la detección de baculovirus recombinantes.

INTRODUCCIÓN

Como ya se ha mencionado, el método clásico para introducir cambios en el genoma de los baculovirus, se basa en la cotransfección de células de insecto con DNA viral circular y un vector de transferencia que contiene secuencias virales flanqueando al gen que se desea insertar en el genoma viral. Dentro de la célula, enzimas virales y celulares median la recombinación homóloga entre las secuencias virales y sus homólogos en el vector de transferencia. Una sustitución alélica involucra dos eventos definidos e independientes de recombinación homóloga: uno en cada una de las dos regiones flanqueando al gen heterólogo en el plásmido de transferencia. Si ocurren ambos eventos de recombinación, se obtiene un doble recombinante. Sin embargo, el tipo de recombinante más común que se encuentra en la progenie viral luego de las cotransfecciones, es el simple recombinante donde se ha integrado la totalidad del plásmido de transferencia a través de un único evento de recombinación homóloga (ver figura 4.1, Capítulo 4 de Resultados y Discusión). La selección de los virus recombinantes a partir del sobrenadante de cotransfección, resulta una tarea tediosa que demanda mucho tiempo, ya que el recombinante deseado representa un 0.1 – 1% del total de la población viral. En este contexto, la selección inicial de los posibles recombinantes resulta una etapa crítica y limitante. Generalmente, la selección se hace a través de ensayos de placas, en donde los recombinantes se identifican visualmente y se purifican por rondas adicionales de ensayos de placas (O'Reilly et al., 1992; Kitts y Possee, 1993). Debido a que los recombinantes simples y dobles poseen el mismo fenotipo en cuanto a la expresión del gen heterólogo, un alto porcentaje de las placas picadas en la primera ronda no presenta el genotipo recombinante deseado.

En esta sección de la tesis nos dirigimos a esta fase inicial del proceso de selección, describiendo el desarrollo de un método de extracción de DNA de baculovirus que puede ser aplicado directamente a las placas de lisis picadas (para un desarrollo detallado de la técnica ver "Sección IV: Materiales y Métodos").

RESULTADOS

Extracción de DNA directamente de las placas de lisis picadas para su análisis por PCR: una aplicación práctica del método desarrollado

La amplificación de segmentos específicos de DNA por PCR, puede ser muy útil para rápidamente verificar si un ensayo de cotransfección ha sido exitoso y contiene al recombinante buscado. Sin embargo, en esta etapa se debe tener la precaución de amplificar el DNA viral para evitar la interferencia de cualquier DNA residual que haya quedado de la transfección. Para esto, los moldes de DNA se deben preparar a partir de cultivos celulares infectados, no transfectados (Folgueras-Flatschart et al., 2000). Durante el análisis del sobrenadante de cotransfección por medio de los ensayos de placas, resultaría extremadamente útil la posibilidad de analizar por PCR el DNA extraído directamente de las placas de lisis picadas, para evitar pérdidas innecesarias de tiempo y reactivos involucrados en los pasos siguientes. Sin embargo, los datos aportados por la bibliografía indican que la amplificación por PCR de DNA viral extraído directamente de las placas de lisis picadas, no es lo suficientemente eficiente como para permitir el uso rutinario de este enfoque. Se ha establecido que es necesario escalar los títulos virales de las placas picadas, a través de una ronda de infección en cultivo celular. Esto se recomienda porque el título viral extracelular es demasiado bajo como para ser usado en ensayos de PCR (O'Reilly et al., 1992; Malitschek y Schartl, 1991; Webb et al., 1991).

En contraste con esta información, en este trabajo de tesis se pudo desarrollar un método para extraer DNA a partir de alícuotas de placas picadas - resuspendidas - (ver "Sección IV: Materiales y Métodos") que permitió analizarlas por PCR. Esto redujo significativamente los tiempos esperados de ensayo (ver figura 5.1).



Figura 5.1. Diagrama comparativo de las ventajas del método desarrollado para la extracción de DNA directamente a partir de placas de lisis. Como muestra el diagrama, la posibilidad de analizar las placas picadas directamente por PCR, reduce significativamente los tiempos, la manipulación y el costo (medio, material descartable, etc.) involucrados en la selección de recombinantes.

Elección de cebadores para la identificación de posibles recombinantes

La cuidadosa elección de cebadores permite diferenciar al recombinante buscado de los simples recombinantes y/o el virus parental (Malitschek y Schartl, 1991; Webb *et al.*, 1991). Para analizar las diferentes placas picadas y procesadas en esta sección de la tesis, se usaron cuatro pares de cebadores (ver figura 5.2). Aunque el diagrama muestra los

cebadores que se utilizaron en este ensayo en particular, el razonamiento desplegado es extensivo a cualquier cotransfección. El diagrama representa un típico análisis por PCR realizado sobre diferentes placas picadas para determinar su naturaleza (recombinante o parental). Los cebadores variarán de acuerdo al plásmido de transferencia utilizado en la cotransfección. En este caso particular, la cotransfección fue realizada con AgMNPV-2D y pAg-IPpol (ver Capítulo 2 de Resultados y Discusión). Por lo tanto, en la PCR para identificar secuencias recombinantes (última columna de la derecha) se debieron utilizar ambos cebadores del sitio I-Ppol/BamHI (U-B y L-B, ver Capítulo 2 de Resultados y Discusión) en reacciones independientes, ya que, de la misma manera que en la construcción del vector de transferencia (pAg-IPpol), la secuencia del sitio I-Ppol podía insertarse en un sentido o en el otro.

CEBADORES VIRUS	CEBADORES QUE AMPLIFICAN SECUENCIAS DE SIMPLES RECOMBINANTES DW	CEBADORES QUE AMPLIFICAN SECUENCIAS DE SIMPLES RECOMBINANTES UP	CEBADORES QUE AMPLIFICAN SECUENCIAS DEL GEN DE <i>POLIEDRINA</i>	CEBADORES QUE AMPLIFICAN SECUENCIAS RECOMBINANTES
Doble Recombinante AgMNPV	M13		Uup-orf	U-B/L-B 198 pb phn-Back
SIMPLE RECOMBINANTE DW AgMNPV	M13 897 pb		Uup-orf	U-B/L-B 198 pb V phn-Back
SIMPLE RECOMBINANTE UP AgMNPV		L-B	Uup-orf 632 pb ✓ Lup-orf	U-B/L-B phn-Back 198 pb
AgMNPV-2D			Uup-orf	U-B/L-B phn-Back

Referencias:

UP viral

UP plasmídico
DW viral

DW plasmídico
 pBS

ORF poliedrina
 ORF *lacZ*

Figura 5.2. Identificación por PCR de los diferentes genomas recombinantes y del parental: Ejemplo de un adecuado análisis por PCR de posibles recombinantes. Las posibles especies virales son comparables a aquellas obtenidas en la cotransfección representada en la figura 4.1 del Capítulo 4 de Resultados y Discusión. Los cebadores utilizados en cada reacción de PCR se encuentran indicados en la figura, al igual que los tamaños de los fragmentos de amplificación correspondientes a cada PCR. Las secuencias que reconocen los cebadores y los cebadores respectivos, están indicados con el mismo color. Los tamaños de los cebadores y de las secuencias que reconocen no son proporcionales. Para mayor detalle de los perfiles de ciclado y secuencias de los *primers*, ver "Sección IV: Materiales y Métodos".

Las PCRs realizadas utilizando una combinación de todos los cebadores permitieron seleccionar dos posibles dobles recombinantes, de las veinte placas de lisis picadas y procesadas: 2₄ y 8₂. En la figura 5.3, La fotografía de la izquierda corresponde a la PCR que identificó los simples recombinantes DW (ver columna 2 de la figura 5.2). La fotografía de la derecha corresponde a la PCR que identificó a los simples recombinantes UP (ver columna 3 de la figura 5.2). Sólo aquellas placas que no dieron producto de amplificación en estas reacciones (es decir, 2₄ y 8₂) fueron sometidas a posteriores análisis por PCR.



Figura 5.3. Resultados del análisis por PCR para la identificación de simples recombinantes DW y UP. M13 y U-H son los cebadores utilizados para identificar simples recombinantes DW. La reacción de PCR amplifica un fragmento de 897 pb, que corresponde a secuencias UP y del plásmido base (pBS). T7 y L-B son los cebadores utilizados para identificar los simples recombinantes UP. Amplifican un producto de 911 pb que corresponde a secuencias DW y de pBS.

El paso siguiente consistió en realizar análisis adicionales de las placas 2₄ y 8₂ para confirmar su identidad, ya que podían ser dobles recombinantes, AgMNPV-2D o una mezcla de ambos (ver figura 5.4). La PCR que amplifica parte de las secuencias *upstream* y del gen de poliedrina, indicaba la presencia de AgMNPV-2D (ver columna 4 de la figura 5.2). En esta PCR sólo se observó amplificación inespecífica en ambas placas (2₄ y 8₂). Como ya se mencionó, para identificar las secuencias recombinantes se realizaron 2 PCRs independientes: una en la que se utilizaban los cebadores U-B y phn-Back y otra en la que se usaban los cebadores L-B y phn-Back. Los resultados de todas estas PCRs indicaron que las placas 2₄ y 8₂ eran dobles recombinantes de AgMNPV-2D y que no presentaban virus parental contaminante (ver figura 5.4).



UP+poin = PCR (U-B+phn-Back = PCR (U-B+phn-Back = PCR M 2_4 y 8_2 = placas de lisis

(+) = control positivo (-) = control negativo M = pcDNAii/*Hin*dIII+*Hinf*I

Figura 5.4. Resultados del análisis por PCR para la identificación de dobles recombinantes y DNA parental. Uup-orf y Lup-orf son los cebadores utilizados para identificar secuencias parentales. La reacción de PCR amplifica un fragmento de 632 pb, que corresponde a secuencias UP y de *polh*. U-B / phn-Back y L-B / phn-Back son los pares de cebadores utilizados para identificar secuencias recombinantes. Ambas PCRs amplifican un producto de 198 pb que corresponden al sitio I-*Ppo*I y secuencias DW.

La identidad de las placas 2₄ y 8₂ fue confirmada por análisis de restricción y por *Southern blot* (ver Capítulo 6).

Posteriores aplicaciones del método de extracción de DNA

En estudios posteriores, este mismo método se utilizó para extraer DNA para análisis por PCR de sobrenadantes de cotransfección amplificados por una ronda de infección en cultivo celular, y sobrenadantes de cultivo celular que se sospechaba presentaban una infección viral latente. En ambos casos el método de extracción fue tan confiable como para las placas de lisis picadas (resultados no mostrados).

DISCUSIÓN

El método descripto en la bibliografía para la extracción de DNA a partir de placas de lisis amplificadas por cultivo celular, extrae DNA de un lisado celular (O'Reilly et al., 1992; Malitschek y Schartl, 1991; Webb *et al.*, 1991). Con este método, el pequeño número de células presentes en una placa picada explicaría la necesidad de escalar el título viral. En lugar de esto, el método que se presenta en este trabajo de tesis está basado en la extracción de DNA a partir de BVs. Las placas son picadas en una fase muy tardía del proceso de infección, momento en que es muy alto el porcentaje de BVs en el ambiente extracelular y en la célula misma. Esto explicaría por qué la que la extracción de DNA a partir de PNA a proceso necesidad proporcionaría suficientes cantidades para un análisis sensible por PCR.

La posibilidad de analizar los genomas de los baculovirus a partir de material recuperado directamente de placas de lisis, extendería la aplicación de este método a estudios más detallados sobre la variabilidad genómica intra-específica (Maruniak *et al.*, 1999; Muñoz *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1985; Maruniak *et al.*, 1984; Bull *et al.*, 2003).

En este estudio, se adaptó un método fácilmente reproducible para una extracción rápida y sensible de DNA de baculovirus, a partir de sobrenadantes de cultivo celular, para su análisis por PCR. Este método inicialmente fue desarrollado para extraer DNA directamente de placas de lisis y, en este caso, sus mayores ventajas fueron la simplificación de la tediosa tarea de seleccionar recombinantes y la manera significativa en que acortó los tiempos inherentes a la misma. El método desarrollado puede ser aplicado a diferentes situaciones en las que es necesaria una extracción de DNA rápida y confiable para su análisis por PCR. Esto incluye contaminaciones cruzadas de cepas virales, posibles infecciones virales de cultivos celulares o análisis de la integridad genómica de inóculos virales.



CAPÍTULO 6

Aislamiento del virus recombinante AgMNPV-2D con sitios únicos de restricción: Segunda etapa de la purificación y caracterización de los AgMNPV-I*Ppol* aislados.

INTRODUCCIÓN

El simple recombinante con sitios únicos de restricción aislado (SR-I*Ppo*I, Capítulo 4 de Resultados y Discusión) no se iba a poder utilizar como virus parental en las siguientes cotransfecciones, debido a la composición impredecible de la progenie viral resultante de las mismas. Por esto se reinició la búsqueda del doble recombinante AgMNPV-I*Ppo*I. La finalidad, era obtener un virus que pudiera ser linealizado para poder utilizarlo como parental en posteriores ensayos de cotransfección, a fin de aumentar la frecuencia de recuperación de recombinantes.

Habiéndose desarrollado la metodología descripta en el Capítulo 5, la búsqueda del doble recombinante AgMNPV-I*Ppo*I resultaría mucho más expeditiva que en la etapa inicial (ver Capítulo 4 de Resultados y Discusión). La selección y aislamiento de los recombinantes se hizo por ensayo de placas, al igual que en el caso de SR-I*Ppo*I (ver Capítulo 4 de Resultados y Discusión para un desarrollo más detallado).

RESULTADOS

Para aislar el doble recombinante con sitios únicos de restricción (a partir de este Capítulo se referirá al mismo como AgMNPV-I*PpoI*), se realizó una nueva cotransfección de acuerdo al siguiente esquema (la cotransfección mencionada en este Capítulo se encuentra incluida en la "Sección VI: Apéndice"):

N°	COTRANSFECCI	medio sin	Tfx™-10	Vf	
	AgMNPV-2D	pAg-I <i>Ppo</i> I / <i>Not</i> I	suero		
1	20 μl (~2 μg)	30 μl (~10 μg)	644 μl	6 μl	700µl
2	Control (-) si	700 μl	-	700µl	

Previo a la cotransfección, se linealizó pAg-I*Ppo*I con *Not*I (y se inactivó la digestión). En teoría, utilizar plásmido linealizado en la cotransfección reduciría la proporción de simples recombinantes. Esto se basaba en que si ocurría un único evento de recombinación homóloga se generaría un simple recombinante viral lineal. Éste sería inviable porque el DNA de los baculovirus debe ser circular para ser replicado (ver "Sección I: Introducción"). Por esto se buscó una enzima que linealizara a pAg-I*Ppo*I por fuera de la zona que recombinaría con AgMNPV-2D. Se encontró que el plásmido de transferencia presentaba un único sitio *Not*I, inmediatamente externo al sitio *Xba*I que flanqueaba a las secuencias DW (ver figura 6.1).



Figura 6.1. Esquema de pAg-I*Ppo*I indicando el sitio de corte de *Not*I.

Como en el caso de SR-I*Ppo*I, el primer ensayo de placas se realizó con diferentes diluciones del sobrenadante de cotransfección. Se picó una cantidad significativa de placas azules de la dilución mayor del mismo. Estas placas fueron procesadas de la manera descripta, y luego sometidas a un análisis por PCR para identificar si eran simples o dobles recombinantes y/o si estaban contaminadas con virus parental. A partir de estos resultados, las placas más promisorias se sometieron a posteriores reaislamientos por placa, repitiéndose el mismo análisis en cada etapa. Luego de cinco reaislamientos por placa se identificaron dos placas correspondientes a clones de virus dobles recombinantes, 2₄ y 8₂ (ver Capítulo 5 de Resultados y Discusión para un desarrollo detallado del análisis). Éstas se amplificaron por cultivo celular para aislar su DNA viral y luego se las analizó por digestión con endonucleasas (*Hin*dIII, *Eco*RI y *Bg/*II). Este análisis y un posterior *Southern blot* confirmaron la identidad de los clones doble recombinantes 2₄ y 8₂ AgMNPV-I*Ppo*I (ver

figura 6.2; es una repetición de la figura 4.2 (Capítulo 4 de Resultados y Discusión)), pero se incluyó para facilitar la interpretación de los resultados). Como se puede ver en la figura, la sonda hibridó en los fragmentos esperados en AgMNPV-2D, en ambos clones AgMNPV-I*Ppo*I (2₄ y 8₂) y en SR-I*Ppo*I.



Figura 6.2. Confirmación de la identidad de los clones dobles recombinantes (2₄ y 8₂) **por digestión con** *Hin***dIII y** *Southern blot.* **A la izquierda, la tabla reúne los mapas de restricción correspondientes a las diferentes especies virales. En ella se encuentran resaltadas las bandas nuevas esperadas de los recombinantes y la banda G de AgMNPV-2D. Los colores de las fotografías y de la tabla se corresponden.**

La fotografía central muestra digestiones con *Hin*dIII de los dos clones AgMNPV-I*Ppo*I (2₄ y 8₂), de diferentes pasajes de SR-I*Ppo*I (2do. y 10mo.) y de la cepa salvaje (AgMNPV-2D).

La fotografía de la derecha corresponde a un *Southern blot* hecho a partir del mismo gel, marcado con una sonda específica para la zona *downstream* del gen de poliedrina. La numeración de las calles es equivalente a la de la otra fotografía. Los fragmentos nuevos esperados de los dobles y simples recombinantes y la banda G de AgMNPV-2D (adonde se esta dirigiendo la recombinación) y sus tamaños respectivos, se encuentran resaltados en ambas fotografías (y unidos por líneas del mismo color).

<u>Referencias</u>: **Wf** = salvaje, fragmento G en **color verde**; **DC** = doble recombinante, fragmento nuevo en **color celeste**; **SC** = simple recombinante, fragmento nuevo en **color rojo**.

Análisis adecuado para el cálculo de los mapas de restricción de los posibles recombinantes

Dado que no se ha publicado aún la secuencia de AgMNPV-2D, los mapas de restricción de los diferentes recombinantes se calculan en base a la información provista por dos publicaciones. La primera, de Johnson y Maruniak (1989), presenta el mapa físico de AgMNPV-2D. La segunda, de Zanotto *et al.* (1992), presenta, entre otros, un análisis de restricción más detallado de la banda G de *Hin*dIII (de 7262 pb) y la secuencia de la región del gen de poliedrina, incluyendo sus secuencias flanqueantes (2085 pb en total).

De acuerdo a esta última publicación, se sabe que, entre el extremo 5' del fragmento *Hin*dIII y el sitio *Eco*RI, hay 1126 pb. De este sitio *Eco*RI al sitio *Sph*I que se encuentra en el extremo 5' de las secuencias *upstream* del gen de poliedrina hay 1438 pb. Entre este sitio *Sph*I de la región *upstream* y el codón de inicio del gen de poliedrina hay 829 pb; el gen tiene un marco de lectura abierto (ORF) de 738 pb; y entre el codón de finalización de la poliedrina y el sitio *Sph*I que se encuentra en el extremo 3' de sus secuencias *downstream*, hay 883 pb. La longitud total de este fragmento *Sph*I es de 2450 pb. Este fragmento (*Sph*I de 2450 pb) es el que se clonó originalmente en pcDNAii (Arana, 2003). Entre este último sitio *Sph*I y el sitio 3' de *Hin*dIII-G hay 2182 pb (ver figura 6.3).



Figura 6.3. Esquemas del fragmento *Hind***III-G de AgMNPV-2D y de pAg-I***Ppo***I.** En el esquema del fragmento *Hind***III-G se encuentran detallados los tamaños de los fragmentos** mencionados en el texto. Se incluye el esquema de pAg-I*Ppo*I para facilitar la interpretación del proceso de recombinación y de los cálculos que se encuentran más adelante.

Este es el punto de partida para todos los cálculos, ya que todas las modificaciones se dirigen al fragmento G de *Hin*dIII, en particular a la región del gen de poliedrina y sus secuencias flanqueantes (como se puede apreciar en la figura 6.3). Por lo tanto, las

diferencias en los patrones de restricción de los recombinantes con respecto al de AgMNPV-2D, se darían solamente a nivel de este fragmento (*Hin*dIII-G). Si se realizan digestiones con cualquiera de las otras enzimas con las que se han construido mapas físicos de AgMNPV-2D (*Eco*RI, *BgI*II, *Bam*HI, *Bst*EII), se debe considerar la distancia a la que se encuentra el sitio correspondiente del sitio 5' de *Hin*dIII-G, calculada en base las unidades de mapa y sabiendo que el genoma de AgMNPV-2D es de 133 kb.

Para ejemplificar esto más claramente, se mostrará cómo se calcularon los tamaños de los fragmentos nuevos de los diferentes recombinantes generados a partir de la cotransfección entre AgMNPV-2D y pAg-I*Ppo*I (simples y doble recombinantes). Estos cálculos se realizaron en base a una digestión con *Hin*dIII (ver figura 6.4):



Figura 6.4. Cálculo de los mapas de restricción con *Hin*dIII de los simples y doble recombinantes AgMNPV-I*PpoI*. En el esquema de cada especie recombinante se deben agregar los sitios de restricción correspondientes al mapa que se está calculando. En este caso serían los de *Hin*dIII. Sin embargo, como en la construcción de pAg-I*Ppo*I se perdió el único sitio *Hin*dIII que presentaba el plásmido original, no hay ningún sitio que agregar en los diferentes esquemas. Las sumas serían las siguientes:

Doble recombinante:

*Hin*dIII – *Sph*I = 2564 pb vUP – *lacZ* – vDW = 829+3736+883 = 5448 pb *Sph*I – *Hin*dIII = 2182 pb

Total = 2564+5448+2182 = 10194 pb

Simple recombinante UP:

*Hin*dIII – *Sph*I = 2564 pb vUP/pUP – *lacZ* – pDW – pBS – pUP/vUP – *PH* – vDW = 829+3736+883+2895+829+738+883 = 10793 pb *Sph*I – *Hin*dIII = 2182 pb

Total = 2564+10793+2182 = **15539 pb**

Simple recombinante DW:

*Hin*dIII – *Sph*I = 2564 pb vUP – *PH* – vDW/pDW – pBS – pUP – *lacZ* – pDW/vDW = 829+738+883+2895+829+3736+883 = 10793 pb *Sph*I – *Hin*dIII = 2182 pb

Total = 2564+10793+2182 = 15539 pb

Estos resultados se visualizan de la siguiente manera: en el patrón de restricción de cada una de las tres especies recombinantes desaparece la banda G y aparece una banda nueva que, en el caso del doble recombinante será de 10194 pb y, en el caso de ambos simples recombinantes, será de 15539 pb. Esto se puede apreciar en la figura 6.2.

DISCUSIÓN

A pesar de que se linealizó el plásmido de transferencia (pAg-I*Ppo*I) previo a la cotransfección, se tuvieron que realizar cinco reaislamientos por placa para poder encontrar los dobles recombinantes. Esto puede haberse debido a un corte incompleto del plásmido de transferencia, ya que el DNA circular transfecta mucho más eficientemente que el lineal. De esta manera, aunque el porcentaje de DNA plasmídico circular sea muy bajo, al transfectar más eficientemente hay una mayor relación de moléculas circulares del plásmido (con respecto a las lineales) dentro de la célula, disponibles para sufrir eventos de recombinación homóloga con el DNA viral circular que ha transfectado.

A pesar de esto, la posibilidad de analizar por PCR las placas de lisis obtenidas a partir de los reaislamientos, acortó significativamente los tiempos de búsqueda. El resultado fue el aislamiento de dos clones dobles recombinantes AgMNPV-I*Ppol* (2₄ y 8₂). De esta manera se completó uno de los objetivos de esta tesis: la generación de un recombinante de AgMNPV-2D con sitios únicos de restricción, que pudiera ser linealizado y usado como parental en los siguientes experimentos de cotransfección para la producción de recombinantes.



CAPÍTULO 7

Construcción del vector de transferencia de segunda generación (pIERUPOD).

INTRODUCCIÓN

Para el diseño del vector de transferencia de segunda generación (pIERUPOD), entre otros, se tuvo en cuenta el aspecto del impacto ambiental que pudiera tener un organismo modificado genéticamente. En este sentido, se eligieron genes heterólogos que fueran lo más inofensivos posible para el medio, no sólo en cuanto a su acción sobre posibles organismos no blanco, sino también en caso de una eventual transferencia lateral de material genético. Las secuencias foráneas elegidas fueron las del gen *enhancin 1* de LdMNPV, las del gen *DsRed1* de *Discosoma*, las del sitio interno de entrada del ribosoma (*internal ribosome entry site* o IRES) del virus de la encéfalo miocarditis (ECMV) y las señales de poliadenilación de SV40. El IRES de ECMV permite la traducción de dos ORFs consecutivos a partir del mismo RNA mensajero (Rees *et al.*, 1996; Jackson *et al.*, 1990; Jang *et al.*, 1990) y las señales de poliadenilación de SV40.

Enhancin 1: Los enhancins son proteínas que fueron encontradas inicialmente en los cuerpos de oclusión de los GV, las cuales tienen la habilidad de intensificar la infectividad de algunos NPVs. También se los ha denominado factores sinérgicos o de intensificación viral. Tanada fue el primero en aislar e identificar enhancins (Tanada, 1959; Tanada *et al.*, 1973; Tanada, 1985). Tanada *et al.* (1980) encontraron que la proteína enhancin de PuGV intensificaba la infectividad de PuNPV, pero sólo cuando ambos (PuNPV y el enhancin de PuGV) eran inoculados oralmente. Esto indicó que el intestino medio es el sitio de acción del enhancin. La proteína enhancin purificada de TnGV aumentó la infectividad de AcMNPV en Helicoverpa zea, Spodoptera exigua, P. unipuncta y T. ni desde 2 hasta 14 veces, dependiendo de la especie hospedadora (Wang *et al.*, 1994). Actualmente se han secuenciado genes enhancin en cuatro GVs, HaGV (Roelvink *et al.*, 1995), PuGV (Roelvink *et al.*, 1995), TnGV (Hashimoto *et al.*, 1991) y XcGV (Hayakawa *et al.*, 1999). Se encontraron cuatro diferentes genes enhancin en el primer genoma de GV que se secuenció completamente, XcGV (Hayakawa *et al.*, 1999). En contraste con esto, el genoma de PxGV no tiene ningún gen enhancin (Hashimoto *et al.*, 2000b).

Se han propuesto dos funciones para los enhancins, incremento de los eventos de fusión entre el virus y las células hospedadoras y rotura o desorganización de la membrana peritrófica. Se vio que el enhancin de PuGV facilitaba la incorporación de partículas virales por medio de un incremento en el número de eventos de fusión entre la membrana plasmática y el virus (Kozuma y Hukuhara, 1994; Tanada, 1985; Tanada et al., 1975; Uchima et al., 1988). Se encontró un sitio de unión específico del enhancin de TnGV en el intestino medio de *P. unipuncta*, pero no en los de *T. ni*, *H. Zea* o *S. exigua*, aunque todos ellos responden al enhancin de TnGV cuando son infectados con AcMNPV (Wang et al., 1994). Se vio que el enhancin de TnGV dañaba la membrana peritrófica que recubre al intestino medio larval, exponiendo la pared intestinal a la infección viral (Derksen y Granados, 1988). Los bioensayos realizados con larvas de T. ni infectadas con AcMNPV y diferentes concentraciones de enhancin de TnGV, demostraron que el mayor efecto que produce esta proteína es el de incrementar la eficiencia de infección a través de la rotura de la membrana peritrófica de los insectos (Gallo et al., 1991). Posteriormente se vio que este enhancin era una metaloproteasa que degradaba mucina, y esta última es un constituyente principal de la membrana peritrófica (Lepore *et al.*, 1996; Wang y Granados, 1997).

Lymantria dispar MNPV (LdMNPV) es un baculovirus patogénico para *L. dispar*, una plaga forestal y urbana defoliadora de árboles que se encuentra en el noreste y algunas regiones del oeste central de EEUU de N.A. El genoma de LdMNPV es significativamente más grande que el de la mayoría de los baculovirus. El genoma de la cepa secuenciada de LdMNPV es de 161.046 bases (Kuzio *et al.*, 1999), en contraste con las 133.894 bases de AcMNPV (Ayres *et al.*, 1994), las 128.413 de BmNPV (Gomi *et al.*, 1999), las 131.403 bases de HaSNPV (Chen *et al.*, 2001), las 131.990 bases de OpMNPV (Ahrens *et al.*, 1997) y las 135.611 bases de SeMNPV (Ijkel *et al.*, 1999). LdMNPV contiene varios marcos de lectura abiertos propios (ORFs) como también algunos que presentan homología con los ORFs de GVs. El primer homólogo de GV que se encontró en NPVs (Bischoff y Slavicek, 1997). El gen *E1* de LdMNPV presenta un 29% de identidad aminoacídica con los *enhancins* secuenciados de TnGV, PuGV y HaGV y contiene un dominio conservado de unión a zinc característico de las metaloproteasas. Los transcriptos del gen *E1* se expresan a tiempos tardíos post-infección a partir de un promotor tardío consenso de los baculovirus.

Se construyó un recombinante de LdMNPV que carecía del gen funcional *E1* para estudiar la función del mismo. Análisis de potencia viral revelaron que la cepa que carecía del gen *enhancin 1* era aproximadamente 2 a 3 veces menos potente que las cepas salvajes, sugiriendo que el *enhancin* de LdMNPV afecta la potencia viral (Bischoff y Slavicek, 1997). Recientemente, cuando se terminó de secuenciar el genoma de la cepa 5-6 de LdMNPV

(Kuzio et al., 1999), se identificó un segundo gen enhancin (E2). Se han secuenciado cinco otros NPVs, pero no se han encontrado enhancins en ninguno de ellos (AcMNPV [Ayres et *al.*, 1994], BmNPV [Gomi *et al.*, 1999], HaSNPV [Chen *et al.*, 2001], OpMNPV [Ahrens *et al.*, 1997], SeMNPV [Ijkel et al., 1999] y AgMNPV [B. Ribeiro y J.L. Wolff, comunicación personal]).

Los bioensayos realizados por Popham et al. (2001), indicaron que los productos génicos E1 y E2 pueden compensar parcialmente la pérdida de uno de los genes, ya que la deleción de los genes E1 o E2 redujo en aproximadamente 2 veces la potencia viral, mientras que la deleción de ambos genes la redujo en aproximadamente 12 veces. Aparentemente, la contribución a la potencia viral de las proteínas enhancin no es aditiva, ya que cada proteína por sí sola es capaz de incrementar aproximadamente 10 veces la potencia viral (relativo a virus que no presentan genes *enhancin*), mientras que, cuando ambas proteínas están presentes, se observa un incremento de 12 veces de la potencia. Esto sugiere que hay un límite en el grado en que las proteínas enhancin pueden intensificar la potencia viral. Dado que la contribución total a la potencia viral de ambas proteínas enhancin es mayor que la de cada una de ellas por separado, la presencia de ambos genes hace al virus más competitivo que una cepa que tenga sólo uno. Todavía se desconocen el sitio de acción de los productos de los genes enhancin de LdMNPV, el mecanismo por el cual incrementan la potencia viral y la manera en que son transportados al sitio de acción.

Por todas las características mencionadas anteriormente (su capacidad de incrementar la potencia viral y el hecho de que se trata de un enhancin identificado en un NPV) decidimos utilizar el enhancin1 de LdMNPV (Bischoff y Slavicek, 1997; Popham et al., 2001) para analizar su efecto sobre la infectividad de AgMNPV-2D. El gen E1, clonado en pBSSK (pBSE1), fue gentilmente cedido por el Dr. J. Slavicek (Forestry Sciences Laboratory, Northeastern Research Station, USDA Forest Service, Delaware, Ohio).

DsRed1: La proteína verde fluorescente (GFP) se ha convertido en una herramienta invalorable en estudios biológicos básicos y aplicados (Sullivan y Kay, 1999). Diversas mutagénesis en el gen salvaje generaron diferentes variantes mejoradas tales como la GFP intensificada (EGFP) (Heim et al., 1995; Cormack et al., 1996) y variantes de colores tales como las proteínas fluorescentes cian (CFP) y amarilla (YFP) (Heim y Tsien, 1996; Miyawaki et al., 1997). Una publicación reciente describió a una familia de proteínas fluorescentes relacionadas con la GFP. La más útil de estas proteínas nuevas es la DsRed, derivada del coral Discosoma. DsRed tiene una fluorescencia naranja-roja con un máximo de emisión a 583 nm. Estudios biofísicos y cristalográficos por difracción de rayos X, revelaron que

DsRed forma un tetrámero estable y que cada monómero que lo compone es muy similar estructuralmente a GFP (Baird et al., 2000; Wall et al., 2000; Yarbrough et al., 2001). La excitación óptima de DsRed es a 558 nm, pero también puede ser excitada con un láser standard de 488 nm. Esto permite que DsRed sea usada con microscopios confocales con láser y citómetros de flujo (Hawley et al., 2001). DsRed tiene un alto rendimiento cuántico y es fotoestable (Baird et al., 2000). Estas características hacen de DsRed un candidato ideal para su uso en sistemas biológicos, ya que es excitada con luz visible. También lo es para imágenes de fluorescencia, particularmente en experimentos multicolores involucrando a GFP y sus variantes.

A pesar de estas ventajas, el uso de la proteína *DsRed* salvaje como reportero fluorescente presenta varios problemas. Cuando DsRed es fusionada a otra proteína, la tetramerización del dominio *DsRed* puede alterar la función y localización de la proteína (Lauf *et al.*, 2001). También resulta problemático el hecho de que el tetrámero de DsRed se auto-asocia para formar agregados de mayor magnitud (Jakobs et al., 2000). Sin embargo, tal vez el problema más serio que presenta DsRed es la lenta maduración de su cromóforo, con un tiempo medio (half-time) de más de 24 horas a temperatura ambiente (Baird et al., 2000; Wiehler et al., 2001). Además, la proteína DsRed recién sintetizada desarrolla una débil fluorescencia verde debido a que, en esta etapa, se forma el mismo cromóforo que en el caso de GFP. Posteriormente, una segunda reacción de oxidación genera el cromóforo rojo. En general, el lento desarrollo de fluorescencia roja limita la intensidad de señal de DsRed, particularmente en organismos de crecimiento rápido como las levaduras. Recientemente se generaron variantes mejoradas de DsRed por mutagénesis, que maduran más rápido y son más solubles que el DsRed salvaje (Bevis y Glick, 2002).

A pesar de los problemas que presenta, decidimos utilizar a DsRed como reportero fluorescente en lugar de GFP, porque consideramos que la posibilidad de excitarlo con luz de longitud de onda de 558 nm representaba una ventaja insuperable a la hora de trabajar con sistemas biológicos, en contraposición con el uso de luz UV que resulta perjudicial para los mismos e imprescindible cuando se trabaja con GFP. Por otra parte, su espectro prácticamente eliminaba el problema de la autofluorescencia que normalmente interfiere con la visualización de GFP, cuando se trabaja con la línea celular UF-LAG-286 (observación personal). Esto resultaba pertinente porque era la línea celular que se utilizaba regularmente en los ensayos con AgMNPV.

Para la construcción del vector de transferencia de segunda generación (pIERUPOD), se eligió la estrategia *Splice Overlap Extension PCR* (SOE PCR). Ésta consistía en la amplificación independiente de pares de fragmentos con cebadores diseñados de manera tal de agregarle secuencias del otro fragmento amplificado. En una posterior reacción de PCR, se utilizaba como molde una mezcla de ambos fragmentos para amplificarlos en uno sólo. En esta última amplificación, las secuencias del otro fragmento que presentaba cada producto de amplificación, permitían que las hebras de DNA de simple cadena (ssDNA) hibridaran en los extremos internos, quedando así el molde final para la amplificación de ambos fragmentos en uno (ver figura 7.1).

Primera Etapa:

Se realizan dos PCRs independientes sobre los moldes correspondientes. Los primeros 10 ciclos deben realizarse a la temperatura de hibridación calculada para los cebadores *sin considerar las colas inespecíficas* y los restantes 25 ciclos a la temperatura de hibridación calculada *considerando las colas inespecíficas*, de manera de optimizar la amplificación de los productos deseados.



Segunda Etapa:

Se realiza una tercer PCR utilizando como molde una mezcla de ambos productos de amplificación. Esta PCR se debe realizar en dos fases:

- una inicial de 10 ciclos que debe desarrollarse *sin cebadores* para que se terminen de hibridar los fragmentos, para que se extiendan sus extremos internos y para consumir los cebadores que quedaron de las PCRs anteriores

- una final de 35 ciclos en la que se agregan los cebadores correspondientes (los externos), para que se amplifique el fragmento deseado.



Figura 7.1. Explicación de la estrategia SOE PCR.

RESULTADOS

Los moldes utilizados en las diferentes reacciones de PCR fueron pAgPH [ORF de poliedrina y secuencias flanqueantes *upstream* (UP) y *downstream* (DW) clonados en pcDNAii (Arana, 2003)], pBSE1 (ORF del *enhancin 1* (*E1*) de LdMNPV clonado en pBSSK) y pDsRed-N1 (a partir de este plásmido se amplificaron el ORF de *DsRed1* y las secuencias polyA de SV40; Clontech). Todos los cebadores se diseñaron de la manera descripta en la explicación de la estrategia SOE PCR y, además, tenían agregadas las secuencias de los sitios de restricción únicos de la construcción final (pIERUPOD) (ver lista y secuencia en "Sección IV: Materiales y Métodos"). Las secuencias IRES fueron aportadas por el plámido base que se utilizó para la construcción de pIERUPOD (pIRES, Clontech).

La construcción de pIERUPOD (vector de transferencia de segunda generación) constó de tres etapas principales de subclonado. En la **primera etapa**, se amplificaron independientemente los fragmentos [*DsRed1* + SV40polyA] y [UP]. Posteriormente, se hizo una tercer PCR en la que ambos fragmentos fueron amplificados en uno sólo [*DsRed1* + SV40polyA + UP]. Este último producto de amplificación fue subclonado en pZErOTM-2 (Invitrogen) y se lo denominó pZRU. La presencia del fragmento fue constatada por PCR y digestión enzimática (ver figura 7.2). Posteriormente, el fragmento [*DsRed1* + SV40polyA + UP] fue liberado de pZRU por digestión con *Xmal* + *Rsr*II, y clonado en pIRES (Clontech) digerido con las mismas enzimas. A esta construcción parcial se la llamó **pIRU** (ver figura 7.2). Esta construcción fue constatada por PCR y digestión enzimática.



Figura 7.2. Primer etapa en la construcción de plERUPOD: clonado de *DsRed1*+**SV40polyA y secuencias UP en plRES (plRU).** En la parte superior de la figura se encuentra representada la estrategia de PCR que se utilizó para el subclonado de las secuencias *DsRed1*+SV40polyA y UP en pZErO[™]-2. Una dilución 1:10 del producto de ambas PCRs (PCR1 y PCR 2) se utilizó como molde en una tercer PCR para amplificar a ambos fragmentos en uno solo. Los cebadores utilizados en cada PCR se encuentran indicados en la figura. El producto de amplificación correspondiente, sin purificar, fue ligado en pZErO[™]-2 digerido con *Eco*RV, en una relación 100:1 (inserto:vector). Con esta ligación se transformaron bacterias. Se obtuvo 1 clon positivo (**pZRU**).

Posteriormente, pZRU y pIRES fueron digeridos con *Xma*l y *Rsr*II. Se purificó el fragmento correspondiente de 1539 pb de la digestión de pZRU (*DsRed1* + SV40polyA + UP). Este fragmento (*DsRed1* +SV40polyA + UP) se ligó con la digestión directa (sin purificar) de pIRES, en una relación 366:1 (inserto:vector). Se obtuvieron 6 clones positivos (**pIRU**).

Las digestiones y/o PCRs confirmatorias de cada etapa se encuentran incluidas en la figura. Los fragmentos y sus tamaños correspondientes están resaltados.

En la **segunda etapa**, se amplificaron independientemente los fragmentos [promotor de poliedrina (P_{polh})] y [*E1*]. Posteriormente, se hizo una tercer PCR en la que ambos fragmentos fueron amplificados en uno sólo [$P_{polh} + E1$]. Este último producto de amplificación se clonó directamente en pIRU. Para esto, fueron digeridos el fragmento de amplificación [$P_{polh} + E1$] y pIRU con *Nhe*I + *Nde*I. A esta construcción parcial se la llamó **pIERU** (ver figura 7.3). Esta construcción se constató por PCR, digestión enzimática y secuenciación.



Figura 7.3. Segunda etapa en la construcción de pIERUPOD: clonado de $P_{polh}+E1$ en pIRU (pIERU). En la parte superior de la figura se encuentra representada la estrategia de PCR que se utilizó para el clonado de las secuencias $P_{polh}+E1$ en pIRU. Una dilución 1:10 del producto de ambas PCRs (PCR1 y PCR 2) se utilizó como molde en una tercer PCR para amplificar a ambos fragmentos en uno solo. Los cebadores utilizados en cada PCR se encuentran indicados en la figura. El producto de amplificación de la PCR 3 se digirió con *Nhe*l y *Nde*l y se precipitó la digestión. pIRU también fue digerido con las mismas enzimas. El fragmento correspondiente de 4928 pb de esta última digestión fue purificado. La digestión precipitada del producto de PCR y el fragmento purificado de pIRU de 4928 pb, fueron ligados en una relación 10:1 (inserto:vector). Con esta ligación se transformaron bacterias y se obtuvo 1 clon positivo (**pIERU**).

Las digestiones y/o PCRs confirmatorias de cada etapa se encuentran incluidas en la figura. Los fragmentos y sus tamaños correspondientes están resaltados.

En la **tercer etapa**, se amplificaron independientemente los fragmentos [P_{polh} + ORF de poliedrina (*polh*)] y [DW]. Posteriormente, se hizo una tercer PCR en la que ambos fragmentos fueron amplificados en uno sólo [P_{polh} + *polh* + DW]. Este último producto de amplificación fue subclonado en pZErO-2TM (Invitrogen) y se lo denominó pZP_{polh}ORF-DW (ver figura 7.4). Esta construcción se constató por PCR, digestión enzimática y secuenciación. El paso siguiente consistía en liberar este fragmento por digestión con *Bg/*II + *Nde*I y clonarlo en pIERU digerido con las mismas enzimas. Este último paso de clonado produciría un plásmido de transferencia en el que los dos promotores de poliedrina quedarían ubicados secuencialmente y en sentido opuesto, de acuerdo al diseño original de pIERUPOD.

Sin embargo, esta última etapa resultó mucho más dificultosa de lo previsto, dado que el clonado de los dos promotores de poliedrina en forma secuencial y sentido opuesto resultó ser casi inviable. Esto se dedujo por la altísima inestabilidad que presentó esta disposición de secuencias en las diferentes cepas bacterianas transformadas con estas ligaciones (TOP10, JM109, DH5 α). Esta inestabilidad se manifestó en que, en los múltiples ensayos de clonación generalmente no se obtenían clones y, si se obtenían, éstos eran artefactos. De la manera descripta, luego de ensayar diversas combinaciones diferentes en las numerosas ligaciones realizadas, el único clon que se obtuvo presentaba el fragmento deseado $P_{polh} + polh + DW$, pero en el proceso de clonado había perdido las secuencias $P_{polh} + E1$. Se lo denominó **pIERUPOD fallido** (ver figura 7.4). Esta construcción se constató por PCR, digestión enzimática y secuenciación.


Figura 7.4. Tercer etapa en la construcción de plERUPOD: clonado de P_{polh} + polh y secuencias DW en plERU (plERUPOD fallido). En la parte superior de la figura se encuentra representada la estrategia de PCR que se utilizó para el subclonado de las secuencias P_{polh} + polh + DW en pZErOTM-2 (pZP_{polh}ORF-DW). Una dilución 1:10 del producto de ambas PCRs (PCR1 y PCR 2) se utilizó como molde en una tercer PCR para amplificar a ambos fragmentos en uno solo. Los cebadores utilizados en cada PCR se encuentran indicados en la figura. El producto de amplificación correspondiente fue purificado (GFXTM, Amersham Pharmacia Biotech) y ligado en pZErOTM-2 digerido con *Eco*RV, en una relación 10:1 (inserto:vector). Con esta ligación se transformaron bacterias y se obtuvieron 2 clones positivos (**pZP**_{polh}**ORF-DW**).

Posteriormente, pZP_{polh}ORF-DW y pIERU fueron digeridos con *Nde*I y *BgI*II. Se purificó el fragmento correspondiente de 1402 pb de la digestión de pZP_{polh}ORF-DW (P_{polh}-polh+DW) (GFXTM, Amersham Pharmacia Biotech). P_{polh}-polh+DW se ligó con el fragmento purificado (GFXTM, Amersham Pharmacia Biotech) de la digestión de pIERU de 7050 pb, en una relación 25:1 (inserto:vector). Crecieron varias colonias pero la única que tenía una estructura similar a la buscada fue **pIERUPOD fallido**.

Las digestiones y/o PCRs confirmatorias de cada etapa se encuentran incluidas en la figura. Los fragmentos y sus tamaños correspondientes están resaltados.

Finalmente, para obtener la construcción deseada se tuvo que cambiar de estrategia. Entre pIERU y pIERUPOD fallido se tenía la totalidad de las secuencias buscadas en la construcción final, ya que pIERU tenía las secuencias $P_{polh} + E1$ pero carecía de $P_{polh} + polh + DW$, y pIERUPOD fallido tenía estas últimas pero carecía de las primeras (ambos tenían las secuencias *DsRed1* + SV40polyA + UP). Por esto se pudo diseñar una estrategia en la que se amplificaría la construcción final (pIERUPOD) por PCR. Con una mezcla de ambos moldes se realizó una PCR con un cebador (Uprom-Nde) que, utilizando a ambos plásmidos como molde, amplificaría la secuencia total de la construcción final (ver figura 7.5). El producto de PCR del tamaño apropiado fue ligado y se usó esta mezcla de ligación para transformar bacterias. De esta manera, sólo se obtuvieron dos clones viables. El clon pIERUPOD-47 tenía 600 pb del gen *E1* agregadas espontáneamente entre ambos promotores de poliedrina y flanqueadas por sitios *Nde*I. En el caso del clon pIERUPOD-21, el promotor de poliedrina que dirigía la expresión del gen *E1* sufrió la deleción de las 62 pb iniciales (hacia *upstream*) del total de 147 (ver figura 7.5).



Figura 7.5. Cambio de estrategia en la construcción de pIERUPOD: PCR utilizando una mezcla de pIERU+pIERUPOD fallido como molde para amplificar la secuencia buscada. En la parte superior de la figura se encuentra representada la estrategia de PCR que se utilizó para levantar la secuencia total de pIERUPOD a partir de pIERU y pIERUPOD fallido. Una dilución 1:100 de ambos plásmidos se utilizó como molde en la PCR que amplificaría a ambos fragmentos en uno solo. El cebador utilizado se encuentra indicado en la figura. El producto de amplificación correspondiente de 8452 pb se purificó (GFX[™], Amersham Pharmacia Biotech) y ligó. Con esta ligación se transformaron bacterias. Crecieron varias colonias pero los únicos dos clones viables que se obtuvieron fueron pIERUPOD-21 y pIERUPOD-47. Sus particularidades se indican en la figura.

Las digestiones y/o PCRs confirmatorias de cada etapa se encuentran incluidas en la figura. Los fragmentos y sus tamaños correspondientes están resaltados.

DISCUSIÓN

La construcción del vector de transferencia de segunda generación (pIERUPOD) tomó mucho más tiempo de lo estipulado. Esto aparentemente se debió a que en su diseño original, que se siguió sin variaciones hasta finalizar la construcción del mismo, había un problema intrínseco: la presencia concatenada de dos copias del promotor de poliedrina en sentido opuesto. Es posible que esta disposición de secuencias de ambos P_{polh} resultara muy recombinogénica en bacterias. Esto resultó tan problemático que, en esta etapa de la clonación, se tuvo que buscar una estrategia alternativa debido a que las clásicas habían sido agotadas con resultados negativos. Ensayando esta estrategia alternativa se obtuvieron sólo dos clones, imperfectos desde el punto de vista de la versión deseada: pIERUPOD-47, que presentaba 600 pb adicionales entre ambos promotores de poliedrina y pIERUPOD-21, que tenía 62 pb faltantes en uno de los promotores. Sin embargo, no consideramos que estas características afectaran su utilidad como vectores de transferencia ya que, para poder realizar un correcto análisis biológico de los virus recombinantes, éstos debían expresar adecuadamente los genes de poliedrina, E1 y DsRed1. Para esto la secuencia de los P_{polh} debía estar completa. En el caso de pIERUPOD-47, esto estaba confirmado a nivel de secuencia y, en el caso de pIERUPOD-21, existía la posibilidad de que las 62 pb iniciales faltantes del P_{polh} de E1 no afectaran su función debido a que otro promotor muy tardío (el de p10, P_{p10}) retenía su función con sólo 60 pb (Arana, 2003), y a este P_{polh} le quedaban 85 pb.



CAPÍTULO 8

Generación de virus recombinantes a partir de plERUPOD.

INTRODUCCIÓN

Una vez finalizada la construcción del vector de transferencia de segunda generación, y habiendo obtenido dos clones viables, pIERUPOD-21 y pIERUPOD-47, se procedió a la generación del virus recombinante correspondiente (AgMNPV-pIERUPOD). El plan original de tesis incluía también la construcción de recombinantes que presentaran, además de los genes aportados por el vector de transferencia pIERUPOD, la deleción del gen de la ecdisona glucosil transferasa (egt). El producto de este gen es una enzima 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 ecdisteroides, inactivándolos (O'Reilly & Miller, 1990). Los ecdisteroides son hormonas esteroides que regulan la muda de los insectos. Con esta inactivación el virus inhibe la muda. De esta manera, la larva continúa alimentándose e incrementado su masa celular, que, al estar disponible para ser infectada, permitirá un aumento de la progenie viral. El virus AgMNPV-2D con el gen egt delecionado (Ag∆EGT-lacZ; Pinedo et al, 2003) fue cedido por el Dr. B. M Ribeiro.

Con respecto a los dos clones del vector de transferencia de segunda generación, pIERUPOD-21 presentaba todas las características buscadas. El único interrogante correspondía al promotor de poliedrina de 85 pb que dirigía la expresión de E1. Sin embargo, consideramos altamente probable que esto no perjudicara su función como secuencia promotora, dado que el promotor de p10 (P_{p10}) retenía su función con sólo 60 pb (Arana, 2003). En el caso del clon pIERUPOD-47, ambos promotores tenían la totalidad de las 147 pb. Sin embargo, había 600 pb de secuencias del gen *E1* entre ambos. En este caso, era posible que, durante los eventos de recombinación homóloga posteriores a las cotransfecciones, estas 600 pb recombinaran con las del E1 cercano y, de esta manera, se perdiera toda esta región en el virus recombinante. Sin embargo, consideramos que la probabilidad de que esto sucediera era menor debido a la elevada estabilidad que esta construcción presentó en bacterias.

Se esperaba un incremento en la frecuencia de generación de recombinantes en las cotransfecciones en las que se utilizara como virus parental al doble recombinante con sitios únicos de restricción (AgMNPV-IPpol, ver Capítulo 6 de Resultados y Discusión). No sólo porque teóricamente se eliminaría el *background* de virus parental, sino también porque reduciría dramáticamente el porcentaje de simples recombinantes. En caso de ocurrir un único evento de recombinación homóloga, las especies resultantes serían lineales y, por lo tanto, inviables porque no pueden ser replicadas.

En las cotransfecciones en las que se utilizara como virus parental a Ag∆EGT-*lacZ*, se esperaba un elevado *background* de virus parental y de simples recombinantes debido a que este virus no puede ser linealizado.

Para la generación de recombinantes virales se utilizaron ensayos de cotransfección y para su aislamiento el método del ensayo de placas. En estos últimos, cada placa de lisis aislada correspondería a un clon viral. Sin embargo, para que se forme la placa de lisis correspondiente, el clon debe sufrir varias rondas de replicación. En caso que el clon inicial sea un simple recombinante, en las sucesivas rondas de replicación éste puede resolverse a parental y/o doble recombinante y/o permanecer como simple recombinante. Es por esto que cuando las placas presentaban señal recombinante, era posible que se tratara de un simple recombinante y/o de un doble recombinante contaminado con virus parental.

RESULTADOS

Generación de recombinantes utilizando al AgMNPV-2D con sitios únicos de restricción (AgMNPV-I*Ppo*I) como virus parental y a pIERUPOD como vector de transferencia

Para aislar el recombinante con *E1*, *DsRed1* y poliedrina (AgMNPV-pIERUPOD), se realizó una primer cotransfección de acuerdo al siguiente esquema (la lista y nomenclatura de las cotransfecciones mencionadas en este Capítulo se encuentran en la "Sección VI: Apéndice"):

	COTRANSFECCIÓN 09/05/02		medio sin	Tfx™-10	V _f
N°	AgMNPV-I <i>Ppo</i> I 2₄ ^(a) linealizado	pIERUPOD-21	suero		
1	20 μl ~3μg	10 μl ~10 μg	950 μl	20 µl	1000µl
(cf-21a)				-	
2	Control (-) sin Tfx™10		1000 μl	-	1000µl

^(a) clon 2₄ de AgMNPV-I*Ppo*I

Cuando se recogió el sobrenadante de esta cotransfección a los 6 días post-transfección, se veían claras señales de infección en la monocapa celular de la cotransfección 1 (**cf-21a**). Se hizo un primer ensayo de placas utilizando el sobrenadante de cf-21a. En este ensayo se esperaba poder identificar las placas de lisis recombinantes por la fluorescencia del *DsRed1*. Como ésta no se observó, se realizó un nuevo ensayo, pero esta vez se cambió la estrategia. Se identificarían las placas de lisis mediante la adición de X-Gal y Rojo Neutro (RN) (ver "Sección IV: Materiales y Métodos"). El primero (X-Gal) serviría para identificar las placas de lisis azules generadas por el virus parental o los simples recombinantes. El segundo (RN) identificaría las placas de lisis blancas generadas por los doble recombinantes. En los ensayos de placas posteriores de este Capítulo y de los Capítulos 10 y 12 se utilizó esta misma estrategia.

En este último ensayo de placas no se observaron placas de lisis azules en ningún momento y, a los 7 días post-infección (p.i.), se levantaron 20 placas de lisis blancas. Se realizaron PCRs sobre los procesamientos de las mismas (de acuerdo a la metodología desarrollada, ver Capítulo 5 de Resultados y Discusión). Todas presentaron señal recombinante y parental (ver figura 8.1).



Figura 8.1. Análisis por PCR de las placas de lisis picadas del ensayo de placas de la cotransfección con AgMNPV-IPpol y plERUPOD-21 (cf-21a). Ured-Xma y Lred-Sfi fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal recombinante (*DsRed1*+SV40polyA). U-B y phn-Back fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal parental. Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". Los resultados de la PCR para identificar las secuencias parentales no se muestran. El fragmento correspondiente a la PCR para amplificar las secuencias recombinantes se encuentra recuadrado en rojo y su tamaño indicado.

Esto fue un resultado inesperado dado que no se habían observado placas de lisis azules. Por esto se prosiguió a la amplificación por pasaje celular de algunas de las placas para aislar su DNA viral y así hacer un análisis de restricción de su estructura genómica. El patrón de restricción fue el del DNA viral parental (AgMNPV-IPpol). Posteriormente, se realizó un análisis de Southern blot para eliminar la posibilidad de que se tratara de una población viral en la que el recombinante deseado se encontrara en bajas proporciones, ya que éste es un método mucho más sensible. Las sondas utilizadas, en eventos independientes, fueron secuencias del P_{polh}+polh, ORF E1 y DsRed1+SV40polyA. El patrón de señales de las tres sondas en la placa amplificada por cultivo celular, fue equivalente al que presentaron en el virus parental que había sido agregado como control (no se muestran los resultados). La única sonda que presentó señal significativa fue la DsRed1+SV40polyA y esto se podría atribuir a pegado inespecífico de la sonda. En la placa amplificada, la señal se encontró a la altura de la banda propia del virus parental (AgMNPV-IPpoI) de 10194 pb. Esto no se podría atribuir al recombinante buscado (AgMNPV-pIERUPOD), ya que la señal apareció en una banda que, no sólo era la propia del virus parental (y que también apareció en el virus parental), sino que no se correspondía con alguna de las bandas nuevas del patrón esperado del recombinante. En cuanto a las sondas P_{polh}+polh y E1, era esperable que el parental (AgMNPV-IPpol) no presentara señal significativa. De todas esas secuencias, el virus parental sólo tiene las del P_{polh}, y a éste se podría deber la tenue señal que presentó la sonda de P_{polh}+polh a la altura de la banda nueva de AgMNPV-I*Ppo*I, tanto en el parental como en la placa de lisis amplificada.

Si los clones que presentaron señal recombinante hubiesen sido dobles recombinantes contaminados con virus parental, la señal recombinante no se hubiera perdido y, en el análisis de restricción, se hubiese observado la presencia de ambos, salvo que la velocidad de crecimiento de ambas especies sea muy diferente. Como esto no se observó, se infirió que los clones eran simples recombinantes que segregaron preferentemente para producir virus parental en lugar del doble recombinante, o que éste último sufrió una selección negativa. Por un lado, porque los clones analizados perdieron la señal recombinante luego de dos amplificaciones por pasaje celular. Esto es esperable de un simple recombinante debido a su alta inestabilidad genómica por la repetición de secuencias homólogas (ver Capítulo 4 para un análisis más detallado). Por otro lado, porque se resolvieron a virus parental.

Se hizo una nueva cotransfección para aislar el recombinante deseado y, además, para tener datos más exactos en cuanto al incremento en la frecuencia de producción de recombinantes al usar AgMNPV-I*Ppo*I. Se siguió el siguiente esquema:

	COTRANSFECCIÓN 29/05/02			Medio	Tfx [™] -10	Vf
N°	AgMNPV-I <i>Ppol</i> 8 ₂ ^(a)		pIERUPOD-21	sin		
	linealizado	circular		suero		
1	10 μl ~0,5 μg		5 μl ~10 μg	675 μl	10 μl	700µl
(cf-21b)				•		
2	10 μl ~0,5 μg			680 μl	10 μl	700µl
3		4 μl ~0,5 μg	5 μl ~10 μg	681 μl	10 μl	700µl
(cf-21c)				•		
4		4 μl ~0,5 μg		686 μl	10 μl	700µl
5	Cor	ntrol (-) con Tfx™	<i>^</i> -10	690 μl	10 µl	700µl

^(a) clon 8₂ de AgMNPV-I*Ppo*I

Aquí se agregó un control negativo con Tfx[™]-10 (Promega) para observar si las cantidades que se estaban usando resultaban perjudiciales para las células. No se observaron signos de citotoxicidad. Por lo tanto, se pudo afirmar que los efectos citopáticos que se observaban se debían exclusivamente a la acción del DNA viral transfectado.

Se realizaron ensayos de placas sobre las **cf-21b** y **cf-21c** (cotransfecciones realizadas con DNA viral linealizado y circular, respectivamente). Comparativamente, la producción de recombinantes en la cf-21b fue mucho más alta que en la cf-21c (ver figura 8.2). Las fotografías fueron tomadas al sexto día p.i. En la figura 8.2 se ve claramente la mayor frecuencia en la producción de recombinantes utilizando el virus linealizado. En la placa 10⁻⁵ de la cf-21b hay un total de 10 placas de lisis y sólo en una de ellas se ha desarrollado celeste casi imperceptible. Por otro lado, en la placa 10⁻⁵ de la cf-21c se observan más de 100 placas de lisis de color azul bien definido y sólo 4 posibles blancas, en las cuales igualmente se distingue celeste tenue.



Figura 8.2. Ensayo de placas sobre cf-21b (cotransfección 1, con DNA viral linealizado) y cf-21c (ctransfección 2, con DNA viral sin digerir). A la izquierda de la figura se encuentra una ampliación de las placas infectadas con diluciones 10⁻⁵ de los respectivos sobrenadantes de cotransfección (adonde se encontraban más aisladas y definidas). Las placas de lisis blancas están marcadas con círculos de color rosa pálido y las placas de lisis azules con círculos de color celeste pálido. Las fotografías fueron tomadas al sexto día p.i.

Sin embargo, un inconveniente patente en todos los ensayos de cotransfección fue que la expresión de *lacZ* era extremadamente tardía. Comenzaba a verse en forma tenue a los 6 días p.i., pero su máxima expresión se observaba a los 10-12 días p.i. Esto era un grave inconveniente ya que las placas de lisis comienzan a desdibujarse a partir del octavo día p.i. Esto significó que muchas de las placas que se picaban como blancas (fenotipo recombinante) eran en realidad azules (fenotipo parental) y no se podía retrasar el picado de las placas porque de lo contrario éstas se desdibujaban (sus límites dejaban de ser definidos).

Por esto se observó un elevado *background* de virus parental en esta cotransfección (corroborado también por ensayos de PCR sobre los sobrenadantes de cotransfección). A pesar de esto, la producción de recombinantes fue mucho más elevada en el caso en que se utilizó DNA viral linealizado (ver figura 8.2).

Se consideró que el elevado *background* de virus parental en las cotransfecciones en las que éste había sido linealizado, se podía deber a las elevadas cantidades de DNA utilizadas en las cotransfecciones, ya que esto aumentaría la proporción de virus no digerido. Se decidió hacer nuevas cotransfecciones utilizando el clon pIERUPOD-47. La primera se realizó según el siguiente esquema:

	COTRANSFECC	IÓN 24/06/02	medio sin	Tfx™-10	Vf
N°	AgMNPV-I <i>Pp</i> ol 2₄ ^(a)	pIERUPOD-47	suero		
	lillealizauu				
1	10 μl ~100 ng	0,5 μl ~500 ng	683,5 μl	6 μl	700µl
(cf-47a)	. 0		•	•	•
2	Control (-) con Tfx10		694 μl	6 μl	700µl

^(a) clon 2₄ AgMNPV-I*Ppo*I

En este caso, se utilizaron concentraciones de DNA menores siguiendo aquellas propuestas por Kitts y Possee (1993). En primer lugar, porque los autores, que trabajaban con DNA viral linealizado, habían obtenido un 85%-99% de virus recombinantes que expresaban el gen heterólogo, utilizando las cantidades de DNA indicadas en el esquema (100 ng de virus y 500 ng de plásmido). En segundo lugar, como ya se mencionó, porque se quería disminuir la proporción de virus no digerido en las mezclas de cotransfección.

A los 6 días post-cotransfección, se cosecharon los sobrenadantes y se agregó X-gal a las monocapas de células para observar actividad del virus parental. Los resultados fueron negativos (no se observó coloración azul). A partir de **cf-47a** se hizo una amplificación por

pasaje celular, donde se observaron claras señales de infección en la monocapa celular, aunque los poliedros no eran evidentes. También se realizó un ensayo de placas del cual se picaron 16 placas de lisis blancas.

Paralelamente, se realizó una nueva cotransfección manteniendo las mismas concentraciones de DNA y de acuerdo al siguiente esquema:

	COTRANSFECC	IÓN 28/06/02	medio sin	medio sin	
N°	AgMNPV-I <i>Ppo</i> I 2₄ ^(a) linealizado	pIERUPOD-47	suero		
1	10 μl ~100 ng	0,5 μl ~500 ng	679,5 μl	10 μl	700µl
(cf-47b)					
2	Control (-) con Tfx10		690 μl	10 μl	700µl

^(a) clon 2₄ AgMNPV-I*Ppo*I

El sobrenadante de transfección fue recogido a los 6 días post-cotransfección. No se observaban señales de infección en cf-47b. Por esto, luego de recoger el sobrenadante de cf-47b, se agregó medio nuevo a la monocapa celular para recuperar las especies recombinantes que se pudieran producir tardíamente. Este segundo sobrenadante, que se denominó cf-47c, fue levantado a los 7 días luego de agregado el medio nuevo, pero 13 días p.i.

Del primer sobrenadante de cotransfección (**cf-47b**) se tomaron alícuotas. Por un lado, para amplificarlo por cultivo celular a fin de escalar el título viral. Por otro lado, para realizar un ensayo de placas. Ninguno de los dos ensayos presentaron señales de infección, lo cual indicó que en ese primer sobrenadante de transfección no había ninguna especie viral, recombinante o parental.

Del segundo sobrenadante de transfección (**cf-47c**) se tomó una alícuota para amplificarlo por cultivo celular. Estas células presentaron claras señales de infección y, además, presentaron una característica muy particular que consistía en que las células infectadas parecían brotadas. Este efecto citopático no se había observado en el resto de las infecciones virales.

Considerando que la expresión del *E1* se debería observar en caso de estar presente la especie viral recombinante deseada, se analizaron mediante electroforesis las proteínas de lisados de células infectadas, producto de amplificaciones de **cf-47a**, **cf-47c** y de una amplificación de una de las placas de la **cf-21a**. Los controles fueron AgMNPV-2D, AgMNPV-I*Ppo*I y células sin infectar. La proteína E1 tiene aproximadamente 88 kDa

(Bischoff y Slavicek, 1997) y la única muestra que presentó una banda significativa del tamaño esperado, fue la de cf-47c (ver figura 8.3).



- 1 = AgMNPV-I*Ppo*I
- 2 = AgMNPV-2D
- 3 = cf-47c amplificada por cultivo celular
- 4 = cf-47a amplificada por cultivo celular
- 5 = placa de lisis de la cf-21a amplificada por cultivo celular
- (-) = células sin infectar
- \dot{M} = marcador de proteínas

Figura 8.3. Electroforesis de las proteínas producidas por las diferentes cotransfecciones. La banda correspondiente a la proteína poliedrina se encuentra recuadrada en verde y su tamaño indicado. La banda correspondiente a la posible proteína enhancin se encuentra recuadrada en amarillo y su tamaño indicado.

En la calle 4 (cf-47a) se observa un patrón similar al de la calle 1 (AgMNPV-I*Ppo*I), lo cual indicaría que las especies resultantes de la amplificación por cultivo celular de esta cotransfección corresponderían principalmente a virus parental (AgMNPV-I*Ppo*I). En la calle 5 (una de las placas de lisis de la cf-21a) se observa un patrón similar al del control negativo (células sin infectar), lo cual es coincidente con su amplificación por cultivo celular en la que no se observaron señales de infección. Esto podría deberse a un bajo título viral de la placa de lisis. La calle 3 (cf-47c) fue la única que presentó una banda significativa de tamaño correspondiente al de la proteína E1.

Debido a este resultado, se decidió continuar analizando la **cf-47c**, para lo cual se tomó una alícuota del sobrenadante para realizar un ensayo de placas. De este ensayo de placas se picaron 22 placas de lisis blancas. Se tomaron alícuotas de las mismas para amplificarlas por cultivo celular y para analizarlas por PCR (luego de procesarlas adecuadamente). Aquellas que presentaron señales de infección en las amplificaciones por cultivo celular fueron analizadas por PCR (ver figura 8.4). En todas las placas analizadas la señal recombinante fue positiva, aunque en algunos casos esta señal fue débil (2, 10 y 15), y la señal parental fue negativa. Inicialmente, esto indicaba que tenían la estructura genómica buscada.



DsRed1+SV40polyA = PCR parental = PCR 2, 7 al 15 = placas de lisis (+) = control positivo (-) = control negativo M = pcDNAii/*Hin*dIII

Figura 8.4. Análisis por PCR de las placas de lisis picadas del ensayo de placas de la cf-47c. Ured-Xma y Lred-Sfi fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal recombinante (*DsRed1*+SV40polyA). U-B y phn-Back fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal parental. Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento correspondiente de las diferentes PCRs se encuentra recuadrado y su tamaño indicado. El control positivo para la PCR *DsRed1* + SV40polyA fue plERUPOD-47. El control positivo para la PCR parental fue el clon 2₄ AgMNPV-I*Ppo*I.

Estas placas se re-amplificaron por cultivo celular, se extrajo su DNA viral y se realizaron digestiones con *Hin*dIII, *BgI*II y *Eco*RV. A continuación se presenta el patrón esperado de estas especies recombinantes (figura 8.5).

Fragmento	AgMNPV-2D /HindIII	AgMNPV-IPpoI / HindIII	AgMNPV- pIERUPOD47 / HindIII
А	19232	19232	19232
В	16446	16446	16446
G*		10194	
С	9942	9942	9942
D	8976	8976	8976
Е	8540	8540	8540
F	8356	8356	8356
			7336
G	7262		
Н	6164	6164	6164
Ι	5517	5517	5517
J	4967	4967	4967
			4304
K	4080	4080	4080
L	3477	3477	3477
М	3443	3443	3443
N	3222	3222	3222
0	3214	3214	3214
Р	2841	2841	2841
Q	2512	2512	2512
R	2381	2381	2381
S	2381	2381	2381
Т	2267	2267	2267
U	2114	2114	2114
V	2114	2114	2114
W	2104	2104	2104
Х	1082	1082	1082
			348
Y	337	337	337



AgMNPV-pIERUPOD-47

Fragmento	AgMNPV-2D / EcoRI	AgMNPV-IPpoI / EcoRI	AgMNPV- pIERUPOD47 / EcoRI
A	38716	38716	38716
В	18593	18593	18593
С	17845	17845	17845
D	13629	13629	13629
Е	10917	10917	10917
F	10508	10508	10508
G	10174		
			9895
G*		7571	
Н	6403	6403	6403
G**		5553	
Ι	5113	5113	5113
			3802
			1173
J	1095	1095	1095
			59







Fragmento	AgMNPV-2D / BglII	AgMNPV-IPpoI / BglII	AgMNPV- pIERUPOD47 / BglII
А	34264	34264	34264
			34051
B *		32257	
В	29296		
С	24081	24081	24081
D	21914	21914	21914
Е	17805	17805	17805
F	4497	4497	4497
G	1132	1132	1132



Figura 8.5. Patrones de restricción esperados con *Hind*III, *Eco*RI y *Bgl*II de los recombinantes de las cotransfecciones con AgMNPV-IPpol y pIERUPOD-47. Las tablas muestran los diferentes patrones de restricción con *Hin*dIII, *Eco*RI y *Bgl*II. Los cálculos realizados para llegar a los datos que se encuentran resaltados en las mismas, se encuentran esquematizados en la parte inferior de cada tabla. En verde están resaltados los fragmentos *Hin*dIII-G, *Eco*RI-G y *Bgl*II-B en AgMNPV-2D. En celeste están resaltados los fragmentos característicos de AgMNPV-IPpol (resultado de una doble recombinación homóloga entre AgMNPV-2D y pAg-IPpol) adonde se está dirigiendo la modificación (HindIII-G*, *Eco*RI-G* y *Eco*RI-G**, *Bgl*II-B*). En amarillo están resaltados los fragmentos que deberían aparecer en el recombinante AgMNPV-IPpoI y pIERUPOD-47 (resultado de una doble recombinación homóloga entre AgMNPV-I*PpoI* y pIERUPOD-47).

Los ensayos de restricción mostraron irregularidades en la estructura genómica de los clones, ya que no presentaban el patrón esperado. A pesar de las irregularidades, todos los clones digeridos con las diferentes enzimas presentaron el mismo patrón de restricción. No existía variación entre los mismos (ver figura 8.6). Sin embargo, no puede descartarse que todos hayan provenido de un único progenitor recombinante.



 $Bg/II = digestion \qquad 3 = AgMNPV-IPpol \qquad M = \lambda/HindIII$ HindIII = digestion

Figura 8.6. Digestión con EcoRI, *Bg/*II y *Hin*dIII de dos clones aislados a partir de la cf-**47c.** Las bandas recuadradas en amarillo corresponden a aquellas que aparecieron en los clones de la cf-47c. Las recuadradas en azul corresponden a las características de AgMNPV-I*Ppo*I, adonde se está dirigiendo la recombinación homóloga (no se muestra aquella característica de la digestión con *Bg/*II, ya que no se diferencia debido a la gran cantidad de DNA cargado en el gel). Las bandas recuadradas en verde corresponden a las de AgMNPV-2D. También se indica la letra que identifica a cada banda en la digestión de AgMNPV-2D con *Hin*dIII (ver figura 8.5). Como se puede apreciar comparando las fotos de esta figura con los datos de la figura 8.5, el patrón de restricción de los clones de la cf-47c no guardaba relación alguna con el esperado.

Estos resultados totalmente inesperados fueron desconcertantes, pero atribuimos la generación de estas especies recombinantes aberrantes a las condiciones particulares (ya descriptas) de la **cf-47c**. Por esto, realizamos una nueva cotransfección de acuerdo al siguiente esquema:

	I COTRANSFECCIÓN 01/10/02					
N°	AgMNPV-I <i>Ppo</i> l	AgMNPV-I <i>Ppo</i> I	pIERUPOD-47	Medio	Tfx [™] -	Vf
	2 4 ^(a)	2 4 ^(a)		sin	10	
	linealizado	circular		suero		
1a	10 μl ~100 ng		0,5 μl ~500 ng	679,5 μl	10 μl	700µl
(cf-47d)						-
2a	10 μl ~100 ng			679,5 μl	10 μl	700µl
3a		2 μl ~100 ng	0,5 μl ~500 ng	687,5 μl	10 μl	700µl
(cf-47e)				•		•
4a		2 μl ~100 ng		688 μl	10 μl	700µl
5a	Control (-) con Tfx10		690 μl	10 μl	700µl	
6a	Co	ontrol (-) sin Tfx10		700µl	-	700µl

^(a) clon 2₄ AgMNPV-I*Ppol*

Los sobrenadantes de transfección fueron cosechados a los 6 días post-transfección y se agregó X-gal a las monocapas celulares para identificar actividad del virus parental. La cotransfección 1a (**cf-47d**) no presentó ninguna coloración. Esto preliminarmente indicaba que la cotransfección había sido eficiente.

Se realizó un ensayo de placas a partir del sobrenadante cf-47d. Al sexto día p.i., presentaba leves señales de infección la placa infectada con una alícuota directa de este sobrenadante de cotransfección. Sin embargo las placas de lisis no se diferenciaban bien, así que se las tuvo que seleccionar mirando la monocapa celular con el microscopio óptico. También se picaron placas de lisis de otras diluciones. Todas fueron amplificadas por pasaje celular. Las únicas que presentaron señales de infección fueron las 10 que habían sido picadas de la placa infectada con una alícuota directa del sobrenadante cf-47d. A estas monocapas celulares se les agregó X-gal y no se detectó actividad de β-galactosidasa. Es de recalcar que en estas amplificaciones se veían muchos más poliedros que en las amplificaciones de la cf-47c. Se re-amplificaron las placas de lisis para extraer el DNA viral y se lo digirió en forma independiente con *Hin*dIII, *Eco*RV y *BgI*II. Las digestiones pusieron de manifiesto que, en todos los casos, se trataba de clones que presentaban una misma

estructura genómica aberrante, pero diferente a la de los clones aislados de cf-47c (ver figura 8.7). Como se puede apreciar comparando estas fotos con los datos aportados por la figura 8.5, el patrón de restricción de los clones de la cf-47d tampoco guardaba relación alguna con el esperado.



Figura 8.7. Digestión con HindIII y EcoRI de dos clones aislados a partir de la cf-47d. Las bandas recuadradas en amarillo corresponden a aquellas que aparecieron en los clones de la cf-47c y de la cf-47d. Las bandas recuadradas en verde corresponden a las de AgMNPV-2D. También se indica la letra que identifica a cada banda en las diferentes digestiones (ver figura 8.5). Se incluyó uno de los clones aberrantes de la cf-47c a modo comparativo.

Para analizar cuantitativamente la frecuencia en la generación de recombinantes de esta última cotransfección, se procesaron los sobrenadantes de las cotransfecciones **cf-47d** y **cf-47e** (DNA viral linealizado y circular, respectivamente) y de sus amplificaciones por cultivo celular, y se hicieron las PCRs correspondientes. Estos resultados confirmaron que, cuando se usó DNA viral linealizado, el *background* de parental era muy bajo y que la generación de recombinantes había sido mucho más eficiente (ver figura 8.8).



 $DsRed1 = PCR \quad 1 = cf-47d \text{ (con DNA viral linealizado)} \quad (+) = control positivo$ $parental = PCR \quad 3 = cf-47e \text{ (con DNA viral circular)} \quad (-) = control negativo$ (-) = control negativo(-) =

M = pcDNAii/*Hin*dIII+*Hinf*I

Figura 8.8. Análisis por PCR de la eficiencia de la cotransfección con AgMNPV-I*Ppol* y pIERUPOD-47 (cf-47d y cf-47e). Ured-Xma y Lred-Sfi fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal recombinante (*DsRed1*+SV40polyA). U-B y phn-Back fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal parental. Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación de la PCR que levanta las secuencias del *DsRed1* + SV40polyA (señal recombinante), se encuentra recuadrado en rojo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que levanta secuencias parentales, se encuentra recuadrado en azul y su tamaño está indicado. El control positivo para la PCR *DsRed1* + SV40polyA fue pIERUPOD-47. El control positivo para la PCR parental fue el clon 2₄ AgMNPV-I*Ppo*I.

En la figura 8.8, la fotografía de la izquierda muestra los resultados de una PCR realizada sobre el sobrenadante de las cotransfecciones. Aquí no se puede descartar la posibilidad de que parte de la señal recombinante se deba a DNA plasmídico residual. Aparentemente, habría una mayor señal recombinante en la cf-47e, donde se utilizó virus circular. Sin embargo, la señal de virus parental es fuerte en la cf-47e, mientras que es indetectable en la cf-47d, donde se utilizó virus linealizado.

La fotografía de la derecha indica los resultados de una PCR realizada sobre las mismas cotransfecciones pero amplificadas por cultivo celular; aquí ya se elimina la posibilidad de DNA plasmídico residual. Hay una fuerte señal recombinante en la cf-47d, mientras que ésta es casi imperceptible en la cf-47e. Por otro lado, la señal parental en la cf-47d, que era indetectable en la PCR realizada sobre el sobrenadante de cotransfección no amplificado por cultivo celular, aumentó significativamente. Esto se podría deber a una transfección más eficiente de la pequeña fracción de DNA viral que queda sin digerir, que estaría prontamente disponible para ser replicado. Sin embargo, mientras que la señal recombinante en la cotransfección por cultivo celular, en la cotransfección donde se usó DNA viral linealizado, luego de una ronda de amplificación por cultivo celular, en cotransfección donde se usó DNA viral linealizado, luego de una ronda de amplificación por cultivo celular la señal recombinante aumentó.

Integrando todos estos resultados, era evidente que la frecuencia en la producción de recombinantes de la cotransfección utilizando DNA viral linealizado había sido muy elevada. Esto mismo se había comprobado en cada uno de los diferentes ensayos realizados. Sin embargo, todas las especies recombinantes producidas eran clones con genotipos inesperados y aberrantes.

La única explicación que pudimos postular en esta instancia, fue que la repetición de secuencias aportadas por el vector de transferencia podía estar provocando recombinaciones intramoleculares inesperadas. Por un lado, estaban las 600 pb agregadas de *E1* entre ambos promotores de poliedrina y, por el otro, estaban las dos copias del promotor de poliedrina separadas por 600 pb. Debido a esto, decidimos modificar el vector de transferencia, cambiando el promotor de poliedrina que dirigía la expresión del gen *E1* por el de *p10*, para poder usar esta nueva versión del plásmido en las futuras cotransfecciones y así eliminar la generación de especies aberrantes.

Generación de recombinantes utilizando a Ag∆EGT-*lacZ* como virus parental y a pIERUPOD como vector de transferencia

Se comenzó en forma paralela con el aislamiento del AgMNPVAEGT-pIERUPOD. Se realizó una cotransfección de acuerdo al siguiente esquema:

	II COTRANSFECCIÓN 01/10/02		medio	Tfx10	V _f
N°	Ag∆EGT S/D	pIERUPOD-47	sin		
	-		suero		
1b	2 μl ~100 ng	0,5 μl ~500 ng	687,5 μl	10 μl	700µl
(cf-47∆)				-	
2b	Control (-) con Tfx10		690 μl	10 μl	700µl

Los sobrenadantes de transfección fueron recogidos a los 6 días post-transfección. Se realizó un ensayo de placas a partir del sobrenadante de **cf-47** Δ . En este caso, tanto el virus parental como el recombinante presentarían actividad de β -galactosidasa, ya que el ORF de *egt* fue interrumpido por la inserción de un *cassette hsp70-lacZ*. Sin embargo, como las placas de lisis azules son mucho más fáciles de identificar que las blancas, a los ensayos de placas de esta cotransfección se les agregó X-gal. No se utilizó RN adicionalmente, porque no había placas de lisis blancas que identificar.

Debido a que, hasta el momento, no se había observado la expresión del *DsRed1*, los fenotipos virales parental y recombinante eran indistinguibles. Por otro lado, el *background* de parental iba a ser altísimo dado que éste no podía ser linealizado. Por todo esto, la estrategia para el aislamiento del recombinante consistía en picar la mayor cantidad posible de placas de lisis aisladas, procesarlas adecuadamente y analizarlas por PCR.

De este primer ensayo de placas se levantaron 26 placas de lisis de las tres diluciones mayores (10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶). Se las procesó y analizó por PCR (ver figura 8.9).



parental = PCR $-6_1 a - 6_3 y - 5_1 a - 5_{11}$ = placas de lisis (-) = control negativo *DsRed1*+SV40polyA = PCR (+) = control positivo M = pcDNAii/*Hin*dIII+*Hin*fl

Figura 8.9. PCR realizada sobre las placas de lisis picadas del ensayo de placas realizado a partir de la cf-47 Δ (cotransfección con Ag Δ EGT-*lacZ* y plERUPOD-47). Ured-Xma y Lred-Sfi fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal recombinante (*DsRed1*+SV40polyA). Uup-orf y Lup-orf fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal parental. Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación de la PCR que amplifica las secuencias del *DsRed1* + SV40polyA (señal recombinante), se encuentra recuadrado en rojo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que amplifica secuencias parentales se encuentra recuadrado en verde y su tamaño está indicado. El color diferente para la señal parental se debe a que la PCR es otra porque se usó un virus parental distinto. Las secuencias parentales que aquí se amplifican son parte de las UP + parte del ORF de poliedrina. La fotografía fue compaginada para facilitar la interpretación de los resultados, ya que esta PCR fue corrida en varios geles. El control positivo para la PCR *DsRed1* + SV40 polyA fue plERUPOD-47. El control positivo para la PCR parental fue Ag Δ EGT-*lacZ*.

En la figura 8.9 se puede apreciar que en todas las placas de lisis en las que se amplificaron secuencias recombinantes, también se amplificaron secuencias parentales. Esto implicaba que todas las placas de lisis analizadas presentaban contaminación con parental o eran simples recombinantes.

Por esto, se decidió realizar un nuevo ensayo de placas a partir del material eluido de una de las placas de lisis que había presentado una fuerte señal recombinante [-6₁; el número (-6) indica la dilución de la que fue picada y el subíndice (1) indica el número de placa picada de esa dilución]. En este ensayo de placas, sólo se observaron placas de lisis azules y definidas en las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁴. Se picaron 16 en total. Éstas fueron procesadas y analizadas por PCR (ver figura 8.10).



Figura 8.10. PCR sobre las placas de lisis picadas del ensayo de placas realizado a partir de -6₁. Ured-Xma y Lred-Sfi fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal recombinante (*DsRed1*+SV40polyA). El fragmento de amplificación de la PCR que levanta las secuencias del *DsRed1* + SV40polyA (señal recombinante), se encuentra recuadrado en rojo y su tamaño está indicado. Se encuentran indicadas aquellas placas que presentaron una tenue señal, para facilitar su visualización. El control positivo para la PCR *DsRed1* + SV40polyA fue pIERUPOD-47. En la figura sólo se muestran los resultados de la PCR para amplificar secuencias recombinantes, ya que los de la PCR para identificar señal parental fueron similares a los de la figura anterior.

Todas las placas de lisis analizadas presentaron una fuerte señal de parental. Como se puede apreciar en la figura 8.10, pocas presentaron una señal recombinante muy débil.

Por esto se decidió realizar un ensayo de placas a partir de una de las placas de lisis del ensayo realizado sobre cf-47 Δ , que también había presentado una fuerte señal recombinante (-5₈). En este ensayo las placas de lisis azules definidas se encontraron en las diluciones 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵. Se picaron 26 placas, se las procesó como se describe en "Sección IV: Materiales y Métodos" y se hicieron las PCRs correspondientes para identificar señal recombinante y parental (ver figura 8.11).



(+) = control positivo

M = pcDNAii/HindIII+Hinfl

Figura 8.11. PCR sobre las placas de lisis picadas del ensayo de placas realizado sobre -58. Ured-Xma y Lred-Sfi fueron los primers utilizados para amplificar la señal recombinante (DsRed1+SV40polyA). Uup-orf y Lup-orf fueron los primers utilizados para amplificar la señal parental. Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en Materiales y Métodos. El fragmento de amplificación de la PCR que levanta las secuencias del DsRed1 + SV40 polyA (señal recombinante), se encuentra recuadrado en rojo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que levanta secuencias parentales, se encuentra recuadrado en verde y su tamaño está indicado. El control positivo para la PCR DsRed1 + SV40 polyA fue pIERUPOD-47. El control positivo para la PCR parental fue AgAEGT-lacZ. Las fotografías fueron compaginadas para facilitar la interpretación de los resultados, ya que esta PCR fue corrida en varios geles.

Se procesaron y analizaron todas las placas picadas, sin embargo esta figura es una muestra representativa ya que los otros resultados fueron similares.

Nuevamente aquí la señal del recombinante era extremadamente débil en los pocos casos en los que aparecía, mientras que la señal de parental era fuerte en todos las placas.

Se hizo un nuevo ensayo de placas a partir de una de las placas de lisis de este último ensayo que presentó una débil señal recombinante (-5_8-5_1). En este ensayo se desarrollaron placas azules solamente en las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} . Aparentemente el título viral disminuía progresivamente con los sucesivos pasajes por placa. Se picaron 30 placas de lisis azules, se procesaron y se realizaron las PCRs correspondientes. La mayoría de estas placas presentó señal parental y, en la PCR para identificar el recombinante, en todas se amplificó la misma banda inespecífica (ver figura 8.12).



Figura 8.12. PCR realizada sobre las placas de lisis picadas del ensayo de placas a partir de -5_8-5_1 . Ured-Xma y Lred-Sfi fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal recombinante (*DsRed1*+SV40polyA). Uup-orf y Lup-orf fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal parental. Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en Materiales y Métodos. El fragmento de amplificación de la PCR que levanta las secuencias del *DsRed1* + SV40 polyA (señal recombinante), se encuentra recuadrado en rojo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que levanta secuencias parentales, se encuentra recuadrado en verde y su tamaño está indicado. El control positivo para la PCR *DsRed1* + SV40 polyA fue pIERUPOD-47. El control positivo para la PCR *DsRed1* + SV40 polyA fue pIERUPOD-47. El control positivo para la PCR parental fue Ag Δ EGT-*lacZ* Las fotografías fueron compaginadas para facilitar la interpretación de los resultados, ya que esta PCR fue corrida en varios geles.

Todas las placas picadas fueron procesadas, sin embargo esta figura es una muestra representativa ya que el resto de los resultados fue similar.

La señal parental fue menor en las placas de lisis de este ensayo, si se la compara con la de las placas de lisis de los ensayos anteriores. Por otro lado, en la PCR para identificar señal recombinante sólo se amplificó una banda inespecífica. Esto también sugeriría que ocurrió una disminución gradual del título viral a lo largo de los sucesivos pasajes por placa y que hubo una pérdida total de las especies recombinantes, aunque no se puede descartar que fueran indetectables por este método.

Frente a estos resultados, se hizo una amplificación por pasaje celular de dos de las placas de lisis del primer ensayo de placas, que habían presentado una fuerte señal recombinante $(-6_1 \text{ y } -5_3)$. Esto se hizo para terminar de definir si la señal recombinante se debía a la presencia del doble recombinante deseado (contaminado con parental) o si se trataba de un simple recombinante que se resolvía a parental luego de la amplificación. Se extrajo el DNA viral de $-6_1 \text{ y } -5_3$ y se realizaron digestiones con *Bam*HI y *Sma*l conjuntamente, de acuerdo a los datos aportados por Pinedo *et al* (2003). El patrón de restricción de ambas placas de lisis fue el del DNA viral parental (ver figura 8.13). Esto indicaba que era muy probable que se tratara de simples recombinantes que habían segregado preferentemente para producir virus parental en lugar del doble recombinante, o que éste último había sufrido una selección negativa



Fragmento	AgMNPV-2D / BamHI+SmaI	Ag∆EGT-lacZ / BamHI+SmaI	Ag∆EGT <i>lacZ-</i> pIERUPOD47 / BamHI+SmaI
А	45989	45989	45989
В	28181	28181	
			23196
С	22117	22117	22117
D	18087	18087	18087
Е	12501	12501	12501
			9067
		9000	9000
F	5333		
G	785	785	785

1 = AgMNPV-2D

2 = Ag∆EGT-*lacZ*

3 y 4 = placas -6_1 y -5_3 , amplificadas por cultivo celular,

de la cotransfección con Ag∆EGT-*lacZ* y pIERUPOD-47 M = λ/*Hin*dIII

Figura 8.13. Digestión con *Bam*HI + *Sma*I de dos placas de lisis producto de la cf-47 Δ (cotransfección con Ag Δ EGT-*lacZ* y plERUPOD-47). En la fotografía de la izquierda, las bandas recuadradas en naranja corresponden a aquellas características de Ag Δ EGT-*lacZ*. Las bandas recuadradas en verde corresponden a aquellas adonde se está dirigiendo la modificación en AgMNPV-2D; la banda F fue la que se modificó en la generación de Ag Δ EGT-*lacZ*; la banda B habría sido la modificada en la generación de Ag Δ EGT*lacZ*-plERUPOD47.

En la parte derecha de la figura se encuentra una tabla que indica los patrones de restricción correspondientes a la digestión *Bam*HI+*Sma*I para AgMNPV-2D, Ag∆EGT-*lacZ* y Ag∆EGT-*lacZ*-pIERUPOD47. Los colores con los que están resaltados los fragmentos se corresponden con los de la fotografía.

En la fotografía se puede apreciar que las calles 3 y 4 (placas de lisis -6_1 y -5_3) tienen el mismo patrón que la calle 2 (Ag Δ EGT-*lacZ*), debido a que no se observa ningún doblete a la altura de la banda de 9 kb. La zona de las bandas de mayor peso es indiferenciable debido a la gran cantidad de DNA cargada en el gel.

DISCUSIÓN

Generación de recombinantes utilizando a AgMNPV-IPpol como virus parental y a pIERUPOD como vector de transferencia

Consideramos que iba a ser muy directa la generación de recombinantes a partir de AgMNPV-IPpol y de los dos clones del vector de transferencia de segunda generación (pIERUPOD-21 y pIERUPOD-47), debido a que en estas cotransfecciones se podía linealizar el virus parental. Sin embargo, nos encontramos con muchos problemas inesperados.

La frecuencia de generación de recombinantes en las cotransfecciones realizadas con AgMNPV-IPpol y pIERUPOD-21 fue mucho menor que la esperada, ya que el background de virus parental era elevado y que los recombinantes obtenidos eran mayormente simples recombinantes. A pesar de esto, la frecuencia fue mayor que cuando se utilizó DNA viral circular (ver figura 8.2).

La frecuencia de generación de recombinantes en las cotransfecciones realizadas con AgMNPV-IPpol y pIERUPOD-47 fue elevada, ya que todas las especies analizadas resultaron ser clones dobles recombinantes. Sin embargo, todos estos clones presentaron estructuras genómicas aberrantes, tanto en las cotransfecciones realizadas de la manera clásica (cf-47d), como en aquellas en las que se buscaron las especies recombinantes tardías (cf-47c).

Con respecto a la menor frecuencia en la producción de recombinantes de las cotransfecciones utilizando pIERUPOD-21, una posibilidad era que la enzima (I-PpoI) no estuviese digiriendo adecuadamente el DNA viral. Sin embargo, esto no era muy probable debido a que la frecuencia de producción de recombinantes de las cotransfecciones realizadas con pIERUPOD-47 había sido muy elevada. Otra posibilidad era que, aunque el DNA viral fue extraído de la misma manera para todas las cotransfecciones, las diferencias inherentes a la manipulación hayan generado un DNA viral que era digerido menos eficientemente en las cotransfecciones con pIERUPOD-21. Esto habría afectado directamente la frecuencia de producción de recombinantes.

El hecho de que no se haya observado en ninguna instancia la expresión del DsRed1, se explica claramente por la producción de especies recombinantes aberrantes en las cotransfecciones con pIERUPOD-47. En el caso de aquellas realizadas con pIERUPOD-21, se explicaría por la baja eficiencia de las mismas con un alto porcentaje relativo de simples recombinantes, que se perdían luego de una ronda de amplificación por cultivo celular.

Un dato importante e interesante es que la cf-47c fue la única cotransfección en la que se observó la expresión de una proteína del tamaño correspondiente al de E1 (ver figura 8.3). Además, este sobrenadante de transfección producía un efecto citopático muy notorio que no se había observado antes, que consistía en que las células tenían aspecto brotado. Ambos datos apuntaban a que el fenotipo que se observaba en las células infectadas se debía a la acción de E1.

Generación de recombinantes utilizando a AgAEGT-lacZ como virus parental y a pIERUPOD como vector de transferencia

Con respecto a los resultados obtenidos de la cotransfección con vAgAEGT-lacZ y pIERUPOD-47, por un lado, se observó una disminución del título viral con el sucesivo pasaje por placas. A medida que aumentaba el número de pasajes, las especies virales se encontraban en diluciones cada vez menores en los ensayos de placas. Por otro lado, se observó un fenómeno similar al ocurrido en las cotransfecciones entre AgMNPV-I*Ppo*I y pIERUPOD-21 (aunque en este último el número de recombinantes era mucho mayor), en cuanto a que las especies recombinantes obtenidas eran simples recombinantes que, luego de dos pasajes por cultivo celular como máximo, se resolvían a parental (en este caso, vAg∆EGT-*lacZ*).

El alto porcentaje de simples recombinantes en esta cotransfección se debía a que el virus parental no podía ser linealizado. Por un lado, un solo evento de recombinación es mucho más probable que dos y, por otro, cuando se utiliza DNA viral circular, los simples recombinantes son viables debido a que son circulares (ver Capítulo 4 para un análisis más detallado). Como los simples recombinantes se perdían luego de uno o dos pasajes por célula, la señal recombinante en el siguiente ensayo de placas era casi nula.

En esta etapa del trabajo de tesis doctoral, concluimos que era probable que la generación de especies recombinantes aberrantes se debiera a que las dos versiones obtenidas de pIERUPOD (clones 21 y 47) no tenían la estructura original buscada. En ambos casos existían secuencias repetidas. Por un lado, en los dos clones (pIERUPOD-21 y pIERUPOD-47) se encontraban ambas copias del promotor de poliedrina y, por otro, en el caso particular del clon 47, existía una repetición de las secuencias E1 debido a las 600 pb (de secuencias E1) agregadas entre ambos promotores de poliedrina, y a la presencia del ORF de E1. Era posible que esta repetición de secuencias indujera eventos de recombinación intramoleculares inesperados que producían estas especies recombinantes aberrantes, aunque estables y selectivamente competitivas. En el caso del clon 21, era posible que las 62 pb faltantes del P_{polh} que dirigía la expresión de *E1*, hicieran al recombinante menos competitivo en co-infecciones con el virus parental, y por esto era seleccionado negativamente en los ensayos de placas.

Concluyendo, analizamos que para poder obtener el virus recombinante buscado sería conveniente modificar el vector de transferencia, cambiando el promotor de poliedrina que dirigía la expresión de *E1* por el de p10, otro gen muy tardío.



CAPÍTULO 9

Construcción de una versión alternativa del plásmido de transferencia de segunda generación (plERUPOD- P_{p10}).

INTRODUCCIÓN

Buscando evitar las dificultades que presentó el aislamiento del recombinante deseado a partir de los clones 21 y 47 pIERUPOD, se prosiguió a la generación de otra versión del vector de transferencia, cambiando el promotor de poliedrina que dirigía la expresión de *E1* por el de *p10*. La finalidad de esta nueva versión era eliminar la repetición de secuencias en el vector de transferencia, ya que era probable que ésta fuera la causa de los procesos de recombinación inesperados que producían las especies recombinantes aberrantes (ver Capítulo 8 de Resultados y Discusión).

RESULTADOS

La secuencia del promotor de *p10* se pudo obtener del *GenBank*, a partir de la caracterización de la región del gen realizada por Razuck *et al* (2002). Los cebadores se diseñaron a fin de agregarle los sitios de restricción correspondientes en la construcción final (*Ndel* y *Sgfl*) (ver "Sección IV: Materiales y Métodos"). En una **primer etapa**, se subclonó el fragmento de PCR en pZErOTM-2 (Invitrogen) (**pZP**_{*p10*}). Esta construcción se constató por PCR, digestión enzimática y secuenciación (ver figura 9.1). En la **segunda etapa**, en una primer instancia se intentó clonar P_{*p10*}, producto de la digestión de pZP_{*p10*} con *Ndel* y *Sgfl*, en pIERUPOD-21 digerido con las mismas enzimas (*Ndel* y *Sgfl*). Sin embargo, los múltiples intentos arrojaron sólo resultados negativos. Finalmente, se ensayó clonarlo en pIERUPOD-47, con la misma metodología, y se obtuvieron 5 clones positivos (**pIERUPOD-P**_{*p10*}, ver figura 9.1). La correcta disposición y secuencia de los fragmentos clonados, fue constatada por PCR, digestión enzimática y secuenciación.


Figura 9.1. Construcción de pIERUPOD-P_{*p*10}. En la parte superior de la figura se encuentra representada la estrategia de PCR que se utilizó para el subclonado de las secuencias P_{p10} en pZErOTM-2. El producto de amplificación correspondiente, de 199 pb, fue purificado (GFXTM, Amersham Pharmacia Biotech) y ligado en pZErOTM-2 digerido con *Eco*RV, en una relación 2:1 (inserto:vector). Con esta ligación se transformaron bacterias. Se obtuvo 1 clon positivo (**pZP**_{*p*10}).

En la segunda etapa se digirieron pZP_{*p10*} y pIERUPOD-47 con *Nde*l y *Sgf*l. Se purificó el fragmento correspondiente de pIERUPOD-47 de 8305 pb (por filtrado a través de lana de vidrio) y se inactivó la digestión de p ZP_{*p10*}. Ambos productos fueron ligados en una relación 375:1 (inserto:vector) y luego se transformaron bacterias con esta ligación. Se obtuvieron 5 clones positivos (**pIERUPOD-P**_{*p10*}).

Las digestiones y/o PCRs confirmatorias de cada fase se encuentran incluidas en la figura. Los fragmentos y sus tamaños correspondientes están resaltados.

DISCUSIÓN

Resultó bastante directo el intercambio del promotor de poliedrina por el de *p10* para construir la versión pIERUPOD-P_{*p10*}, a pesar de la dificultad que presentó inicialmente la generación de esta versión alternativa a partir de pIERUPOD-21. Especialmente si se lo compara con la etapa equivalente en la construcción de la versión original de pIERUPOD (que dio como resultado los clones 21 y 47).

Esto daría mayor sustento a nuestra presunción de que, en la construcción de un vector cualquiera, la repetición de una misma secuencia en sentidos opuestos y de manera consecutiva resulta inestable en bacterias. En base a la observación de los eventos que ocurrieron espontáneamente y que dieron lugar a los clones pIERUPOD 21 y 47, es posible que la eliminación de algunas decenas de bases de alguna de las dos copias o el agregado de bases entre ambas secuencias, sea suficiente para otorgar a la construcción la estabilidad suficiente como para que sea viable en bacterias.



CAPÍTULO 10

CAPÍTULO 10

Generación de virus recombinantes a partir de una versión alternativa del plásmido original (pIERUPOD-P_{*p*10}).

INTRODUCCIÓN

Una vez finalizada la construcción de pIERUPOD- P_{p10} , se procedió al aislamiento del virus recombinante buscado, utilizando a AgMNPV-I*Ppo*I como virus parental (recombinante con sitios únicos de restricción). Debido a que en esta versión del vector de transferencia no se encontraban secuencias repetidas, se esperaba evitar los procesos inesperados de recombinación homóloga que produjeron las especies aberrantes en las cotransfecciones con AgMNPV-I*Ppo*I y pIERUPOD-47 (ver Capítulo 8 de Resultados y Discusión), y así aislar virus recombinantes con la estructura genómica esperada.

Para la generación de recombinantes virales se utilizaron ensayos de cotransfección y para su aislamiento el método del ensayo de placas. Las placas de lisis se identificaron mediante la adición de X-Gal y Rojo Neutro (RN) (ver Capítulo 8 de Resultados y Discusión y "Sección IV: Materiales y Métodos").

RESULTADOS

Una vez purificado el DNA de pIERUPOD- P_{p10} , se realizó una cotransfección de acuerdo al siguiente esquema (el detalle de las cotransfecciones mencionadas en este Capítulo, con la nomenclatura abreviada correspondiente, se encuentra en la "Sección VI: Apéndice"):

	Сотя	3/03	medio	Tfx™-	Vf	
N°	AgMNPV-I <i>Ppo</i> l	AgMNPV-I <i>Ppo</i> I	pIERUPOD-	sin	10	
	8 ₂ ^(a)	8 ₂ ^(a)	P _{<i>p</i>10}	suero		
	linealizado	sin digerir				
1	5 μl ~100 ng		0,5 μl ~500 ng	684,5 μl	10 μl	700µl
(cf-p10a)				-		-
2	5 μl ~100 ng			685 μl	10 μl	700µl
3		1 μl ~100 ng	0,5 μl ~500 ng	688,5 μl	10 μl	700µl
4		1 μl ~100 ng		689 μl	10 μl	700µl
5	Со	ntrol (-) sin Tfx [™] -1	0	700 μl	-	700µl

^(a) clon 8₂ AgMNPV-I*Ppol*

Los sobrenadantes se cosecharon a los 6 días post-transfección. Se tomaron alícuotas de los mismos para procesarlas y analizarlas por PCR y para hacer amplificaciones por cultivo celular. Estas últimas se levantaron a los 4 días p.i. y también se procesaron para analizarlas PCR. Los resultados de las PCRs de los sobrenadantes de cotransfección y de las amplificaciones por cultivo celular de los sobrenadantes, indicaron que había sido baja la frecuencia de producción de recombinantes de esta transfección (ver figura 10.1).



Figura 10.1. Análisis por PCR de la frecuencia de generación de recombinantes de la cotransfección con AgMNPV-I*Ppol* y pIERUPOD-P_{*p*10}. Lpr10-Sgf y Lpr(c)-Sgf fueron los *primers* utilizados para amplificar el DNA viral recombinante ($P_{p10} + P_{polh}$). L-B y phn-Back fueron los *primers* utilizados para amplificar el DNA viral parental. Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias de ambos promotores ($P_{p10}+P_{polh}$), se encuentra recuadrado en verde claro y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica secuencias parentales, se encuentra recuadrado en azul y su tamaño está indicado.

La fotografía de la izquierda muestra los resultados de la PCR realizada sobre el DNA aislado de los sobrenadantes de las cotransfecciones. La de la derecha muestra los productos de PCR de los sobrenadantes de cotransfección amplificados previamente por cultivo celular. El control positivo para la PCR $P_{p10} + P_{polh}$ fue pIERUPOD- P_{p10} . El control positivo para la PCR parental fue el clon 8₂ AgMNPV-I*Ppo*I.

En las PCRs de los sobrenadantes de cotransfección no se puede descartar la posibilidad de que parte de la señal recombinante se deba a DNA plasmídico residual, ya que se ven

señales recombinantes de igual intensidad en las cotransfecciones 1 y 3 donde se utilizó virus linealizado y circular, respectivamente, además de DNA plasmídico. En las cotransfecciones 2 y 4 no se observa señal recombinante, porque aquí se transfectó solamente con DNA viral (linealizado y circular, respectivamente). En cuanto a la señal parental, se observa una pequeña diferencia en las cotransfecciones 1 y 3, con una menor señal en la cotransfección en la que se utilizó DNA viral lineal (*cf*1). En la cotransfección 2 no se observa señal parental alguna (la transfección se realizó con DNA viral linealizado solamente). En la cotransfección 4, en la que se utilizó solamente DNA viral circular, se observa una señal comparable a la de la cotransfección 1.

La fotografía de la derecha muestra los resultados de las PCRs realizadas sobre las cotransfecciones previamente amplificadas por cultivo celular. Aquí se elimina la posibilidad de DNA plasmídico residual. La señal recombinante de la cotransfección 1 fue más intensa que la de cotransfección 3. Las cotransfecciones 2 y 4 siguieron dando resultados negativos para esta PCR. Sin embargo, la intensidad de señal parental fue la misma en las cotransfecciones 1, 3 y 4. Esto indicaba que el *background* de DNA parental en la cotransfección 2 no dio señal parental en esta PCR, al igual que en el ensayo hecho directamente con muestras de sobrenadantes de cotransfección.

La cotransfección 5 dio resultados negativos en todos los casos porque era el control negativo de la cotransfección.

Sin embargo, como los ensayos de transfecciones posteriores produjeron una proporción menor de virus recombinantes o directamente dieron resultados negativos, se decidió seguir adelante con esta cotransfección para intentar aislar el recombinante deseado, mientras se buscaba solucionar el problema de la baja eficiencia de las transfecciones. Para esto, se tomó una alícuota de la **cf-p10a** para realizar un ensayo de placas. Las placas de lisis se levantaron a los 7 días p.i. Debido al alto *background* de virus parental, las placas de lisis fueron numerosas y se tuvieron que picar de las diluciones mayores, de manera de analizar aquellas que estuvieran más aisladas. Esto fue una diferencia importante con las cotransfecciones realizadas con pIERUPOD-47. Los ensayos de placas de estas últimas, sólo presentaban placas de lisis en aquellas placas que habían sido infectadas con una alícuota directa de los sobrenadantes correspondientes de transfección.

Las placas de lisis picadas del ensayo de placas de **cf-p10a**, aparentemente blancas, fueron procesadas y analizadas por PCR. De todas las placas analizadas sólo dos presentaron señal recombinante y parental (-3_7 y -3_8), lo que podía deberse a dobles recombinantes

contaminados con virus parental o a simples recombinantes. El resto de las placas presentó el genotipo del virus parental (ver figura 10.2).



 $\begin{array}{ll} \mathsf{P}_{\textit{pnt}} + \mathsf{P}_{\textit{polh}} = \mathsf{PCR} & -3_{_{16}} = \mathsf{placas} \ \mathsf{del} \ \mathsf{lisis} & (-) = \mathsf{control} \ \mathsf{negativo} \\ \mathsf{parental} = \mathsf{PCR} & (+) = \mathsf{control} \ \mathsf{positivo} & \mathsf{M} = \lambda/\mathit{Hind}\mathsf{III} \end{array}$

Figura 10.2. PCR realizada sobre las placas de lisis picadas del ensayo de placas realizado a partir de cf-p10a (cotransfección con AgMNPV-I*Ppol* y plERUPOD-P_{*p*10}). Lpr10-Sgf y Lpr(c)-Sgf fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal recombinante ($P_{p10}+P_{polh}$). L-B y phn-Back fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal parental. Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias recombinantes ($P_{p10}+P_{polh}$), se encuentra recuadrado en verde claro y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica secuencias parentales se encuentra recuadrado en azul y su tamaño está indicado. El control positivo para la PCR $P_{p10} + P_{polh}$ fue plERUPOD- P_{p10} . El control positivo para la PCR parental fue el clon 8₂ AgMNPV-I*Ppo*I.

Como consecuencia de este resultado, se realizó un segundo ensayo de placas a partir del material eluido de una de las placas de lisis que presentó una intensa señal recombinante (- 3_8). De este segundo ensayo se picaron 26 placas de lisis aparentemente blancas (de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}); se procesaron y analizaron por PCR. Los datos aportados por la misma, indicaron que todas las placas que presentaban señal recombinante, también presentaban señal parental, por lo cual eran dobles recombinantes contaminados con parental o simples recombinantes (ver figura 10.3).

parental = PCR

(+) = control positivo





M = pcDNAii/HindIII+Hinfl

Figura 10.3. PCR realizada sobre las placas de lisis picadas del ensayo de placas realizado a partir de -3₈. Lpr10-Sgf y Lpr(c)-Sgf fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal recombinante ($P_{p10}+P_{polh}$). L-B y phn-Back fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal parental. Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias recombinantes ($P_{p10}+P_{polh}$), se encuentra recuadrado en verde claro y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica secuencias parentales, se encuentra recuadrado en azul y su tamaño está indicado. El control positivo para la PCR $P_{p10} + P_{polh}$ fue plERUPOD- P_{p10} . El control positivo para la PCR parental fue el clon 8₂ AgMNPV-I*Ppo*I.

Debido a este resultado, se procedió a hacer un ensayo de placas con el material eluido de la otra placa de lisis que había presentado una intensa señal recombinante (-3_7) en el ensayo de placas inicial. En este ensayo, las placas de lisis estaban bien definidas y se levantaron 47 aparentemente blancas de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} . Nuevamente, las pocas placas de lisis que presentaban señal recombinante también presentaban señal parental. Muchas que habían sido picadas como placas de lisis definidas, no presentaban señal

pág.189

alguna (ni de recombinante ni de parental). La mayoría de las placas picadas correspondía a virus parental (resultado no mostrado).

Para comprobar si las placas de lisis que presentaban señal recombinante (y parental) eran dobles recombinantes contaminados con virus parental o simples recombinantes, se amplificaron por cultivo celular dos de las placas de lisis $(-3_1 \text{ y} - 3_5)$ del ensayo realizado a partir del material eluido de -3_8 . Se extrajo el DNA viral para hacer un análisis de restricción. Si se trataba del recombinante buscado contaminado con parental, en el patrón de restricción se debería ver una mezcla de ambos. Si se trataba de clones simples recombinantes, se vería directamente el patrón del virus parental o, si el simple recombinante superaba las dos rondas de amplificación, se vería su propio patrón de restricción (ver figura 10.4).



Figura 10.4. Digestión con *Hin*dIII de dos placas de lisis $(-3_1 y - 3_5)$ picadas del ensayo de placas a partir de -3_8 . El fragmento recuadrado en verde corresponde a la banda G de AgMNPV-2D; su tamaño está indicado. Las bandas recuadradas en azul corresponden al fragmento característico de AgMNPV-I*Ppo*I de 10194 pb.

*Hin*dIII = digestión 1 = AgMNPV-I*Ppo*I 2 = AgMNPV-2D 3 y 4 = placas de lisis $-3_1y - 3_5$, amplificadas por cultivo celular M = λ /*Hin*dIII

En la fotografía se puede apreciar que las calles 3 y 4 (placas de lisis -3_1 y -3_5) tienen el mismo patrón que la calle 1 (AgMNPV-I*PpoI*). Por esto se concluyó que se trataba de simples recombinantes que segregaron preferentemente para producir virus parental en lugar del doble recombinante, o que éste último sufrió una selección negativa.

En cuanto a la disminución de la eficiencia en los ensayos de cotransfección, se exploraron varias alternativas para recuperarla. Se hicieron diversos ensayos cambiando diferentes variables:

- ✓ DNA: se buscó disminuir el *background* de parental utilizando diferentes combinaciones de DNA viral y plasmídico linealizados.
- ✓ método de transfección: se probaron diferentes lípidos comerciales (Cellfectin, Tfx[™]-20, Tfx[™]-10) en diversas relaciones (lípido catiónico : DNA) utilizando plásmidos control de expresión transiente.
- ✓ células huésped: se cambió la línea celular en la que regularmente se realizaban las transfecciones (de UF-LAG-286 a Sf9).
- ✓ pureza del DNA: se ensayaron diferentes maneras de extraer los DNAs, buscando incrementar la pureza de los mismos.

Se encontró que un cambio en el método de extracción del DNA mejoró la eficiencia de transfección, aunque no se alcanzaron los niveles iniciales.

Posteriormente, se hizo una nueva cotransfección para aislar el recombinante buscado, de acuerdo al siguiente esquema:

	COTRANSFECC	IÓN 13/09/03	Medio sin	Tfx™-20	V _f
N°	AgMNPV-I <i>Ppol</i> 8 ₂ ^(a)	pIERUPOD-p10	suero	2:1	
	linealizado				
1	30 μl ~1,5 μg	2 μl ~3 μg	953µl	15 μl	1 ml
(cf-p10b)			•	•	
2	Control (-) si	n Tfx™-20	1 ml	-	1 ml

^(a) clon 8₂ AgMNPV-I*Ppo*I

Aquí se usó Tfx[™]-20 en lugar de Tfx[™]-10 y una relación lípido catiónico : DNA óptima para la transfección de células de insecto de acuerdo a la recomendación del fabricante (2:1).

El sobrenadante de cotransfección se cosechó a los 5 días post-transfección. Se veían señales de infección en la **cf-p10b**. La PCR que se hizo sobre una alícuota procesada de cfp10b indicó que el *background* de virus parental era alto (resultado no mostrado).

Sin embargo, se tomó una alícuota para realizar un ensayo de placas. Al quinto día p.i. la progresión de la infección se visualizaba perfectamente (ver figura 10.5).



Figura 10.5. Progreso de la infección en el ensayo de placas realizado sobre la cfp10b. Cada columna corresponde a una dilución diferente, que se encuentra especificada en la parte superior de la figura. Las filas corresponden a diferentes aumentos del microscopio de contraste de fases, indicados en la parte izquierda de la figura. En la parte inferior de la figura hay una ampliación de una de las células del ensayo que contiene poliedros. A la derecha de la misma, hay dos fotografías de células infectadas con AgMNPV-2D y Ag∆EGT-*lacZ*.

Como se puede apreciar en las fotografías de las células sin infectar, el aspecto de las células UFLAG-286 es mayormente irregular, aunque con una tendencia a una forma ahusada. El aspecto redondeado es típico de las células infectadas (para un desarrollo más detallado ver "Sección I: Introducción"). Las dos fotografías de las infecciones con AgMNPV-2D y Ag∆EGT-*lacZ* fueron incluidas a modo comparativo. Se puede apreciar que la producción de poliedros en el ensayo de placas es similar al de la infección con AgMNPV-2D, mientras que el número de poliedros en las células infectadas con Ag∆EGT-*lacZ* es bastante menor que en los otros dos casos.

Se picaron un total de 25 placas de lisis de las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} de este ensayo. Se realizaron PCRs sobre alícuotas procesadas de todas ellas. Los resultados indicaron que, en la mayoría de los casos, se trataba de virus parental y sólo una de las muestras que presentó señal recombinante no presentó señal parental (-5₆) (ver figura 10.6).



parental = PCR -5_6 a -5_{15} = placas de lisis(-) = control negativo $P_{p10}+P_{poln}$ = PCR(+) = control positivoM = pcDNAii/HindIII+Hinfl

Figura 10.6. PCR realizada sobre las placas de lisis picadas del primer ensayo de placas a partir de cf-p10b (segunda cotransfección con AgMNPV-I*Ppol* y plERUPODp10). Lpr10-Sgf y Lpr(c)-Sgf fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal recombinante ($P_{p10}+P_{polh}$). L-B y phn-Back fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal parental. Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias recombinantes ($P_{p10}+P_{polh}$), se encuentra recuadrado en verde claro y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica se encuentra recuadrado en azul y su tamaño está indicado. El control positivo para la PCR $P_{p10} + P_{polh}$ fue plERUPOD- P_{p10} . El control positivo para la PCR $P_{p10} + P_{polh}$ fue plERUPOD- P_{p10} . El control positivo para la PCR $P_{p10} + P_{polh}$ fue plERUPOD- P_{p10} . El control positivo para la PCR parental fue el clon 8₂ AgMNPV-I*Pp*oI.

Como se puede apreciar en la fotografía, -5_6 fue la única placa que presentó señal recombinante y que no presentó señal parental.

Se hizo una amplificación por cultivo celular de esta placa y de una de las que había presentado tanto señal recombinante como parental (-6₁). La PCR que se hizo sobre estas amplificaciones indicó que -6_1 se trataba de un simple recombinante que había segregado preferentemente a parental en lugar del doble recombinante, o que éste último había sufrido una selección negativa, ya que luego de un pasaje por células perdió la señal recombinante (resultado no mostrado). Por lo tanto, se prosiguió a la purificación de DNA viral de la placa -5_6 mediante posteriores amplificaciones por cultivo celular, en las cuales se veían pocos poliedros. El patrón que se esperaba obtener se encuentra detallado en la figura 10.7.

Fragmento	AgMNPV-2D / HindIII	AgMNPV-IPpoI / HindIII	AgMNPV- pIERUPODp10 / HindIII
A	19232	19232	19232
В	16446	16446	16446
G*		10194	
С	9942	9942	9942
D	8976	8976	8976
Е	8540	8540	8540
F	8356	8356	8356
G	7262		
			6788
Н	6164	6164	6164
Ι	5517	5517	5517
J	4967	4967	4967
			4304
K	4080	4080	4080
L	3477	3477	3477
М	3443	3443	3443
Ν	3222	3222	3222
0	3214	3214	3214
Р	2841	2841	2841
Q	2512	2512	2512
R	2381	2381	2381
S	2381	2381	2381
Т	2267	2267	2267
U	2114	2114	2114
V	2114	2114	2114
W	2104	2104	2104
X	1082	1082	1082
			348
Y	337	337	337



Fragmento	AgMNPV-2D / EcoRI	AgMNPV-IPpoI / EcoRI	AgMNPV- pIERUPODp10 / EcoRI
А	38716	38716	38716
В	18593	18593	18593
С	17845	17845	17845
D	13629	13629	13629
Е	10917	10917	10917
F	10508	10508	10508
G	10174		
			9347
G*		7571	
Н	6403	6403	6403
G**		5553	
Ι	5113	5113	5113
			3802
			1173
J	1095	1095	1095
			50



Figura 10.7. Patrones de restricción esperados con *Hind*III y *Eco*RI de los recombinantes de las cotransfecciones con AgMNPV-I*Ppo*I y pIERUPOD-P_{*p*10}. Los cálculos realizados para llegar a los datos que se encuentran resaltados en las tablas, se muestran en la parte inferior de cada tabla. Para un análisis más detallado de AgMNPV-2D y AgMNPV-I*Ppo*I, ver la figura 8.5 (Capítulo 8 de Resultados y Discusión). En verde está resaltados los fragmentos *Hind*III-G y *Eco*RI-G de AgMNPV-2D. En celeste están resaltados los fragmentos característicos de AgMNPV-I*Ppo*I (resultado de una doble recombinación homóloga entre AgMNPV-2D y pAg-I*Ppo*I) adonde se está dirigiendo la modificación (*Hind*III-G*, *Eco*RI-G* y *Eco*RI-G**). En amarillo están resaltados los fragmentos nuevos que deberían aparecer en el recombinante AgMNPV-I*Ppo*I y pIERUPODP_{*p*10} (resultado de una doble recombinación homóloga entre AgMNPV-I*Ppo*I) y pIERUPODP_{*p*10}).

Fue sorprendente e inesperado encontrar que las digestiones que se hicieron sobre este recombinante nuevamente mostraron patrones de restricción aberrantes (ver figura 10.8).



Figura 10.8. Digestión con EcoRI y HindIII del clon -5₆ aislado a partir de la cf-p10b. Las bandas recuadradas en amarillo corresponden a aquellas que aparecieron en el clon -5₆. Las recuadradas en azul corresponden a aquellas características de AgMNPV-I*Ppo*I adonde se está dirigiendo la modificación. Las bandas recuadradas en verde corresponden a los fragmentos *Hin*dIII-G y *Eco*RI-G de AgMNPV-2D. También se indica la letra que identifica a cada banda en la digestión con *Hin*dIII (ver figura 10.7).

Analizando estas fotografías a la luz de los datos aportados por la figura 10.7, el patrón de restricción del clon -5₆ no guarda relación alguna con el esperado. Además, si se las compara con las fotografías de la figura 8.7 (Capítulo 8), se podrá apreciar que -5_6 tiene los mismos patrones de restricción que los clones aislados de esa cotransfección **cf-47d** (realizada con AgMNPV-I*Ppo*I y pIERUPOD-47).

Se hicieron PCRs sobre -5_6 para ver cuáles genes había incorporado a partir del vector de transferencia. Los resultados indicaron la presencia de las secuencias *DsRed1*+ SV40polyA y de ambos promotores (el de *p10* y el de poliedrina) y la ausencia del gen de *E1* (ver figura 10.9).



Figura 10.9. PCRs realizadas sobre el clon -5₆. Upr10-Nde y Lenh-NheEco fueron los *primers* utilizados para amplificar al promotor de *p10* + el gen *E1* ($P_{p10}+E1$). Ured-Xma y Lred-Sfi fueron los *primers* utilizados para amplificar *DsRed1*+SV40polyA. Lpr10-Sgf y Lpr(c)-Sgf fueron los *primers* utilizados para amplificar a ambos promotores ($P_{p10}+P_{polh}$). Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias del gen *E1* se encuentra recuadrado en amarillo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica el gen *DsRed1*+SV40 polyA se encuentra recuadrado en rojo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias $P_{p10}+P_{polh}$ se encuentra recuadrado en verde claro y su tamaño está indicado. Los controles positivos de todas las PCRs fueron pIERUPOD-P_{p10}.

	COTR	COTRANSFECCIÓN 12/12/03			Tfx™-20	V _f
N°	AgMNPV-I <i>Ppo</i> I	AgMNPV-I <i>Ppo</i> I	pIERUPOD-	sin	2:1	
	2 4 ^(a)	2 4 ^(a)	P _{<i>p</i>10}	suero		
	linealizado	sin digerir				
1	10 μl ~500 ng		1 μl ~1,5 μg	983 μl	6 µl	1 ml
(cf-p10c)				-	-	
2	10 μl ~500 ng			988,5 μl	1,5 μl	1 ml
3		2 μl ~500 ng	1 μl ~1,5 μg	988 μl	6 μl	1 ml
4		2 μl ~500 ng		993,5 μl	1,5 μl	1 ml
5			1 μl ~1,5 μg	994,5 μl	4,5 μl	1 ml
6	Con	trol (-) sin Tfx [™] -20)	1 ml	-	1 ml

Se realizó una nueva cotransfección de acuerdo al siguiente esquema:

^(a) clon 2₄ AgMNPV-I*Ppo*I

A fin de cuantificar la proporción de señal recombinante que correspondía a DNA plasmídico residual en los sobrenadantes de cotransfección, en esta cotransfección se agregó un control que consistía en transfectar células solamente con el plásmido de transferencia (cotransfección N° 5).

Inicialmente, se procesaron alícuotas de los sobrenadantes de cotransfección cosechados a los 6 días post-transfección y se realizaron diversas PCRs. En primer lugar, se hizo una PCR para analizar la frecuencia de producción de recombinantes de la cotransfección, habiendo usado un nuevo *stock* de I-*Ppo*I. Los resultados indicaron que la eficiencia había mejorado, pero no de la manera esperada (ver figura 10.10).



Figura 10.10. Análisis por PCR de la eficiencia de la cf-p10c (tercer cotransfección con AgMNPV-I*Ppol* y pIERUPOD-P_{*p*10}). Lpr10-Sgf y Lpr(c)-Sgf fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal recombinante (P_{*p*10}+P_{*polh*}). L-B y phn-Back fueron los *primers* utilizados para amplificar la señal parental. Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias recombinantes (P_{*p*10}+P_{*polh*}) se encuentra recuadrado en verde claro y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica secuencias parentales, se encuentra recuadrado en azul y su tamaño está indicado. El control positivo para la PCR P_{*p*10} + P_{*polh*} fue pIERUPOD-P_{*p*10}. El control positivo para la PCR parental fue el clon 2₄ AgMNPV-I*Ppo*I.

Las fotografías muestran los resultados de las PCRs realizadas sobre los sobrenadantes de las cotransfecciones. Se ven señales recombinantes de intensidades similares en las cotransfecciones 1 y 3, donde se utilizó virus linealizado y circular, respectivamente, además de DNA plasmídico. Dado que esta misma intensidad se observa en la cotransfección 5, que corresponde a células transfectadas solamente con DNA plasmídico, estas señales indican una elevada proporción de DNA plasmídico residual. En las cotransfecciones 2 y 4 no se observa señal recombinante porque aquí se transfectó solamente con DNA viral (linealizado y circular, respectivamente).

En cuanto a la señal parental, se observa una diferencia significativa en las cotransfecciones 1 y 3, con una menor señal en la primera. En la cotransfección 2 también se observa una débil señal parental. Esto es indicativo de la eficiencia de la digestión con *I-PpoI*, ya que, si hay señal de parental, esto implica que una fracción de DNA no digerido transfectó exitosamente y sufrió rondas de replicación. En la cotransfección 4, en la que se utilizó solamente DNA viral circular, se observa una señal similar a la de la cotransfección 3. La

cotransfección 5 no presentó señal parental porque sólo fue transfectada con DNA plasmídico.

La cotransfección 6 dio resultados negativos en todos los casos porque se trataba del control negativo de la cotransfección.

En segundo lugar, se hicieron otras PCRs para ver si se encontraba la especie recombinante buscada en la progenie viral de la cotransfección. Estos resultados indicaron que, al igual que para el clon -5_6 de la cf-p10b, no se encontraba el gen *E1* pero sí estaban ambos promotores (ver figura 11.11).



Figura 11.11. PCRs realizadas sobre la cf-p10c. Uenh-Sgf y Lenh-NheEco fueron los *primers* utilizados para amplificar al promotor el gen *E1* (*E1*). Lpr10-Sgf y Lpr(c)-Sgf fueron los *primers* utilizados para amplificar a ambos promotores ($P_{p10}+P_{polh}$). Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias del gen *E1* se encuentra recuadrado en amarillo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica verte claro y su tamaño está indicado. Los controles positivos para ambas PCRs fueron pIERUPOD- P_{p10} .

DISCUSIÓN

El hecho de que el único clon recombinante aislado a partir de las cotransfecciones con AgMNPV-I*Ppo*I y pIERUPOD-P_{*p*10} (**cf-p10b**), fuese exactamente igual a los de la **cf-47d** (AgMNPV-I*Ppo*I y pIERUPOD-47) [ver figuras 10.8 (en este Capítulo) y 8.7 (Capítulo 8)] y que los ensayos realizados sobre las diferentes cotransfecciones indicaran la ausencia del recombinante buscado, fue otro resultado totalmente inesperado.

Sin embargo, nos permitió concluir que las especies recombinantes aberrantes que se obtuvieron en las cotransfecciones con pIERUPOD-47, no eran consecuencia de la repetición de secuencias que aportaba el vector (tanto de ambas copias del promotor de poliedrina como de las 600 bases agregadas de *E1* entre ambos P_{polh}), ya que esta nueva vesión del plásmido de transferencia (pIERUPOD- P_{p10}), no presentaba repetición de secuencias y, a pesar de esto, producía los mismos recombinantes.

Dado que la generación de especies aberrantes ya no se podía atribuir a la presencia de secuencias repetidas en el plásmido de transferencia, se buscaron explicaciones alternativas a estos hechos desconcertantes.

Una de las posibilidades era que el genoma de AgMNPV-I*Ppo*I presentara regiones con alta homología a las secuencias heterólogas que estábamos tratando de introducir, lo cual produciría eventos de recombinación homóloga inesperados. Por un lado, se pudo descartar la presencia de regiones de secuencias homólogas entre el plásmido de transferencia (pIERUPOD-P_{*p*10}) y el ORF de *lacZ* en el genoma de AgMNPV-I*Ppo*I, que pudieran dar cuenta de recombinaciones inesperadas con el DNA viral circular, en el caso de una digestión incompleta (ya que el virus lineal ha perdido el gen *lacZ*). Por otro lado, como no está publicada la secuencia de AgMNPV-2D, no se podía hacer la búsqueda correspondiente en el *GenBank*. Sin embargo, sabíamos que el grupo de investigación que estaba trabajando en este proyecto había terminado con la secuenciación preliminar de AgMNPV-2D. Por esto se les envió la secuencia de la región heteróloga de pIERUPOD-P_{*p*10} que estábamos tratando de introducir en el genoma (*E1*, IRES, *DsRed1* + SV40 polyA). Los resultados indicaron que no se encontraba homología significativa (B. Ribeiro y J.L. Wolff, comunicación personal).

Descartada esta posibilidad, se consideró factible que la estructura secundaria característica que pueden formar las secuencias IRES, interfiriera durante los eventos de recombinación homóloga, generando la escisión del gen *E1*. Para explorar esta posibilidad, se decidió

volver a la construcción de versiones alternativas del vector de transferencia original (pIERUPOD), buscando la eliminación de estas secuencias.

CAPÍTULO 11

CAPÍTULO 11

Construcción de otras versiones alternativas del plásmido original (pEUPOD y pRUPOD).

INTRODUCCIÓN

Dado que en las cotransfecciones con pIERUPOD- P_{p10} se produjo una especie recombinante con exactamente la misma estructura genómica que aquella aislada de las cotransfecciones con pIERUPOD-47, se tuvieron que buscar nuevas estrategias alternativas. Una vez que se confirmó que no existía homología significativa entre las secuencias heterólogas del vector de transferencia y el genoma de AgMNPV-I*PpoI* (B. Ribeiro y J.L. Wolff, comunicación personal), como última instancia se exploró la posibilidad de que fuera la estructura tridimensional de las secuencias IRES la que estuviera interfiriendo con los eventos de recombinación homóloga buscados o que estuviera favoreciendo otros.

Para analizar esta posibilidad se diseñaron dos versiones alternativas de pIERUPOD- P_{p10} . En una de ellas se eliminarían las secuencias IRES y el gen *DsRed1*, de manera que sólo quede el gen *E1* con las señales de poliadenilación de SV40 bajo el control del promotor de *p10* (pEUPOD). En la otra se eliminarían las secuencias IRES y el gen *E1*, de manera que sólo quede el gen *DsRed1* con las señales de poliadenilación de SV40 bajo el control del promotor de *p10* (pRUPOD).

RESULTADOS

La construcción de ambas versiones alternativas se realizó en forma simultánea.

La estrategia que se utilizó en el caso de **pRUPOD** fue similar a la que se usó para la generación de pIERUPOD a partir de mezclas de pIERU y pIERUPOD fallido (que dio como resultado los clones pIERUPOD 21 y 47). Se utilizaron dos cebadores (Ured-Xma y Lpr10-Sgf) para amplificar el fragmento deseado (de aproximadamente 5.5 kb) utilizando a pIERUPOD-p10 como molde. Este fragmento, de extremos romos, fue ligado y transformado en bacterias. Se obtuvieron dos clones positivos (ver figura 11.1) que fueron constatados por PCR, digestión enzimática y secuenciación.



Figura 11.1. Construcción de pRUPOD. En la parte superior de la figura se encuentra representada la estrategia de PCR que se utilizó para la construcción de esta nueva versión del plásmido. Los *primers* utilizados en la reacción de PCR y el tamaño esperado del fragmento de amplificación se encuentran indicados. El perfil de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación correspondiente, sin purificar, fue ligado y luego se transformaron bacterias con esta ligación. Se obtuvieron 2 clones positivos (**pRUPOD**).

Las digestiones y/o PCRs confirmatorias de cada fase se encuentran incluidas en la figura. Los fragmentos y sus tamaños correspondientes están resaltados.

La estrategia que se utilizó en el caso de **pEUPOD**, consistió en digerir pIERUPOD-p10 con *Not*I y *Eco*RV para eliminar las secuencias IRES y el gen *DsRed1*. Posteriormente, al producto de digestión correspondiente se le hizo *fill-in*, debido a que *Not*I deja *overhangs* 5' extendidos y *Eco*RV deja extremos romos. El producto de este *fill-in* fue sometido a ligación y luego se transformaron bacterias. Se obtuvo sólo un clon positivo (ver figura 11.2) que fue constatado por PCR, digestión enzimática y secuenciación. En la construcción de pEUPOD no se pudo utilizar la misma estrategia que se utilizó para pRUPOD, porque no se contaba con los cebadores adecuados como para poder amplificar la construcción deseada por PCR.



Figura 11.2. Construcción de pEUPOD. En la parte superior de la figura se encuentra representada la estrategia que se utilizó para la construcción de esta nueva versión del plásmido. La digestión de pIERUPOD- P_{p10} con *Eco*RV+*Not*I fue sometida a *fill-in* con la Klenow polimerasa. El DNA de esta mezcla de reacción fue extraído (con fenol-cloroformo-isoamílico) y precipitado (con CILi). Este DNA fue ligado y luego se transformaron bacterias con esta ligación. Se obtuvo un único clon positivo (**pEUPOD**).

Las digestiones confirmatorias de cada fase se encuentran incluidas en la figura. Los fragmentos y sus tamaños correspondientes están resaltados.

DISCUSIÓN

La construcción de estas dos versiones alternativas del plásmido original, **pRUPOD** y **pEUPOD**, resultó relativamente directa. Esto se debe en gran proporción a la versatilidad del diseño del plásmido, que, al tener los insertos clonados flanqueados por secuencias de restricción únicas, permite la fácil escisión de los mismos, ya sea para reemplazarlos o para eliminarlos. Otra ventaja es que la mayoría de las enzimas correspondientes a los sitios de restricción únicos tienen condiciones de corte muy similares entre sí, lo cual facilita la digestión simultánea con varias enzimas.

La construcción exitosa de pEUPOD y pRUPOD permitió continuar con la siguiente etapa: la generación de los recombinantes correspondientes a partir de estas construcciones.



CAPÍTULO 12

Generación de virus recombinantes a partir de otras versiones alternativas del plásmido original (pEUPOD y pRUPOD).

INTRODUCCIÓN

Una vez finalizada la construcción de pEUPOD y pRUPOD, dos versiones alternativas del plásmido de transferencia original, se procedió a la generación de las especies virales recombinantes correspondientes. En los ensayos de cotransfección se utilizó a AgMNPV-IPpol (recombinante con sitios únicos de restricción) como virus parental.

Se consideraba probable que la generación de especies recombinantes aberrantes (ver Capítulos 8 y 10 de Resultados y Discusión) estuviera favorecida por las secuencias IRES. Era posible que la estructura tridimensional de las mismas estuviera interfiriendo con los eventos de recombinación homóloga buscados o que estuviera favoreciendo otros. Debido a que ambas versiones alternativas del plásmido no presentaban las secuencias IRES, se esperaba eliminar los eventos de recombinación inesperados en los ensayos de cotransfección y así obtener los virus recombinantes con la estructura genómica esperada.

RESULTADOS

Una vez purificados los DNAs de pEUPOD y pRUPOD se realizó una cotransfección de acuerdo al siguiente esquema (el detalle de las cotransfecciones mencionadas en este Capítulo, con la nomenclatura abreviada correspondiente, se encuentra en la "Sección VI: Apéndice"):

	COTRANSFECCIÓN 26/03/04						
	DNA	DNA viral		DNA plasmídico			Vf
N°	AgMNPV- I <i>Pp</i> ol 2₄ ^(a) linealizado	AgMNPV- I <i>Ppo</i> I 82 ^(b) linealizado	pRUPOD	pEUPOD	sin suero	-20 2:1	
1 ^(c)	10 μl ~500 ng		1 μl ~1,5 μg		983 μl	6 μl	1 ml
(cf-pRa)			_				
2 ^(c)	10 μl ~500 ng			1 μl ~1,5 μg	983 μl	6 μl	1 ml
(cf-pEa)						-	
3 ^(d)		10 μl ~500 ng	1 μl ~1,5 μg		983 μl	6 μl	1 ml
(cf-pRb)					-		
4 (d)		10 μl ~500 ng		1 μl ~1,5 μg	983 μl	6 μl	1 ml
(cf-pEb)						•	

^(a) clon 2₄ AgMNPV-I*Ppo*I

^(b) clon 8₂ AgMNPV-I*Ppo*I

^(c) DNA viral de mayor pureza (2 extracciones fenólicas)

^(d) DNA viral de menor pureza (1 extracción fenólica)

Los DNAs plasmídicos utilizados de todas las cotransfecciones fueron sometidos a dos extracciones fenólicas. En las cotransfecciones cf-pRa y cf-pEa se utilizó DNA viral de mayor pureza (ver "Sección IV: Materiales y Métodos"), ya que había sido sometido a dos extracciones fenólicas. En las cotransfecciones cf-pRb y cf-pEb se utilizó DNA viral de menor pureza (una sola extracción fenólica). Los sobrenadantes se levantaron a los 6 días post-transfección.

Una alícuota de los sobrenadantes de cotransfección se procesó para realizar las PCRs correspondientes, a fin de ver si se habían producido las especies recombinantes deseadas. Los resultados indicaron una buena señal del gen *DsRed1* bajo el control de P_{p10} en cf-pRa y cf-pRb, mientras que la señal del gen *E1* bajo el control del mismo promotor era muy débil en cf-pEa y cf-pEb. No se detectaba *background* parental en cf-pRa y cf-pEa (cotransfecciones realizadas con DNA viral de mayor pureza), contrario a cf-pRb y cf-pEb que presentaron un alto *background* de virus parental (cotransfecciones realizadas con DNA viral de menor pureza) (ver figura 12.1).



Figura 12.1. Análisis por PCR de las cotransfecciones con AgMNPV-IPpol + pRUPOD y AgMNPV-IPpol + pEUPOD. Upr10-Nde y Lred-Sfi fueron los primers utilizados para amplificar las secuencias del promotor de P_{p10}+DsRed1+SV40polyA (P_{p10}+DsRed1, señal recombinante en el caso de las cotransfecciones con pRUPOD) y las secuencias del promotor de p10+E1+SV40polyA (P_{p10}+E1, señal recombinante en el caso de las cotransfecciones con pEUPOD). U-B y phn-Back fueron los primers utilizados para amplificar la señal parental en las cotransfecciones con el clon 24 AgMNPV-IPpol. L-B y phn-Back fueron los primers utilizados para amplificar la señal parental en las cotransfecciones con el clon 82 AgMNPV-IPpol. Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias $P_{p10}+DsRed1$ se encuentra recuadrado en rojo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias $P_{p10}+E1$ se encuentra recuadrado en amarillo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias parentales se encuentra recuadrado en azul y su tamaño está indicado. El control positivo para la PCR Pp10 + *DsRed1* fue pRUPOD. El control positivo para la PCR P_{p10} + *E1* fue pEUPOD. Los controles positivos para las PCRs parentales fueron, alternativamente, los clones 24 y 82 AgMNPV-IPpol.

Las fotografías muestran los resultados de las PCRs realizadas sobre los sobrenadantes de las diferentes cotransfecciones. Aquí no se puede descartar la posibilidad de que parte de la señal recombinante se deba a DNA plasmídico residual.

En la fotografía de la izquierda, en cf-pRa y cf-pRb, se ven señales recombinantes fuertes y de intensidad similar ($P_{p10}+DsRed1$). En ellas se utilizó virus linealizado y DNA de pRUPOD.

En cf-pEa y cf-pEb se observa una señal recombinante muy débil ($P_{p10}+E1$). Aquí se transfectó con DNA viral linealizado y DNA de pEUPOD.

En la fotografía de la derecha, no se observa señal parental en cf-pRa y cf-pEa, que son las cotransfecciones donde se utilizó DNA viral de mayor pureza (además de los DNAs de pRUPOD y pEUPOD, respectivamente). En este caso no había resto de DNA viral circular porque habría sido digerido eficientemente por I-*Ppo*I. Por otro lado, en cf-pRb y cf-pEb, donde se utilizó DNA viral de menor pureza (además de los DNAs de pRUPOD y pEUPOD, respectivamente) se observa una importante señal parental, dado que había una fracción no cortada con I-*Ppo*I.

Tomados en forma conjunta, los resultados indicaron que cf-pRa y cf-pEa habían generado una proporción significativamente mayor de recombinantes (cf-pRa mucho más que cf-pEa, debido a que presenta una señal recombinante mucho mayor) que cf-pRb y cf-pEb. Por esto los ensayos subsiguientes se realizaron con material de cf-pRa y cf-pEa.

Debido a estos resultados, se hicieron amplificaciones por cultivo celular de las transfecciones que habían generado una mayor proporción de recombinantes (**cf-pRa** y **cf-pEa**), para extraer DNA viral de las mismas y así poder analizar más detalladamente su estructura genómica por medio de ensayos de restricción. Aunque la especie viral parental no se detectaba por PCR en estas cotransfecciones, era esperable que en estas amplificaciones se encontrara una población viral heterogénea, con la especie recombinante como la especie predominante. A pesar de esto, se realizaron ensayos de restricción antes de aislar los diferentes genotipos recombinantes por placa, para verificar que la estructura genómica de las especies recombinantes dominantes era la buscada.

El DNA viral extraído de las amplificaciones fue digerido con *Eco*RI y *Hin*dIII. Los patrones de restricción esperados se detallan en la figura 12.2.

Fragmento	AgMNPV-2D /HindIII	AgMNPV-IPpoI / HindIII	AgMNPV- pEUPOD / <i>Hin</i> dIII	AgMNPV- pRUPOD /HindIII
А	19232	19232	19232	19232
В	16446	16446	16446	16446
G*		10194		
			10117	
С	9942	9942	9942	9942
D	8976	8976	8976	8976
Е	8540	8540	8540	8540
				8440
F	8356	8356	8356	8356
G	7262			
Н	6164	6164	6164	6164
Ι	5517	5517	5517	5517
J	4967	4967	4967	4967
K	4080	4080	4080	4080
L	3477	3477	3477	3477
М	3443	3443	3443	3443
N	3222	3222	3222	3222
0	3214	3214	3214	3214
Р	2841	2841	2841	2841
Q	2512	2512	2512	2512
R	2381	2381	2381	2381
S	2381	2381	2381	2381
Т	2267	2267	2267	2267
U	2114	2114	2114	2114
V	2114	2114	2114	2114
W	2104	2104	2104	2104
X	1082	1082	1082	1082
Y	337	337	337	337



Fragmento	AgMNPV-2D / EcoRI	AgMNPV-IPpoI /EcoRI	AgMNPV- pEUPOD / EcoRI	AgMNPV- pRUPOD / EcoRI
А	38716	38716	38716	38716
В	18593	18593	18593	18593
С	17845	17845	17845	17845
D	13629	13629	13629	13629
				11370
Е	10917	10917	10917	10917
F	10508	10508	10508	10508
G	10174			
			9347	
G*		7571		
Н	6403	6403	6403	6403
G**		5553		
Ι	5113	5113	5113	5113
			3652	
J	1095	1095	1095	1095
			59	



AgMNPV-pEUPOD

Figura 12.2. Patrones de restricción esperados con *Hind*III y *Eco*RI de los recombinantes de las cotransfecciones con AgMNPV-IPpoI + pRUPOD y AgMNPV-IPpoI + pEUPOD. Los cálculos realizados para llegar a los datos que se encuentran resaltados en las tablas, se muestran en la parte inferior de cada tabla. Para un análisis más detallado de AgMNPV-2D y AgMNPV-IPpoI, ver la figura 8.5 (Capítulo 8 de Resultados y Discusión). En verde están resaltados los fragmentos *Hind*III-G y *Eco*RI-G de AgMNPV-2D. En celeste están resaltados los fragmentos característicos de AgMNPV-IPpoI (resultado de una doble recombinación homóloga entre AgMNPV-2D y pAg-IPpoI) adonde se está dirigiendo la modificación (*Hind*III-G*, *Eco*RI-G** y *Eco*RI-G**). En amarillo están resaltados los fragmentos nuevos que deberían aparecer en los recombinantes AgMNPV-pRUPOD (resultado de una doble recombinación homóloga entre AgMNPV-IPpoI y pRUPOD) y AgMNPV-pEUPOD (resultado de una doble recombinación homóloga entre AgMNPV-IPpoI y pRUPOD) y EUPOD).

Los resultados fueron inesperados (ver figura 12.3). La amplificación de **cf-pRa** (AgMNPV-I*Ppo*I + pRUPOD) presentó exactamente el mismo patrón de restricción que el de los clones obtenidos de la **cf-47d** (AgMNPV-IPpoI y pIERUPOD-47, ver Capítulo 8 de Resultados y Discusión) y la **cf-p10b** (AgMNPV-IPpoI y pIERUPOD-P_{*p*10}, ver Capítulo 10 de Resultados y Discusión). La amplificación de la **cf-pEa** (AgMNPV-I*Ppo*I + pEUPOD) presentó un patrón de restricción similar al de los clones obtenidos a partir de la **cf-47c** (AgMNPV-IPpoI y pIERUPOD-47, ver Capítulo 8 de Resultados y Discusión).



Figura 12.3. Digestión con HindIII y EcoRI de amplificaciones de las cotransfecciones AgMNPV-IPpol + pRUPOD (cf-pRa) y AgMNPV-IPpol + pEUPOD (cf-pEa). Las bandas recuadradas en amarillo corresponden a aquellas que aparecieron en las amplificaciones de las cotransfecciones. Las recuadradas en azul corresponden a aquellas características de AgMNPV-I*Ppo*I adonde se está dirigiendo la modificación. Las bandas recuadradas en verde corresponden a los fragmentos *Hin*dIII-G y *Eco*RI-G de AgMNPV-2D. También se indica la letra que identifica a cada banda en las digestiones con *Hin*dIII y *Eco*RI (ver figura 12.2).

Analizando estas fotografías a la luz de los datos aportados por la figura 12.2, los patrones de restricción de las especies recombinantes de las cotransfecciones no guardan relación alguna con los esperados. Además, si se las compara con las fotografías de las figuras 8.6 y 8.7 (Capítulo 8) y la figura 10.8 (Capítulo 10), se podrá apreciar que la amplificación de la

pág.216

cotransfección AgMNPV-I*Ppo*I + pRUPOD (cf-pRa) tiene los mismos patrones de restricción que los clones aislados de esas cotransfecciones (cf-47d y cf-p10b). Por otro lado, se podrá ver que la amplificación de la cotransfección AgMNPV-I*Ppo*I + pEUPOD (cf-pEa) tiene un patrón muy similar al de los clones aislados de la cf-47c.

Las PCRs realizadas sobre el DNA viral de la **cf-pRa**, confirmaron la presencia del gen *DsRed1* bajo el control de P_{p10} , de ambos promotores (P_{p10} y P_{polh}). El gen de poliedrina bajo el control de su mismo promotor evidenció una deleción, dado que el fragmento de amplificación fue menor al esperado. Las PCRs realizadas sobre el DNA viral de la **cf-pEa**, indicaron la presencia de ambos promotores (P_{p10} y P_{polh}) y del gen completo de poliedrina bajo el control de su mismo promotor y la ausencia del gen *E1* bajo el control de P_{p10} (ver figura 12.4).



Figura 12.4. PCRs realizadas sobre amplificaciones por cultivo celular de las cotransfecciones cf-pRa (AgMNPV-IPpol + pRUPOD) y cf-pEa (AgMNPV-IPpol + pEUPOD). Upr10-Nde y Lred-Sfi fueron los primers utilizados para amplificar las secuencias del promotor de P_{p10} + DsRed1 + SV40polyA (P_{p10} + DsRed1 en el caso de cf-pRa) y las secuencias del promotor de p10 + E1 + SV40polyA (P_{p10} + E1 en el caso de cf-pEa). Uprom-Nde y Lorf-Spe fueron los primers utilizados para amplificar las secuencias del promotor de poliedrina + poliedrina (Ppolh. + polh). Lpr10-Sgf y Lpr(c)-Sgf fueron los primers utilizados para amplificar a ambos promotores ($P_{p10} + P_{polh}$). Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en Materiales y Métodos. El fragmento de amplificación de la PCR que levanta las secuencias P_{p10}+DsRed1 se encuentra recuadrado en rojo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que levanta las secuencias P_{p10}+E1 se encuentra recuadrado en amarillo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que levanta secuencias P_{polh}+polh se encuentra recuadrado en verde oscuro y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que levanta las secuencias P10+ Ppolh se encuentra recuadrado en verde claro y su tamaño está indicado. El control positivo de la PCR P_{p10} + *DsRed1*, fue pRUPOD. El control positivo para la PCR P_{p10} + E1 fue pEUPOD. Los controles positivos para la PCR P_{polh}. + polh fueron, alternativamente, pRUPOD y pEUPOD. Los controles positivos para la PCR Pp10 + P_{polh} fueron, alternativamente, pRUPOD y pEUPOD.
DISCUSIÓN

Además del desconcierto que, una vez más, produjeron los resultados obtenidos, pudimos comprobar que las secuencias IRES no eran las responsables de la generación de las especies recombinantes aberrantes. Esto se pudo concluir porque, estando ausentes las secuencias IRES cuestionadas, se volvieron a generar especies inesperadas y aberrantes. No sólo esto, sino que las que se produjeron a partir de la cotransfección con pRUPOD, eran idénticas a las obtenidas con pIERUPOD-47 (cotransfección cosechada a los 6 días p.i., cf-47d; ver Capítulo 8 de Resultados y Discusión) y pIERUPOD-P_{p10} (cf-p10b; ver Capítulo 10 de Resultados y Discusión). Las producidas a partir de la cotransfección con pIERUPOD-47 cosechada a los 13 días p.i. (cf-47c; ver Capítulo 8 de Resultados y Discusión).

A partir de este punto fue muy difícil saber cómo seguir adelante con este trabajo de tesis, ya que habíamos explorado todas las diferentes alternativas que nos habían parecido probables explicaciones a estos eventos inesperados, con resultados negativos en cuanto a la producción del recombinante deseado.

Para investigar más detalladamente el patrón que se observaba a partir de los análisis de restricción realizados sobre las diferentes especies recombinantes obtenidas a lo largo de este trabajo de tesis, se decidió hacer un *Southern* con todas ellas, utilizando diversas sondas (ver Capítulo 13).

En cuanto a la producción del recombinante buscado, se decidieron probar estrategias alternativas que involucraban la selección de la especie adecuada por pasaje por larvas (ver Capítulo 14).



CAPÍTULO 13

Análisis comparativo de los recombinantes obtenidos con las diferentes versiones de plásmidos de transferencia (pIERUPOD-21, pIERUPOD-47, pIERUPOD-p10, pEUPOD y pRUPOD).

INTRODUCCIÓN

Como ya se adelantó en el capítulo anterior, a partir de los análisis de restricción, se divisaban patrones recurrentes en las diferentes especies recombinantes obtenidas a lo largo de la segunda etapa de este trabajo de tesis. Se hicieron varios análisis de *Southern* con todas ellas, utilizando diversas sondas, con el fin de estudiar el origen de los nuevos fragmentos y verificar la relación entre los recombinantes obtenidos en los diferentes experimentos de cotransfección.

El análisis detallado de los resultados de las PCRs, análisis de restricción y *Southern* realizados sobre todas estas especies recombinantes, permitieron clasificarlas en dos grupos, denominados *I* y *II*, en base a las similitudes observadas. En el *grupo I* (que incluye las especies recombinantes producidas a partir de **cf-47c y cf-pEa**) se dedujo que hubo inserciones y/o duplicaciones. En el *grupo II* (que incluye las especies recombinantes producidas a partir de **cf-47c y cf-pEa**) se dedujo que hubo producidas a partir de **cf-47d, cf-p10b y cf-pRa**) se dedujo que hubo deleciones.

Por otro lado, una vez que se tuvieron estos datos experimentales, se buscaron explicaciones plausibles basadas en la bibliografía existente, que ayudaron a interpretar los resultados obtenidos a lo largo de la segunda parte de este trabajo de tesis, causados por procesos de recombinación inusuales. En este sentido, en la presente Introducción, se hará una síntesis del estado actual de conocimiento sobre esta temática (ver también "Sección I: Introducción"), para poder comprender mejor las conclusiones que se presentan al final. Para un desarrollo detallado de los genes involucrados en la replicación, ver la "Sección I: Introducción".

La recombinación en los baculovirus como factor de variabilidad

Los baculovirus aislados de insectos recolectados a campo comúnmente están compuestos por una mezcla de variantes genómicas (Cherry y Summers, 1985; Hodgson *et al.* 2001; Lee y Miller, 1978; Maeda *et al.*, 1990; Shapiro *et al.*, 1991; Smith y Summers, 1978). Esto sugiere que la recombinación, mutación y/o transposición son eventos comunes en los

baculovirus. La transposición de AcMNPV por TED, un retrotransposón derivado de células de Trichoplusia ni, es el primer ejemplo de integración de un elemento transponible a un genoma viral eucariótico (Miller y Miller, 1982). El elemento transponible piggyBac (también conocido como IFP2) de T. ni también está involucrado en la integración al genoma de baculovirus (Cary et al., 1989; Fraser et al., 1983). La transposición podría ser responsable de la presencia de 20 o más genes de probable origen eucariótico y procariótico encontrados en genomas de baculovirus (Blissard y Rohrmann, 1990; Hayakawa et al., 2000; Kuzio et al., 1999; Possee y Rohrmann, 1997). Se ha observado la integración de DNA plasmídico al DNA de AcMNPV a través de recombinación no homóloga en cultivo celular (Wu et al., 1999). También se ha visto recombinación entre diferentes especies de baculovirus con alta a moderada homología a nivel de secuencia, en cultivos de células de insecto (Croizier y Ribeiro, 1992; Hajós et al., 2000; Kondo y Maeda, 1991; Lee y Miller, 1979; Muñoz et al., 1997; Smith y Summers, 1980; Summers et al., 1980) y en larvas (Merryweather-Clarke et al., 1994; Muñoz et al., 1997). En estos estudios, en general las frecuencias recombinación describieron de se como elevadas, variando de aproximadamente 6,6% en larvas inyectadas con AcMNPVs (Merryweather-Clarke et al., 1994) a casi 46.9% para variantes genómicas de AgMNPV (Croizier y Ribeiro, 1992). La recombinación entre regiones homólogas de AcMNPV y BmNPV luego de su coinfección, ha resultado en virus quimera AcMNPV-BmNPV con un rango de hospedadores ampliado (Kondo y Maeda, 1991; Mori et al., 1992; Woo et al., 1998). La ocurrencia y proliferación de DIs (Defective Interfering virus o partícula viral defectiva interferente) luego del pasaje seriado de baculovirus a altas multiplicidades de infección (MOIs), también sugiere que la recombinación es un evento frecuente (Kool et al., 1991; Pijlman et al., 2001; Wickham et *al.*, 1991).

Crouch y Passarelli (2002) identificaron genes virales que estimulan la recombinación homóloga. Encontraron que los genes *ie-1*, *ie-2*, *lef-7* y *p35* eran necesarios para una recombinación homóloga eficiente, en presencia de otros genes de replicación de AcMNPV y cuando las secuencias *hr* se encontraban en *cis*. Sin embargo, *ie-1* e *ie-2* por sí solos promovían recombinación homóloga de alta frecuencia. En contraste, la recombinación homóloga era menos dependiente de *ie-1* en presencia de secuencias *hr*.

La replicación del DNA de los baculovirus promueve recombinación homóloga de alta frecuencia

El paso inicial y necesario en la construcción de cualquier vector de expresión de AcMNPV, es la introducción de un gen heterólogo de interés en el genoma viral por medio de un vector

de transferencia. Esta reacción de recombinación altamente eficiente, ocurre poco después de la transfección del DNA de AcMNPV (Lee y Miller, 1979; Brown et al., 1979). Se infiere la existencia de un ambiente altamente recombinogénico en células infectadas con AcMNPV, no sólo por la eficiencia con que ocurre el proceso de transferencia génica, sino también por estudios que han identificado una alta frecuencia de recombinación entre genomas virales (Merryweather-Clarke et al., 1994; Summers et al., 1980). Sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre la recombinación en células infectadas está poco caracterizado. Martin y Weber (1997) mostraron que el DNA replicado por AcMNPV era altamente recombinogénico, tanto a nivel del plásmido transfectado como del genoma viral. Más aún, era el proceso de replicación viral el que parecía promover los eventos de recombinación.

RESULTADOS

El detalle de las cotransfecciones mencionadas en este Capítulo, con la nomenclatura abreviada correspondiente, se encuentra en la "Sección VI: Apéndice". Muchas de las figuras en este Capítulo se encuentran en los Capítulos 8, 10 y 12. Se las incluyó por la complejidad de los datos y para facilitar la interpretación de los mismos.

Análisis comparativo de los patrones de restricción de los diferentes recombinantes obtenidos

Los DNAs aislados de diferentes clones de virus recombinantes y de las poblaciones virales de los sobrenadantes de cotransfección, fueron digeridos con diferentes enzimas (HindIII, EcoRI, Bg/II) y sus patrones de restricción fueron analizados comparativamente. De acuerdo a coincidencias en los patrones de restricción, se pudo clasificar al conjunto de los recombinantes obtenidos en dos grupos:

El grupo I que presentó inserciones y/o duplicaciones, incluye a los clones aislados a partir de la cotransfección con AgMNPV-IPpol y pIERUPOD-47 cosechada a los 13 días p.i. (cf-47c) y al sobrenadante amplificado por cultivo celular de la cotransfección con AgMNPV-IPpol y pEUPOD (cf-pEa). Como ya se mencionó en el Capítulo 8, en el caso de cf-47c, cuando se cosechó el sobrenadante de esta cotransfección a los seis días, no se observaban señales de infección en la monocapa celular (tampoco cuando se realizó una amplificación de este sobrenadante de cotransfección). Por esto se agregó medio fresco a las células que habían sido transfectadas y este sobrenadante se cosechó a los 7 días (es decir, un total de 13 días luego de que las células fueran transfectadas). Cuando este sobrenadante se utilizó para inocular células, se observaron señales claras de infección. El medio de este cultivo se utilizó para aislar los recombinantes, que presentaron todos el mismo patrón de restricción. Es posible que esto se debiera a la amplificación de un único virus recombinante resultante de la cotransfección.

El *grupo II* que presentó deleciones y mayor uniformidad en los patrones de restricción, incluye a los clones aislados a partir de los experimentos de cotransfección con **AgMNPV-***IPpol* y pIERUPOD-47 (cf-47d) y con **AgMNPV-***IPpol* y pIERUPOD-P_{*p*10} (cf-p10b), y al sobrenadante amplificado de la cotransfección con **AgMNPV-***IPpol* y pRUPOD (cf-pRa).

<u>**Grupo I**</u>: Aquí se presentan los resultados de las digestiones con *Eco*RI de los clones aislados a partir de **cf-47c**, que pusieron de manifiesto inserciones y/o duplicaciones. Cuando se realizó la digestión con *Eco*RI, aparecieron cuatro bandas nuevas de aproximadamente 7.6, 10.8 (corría como doblete con la banda E de 10.9 kb), 13 y 15 kb y desaparecieron las bandas F, G* y G** (de 10.5, 7.6 y 5.5 kb, respectivamente) (ver la figura 13.1). No se vio diferencia con la banda de peso molecular (PM) menor (1.1 kb). Debido a esto no se la incluyó en la fotografía, ya que, además, su presencia entorpecía la visualización de las bandas de mayor PM.

Aunque en la fotografía se observa que una de las bandas nuevas de **cf-47c** corre a la misma altura que la banda G* de AgMNPV-I*Ppo*I (ver la figura 13.1). Sin embargo, esto no se puede atribuir a contaminación con DNA parental (AgMNPV-I*Ppo*I) porque, si este fuera el caso, deberían aparecer ambas bandas características (G* y G**). Como se puede observar en la figura 13.2, tampoco es posible que, luego de los eventos de recombinación, quede sólo una de las bandas características.



Figura 13.1. Digestión con *Eco***RI de dos clones de cf-47c.** Ambas fotografías corresponden a la misma corrida realizada en un gel 0,6%. La de la derecha fue corrida durante más tiempo. Las bandas resaltadas con marcos celestes corresponden a aquellas que desaparecen. Las bandas nuevas están resaltadas con marcos amarillos y sus tamaños están indicados en kb. También se indica la letra que identifica a cada banda en la digestión con *Eco***RI** (ver tabla 13.2). Las letras con asteriscos resaltadas en color celeste corresponden a los fragmentos característicos de AgMNPV-I*Ppo*I que desaparecen. Las letras sin asterisco resaltadas en color celeste corresponden a los fragmentos comunes a AgMNPV-2D y AgMNPV-I*Ppo*I que desaparecen.

La digestión con *Eco*RI de la especie esperada hubiese generado cuatro bandas nuevas de 0.06 kb, 1.2 kb, 3.8 kb y 9.9 kb y habrían desaparecido solamente las bandas G* y G** de 7.6 y 5.5 kb, respectivamente (ver la figura 13.2).



pIERUPOD-47), AgMNPV-I*Pp*ol y de AgMNPV-2D.

En la digestión con *Hin*dIII se detectaron dos bandas nuevas de aproximadamente 5.1 kb (corría como doblete con la banda J de 5 kb) y 7.3 kb. Desaparecieron las bandas I y G* de 5.5 y 10.2 kb, respectivamente (ver la figura 13.3). No se vio diferencia con las bandas de PM menor. Debido a esto no se las incluyó en la fotografía, ya que, además, su presencia entorpecía la visualización de las bandas de mayor PM.

HindIII 2 3 Μ 1 4 Μ A B D,E 7.3 kb F G Η 5.1 kb Π J K L,M N,O Ρ Q R,S T,U,V

*Hin*dIII = digestión 1 y 2 = clones cf-47c 3 = AgMNPV-I*Ppo*I 4 = AgMNPV-2D M = λ /*Hin*dIII Figura 13.3. Digestión con Hindlll de dos clones de cf-47c. La fotografía corresponde a una corrida realizada en un gel 0,6%. Las bandas resaltadas con marcos celestes corresponden a aquellas que desaparecen. Las bandas nuevas están resaltadas con marcos amarillos y están indicados sus tamaños respectivos en kb. También se indica la letra que identifica a cada banda en la digestión con HindIII (ver tabla 13.1). Las letras con asteriscos resaltadas en color celeste, corresponden a los fragmentos AgMNPV-IPpol característicos de que desaparecen. Las letras sin asterisco resaltadas en color celeste corresponden a los fragmentos que desaparecen tanto en AgMNPV-2D como en AgMNPV-IPpol (excepto por la banda G -sin asterisco-, que desaparece sólo en AgMNPV-2D).

La digestión de la especie esperada hubiese generado tres bandas nuevas de 0.35 kb, 4.3 kb y 7.3 kb; habría desaparecido sólo la banda G* de 10.2 kb (ver la figura 13.4).



Figura 13.4. Digestiones esperadas con *Hin*dIII de los clones cf-47c (AgMNPVpIERUPOD-47), AgMNPV-I*Ppo*I y de AgMNPV-2D.

También se digirió **cf-47c** con *Bg*/II. En esta digestión se observó una movilidad diferente de las bandas A y B (de 34 y 23 kb, respectivamente) de aproximadamente 40 kb (la estimación de tamaños en este rango a partir de la movilidad en gel es poco precisa). También se observó una banda nueva de 9.4 kb (corría a la par de la banda de 9.4 kb de λ /*Hin*dIII).

En cuanto a la digestión con *Eco*RI del DNA del sobrenadante amplificado de **cf-pEa** (AgMNPV-I*Ppo*I y pEUPOD), ésta produjo un patrón de restricción similar al de cf-47c, poniendo de manifiesto inserciones y/o duplicaciones. Para su análisis es importante considerar que se trata de una población viral y no de un clon. Aparecieron cuatro bandas

nuevas de aproximadamente 8 kb (la submolaridad de esta banda es atribuible a que se trata de una población viral), 10.8 kb (corría como doblete con la banda E de 10.9 kb), 12.5 kb y 13.5 kb (corría como doblete con la banda D de 13.6 kb). Al igual que en cf-47c, desaparecieron las bandas F, G* y G** de 10.5, 7.6 y 5.5 kb, respectivamente (ver la figura 13.5). No se vio diferencia con la banda de PM menor (1.1 kb). Debido a esto no se la incluyó en la fotografía, ya que, además, su presencia entorpecía la visualización de las bandas de mayor PM.



*Eco*RI = digestión 1 = AgMNPV-2D 2 = AgMNPV-I*Ppo*I

3 = cf-pEa M = λ/*Hin*dIII

Figura 13.5. Digestión con EcoRI de cfpEa. La corrida fue realizada en un gel 0,6%. Las bandas resaltadas con marcos celestes corresponden a aquellas que desaparecen; las bandas nuevas están resaltadas con marcos amarillos y están indicados sus tamaños respectivos en kb. También se indica la letra que identifica a cada banda en la digestión con EcoRI (ver tabla 13.2). Las letras con asteriscos resaltadas en color celeste, corresponden a los fragmentos característicos de AgMNPV-IPpol que desaparecen. Las letras sin asterisco resaltadas color celeste en fragmentos corresponden а los que desaparecen tanto en AgMNPV-2D como en AgMNPV-IPpol (excepto por la banda G sin asterisco-, que desaparece sólo en AgMNPV-2D).

Si esta cotransfección hubiese producido la especie esperada, la digestión con *Eco*RI habría generado tres bandas nuevas de 0.06 kb, 3.5 kb y 9.3 kb y habrían desaparecido las bandas G* y G** de 7.6 y 5.5, respectivamente (ver la figura 13.6).



Figura 13.6. Digestión esperada con *Eco*RI de las especies cf-pEa (AgMNPV-pEUPOD), AgMNPV-I*Ppo*I y de AgMNPV-2D.

En la digestión de **cf-pEa** con *Hin*dIII se detectaron tres bandas nuevas de 5.1 kb (corría como doblete con la banda J de 5 kb), 7.8 kb y 13.5 kb. Al igual que en cf-47c, desaparecieron las bandas I y G* de 5.5 y 10.2 kb, respectivamente (ver la figura 13.7). No se vio diferencia con las bandas de PM menor. Debido a esto no se las incluyó en la fotografía, ya que, además, su presencia entorpecía la visualización de las bandas de mayor PM.



HindIII = digestion 1 = AgMNPV-2D2 = AgMNPV-IPpol 3 = clon de la cf-47c 4 = cf-pEa M = $\lambda/HindIII$ Figura 13.7. Digestión con Hindlll de las especies del grupo I. La corrida fue realizada en un gel 0,6%. Las bandas resaltadas con marcos celestes corresponden а aquellas que desaparecen; las bandas nuevas están resaltadas con marcos amarillos y están indicados sus tamaños respectivos en kb. Las bandas submolares que se observan en la digestión de cf-pEa indican que se trata de una población viral. También se indica la letra que identifica a cada banda en la digestión con *Hin*dIII (ver tabla 13.1). Las letras con asteriscos resaltadas en color celeste, corresponden а los fragmentos característicos de AgMNPV-IPpol que desaparecen. Las letras sin asterisco resaltadas en color celeste corresponden a los fragmentos que desaparecen tanto en AgMNPV-2D como en AgMNPV-IPpol (excepto por la banda G -sin asterisco-, que desaparece sólo en AgMNPV-2D).

La especie esperada hubiese generado una banda nueva de 10.1 kb y habría desaparecido la banda G* de 10.2 kb (ver la figura 13.8).



Figura 13.8. Digestión esperada con *Hin*dIII de las especies cf-pEa (AgMNPV-pEUPOD), AgMNPV-I*Ppo*I y de AgMNPV-2D.

Se puede realizar una observación interesante a partir de los datos provistos por el estudio que realizaron Maruniak *et al.* (1999). Ellos encontraron "sitios calientes" en el genoma de AgMNPV. Este nombre se debe a que contienen mayor número de reordenamientos en relación a otros sitios. Comparando las representaciones circulares de los mapas físicos de AgMNPV-2D con diferentes enzimas de restricción (ver figura 13.9), se puede observar que las bandas faltantes inesperadas en las digestiones con *Eco*RI, *Hin*dIII y *Bg/*II de **cf-47c** y de **cf-pEa**, es decir los fragmentos F, I y A respectivamente, no sólo se encuentran en la misma

región del genoma sino que, además, ésta corresponde a una de las zonas que presentaron variabilidad (81.94 a 86.09 m.u.) en el estudio de Maruniak *et al.* (1999). Era esperable que desaparecieran las bandas características de AgMNPV-I*Ppol Hin*dIII-G*, *Eco*RI-G* y *Eco*RI-G**, ya que los diferentes vectores de transferencia dirigían la recombinación homóloga a estos fragmentos.



Figura 13.9. Representación circular del mapa físico del genoma de AgMNPV-2D con siete enzimas de restricción. Las coordenadas del mapa (unidades de mapa o m.u.) están representadas en la región interna del mapa. El círculo externo está marcado por círculos negros (•) que indican las localizaciones específicas o límites de las regiones variables, especificadas en m.u.

Las bandas faltantes inesperadas en las digestiones con *Hin*dIII, *Eco*RI y *BgI*II (I, F y A, respectivamente) se encuentran resaltadas en celeste. El "sitio caliente" (*hot spot*) común a todas ellas está indicado con una línea roja (81.94 a 86.09 m.u.). El ORF de *polh* (que en AgMNPV-I*Ppo*I corresponde al ORF de *lacZ*), hacia donde están dirigidos los vectores de transferencia, y su orientación relativa están indicados con una flecha verde.

Figura adaptada de la publicada por Maruniak et al. (1999).

<u>*Grupo II*</u>: Se analizaron los DNAs de los sobrenadantes de cf-47d (AgMNPV-I*Ppol* y pIERUPOD-47), cf-p10b (AgMNPV-I*Ppol* y pIERUPOD-P_{*p*10}) y cf-pRa (AgMNPV-I*Ppol* y pRUPOD). Las digestiones con *Eco*RI y *Hin*dIII pusieron de manifiesto deleciones en estos genomas recombinantes. En las especies recombinantes de cf-47d, cf-p10b y cf-pRa, se observaron deleciones de 5.5, 4.9 y 1.9 kb respectivamente, en relación al tamaño genómico de las especies recombinantes esperadas.

La digestión con *Eco*RI de las especies **cf-47d**, **cf-p10b** y **cf-pRa** generó los mismos patrones de restricción. Se detectó una banda nueva de 9.4 kb y la desaparición de las bandas G* y G** de 7.6 y 5.5 kb, respectivamente (ver la figura 13.10). No se vio diferencia con la banda de PM menor (1.1 kb). Debido a esto no se la incluyó en las fotografías, ya que, además, su presencia entorpecía la visualización de las bandas de mayor PM.



Figura 13.10. Digestión con EcoRI de cf-47d, cf-p10b y cf-pRa. Las tres fotografías corresponden a diferentes corridas realizadas en geles 0,6%. Las bandas resaltadas con marcos celestes corresponden a aquellas que desaparecen; las bandas nuevas están resaltadas con marcos amarillos y están indicados sus tamaños respectivos en kb. También se indica la letra que identifica a cada banda en la digestión con *Eco*RI (ver tabla 13.2). Las letras con asteriscos resaltadas en color celeste, corresponden a los fragmentos característicos de AgMNPV-I*Ppo*I que desaparecen. Las letras sin asterisco resaltadas en color celeste corresponden a los fragmentos que desaparecen tanto en AgMNPV-2D como en AgMNPV-I*Ppo*I (excepto por la banda G –sin asterisco-, que desaparece sólo en AgMNPV-2D).

En el caso de **cf-47d**, la digestión con *Eco*RI de la especie esperada hubiese producido los mismos fragmentos que en el caso esperado para cf-47c. Es decir, cuatro bandas nuevas de 0.06 kb, 1.2 kb, 3.8 kb y 9.9 kb y habrían desaparecido las bandas G* y G** de 7.6 y 5.5 kb, respectivamente (ver la figura 13.11).



Figura 13.11. Digestión esperada con *Eco*RI de los clones cf-47d (AgMNPV-pIERUPOD47), AgMNPV-I*Ppo*I y de AgMNPV-2D.

En el caso de **cf-p10b**, la digestión con *Eco*RI de la especie esperada hubiese producido cuatro fragmentos nuevos de 0.06 kb, 1.2 kb, 3.8 kb y 9.3 kb (ver la figura 13.12) y habrían desaparecido las bandas G* y G** de 7.6 y 5.5 kb, respectivamente (ver la figura 13.11).



Figura 13.12. Digestión esperada con *Eco*RI de los clones cf-p10b (AgMNPV-pIERUPODP_{p10}).

En el caso de **cf-pRa**, la digestión con *Eco*RI de la especie esperada hubiese producido un fragmento nuevo de 11.2 kb y habrían desaparecido las bandas G* y G** de 7.6 y 5.5 kb, respectivamente (ver la figura 13.13).



La digestión con *Hind*III también generó patrones de restricción equivalentes de las especies **cf-47d**, **cf-p10b y cf-pRa**. Se detectó una banda nueva de 6.5 kb y la desaparición de la banda G* de 10.2 kb (ver figura 13.14). No se vio diferencia con las bandas de PM menor. Debido a esto no se las incluyó en las fotografías, ya que, además, su presencia entorpecía la visualización de las bandas de mayor PM.



 $M = \lambda / HindIII$

Hindill = digestion 1 = AgMNPV-2D 2 = AgMNPV-IPpol3 = clon de la cf-47d

Figura 13.14. Digestión con Hindlll de las especies del grupo II. La corrida fue realizada en un gel 0.6%. Las bandas resaltadas con marcos celestes corresponden a aquellas que desaparecen. Las bandas nuevas están resaltadas con marcos amarillos y están indicados sus tamaños respectivos en kb. Las bandas submolares que se observan en cf-pRa se deben a que se trata de una población viral. También se indica la letra que identifica a cada banda en la digestión con 13.1). Las letras *Hin*dIII (tabla con asteriscos resaltadas en color celeste, corresponden а los fragmentos característicos AgMNPV-IPpol de que desaparecen. Las letras sin asterisco resaltadas en color celeste corresponden a los fragmentos que desaparecen tanto en AgMNPV-2D como en AgMNPV-IPpol (excepto por la banda G -sin asterisco-, que desaparece sólo en AgMNPV-2D).

En el caso de **cf-47d**, la digestión con *Hin*dIII de la especie esperada hubiese producido los mismos fragmentos que en el caso esperado para cf-47c. Es decir, tres bandas nuevas de 0.35 kb, 4.3 kb y 7.3 kb y habría desaparecido la banda G* de 10.2 kb (ver la figura 13.15).



En el caso de **cf-p10b**, la digestión con *Hin*dIII de la especie esperada hubiese producido tres fragmentos nuevos de 0.35 kb, 4.3 kb y 6.8 kb y habría desaparecido la banda G* de 10.2 kb (ver la figura 13.16).



Figura 13.16. Digestión esperada con *Hin*dIII de los clones cf-p10b (AgMNPV-pIERUPODP_{p10}), AgMNPV-I*Ppo*I y de AgMNPV-2D.

En el caso de **cf-pRa**, la digestión con *Hin*dIII de la especie esperada hubiese producido un fragmento nuevo de 8.4 kb y habría desaparecido la banda G* de 10.2 kb (ver la figura 13.17).



Figura 13.17. Digestión esperada con *Hin*dIII de las especies cf-pRa (AgMNPV-pRUPOD), AgMNPV-I*Ppo*I y de AgMNPV-2D.

Análisis comparativo de los recombinantes obtenidos a partir de los Southern blots y PCRs realizadas

Los ensayos de *Southern blot* se realizaron sobre digestiones con *Hin*dIII de todos los recombinantes obtenidos, de AgMNPV-2D y de uno de los clones AgMNPV-I*Ppol* (2₄). Las sondas utilizadas fueron el gen de *enhancin1* de LdMNPV (*E1*), el gen de poliedrina de AgMNPV bajo el control de su propio promotor ($P_{polh}+polh$) y el gen *DsRed1* de *Discosoma* más las secuencias polyA de SV40 (*DsRed1*), en ese orden. Los controles positivos de la reacción fueron los plásmidos de transferencia linealizados que se utilizaron en cada

cotransfección. El control negativo utilizado fue λ /*Hin*dIII. Se realizaron controles de deshibridación para verificar la eliminación de la sonda utilizada en el experimento anterior,

Los resultados de los *Southern* y de las PCRs también permitieron clasificar al conjunto de los recombinantes obtenidos en los mismos dos grupos.

<u>Grupo I</u>: Las PCRs realizadas sobre el clon cf-47c indicaron la presencia del gen DsRed1+ SV40polyA (ver figura 13.18).



antes de proceder a la hibridación con una nueva sonda.

Figura 13.18. PCR realizada sobre cf-47c para identificar las secuencias *DsRed1*+**SV40polyA.** Ured-Xma y Lred-Sfi fueron los *primers* utilizados para amplificar las secuencias *DsRed1* + SV40polyA (*DsRed1*). Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias *DsRed1* + SV40polyA se encuentra recuadrado en rojo y su tamaño está indicado.

El clon digerido con *Hin*dIII de **cf-47c** presentó la principal señal de *E1* y $P_{polh}+polh$ a la altura de la banda A de 19.2 kb (ver figuras 13.23 y 13.24). La señal de *DsRed1* se observó, en orden decreciente de intensidad, en la banda nueva de 5.1 kb (que corría como doblete con la banda J de 5 kb), y en las bandas D y A de 9 y 19.2 kb, respectivamente (ver figura 13.22).

En el caso de **cf-pEa** digerido con *Hin*dIII, las tres sondas presentaron prácticamente el mismo patrón de señales. Las escasas diferencias se observaron a nivel de intensidad de señal. Las tres sondas presentaron hibridación en las bandas A y B (de 19.2 y 16.4 kb, respectivamente) y en las bandas nuevas de 13.5 y 7.8 kb. La mayor señal de **DsRed1** se encontró en la banda nueva de 13.5 kb, luego siguieron la banda nueva de 7.8 kb y el fragmento B de 16.4 kb y, por último, la menor intensidad se encontró en la banda A de 19.2 kb (ver figura 13.22). La mayor señal de **E1** también se encontró en la banda nueva de 13.5 kb, pero en este caso el subsiguiente orden decreciente de intensidad de señal fue: bandas B, A (de 16.4 y 19.2 kb, respectivamente) y la nueva de 7.8 kb (ver figura 13.23). La mayor

señal de **P**_{*polh*}+*polh* también se encontró en la banda nueva de 13.5 kb y le siguieron en intensidad decreciente las bandas B y A, de 16.4 y 19.2 kb, respectivamente. La señal en la banda nueva de 7.8 kb (submolar) fue mucho menor. A diferencia de las otras sondas, presentó una débil señal en la banda nueva de 5.1 kb (que corría como doblete con la banda J de 5 kb) (ver figura 13.24).

Las PCRs realizadas sobre este DNA indicaron la presencia de ambos promotores $(P_{p10}+P_{polh})$ y del gen de poliedrina bajo el control de su propio promotor $(P_{polh}+polh)$. La amplificación del gen *enhancin1* bajo el control del promotor de *p10* $(P_{p10}+E1)$ dio negativa (ver figura 13.19).



Figura 13.19. PCRs realizadas sobre DNA extraído de cf-pEa y cf-pRa. Upr10-Nde y Lred-Sfi fueron los primers utilizados para amplificar las secuencias del promotor de $P_{p10}+DsRed1+SV40$ polyA ($P_{p10}+DsRed1$ en el caso de cf-pRa) y las secuencias del promotor de p10+E1+SV40polyA (P_{p10}+E1 en el caso de cf-pEa). Uprom-Nde y Lorf-Spe fueron los primers utilizados para amplificar las secuencias del promotor de poliedrina + poliedrina (P_{polh} + polh). Lpr10-Sgf y Lpr(c)-Sgf fueron los primers utilizados para amplificar a ambos promotores (Pp10+Ppolh). Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias $P_{p10}+DsRed1$ se encuentra recuadrado en rojo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias Pp10+E1 se encuentra recuadrado en amarillo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica secuencias Ppolh se encuentra recuadrado en verde oscuro y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias P_{10} + P_{polh} se encuentra recuadrado en verde claro y su tamaño está indicado. El control positivo de la PCR P_{p10} + DsRed1, fue pRUPOD. El control positivo de la PCR P_{p10} + *E1* fue pEUPOD. Los controles positivos de la PCR P_{polh} + *polh* fueron, alternativamente, pRUPOD y pEUPOD. Los controles positivos de la PCR Pp10 + Ppolh fueron, alternativamente, pRUPOD y pEUPOD.

<u>**Grupo II**</u>: El patrón de hibridación de las diferentes sondas fue equivalente para las muestras de DNA de **cf-47d**, **cf-p10b y cf-pRa**. **Dsred1 y P**_{polh}+**polh** presentaron señal en la única banda nueva de 6.5 kb (ver figuras 13.22 y 13.24). **E1** no presentó señal en ningún caso (ver figura 13.23).

Las PCRs realizadas sobre el clon **cf-47d**, indicaron la presencia del gen *DsRed1* más las secuencias polyA de SV40 (*DsRed1* + SV40polyA). Dio negativa la PCR que amplificaba a ambos promotores de poliedrina ($P_{polh}+P_{polh}$) (ver figura 13.20).



Figura 13.20. PCRs realizadas sobre cf-47d. Ured-Xma y Lred-Sfi fueron los *primers* utilizados para amplificar las secuencias *DsRed1*+SV40polyA (*DsRed1*). Lpr(c)-Sgf fue el *primer* utilizado para amplificar a ambos promotores ($P_{polh}+P_{polh}$). Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias *DsRed1*+SV40polyA se encuentra recuadrado en rojo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica se encuentra recuadrado en verde y su tamaño está indicado. El control positivo para las PCRs P_{polh}+P_{polh} y *DsRed1* fue pIERUPOD-47.

Las PCRs realizadas sobre el clon de **cf-p10b**, indicaron la presencia de ambos promotores $(P_{p10}+P_{polh})$ y de *DsRed1*+ SV40polyA. Dio negativa la PCR para levantar al gen *E1* bajo el control de P_{p10} (ver figura 13.21).



Figura 13.21. PCRs realizadas sobre cf-p10b. Upr10-Nde y Lenh-NheEco fueron los *primers* utilizados para amplificar al promotor de *p10* + el gen *E1* ($P_{p10}+E1$). Ured-Xma y Lred-Sfi fueron los *primers* utilizados para amplificar *DsRed1*+SV40polyA. Lpr10-Sgf y Lpr(c)-Sgf fueron los *primers* utilizados para amplificar a ambos promotores ($P_{p10}+P_{polh}$). Los perfiles de ciclado y las condiciones de reacción correspondientes se encuentran en la "Sección IV: Materiales y Métodos". El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias del gen *E1* se encuentra recuadrado en amarillo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica el gen *DsRed1*+SV40 polyA se encuentra recuadrado en rojo y su tamaño está indicado. El fragmento de amplificación de la PCR que identifica las secuencias *P*_{*p10*+*P*_{*polh*} se encuentra recuadrado en verde claro y su tamaño está indicado. El control positivo en todas las PCRs fue pIERUPOD-*P*_{*p10*}.}

Las PCRs realizadas sobre el DNA de **cf-pRa**, indicaron la presencia de las secuencias *DsRed1*+SV40polyA bajo el control del promotor de *p10* (P_{p10} +*DsRed1*) y de ambos promotores (P_{p10} + P_{polh}). El gen de poliedrina bajo el control de su propio promotor evidenció una deleción, dado que el fragmento de PCR fue menor al esperado (ver figura 13.19).

C	-	
6	2	
	З	
	4	6
LE	5	-
11 I. E. E. E	6	
	7	1:
	8	*
	9	Gru
	10	po I
	1	
	12	G
	13	rupo
	14	=
	15	
		and the state of t
	-	1
	1 2	1
	1 2 3	
	1 2 3 4	
	1 2 3 4 5	
	1 2 3 4 5 6	1111
	1 2 3 4 5 6 7	1111
	1 2 3 4 5 6 7 8	
	1 2 3 4 5 6 7 8 9	Grup
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Grupo I
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11	1111 Grupo I
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	Grupo 1 Grupo 1
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13	Grupo I Grupo
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14	Grupo I Grupo II



corresponden con el fragmento G* característico de AgMNPV-IPpol bandas que se corresponden con el fragmento G de AgMNPV-2D. que se corresponden en el Southern y en la digestión con las especies del grupo II. Las líneas verdes horizontales discontinuas unen las Las lineas celestes horizontales discontinuas unen las bandas que se

DsRed1 presentó señal en la banda G de AgMNPV-2D, por lo tanto era esperable que se observara señal de *DsRed1* donde había señal de $P_{polh}+polh$. A esto se atribuye la tenue señal de *DsRed1* a la altura de la banda nueva de AgMNPV-I*Ppo*I, tanto en la calle 8 como en la 11, ya que aquí se encuentran las secuencias del promotor de poliedrina. No era esperable que $P_{polh}+polh$ presentase señal donde había *DsRed1*, ya que éste no presentó señal en todas las bandas en las que había señal de *DsRed1*.

<u>**Grupo**</u> *I*: En el clon digerido de **cf-47c**, la señal de *DsRed1* se observó, en orden decreciente de intensidad, en la banda nueva de 5.1 kb (corría como doblete con la banda J de 5 kb), y en las bandas D y A de 9 y 19.2 kb, respectivamente. En el caso de **cf-pEa** digerido con *Hin*dIII, la mayor señal de *DsRed1* se encontró en la banda nueva de 13.5 kb, luego la banda nueva de 7.8 kb y el fragmento B de 16.4 kb y, por último, la menor intensidad se encontró en la banda A de 19.2 kb.

<u>Grupo II</u>: El patrón de hibridación de *Dsred1* fue igual para las tres especies (cf-47d, cfp10b y cf-pRa): presentaron señal en la única banda nueva de 6.5 kb.



y II. Las líneas blancas horizontales discontinuas unen las bandas que se corresponden en el Southern y en la digestión con las especies de corresponden a las especies del grupo I digeridas con Hindlll (cf-47c y cf-pEa). Las calles 12 a 14 corresponden a las especies del grupo II digeridas con Hindlll (cf-47d, cf-p10b y cf-pRa) Los marcos de color amarillo claro indican las bandas donde E1 presentó señal. Aquellos de línea continua indican las especies de los grupos i

grupo I

<u>Grupo I</u>: El clon digerido de **cf-47c** presentó la principal señal de *E1* a la altura de la banda A de 19.2 kb. También presentó una señal muy débil a la altura de la banda D de 9 kb. En el caso de **cf-pEa** digerido con *Hin*dIII, la mayor señal de *E1* se encontró en la banda nueva de 13.5 kb, y siguieron en orden decreciente de intensidad de señal, las bandas B y A de 16.4 y 19.2 kb, respectivamente, y la nueva de 7.8 kb.

Grupo II: E1 no presentó señal significativa en ningún caso.



grupos / y //. Los marcos de línea discontinua corresponden a AgMNPV-2D e AgMNPV-IPpol. Las líneas blancas horizontales discontinuas discontinuas unen las bandas que se corresponden con el fragmento G* característico de AgMNPV-IPpol unen las bandas que se corresponden en el Southern y en la digestión con las especies del grupo I. Las líneas naranjas horizontales las especies del grupo II digeridas con HindIII (cf-47d, cf-p10b y cf-pRa). <u>discontinuas</u> unen las bandas que se corresponden en el Southern y en la digestión con las especies del grupo II. Las líneas verdes oscuras Los marcos de color verde claro indican las bandas donde P_{polh}+polh presentó señal. Aquellos de línea continua indican las especies de los horizontales discontinuas unen las bandas que se corresponden con el fragmento G de AgMNPV-2D. Las líneas celestes horizontales

AgMNPV-2D presentó señal a la altura de la banda G, donde se encuentran el gen de poliedrina y su promotor. La señal que presentó a la altura de la banda de 14 kb, podría deberse a que se trata de una población viral, ya que este fragmento, además de ser submolar, no se encuentra en el patrón de restricción publicado para el clon AgMNPV-2D. La señal que presenta AgMNPV-I*Ppo*I a la altura de la banda G* se debe a las secuencias del promotor de poliedrina que allí se encuentran.

Grupo I: El clon digerido de **cf-47c** presentó la principal señal de P_{polh}+polh a la altura de la banda A de 19.2 kb. También presentó una señal muy débil a la altura de la banda D de 9 kb. En el caso de **cf-pEa** digerido con *Hin*dIII, la mayor señal de P_{polh}+polh se encontró en la banda nueva de 13.5 kb y le siguieron en intensidad decreciente las bandas B y A de 16.4 y 19.2 kb, respectivamente. La señal en la banda nueva de 7.8 kb (submolar) fue mucho menor. A diferencia de las otras sondas, presentó una débil señal en la banda nueva de 5.1 kb (que corría como doblete con la banda J de 5 kb).

<u>Grupo II</u>: En las tres especies, P_{polh}+polh presentó señal en la única banda nueva de 6.5 kb.

DISCUSIÓN

La mejor manera de interpretar los resultados obtenidos a partir de las cotransfecciones realizadas en este presente trabajo de tesis, es hacer un análisis detallado de los resultados esperados y luego contraponerlo al de los resultados obtenidos.

En primer lugar y como punto de partida, cada vector de transferencia generado debería haber producido un recombinante diferente, luego de cotransfectado con el DNA viral en células de insecto. En segundo lugar, todos los datos analizados y conclusiones alcanzadas están basadas en la producción de recombinantes en cultivo celular, no en larvas.

Los patrones de restricción esperados habrían sido los siguientes (sólo se mencionará la aparición de las bandas nuevas y desaparición de las bandas esperadas de los dobles recombinantes, respecto de AgMNPV-I*Ppo*I):

Los clones de **cf-47c y cf-47d** deberían haber presentado los mismos patrones de restricción, dado que se usó el mismo vector de transferencia (pIERUPOD-47) para ambas cotransfecciones. La digestión con *Hin*dIII habría producido tres bandas nuevas de 0.35 kb, 4.3 kb y 7.3 kb, y habría desaparecido la banda G* de *Hin*dIII de 10.2 kb (ver la tabla 13.1). La digestión con *Eco*RI habría producido cuatro bandas nuevas de 0.06, 1.2, 3.8 y 9.9 kb y habrían desaparecido las bandas G* y G** de *Eco*RI, de 7.6 y 5.5 kb, respectivamente (ver la tabla 13.2). La digestión con *Bg*/II habría producido una banda nueva de 34 kb. Habría desaparecido la banda B* de *Bg*/II de 32.3 kb (característica de AgMNPV-I*Ppo*I).

Los clones de **cf-p10b** digeridos con *Hin*dIII deberían haber producido tres bandas nuevas de 0.35 kb, 4.3 kb y 6.8 kb y habría desaparecido la banda G* de *Hin*dIII de 10.2 kb (ver la tabla 13.1). La digestión con *Eco*RI habría producido cuatro bandas nuevas de 0.06, 1.2, 3.8 y 9.3 kb y habrían desaparecido las bandas G* y G** de *Eco*RI, de 7.6 y 5.5 kb, respectivamente (ver la tabla 13.2).

Las especies **cf-pEa** digeridas con *Hin*dIII deberían haber producido una banda nueva de 10.1 kb y habría desaparecido la banda G* de *Hin*dIII de 10.2 kb (ver la tabla 13.1). La digestión con *Eco*RI habría producido tres bandas nuevas de 0.06, 3.6 y 9.3 kb y habrían desaparecido las bandas G* y G** de *Eco*RI, de 7.6 y 5.5 kb, respectivamente (ver la tabla 13.2).

Las especies **cf-pRa** digeridas con *Hin*dIII deberían haber producido una banda nueva de 8.4 kb y habría desaparecido la banda G* de *Hin*dIII de 10.2 kb (ver la tabla 13.1). La digestión con *Eco*RI habría producido una banda nueva de 11.4 kb y habrían desaparecido las bandas G* y G** de *Eco*RI, de 7.6 y 5.5 kb, respectivamente (ver la tabla 13.2).

Fragmento	AgMNPV-2D /HindIII	AgMNPV-IPpoI / HindIII	AgMNPV- pIERUPOD-47 / HindIII	AgMNPV- pIERUPOD-P _{p10} /HindIII	AgMNPV- pEUPOD / HindIII	AgMNPV- pRUPOD / <i>Hin</i> dIII
А	19232	19232	19232	19232	19232	19232
В	16446	16446	16446	16446	16446	16446
G*		10194				
					10117	
С	9942	9942	9942	9942	9942	9942
D	8976	8976	8976	8976	8976	8976
Е	8540	8540	8540	8540	8540	8540
						8440
F	8356	8356	8356	8356	8356	8356
			7336			
G	7262					
				6788		
Н	6164	6164	6164	6164	6164	6164
I	5517	5517	5517	5517	5517	5517
J	4967	4967	4967	4967	4967	4967
			4304	4304		
K	4080	4080	4080	4080	4080	4080
L	3477	3477	3477	3477	3477	3477
М	3443	3443	3443	3443	3443	3443
N	3222	3222	3222	3222	3222	3222
0	3214	3214	3214	3214	3214	3214
Р	2841	2841	2841	2841	2841	2841
Q	2512	2512	2512	2512	2512	2512
R	2381	2381	2381	2381	2381	2381
S	2381	2381	2381	2381	2381	2381
Т	2267	2267	2267	2267	2267	2267
U	2114	2114	2114	2114	2114	2114
V	2114	2114	2114	2114	2114	2114
W	2104	2104	2104	2104	2104	2104
X	1082	1082	1082	1082	1082	1082
			348	348		
Y	337	337	337	337	337	337

Tabla 13.1. Mapas de restricción con *Hin***dIII.** En color verde se encuentra resaltada la banda G de AgMNPV-2D. En color celeste está resaltada la banda G* característica de AgMNPV-I*Ppo*I (producto de una doble recombinación homóloga entre AgMNPV-2D y pAg-I*Ppo*I) adonde se está dirigiendo la recombinación homóloga. En color amarillo están resaltadas las bandas nuevas esperadas de AgMNPV-pIERUPOD-47, AgMNPV-pIERUPOD-P_{*p*10}, AgMNPV-pEUPOD y AgMNPV-pRUPOD. Los números corresponden a pares de bases. A la izquierda se encuentra la nomenclatura de los diferentes fragmentos de este mapa de restricción. Los espacios en blanco corresponden a las bandas nuevas, que no tienen nombre.

Fragmento	AgMNPV-2D / EcoRI	AgMNPV-IPpoI / EcoRI	AgMNPV- pIERUPOD-47 / EcoRI	AgMNPV- pIERUPOD-P _{p10} /EcoRI	AgMNPV- pEUPOD /EcoRI	AgMNPV- pRUPOD /EcoRI
А	38716	38716	38716	38716	38716	38716
В	18593	18593	18593	18593	18593	18593
С	17845	17845	17845	17845	17845	17845
D	13629	13629	13629	13629	13629	13629
						11370
Е	10917	10917	10917	10917	10917	10917
F	10508	10508	10508	10508	10508	10508
G	10174					
			9895			
				9347	9347	
G*		7571				
Н	6403	6403	6403	6403	6403	6403
G**		5553				
Ι	5113	5113	5113	5113	5113	5113
			3802	3802		
					3652	
			1173	1173		
J	1095	1095	1095	1095	1095	1095
			59	59	59	

Tabla 13.2. Mapas de restricción con EcoRI. En color verde se encuentra resaltada la banda G de AgMNPV-2D. En color celeste están resaltadas las bandas G* y G** características de AgMNPV-I*Ppo*I (producto de una doble recombinación homóloga entre AgMNPV-2D y pAg-I*Ppo*I) adonde se está dirigiendo la recombinación homóloga. En color amarillo están resaltadas las bandas nuevas esperadas de AgMNPV-pIERUPOD-47, AgMNPV-pIERUPOD-P_{p10}, AgMNPV-pEUPOD y AgMNPV-pRUPOD. Los números corresponden a pares de bases. A la izquierda se encuentra la nomenclatura de los diferentes fragmentos de este mapa de restricción. Los espacios en blanco corresponden a las bandas nuevas, que no tienen nombre.

En el *grupo I* (que incluye a **cf-47c y cf-pEa**) se deduce que hubo inserciones y/o duplicaciones.

En los clones aislados de **cf-47c** digeridos con *Eco*RI se observó un incremento del tamaño del genoma viral (respecto de AgMNPV-I*Ppo*I) de alrededor de 23 kb. En la digestión con *Hin*dIII de estos mismos clones las inserciones y/o duplicaciones no son evidentes. Aún más, con esta digestión se deducirían deleciones, ya que aunque las bandas nuevas que aparecen sumarían lo esperado, desaparece la banda I, por lo cual habría que restar esta banda además de las secuencias correspondientes del fragmento G*. Sin embargo, los datos aportados por los *Southern* confirman las inserciones y/o duplicaciones, ya que *E1*, $P_{polh}+polh$ y *DsRed1* presentaron señal en lo que sería la banda A (de 19.2 kb), y *DsRed1*, además, presentó señal en la banda nueva de 5.1 kb y en la banda D de 9 kb. Estos resultados indicarían que las inserciones y/o duplicaciones habrían sido tales que, en una digestión con *Hin*dIII, algunas de las bandas nuevas correrían a la par de las bandas A y D de 19.2 y 9 kb, respectivamente.

En la digestión con *Eco*RI de **cf-pEa**, también se observó un incremento del tamaño del genoma viral (respecto de AgMNPV-I*Ppo*I), pero de aproximadamente 21 kb. En la digestión con *Hin*dIII, las inserciones y/o duplicaciones son evidentes en forma parcial, ya que se deduce un incremento del genoma viral de alrededor de 11 kb (respecto de AgMNPV-I*Ppo*I). Pero, como en el caso anterior, los datos aportados por los *Southern* confirman la presencia de inserciones y/o duplicaciones mayores que las evidenciadas por la digestión con *Hin*dIII, ya que *E1*, *DsRed1* y P_{polh}+*polh* presentaron señal en las bandas A y B de 19.2 y 16.4 kb, respectivamente, y en la banda nueva de 13.5 kb. Las dos primeras sondas (*E1* y *DsRed1*) también hibridaron fuertemente en la banda nueva de 7.8 kb, mientras que la señal de P_{polh}+*polh* fue débil en esta banda y en la nueva de 5.1 kb. Las otras dos sondas no presentaron señal en la banda nueva de 5.1 kb. Como en el caso anterior, estos resultados indicarían que las inserciones y/o duplicaciones habrían sido tales que, en una digestión con *Hin*dIII, algunas de las bandas nuevas correrían a la par de las bandas A y B de 19.2 y 16.4 kb, respectivamente.

Los resultados de las PCRs realizadas sobre **cf-pEa**, confirman la presencia del gen de poliedrina bajo el control de su propio promotor y de ambos promotores ($P_{p10}+P_{polh}$). En **cf-47c** se amplificaron las secuencias *DsRed1* + SV40polyA. *E1* no se detectó por PCR, sin embargo, esta sonda (*E1*) presentó una fuerte señal en el *Southern* en **cf-47c y cf-pEa**, por lo que se deduce que este gen se encontraría truncado en ambas especies virales.

En el *grupo II* (que incluye a cf-47d, cf-p10b y cf-pRa) se deduce que hubo deleciones.

En los clones aislados de cf-47d, cf-p10b y en cf-pRa, se observó una disminución en el tamaño de los genomas virales (respecto de AgMNPV-I*Ppo*I) de 3.7 kb, tanto en las digestiones con *Hin*dIII como con *Eco*RI.

En relación al tamaño esperado de los genomas recombinantes de cf-47d, cf-p10b y cf-pRa, se observó una disminución de 5.5, 4.9 y 1.9 kb respectivamente (estos datos se deducen tanto de las digestiones con *Hin*dIII como con *Eco*RI).

Los resultados de los *Southern* confirman los datos aportados por las digestiones. Las sondas $P_{polh}+polh$ y *DsRed1* presentaron señal solamente en la banda nueva de 6.5 kb, mientras que *E1* no presentó señal alguna.

Los resultados de las PCRs realizadas sobre estas especies son coincidentes con estos datos, ya que el gen *DsRed1* se amplificó en todas ellas. También se amplificó el gen de poliedrina bajo el control de su propio promotor, aunque evidenciando una deleción, ya que el fragmento de PCR fue menor al esperado. El gen *enhancin1* no se amplificó en ningún caso (lo cual es esperable en la cotransfección con pRUPOD) y, sumado al hecho de que en

el *Southern* no presentó señal, esto indicaría que en estas especies se ha perdido completamente.

Comparando los datos de las especies de los *grupos I* y *II*, se pueden extraer las siguientes conclusiones generales. Las especies del *grupo II* han sufrido eventos de recombinación más simples, directos y, por lo tanto, más deducibles. Esto se infiere del hecho de que estos procesos fueron puestos de manifiesto de manera coincidente por cada una de las diferentes digestiones y de los *Southern*. El elemento común y heterólogo que poseen estas especies es el gen *DsRed1*, ya que el gen *enhancin1* y las secuencias IRES, que se encuentran en pIERUPOD-47 y PIERUPOD-P_{p10}, no se encuentran en pRUPOD. Se observó una persistencia y predominio de la misma especie recombinante en las diferentes cotransfecciones. Esto es, todos los clones analizados presentaron el mismo patrón de restricción y de hibridación en los *Southern*. Por lo tanto, se podría especular que las secuencias del gen *DsRed1* actuarían como agente estabilizante y de presión selectiva positiva sobre el establecimiento de esta especie recombinante aberrante. Además, estas secuencias (*DsRed1*) serían dominantes sobre el efecto de las secuencias de *E1*.

En cuanto a las especies recombinantes del grupo I, como ya se ha mencionado, se produjeron eventos de recombinación más complejos. Éstos estimularon al reacomodamiento de uno de los "sitios calientes" del genoma de AgMNPV, según Maruniak et al. (1999) y, por lo tanto, fueron más difíciles de deducir; ya que fueron necesarios varios ensayos diferentes para poder visualizarlos. Se observó que la cotransfección cf-47c sufrió procesos de recombinación similares a los de la cotransfección cf-pEa. De las dos cotransfecciones, la única en la que se utilizó un plásmido con secuencias de DsRed1 fue cf-47c. Tomando en cuenta la especulación acerca de la dominancia de las secuencias DsRed1 sobre las de E1, se podría pensar que la similitud en los eventos de recombinación de ambas especies (cf-47c y cf-pEa), se podría deber a la presión selectiva que sufrieron los recombinantes de la cf-47c. Dado que esta cotransfección fue muy poco eficiente, es probable que las escasas moléculas recombinantes producidas de manera tardía hayan sido aquellas en las que, por alguna razón, predominó el efecto de las secuencias E1 sobre los procesos de recombinación, a pesar de estar presentes las secuencias del gen DsRed1 (ya que se amplifica por PCR y se identifica en el Southern). Comparando este fenómeno con el de la cotransfección cf-pEa, que no contiene secuencias DsRed1 y que, por lo tanto, sólo se puede atribuir al efecto de las secuencias E1, se observan similitudes. Por un lado, los resultados de los patrones de restricción y de los Southern conducen a la existencia de inserciones y/o duplicaciones y, por otro, los reordenamientos se dieron en la misma región ("hot spot" localizado en 81.94 a 86.09 m.u. del genoma de AgMNPV-2D). La señal de
Southern de *DsRed1*, en el caso de la cotransfección con pEUPOD, se podría atribuir al hecho ya mencionado de que esta sonda presentó señal donde había señal de $P_{polh}+polh$. Además, en el caso de cf-pEa, el patrón de señales de ambas sondas (*DsRed1* y $P_{polh}+polh$) es coincidente.

Existen múltiples estudios que ayudan a interpretar nuestros resultados.

Por un lado, Maruniak *et al.* (1999) analizaron la variación genómica de diecisiete variantes purificadas por placa obtenidas a partir de dos preparaciones comerciales de AgMNPV. Ambas preparaciones estaban compuestas por aislamientos virales que presentaban heterogeneidad molecular, lo cual es esperable en poblaciones de baculovirus salvajes y recolectadas a campo.

La naturaleza de los cambios observados en el DNA, se debió a inserciones o duplicaciones de DNA y a deleciones y mutaciones en el genoma, que eliminaron o generaron sitios de restricción. El mismo tipo de reordenamientos se encontró en SeMNPV (Brown *et al.*, 1985). En ese estudio los autores demostraron la incorporación de DNA celular al genoma del virus. Maruniak *et al.* (1999) no analizaron este aspecto, pero especularon que, dado que los baculovirus existen naturalmente en el campo, los cambios genómicos se podrían haber producido por eventos de recombinación entre los aislamientos geográficos salvajes y la preparación comercial aplicada. Croizier y Ribeiro (1992) determinaron la existencia de un proceso activo de recombinación en las poblaciones salvajes de AgMNPV, y se ha demostrado que la recombinación produce nuevos genotipos en larvas (Croizier *et al.*, 1988; Niessen y Friesen, 1989).

Determinadas regiones del DNA presentaron cambios en casi todos los aislamientos virales, sugiriendo que allí los eventos de recombinación ocurrían con elevada frecuencia. Aparentemente el genoma viral tiene "sitios calientes" (*hot spots*), que presentan numerosos reordenamientos respecto de otros sitios. Una de las regiones variables se encontró en el fragmento que abarcaba 81.94 a 86.09 m.u. (ver figura 13.9). Como ya se mencionó, las especies del *grupo I* del presente trabajo de tesis, presentaron reordenamientos en esta misma región. Esto se dedujo por el hecho que, en las diferentes digestiones, perdieron los fragmentos que se encontraban en esta zona, además de los fragmentos correspondientes a la región a la que se estaba dirigiendo la recombinación homóloga (por medio del vector de transferencia).

Por otro lado, la ocurrencia de deleciones (mayores) espontáneas en baculovirus es un fenómeno generalizado. En SeMNPV, cuando se infectan células de insecto, comúnmente se observan deleciones de secuencias no esenciales de hasta 25 kb (Heldens *et al.*, 1996;

Dai *et al.*, 2000; Pijlman *et al.*, 2002) que se localizan en la región más grande que existe en ese genoma entre dos *hr*s adyacentes (*hr*1 y *hr*2 de SeMNPV) (ljkel *et al.*, 1999). En AcMNPV, las deleciones frecuentemente se encuentran en el *locus* EGT/DA26 (Kumar y Miller, 1987), que está localizado en el centro de la región inter-*hr hr*1-2 (Ayres *et al.*, 1994). Dado que se cree que los *hr*s son orígenes de replicación viral (*oris*), Pijlman *et al.* (2003) especulan que la ocurrencia de las deleciones genómicas es más probable en regiones con una baja densidad de *ori*s.

En cuanto a la eliminación espontánea de secuencias heterólogas aportadas por el vector, Pijlman *et al.* (2003) demostraron que la reconstitución de baculovirus infectivos a partir de bácmidos en células de insecto, está acompañada por una inestabilidad genética de las secuencias del vector BAC. Una vez que el factor de inestabilidad es eliminado por deleción espontánea del vector BAC (no esencial) durante la replicación viral, se genera un virus más estable que predomina en pasajes subsiguientes.

La replicación de los baculovirus promueve recombinación homóloga de alta frecuencia

Los resultados de Martin y Weber (1997) demostraron que el DNA de AcMNPV promueve recombinación de alta frecuencia durante el proceso de infección, y sugieren que es altamente probable que el mismo virus juegue un rol crucial en la transferencia de DNA heterólogo a su propio genoma.

Es tentador especular acerca del rol que podría jugar la recombinación en el ciclo de replicación de AcMNPV. Los intermediarios de recombinación podrían servir para cebar rondas adicionales de replicación independientes de orígenes, incrementando así la cantidad total de DNA replicado. Otro rol potencial para la recombinación en el ciclo de vida viral, podría estar en el procesamiento inicial del DNA viral luego del comienzo de la infección. Está bien establecida la notable habilidad de los baculovirus para persistir por largos períodos de tiempo bajo condiciones ambientales adversas (Blissard y Rohrmann, 1990). Sin embargo, a lo largo del tiempo, el DNA presente en los viriones podría dañarse en gran medida por la acción de rayos ultravioletas y, antes de la replicación, sería necesario reparar estos defectos en el genoma. El procesamiento de este DNA defectuoso a través de un sistema eficiente de recombinación homóloga, podría representar uno de los factores que contribuyen a la habilidad de estos virus de persistir en el ambiente.

En cuanto a la ocurrencia de eventos de recombinación inesperados en el genoma viral, Wu *et al.* (1999) describieron la integración azarosa de DNA plasmídico al genoma de AcMNPV, debido a su co-replicación en células de insecto Sf21. El análisis de los sitios de unión de

estas integraciones, reveló grandes deleciones genómicas y varias inserciones de secuencias cortas, ricas en AT y de origen desconocido. De manera análoga a las secuencias DI encontradas por Pijlman *et al.* (2001), la comparación de las secuencias de unión de las inserciones no reveló ninguna secuencia consenso o de homología clara entre pUC19 (plásmido utilizado en estos ensayos) y el DNA de AcMNPV. Aunque el estudio de Wu *et al.* (1999) se enfocó en la integración de secuencias foráneas al genoma de los baculovirus, los datos de Pijlman *et al.* (2001) proveen evidencia complementaria, sugiriendo que los mismos mecanismos de recombinación podrían estar involucrados en la generación de los genomas DI.

Durante la replicación de AcMNPV en células Sf9, ocurrió recombinación homóloga entre un par de elementos IS50 integrados (Martin y Weber, 1997). Más aún, la recombinación homóloga de alta frecuencia (Hajós et al., 2000) es una característica importante de la replicación de los baculovirus. También se demostró recombinación no homóloga entre DNA viral y foráneo en células Sf9 (Xiong *et al.*, 1991; Schorr and Doerfler, 1993). Estos estudios refuerzan la idea de que el proceso de replicación del DNA de los baculovirus en células de insecto, involucra varios mecanismos de recombinación heteróloga y homóloga que podrían resultar en la rápida generación de genomas defectivos.

Pijlman *et al.* (2001) concluyeron que la rápida generación de DIs es una propiedad intrínseca de la infección de cultivos celulares con baculovirus. Ellos asumen que la continua recombinación homóloga y heteróloga del DNA de baculovirus en células infectadas, ocurre en combinación con una selección de mutantes que tienen una ventaja replicativa y que pueden multiplicarse más rápidamente a expensas de un virus *helper*. La generación de los recombinación homóloga y heteróloga del DNA de baculovirus en células infectadas, de los recombinación homóloga y heteróloga del DNA de baculovirus en células infectadas, combinado con una selección de recombinantes con una clara ventaja replicativa en cultivo celular.

Probable promiscuidad de los mecanismos de replicación y recombinación de los baculovirus

Los resultados presentados aquí, como los datos aportados por Wu *et al.* (1999), sugieren que el mecanismo de replicación del DNA de los baculovirus podría ser promiscuo en cuanto a la elección de molde y/o a la elección del compañero (o *partner*) de recombinación. Wu *et al.* (1999) explican la existencia de baculovirus recombinantes inestables que no pueden ser aislados por placa (Lu *et al.*, 1996), debido a la replicación e integración del DNA cotransfectado al genoma viral. Todos estos resultados también son relevantes en cuanto a

la seguridad en el uso de baculovirus modificados genéticamente como biopesticidas o como vectores en terapia génica, dado que muchos de ellos son construidos por cotransfección de DNA viral y plasmídico. Además, si durante el escalado se integraran homólogos celulares de oncogenes o secuencias repetidas de tipo retroviral (o "retroelementos") al genoma de los baculovirus, estos elementos podrían persistir en la población viral, como demostraron Wu et al. (1999).

Por otro lado, como ya se ha mencionado, Pijlman et al. (2003) demuestran que la reconstitución en células de insecto de baculovirus infectivos a partir de un bácmido, está acompañada por una inestabilidad genética de las secuencias BAC, que es eliminada por deleción espontánea de estas secuencias durante la replicación. Ellos creen que esto podría constituir un grave impedimento en la utilización de baculovirus derivados de bácmidos, especialmente en la producción a gran escala de proteínas heterólogas en biorreactores de células de insecto. Por esto, consideran que tal vez sea necesario volver al método clásico para la generación de baculovirus recombinantes, aunque sea más lento, porque produciría virus de mayor estabilidad. Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo de tesis, sugieren que la generación de baculovirus recombinantes a partir de cotransfecciones con vectores de transferencia (método clásico), también produce una importante inestabilidad genética.

Posibles riesgos ecológicos en la introducción de baculovirus modificados genéticamente

Dada la controversia que genera la introducción en el ambiente de cepas modificadas genéticamente (Giddings, 1998), Dushoff y Dwyer (2001) utilizaron un modelo matemático para explorar las potenciales consecuencias ecológicas en la liberación de baculovirus modificados genéticamente.

En general, las modificaciones resultan en una transmisibilidad reducida del virus introducido en relación al salvaje. Por ejemplo, una de las modificaciones más conocidas es la adición de genes de toxinas de escorpión específicas para insectos, que pueden matar al hospedador hasta un 25% más rápido que las cepas salvajes (Cory et al., 1994). Sin embargo, estos baculovirus modificados tienen una transmisibilidad reducida. Esto se debe a que, contrariamente a la cepa salvaje, no causan la lisis del hospedador que liberaría las partículas infectivas al ambiente, y a que producen un décimo de las partículas infectivas generadas por la cepa salvaje.

Debido a esta transmisibilidad reducida, podría esperarse que la liberación de baculovirus modificados tenga poco impacto ecológico en poblaciones de insectos naturales, ya que las cepas salvajes rápidamente dominarían sobre las modificadas. Esto implicaría la extinción de los baculovirus modificados en el transcurso de escasas generaciones del hospedador, luego de su liberación. Sin embargo, este no es necesariamente el caso. Es importante considerar el retraso entre infección y muerte (es decir, infectividad) en la enfermedad causada por los baculovirus. El menor tiempo en que la cepa modificada mata al hospedador le otorga importantes ventajas. Por un lado, le permite alcanzar más rápidamente a larvas susceptibles en la segunda y subsiguientes generaciones epidémicas. Y por otro, le otorga el potencial para completar un mayor número de generaciones epidémicas en una estación.

El modelo propuesto por Dushoff y Dwyer (2001) muestra que el resultado más probable de la competencia entre cepas modificadas genéticamente y salvajes, es que alguna de ellas se extinguirá. Específicamente, las cepas modificadas que matan más rápidamente sólo se extinguirán si su transmisibilidad es suficientemente más reducida que la de la cepa salvaje. Más aún, el grado de reducción en la transmisibilidad para asegurar la extinción de la cepa modificada, depende del parámetro indicativo del remanente invernal (cuántos han sobrevivido el invierno). Por lo tanto, no siempre será suficiente conocer el grado de reducción en la transmisibilidad de la cepa modificada para predecir el resultado de la competencia. Esto es especialmente incierto dado lo poco que se conoce acerca de la supervivencia invernal de los baculovirus.

Dushoff y Dwyer (2001) realizaron estimaciones acerca de la transmisibilidad relativa y velocidad en que mata un mutante *egt*- de LdMNPV. Dado que el virus *egt*- es un mutante de deleción, se esperaría su extinción y, de hecho, sus estimaciones indican una alta probabilidad de que esto ocurra. Sin embargo, los datos experimentales no permiten descartar la posibilidad de que pueda persistir a campo por cientos de años y aún que domine (*outcompete*) sobre la cepa salvaje.

A pesar de su simplicidad, este modelo mostró que las interacciones competitivas entre cepas nativas e introducidas puede tener importantes implicancias en el uso de agentes de control microbianos. Sobre todo, el modelo muestra que el estado actual de conocimiento probablemente es insuficiente para predecir el resultado de la competencia entre diferentes cepas.



CAPÍTULO 14

CAPÍTULO 14

Estrategias alternativas para mejorar la infectividad de AgMNPV-2D.

INTRODUCCIÓN

La estrategia elegida en este trabajo de tesis para incrementar la infectividad de AgMNPV-2D y desarrollada en los Capítulos anteriores de Resultados y Discusión, consistió en la inserción del gen *E1* de LdMNPV en su genoma a través de un vector de transferencia. Se eligió este gen porque tiene la capacidad de intensificar la infectividad viral. Los *enhancins* son metaloproteasas que degradan uno de los componentes mayoritarios de la membrana peritrófica. También se cree que incrementan los eventos de fusión entre el virus y las células hospedadoras (ver Introducción del Capítulo 7 de Resultados y Discusión para un desarrollo más detallado).

Sin embargo, existía la posibilidad de que, si AgMNPV-2D y LdMNPV eran co-infectados en larvas de *A. gemmatalis*, el producto génico de *E1* aportado en *trans* por LdMNPV incrementara la infectividad de AgMNPV-2D. Se exploró esta primer estrategia alternativa.

La segunda estrategia alternativa apuntó al aislamiento a partir de larvas de *A. gemmatalis*, del recombinante AgMNPV-2D con el gen *E1* (AgMNPV-pIERUPOD). Esto se lograría mediante la infección *per os* de larvas con los cuerpos de inclusión (PIBs) aislados a partir de una de las cotransfecciones realizadas en cultivo celular [en particular, cf-p10b (AgMNPV-I*Ppol* y pIERUPOD-p10); ver Capítulo 10 de Resultados y Discusión]. Esta estrategia se basaba en que los simples y doble recombinantes virales, eran las únicas especies que podían producir cuerpos de inclusión. Como las especies recombinantes virales estrañas que se estaban aislando a partir de cultivo celular eran incapaces de producir cuerpos de inclusión, serían inviables en larvas, ya que este sistema estaría ejerciendo una presión de selección positiva que favorecería a las especies capaces de producir PIBs.

Esta estrategia no había sido ensayada con anterioridad porque el sistema de larvas no es fácil de manipular. Además, aislar el DNA recombinante buscado a partir de larvas no iba a ser una tarea fácil, ya que era altamente probable que hubiera más de una especie recombinante. En este caso, se iba a tener que volver a cultivo celular para su aislamiento y, en función de los fracasos experimentados anteriormente, la probabilidad de que volviera a

sufrir selección negativa en este medio podía ser elevada. A pesar de esto, se exploró también esta segunda estrategia alternativa.

RESULTADOS

Primer estrategia alternativa: ensayos de co-infección en larvas de *A. gemmatalis* con AgMNPV-2D y LdMNPV. Heterogeneidad de la población viral del AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular.

En los ensayos de co-infección en larvas de *A. gemmatalis* con AgMNPV-2D y LdMNPV, se vio que LdMNPV tuvo un efecto positivo sobre la infectividad en larvas (no se muestran los resultados). Sin embargo, en estos ensayos se observó que la infectividad del AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular había disminuido dramáticamente, con lo cual no se tenía un control adecuado de infectividad en los mismos. Por esto, los resultados con respecto a LdMNPV representan un interesante punto de referencia para posteriores ensayos confirmatorios.

Debido a que la infectividad disminuida en larvas de nuestro *stock* de AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular, es un fenómeno que se ha observado en varios baculovirus multiplicados por pasajes seriados en cultivos celulares (MacKinnon *et al.*, 1974; Hink y Strauss, 1976; Potter *et al.*, 1976; Fraser y Hink; 1982; Slavicek *et al.*, 1992), se decidió infectar larvas y así recuperar el genotipo AgMNPV-2D infectivo para las mismas. En este Capítulo, para poder diferenciar claramente los genotipos de AgMNPV-2D amplificados por cultivo celular y por larvas, se referirá a ellos como **AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular** y **AgMNPV-2D amplificado por larvas**, respectivamente.

Se realizó un ensayo en el que se infectaron larvas con cantidades muy elevadas de poliedros aislados a partir del **AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular**. Como ya se mencionó, el objetivo era recuperar el genotipo salvaje del AgMNPV-2D infectivo para larvas, que se esperaba fuera igual al publicado (Johnson y Maruniak, 1989), dado que teóricamente se estaba partiendo de un clon de AgMNPV-2D. Para esto, se debía asegurar la muerte de varias larvas, a fin de poder extraer el DNA viral a partir de los poliedros purificados. Luego se confirmaría su estructura genómica por medio de análisis de restricción y se infectarían células con este genotipo salvaje AgMNPV-2D infectivo para larvas. En este ensayo también se infectaron larvas con poliedros de un formulado de AgMNPV (utilizado a campo) para tener un control de alta infectividad y, además, para poder contrastar su patrón de restricción contra los de AgMNPV-2D amplificados por cultivo celular

y por larvas. Las condiciones del ensayo y los resultados se resumen en el siguiente esquema:

Número de poliedros	Virus ^(a)		control negativo (b)
administrados por larva	AgMNPV-2D	AgMNPV formulado	
500000	3 larvas muertas	7 larvas muertas	-
	2 prepupas muertas	3 pupas	
	5 pupas		
ninguno (sólo dieta)	-	-	2 larvas muertas
			8 pupas

^(a) Se usaron 10 larvas de 3er. estadio para cada condición.

^(b) Se usaron 10 larvas de 3er. estadio.

La muerte de las dos larvas en el control negativo se debió a una incorrecta manipulación en el ensayo. De acuerdo a lo esperado, el AgMNPV formulado fue el de mayor infectividad. Los resultados obtenidos para AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular fueron coherentes con los anteriores. Una alícuota de los PIBs que se aislaron de las larvas y prepupas infectadas con AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular, se usó para infectar 5 larvas (con 10⁷ PIBs cada una). Éstas últimas murieron todas a los 7 días p.i. Se extrajo el DNA viral a partir de los PIBs purificados de esta re-amplificación por larvas (las últimas 5 larvas infectadas), es decir, de **AgMNPV-2D amplificado por larvas**. También se extrajo DNA de los PIBs purificados a partir de las larvas infectadas con el formulado de AgMNPV. Se realizaron digestiones con *Hin*dIII (ver figura 14.1).



Figura 14.1. Digestión con *Hind***III del AgMNPV-2D amplificado por larvas.** Las bandas recuadradas en color morado corresponden a aquellas que son submolares, típicas de poblaciones virales heterogéneas. Las bandas recuadradas en verde corresponden a la banda G de AgMNPV-2D. La banda recuadrada en azul corresponde al fragmento G* característico de AgMNPV-I*Ppo*I. La banda recuadrada en amarillo corresponde al fragmento nuevo de la amplificación por cultivo celular de cf-pRa (cotransfección con AgMNPV-I*Ppo*I y pRUPOD), que fue exactamente igual al que apareció en el clon -5₆, aislado a partir de cf-p10b (ver más adelante). En la digestión de AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular se indican las letras que identifican a cada banda. La calle 6 (cf-pRa) se incluyó para confirmar que la especie que resultaba predominante en cultivo celular no lo sería en larvas (ver más adelante).

En el ensayo se agregaron como controles las digestiones de AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular y de AgMNPV formulado amplificado por larvas. El objetivo del primer control (AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular) era comparar este patrón de restricción con el de AgMNPV-2D amplificado por larvas. Como teóricamente el AgMNPV-2D amplificado

por cultivo celular correspondía a un clon (población viral homogénea), se esperaba que ambos patrones de restricción fueran iguales.

Dado que el AgMNPV formulado corresponde a una población viral heterogénea, el objetivo de este segundo control era contraponer los patrones de restricción de los AgMNPV-2D amplificados por cultivo celular y por larvas, con uno que corresponde al de varias poblaciones virales diferentes. La heterogeneidad en las poblaciones virales se visualiza típicamente a través de las bandas submolares.

En la digestión de **AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular** (calle 1) se ve un fragmento submolar de aproximadamente 14 kb (recuadrado en morado), que no se encuentra en el patrón de restricción publicado. Esto ya era un fuerte indicador de que nuestro *stock* de AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular no era un clon (población homogénea) sino una población viral heterogénea.

La digestión del DNA del **AgMNPV-2D amplificado por larvas**, generó un patrón de restricción completamente diferente al del AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular (calles 2 y 1, respectivamente). Esto indicaría que, dado que nuestro *stock* de AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular es una población viral heterogénea, la amplificación por larvas favorecería selectivamente a aquella/s variante/s que es/son más competitiva/s en este sistema. A esto se atribuyen las diferencias en ambos patrones de restricción.

En conclusión, los análisis de restricción indicaron que nuestro *stock* de **AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular** era una población viral heterogénea

Segunda estrategia alternativa: selección de AgMNPV recombinantes en larvas. Aislamiento del clon AgMNPV-2D recuperado a partir de la amplificación por larvas de la cf-p10b.

En este ensayo se utilizó la **cf-p10b** (*cf1* del 13/09/03, con AgMNP-I*Ppo*I y pIERUPOD-P_{*p10*}; ver Capítulo 10 de Resultados y Discusión) para aislar el recombinante buscado a partir de larvas. Se eligió esta cotransfección porque fue la que presentó mayor cantidad de poliedros en el ensayo de placas (ver figura 10.5, Capítulo 10). Se realizaron amplificaciones y re-amplificaciones del sobrenadante de cotransfección por cultivo celular y se purificaron los PIBs a partir de estas monocapas infectadas. Los PIBs no se cuantificaron, ya que el único objetivo que se perseguía era aislar el recombinante buscado (AgMNPV-2D con el gen *E1*). Para esto, se debía infectar con concentraciones muy elevadas de PIBs, ya que se esperaba una baja recuperación de recombinantes. La totalidad de los PIBs se usó para infectar larvas de *A. gemmatalis*.

Las condiciones del ensayo y los resultados del mismo se resumen en el siguiente esquema:

Número de poliedros	Virus ^(a)		control negativo (b)
administrados por larva	Amplificación cf-p10b	Re-amplificación cf-p10b	
~10 ⁶ poliedros/larva	50 larvas muertas		
~10 ⁷ poliedros/larva		50 larvas muertas	
ninguno (sólo dieta)			20 pupas

^(a) se usaron 50 larvas de 2do. estadio para cada condición.

^(b) se usaron 20 larvas de 2do. estadio.

Como se aprecia en el esquema, la mortalidad de las larvas infectadas fue total (excepto en el control negativo). Para el sexto día p.i. habían muerto 36 larvas de cada dosis y para el séptimo día habían muerto todas (en ambas condiciones). Las larvas infectadas presentaron un tamaño mucho menor (en comparación con las del control negativo) (ver figura 14.2).



Figura 14.2. Larvas infectadas con poliedros purificados de la cf-p10b (AgMNPV-IPpol y pIERUPOD-P_{p10}). En el extremo izquierdo de la fotografía se encuentran dos larvas sin infectar; su aspecto heterogéneo es típico de A. gemmatalis (ver "Sección I: Introducción"). Las 8 larvas restantes murieron por infección per os con poliedros de la cf-p10b. La fotografía fue tomada en el día 5 p.i. y todas las larvas presentaban el mismo estadio de desarrollo. Como se puede observar claramente, las larvas infectadas tienen un tamaño mucho menor que las no infectadas.

Se aislaron los PIBs de las larvas homogeneizadas y, a partir de ellos, se extrajo el DNA viral. Se realizaron las digestiones correspondientes con *Hin*dIII e, inesperadamente, se observó que el DNA extraído de las larvas infectadas con los PIBs de la **cf-p10b**, tenía un genotipo indistinguible del clon AgMNPV-2D (ver figura 14.1). Este resultado sugiere que el proceso de recombinación homóloga tuvo lugar, aunque no de la manera esperada (ver más adelante). En este Capítulo, a modo aclaratorio, se referirá al genotipo de la amplificación en larvas de la cf-p10b como el **clon AgMNPV-2D recuperado**.

Como se puede observar en la figura 14.1, excepto por la ausencia de la banda submolar de aproximadamente 14 kb, el patrón del **clon AgMNPV-2D recuperado** (cf-p10b amplificado por larvas, calle 4) se corresponde con el del **AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular** (calle 1). Este patrón de restricción, equivalente al publicado, indicaría que se trata de la población viral homogénea del clon AgMNPV-2D. De acuerdo a lo esperado, en la calle 4 (**clon AgMNPV-2D recuperado**) no se observa la banda característica de 6.5 kb del genotipo recombinante aberrante predominante en cultivo celular (calle 6), lo cual confirmaría que esta especie aberrante es inviable en larvas.

Sin embargo, era posible que este resultado se debiera a una infección latente de AgMNPV-2D en los *stocks* de células. Esto no era muy plausible, ya que nuestro *stock* de AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular se trataba de una población viral heterogénea, y el patrón de restricción de la amplificación por larvas de la cf-p10b (clon AgMNPV-2D recuperado), correspondía al del clon que nunca tuvimos en forma de población homogénea. Pero para descartar esta posibilidad, se procesaron muestras del control negativo de la cotransfección correspondiente y de los *stocks* de cultivo celular (donde se habían realizado las amplificaciones y re-amplificaciones de la cf-p10b), de acuerdo a la metodología desarrollada en el Capítulo 5 de Resultados y Discusión. Las PCRs confirmaron que el control negativo de la cf-p10b y los *stocks* actuales de células, se encontraban libres de infecciones latentes con AgMNPV-2D, al menos detectables por este método (resultado no mostrado).

Analizando el diseño del vector de transferencia, se vio que si ocurría recombinación homóloga entre las secuencias DW y del promotor de poliedrina (P_{polh}) que dirigía la expresión de su propio gen en el vector, con las secuencias homólogas en AgMNPV-I*Ppo*I, el resultado sería el clon AgMNPV-2D (ver figura 14.3). Es altamente probable que haya sido esto lo que sucedió.



Figura 14.3. Generación del clon AgMNPV-2D recuperado a partir de la cotransfección con AgMNPV-I*Ppol* y pIERUPOD- P_{p10} . La figura muestra cómo se podría producir el clon AgMNPV-2D recuperado a partir de una recombinación homóloga entre las secuencias DW y del P_{polh} del vector, con las secuencias homólogas en AgMNPV-I*Ppo*I.

DISCUSIÓN

Heterogeneidad de la población viral del *stock* de AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular

Debido a la condición de baja infectividad del **AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular**, ninguna de las larvas de *A. gemmatalis* infectadas con este virus presentaron los típicos síntomas de infección por NPV, tales como licuefacción de las larvas y presencia de abundantes poliedros en células infectadas y hemolinfa. Inicialmente se consideró que esta baja infectividad se podía deber a los sucesivos pasajes seriados por cultivo celular, ya que este fenómeno se ha observado en varios baculovirus (MacKinnon *et al.*, 1974; Hink y Strauss, 1976; Potter *et al.*, 1976; Fraser y Hink; 1982; Slavicek *et al.*, 1992).

Sin embargo, luego de realizar los ensayos correspondientes, se vio que la baja infectividad se debía a que se trataba de una población viral heterogénea en la que el genotipo predominante era muy poco infectivo para larvas de *A. gemmatalis*. Esto fue confirmado por las diferencias que se observaron en los patrones de restricción de los DNAs de AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular y por larvas. Es altamente probable que el patrón de restricción del **AgMNPV-2D amplificado por larvas**, corresponda a una de las sub-poblaciones virales del **AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular**, que predominó en larvas debido a su mayor infectividad para las mismas.

Selección de AgMNPV recombinantes en larvas: Recuperación del clon AgMNPV-2D a partir de la cf-p10b

En cuanto al aislamiento por larvas del recombinante buscado, la infección de larvas con los PIBs purificados de la amplificación de la **cf-p10b**, generó el clon que nunca tuvimos como población viral homogénea de AgMNPV-2D (**clon AgMNPV-2D recuperado**). No se puede descartar que el recombinante deseado se haya encontrado en cantidades indetectables por el método utilizado. Sin embargo, el factor común de los ensayos realizados, es que es extremadamente fuerte la presión selectiva negativa sobre la especie recombinante AgMNPV-pIERUPOD. Esto incluye los múltiples resultados obtenidos en cultivo celular y en larvas.

En cuanto a estos últimos, los eventos de recombinación que generaron el **clon AgMNPV-2D recuperado**, eran mucho menos probables que los que hubieran producido el recombinante deseado (AgMNPV-pIERUPOD). En el primer caso (clon AgMNPV-2D recuperado), para que se produzca esta especie, ocurrió recombinación homóloga en las zonas DW de 517 pb y en los P_{polh} de 147 pb (virales y del plásmido, en ambos casos). En el segundo caso, para que se produzca AgMNPV-pIERUPOD, habría ocurrido recombinación homóloga en las zonas DW de 517 pb y las zonas UP de 641 pb (virales y del plásmido, en ambos casos). En teoría, los eventos de recombinación del segundo caso serían mucho más probables que los del primer caso, ya que son mayores las regiones donde puede ocurrir recombinación homóloga (517 y 641 pb contra 517 y 147 pb). Es por esto que se esperaría que el evento de recombinación entre las zonas DW y UP del virus y vector de transferencia (que generaría el AgMNPV-pIERUPOD) fuera predominante.

Se rediseñó el plásmido de transferencia, intercambiando los promotores de *p10* y de poliedrina, a fin de que la poliedrina quede bajo el control de P_{p10} y *E1* bajo el control de P_{polh} (pIERUPOD- P_{polh} - P_{p10} , ver figura 14.4). De esta manera se eliminarían los eventos de recombinación que generan el clon AgMNPV-2D recuperado. Sin embargo, aún no se finalizó con la construcción de esta nueva versión del plásmido.



Figura 14.4. Construcción de pIERUPOD-P*polh***-P***p10*. En la figura se indica el intercambio de los promotores de poliedrina y de *p10*, de manera tal que el gen de poliedrina quede bajo el control de P_{p10} y el de *E1* bajo el control de P_{polh} .

De esta manera, no se descarta la posibilidad de lograr AgMNPVs recombinantes en futuros experimentos, diseñando los vectores de transferencia en base al conocimiento de la secuencia nucleotídica del genoma viral completo y eliminando todas las secuencias cortas con cierta homología, para evitar que ocurran reorganizaciones del DNA por recombinación homóloga inter e intramolecular.

Sin embargo, debido a la gran cantidad de cambios que se realizaron para obtener el recombinante AgMNPV-pIERUPOD (y sus variantes) con resultados infructuosos, es posible que haya algún otro factor o factores que está/n presionando selectivamente de manera

negativa sobre estas especies recombinantes y que no permite/n su establecimiento y/o aislamiento.

Por otra parte, el **clon AgMNPV-2D recuperado** deberá ser utilizado como referencia en los diferentes experimentos replanteados, incluyendo las co-infecciones con LdMNPV y las infecciones con los AgMNPVs recombinantes que se obtengan.



SECCIÓN III RESUMEN DE RESULTADOS, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Elección de una secuencia de restricción única y construcción del vector de transferencia de primera generación (pAg-I*PpoI*)

La linealización del DNA viral en el sitio blanco antes de la cotransfección con el plásmido de transferencia, disminuye drásticamente la proporción de virus parental y de simples recombinantes en la progenie viral (Kitts *et al.*, 1990). Uno de los métodos más utilizados, consiste en la introducción de sitios de restricción únicos en la región de interés del genoma viral. El DNA viral recombinante puede entonces ser linealizado por digestión con la enzima correspondiente. La presencia de múltiples sitios únicos de restricción incrementa la eficiencia de producción de recombinantes (Kitts y Possee, 1993; Martens *et al.*, 1995; Yang y Miller, 1998), probablemente porque se logra una linealización más completa del DNA viral.

Con el objetivo de generar un recombinante de AgMNPV-2D con sitios únicos de restricción, se procedió a la elección de una secuencia de restricción que no se encontrara en la secuencia salvaje del virus. Dado que aún no se ha publicado la secuencia de AgMNPV-2D, esto se debió hacer de manera empírica. Para esto se realizaron ensayos de restricción con DNA de AgMNPV-2D, utilizando endonucleasas de corte poco frecuente. Estas digestiones se marcaron radiactivamente utilizando el fragmento Klenow y α [³²P]dATP. Los ensayos permitieron identificar la ausencia de corte de I-*Ppo*I, una endonucleasa de restricción codificada por un intrón, cuyo sitio de reconocimiento abarca 15 pb. El siguiente paso fue la introducción secuencial de dos sitios de corte de I-*Ppo*I en pAgPHZ3 (Arana *et al.*, 2002), para generar el plásmido de transferencia de primera generación, pAg-I*Ppo*I.

Optimización de la eficiencia de corte de I-Ppol

En este trabajo se vio que las sustituciones múltiples en las secuencias flanqueantes al sitio de restricción de I-PpoI (secuencia contexto), pueden disminuir significativamente la eficiencia de corte de I-*Ppo*I. Sin embargo, también se encontró que un simple cambio en las condiciones de reacción permite superar esta limitación. Durante el análisis comparativo de la actividad catalítica de I-*Ppo*I sobre el sitio blanco en secuencias contexto favorables y desfavorables, se encontró que I-*Ppo*I siempre digería más eficientemente en una condición de pH más neutra (pH 7.5) que la recomendada como óptima (pH 10).

Aislamiento y caracterización de un simple recombinante con sitios únicos de restricción (SR-I*Ppo*I). Evaluación de su estabilidad y eficiencia en la generación de recombinantes.

En la primer etapa del aislamiento del recombinante con sitios únicos de restricción se aisló un simple recombinante (SR-I*PpoI*). Se analizó su estabilidad genética a través de pasajes seriados por cultivo celular. Después de diez pasajes, se vio que SR-I*PpoI* persistía y que alcanzaba un equilibrio con el doble recombinante (DR-I*PpoI*). Sorprendentemente, no se detectó la presencia de la cepa parental en ninguno de los pasajes de SR-I*PpoI*. La ventaja selectiva que presentaron los recombinantes SR-I*PpoI* y DR-I*PpoI* frente a la cepa parental (AgMNPV-2D) en cultivo celular, podría deberse a las similitudes que ambos tenían con el fenotipo mutante de pocos poliedros por célula (FP). SR-I*PpoI* exhibió una estabilidad inusual para un simple recombinante. Su genoma fue digerido eficientemente con I-*PpoI* en las nuevas condiciones experimentales y su linealización permitió generar recombinantes con una elevada frecuencia. En diferentes ensayos se observaron aumentos significativos de 10 y 50 veces de la cotransfección en la que se usó DNA viral lineal, con respecto a aquella en la que se usó DNA viral circular.

Desarrollo de un método para la detección de baculovirus en cultivo celular

Se adaptó un método fácilmente reproducible para una extracción rápida de DNA de baculovirus, a partir de sobrenadantes de cultivos celulares, para su análisis por PCR. Este método también se puso a punto para extraer DNA directamente de placas de lisis, simplificando la tarea de selección de recombinantes. El método desarrollado puede ser aplicado a diferentes situaciones experimentales, incluyendo muestras de campo.

Aislamiento y caracterización de dos clones dobles recombinantes con sitios únicos de restricción (AgMNPV-I*Ppo*I)

La metodología descripta para el análisis por PCR de las placas obtenidas de los reaislamientos, acortó significativamente los tiempos de búsqueda del doble recombinante con sitios únicos de restricción. El resultado fue el aislamiento de dos clones dobles recombinantes AgMNPV-I*Ppo*I, completándose de esta manera uno de los objetivos de esta tesis: la generación de un genoma derivado de AgMNPV-2D con sitios únicos de restricción que pudiera ser linealizado y usado como parental en los siguientes experimentos de producción de recombinantes.

Construcción del vector de transferencia de segunda generación (pIERUPOD)

En la construcción del vector de transferencia de segunda generación (pIERUPOD), se utilizaron genes heterólogos que fueran lo más inofensivos posible para el medio, no sólo en cuanto a su acción sobre posibles organismos no blanco, sino también en caso de una eventual transferencia lateral de material genético. Las secuencias foráneas elegidas fueron las del gen *enhancin* 1 de LdMNPV, que tiene la capacidad de incrementar la potencia viral y es el primer *enhancin* identificado en un NPV; las del gen *DsRed1* de *Discosoma*, como indicador fluorescente excitado con luz de longitud de onda de 558 nm; las del sitio interno de entrada del ribosoma (*internal ribosome entry site* o IRES) del virus de la encéfalo miocarditis (ECMV) y las señales de poliadenilación de SV40. El IRES de ECMV permite la traducción de dos ORFs consecutivos a partir del mismo RNA mensajero (Rees *et al.*, 1996; Jackson *et al.*, 1990; Jang *et al.*, 1990) y las señales de poliadenilación de SV40 dirigen un correcto procesamiento del extremo 3' del mRNA.

La construcción de pIERUPOD tomó mucho más tiempo de lo previsto debido a un problema surgido, aparentemente, a partir de la clonación concatenada de dos copias del promotor de poliedrina en sentido opuesto. En esa etapa de la clonación se tuvieron que buscar estrategias alternativas y, de esta manera, se obtuvieron sólo dos clones: pIERUPOD-47 que presenta 600 pb adicionales de *E1* entre ambos promotores de poliedrina y pIERUPOD-21 que tiene 62 pb faltantes en uno de los promotores.

Generación de recombinantes a partir de los dos clones de plERUPOD

Las cotransfecciones realizadas con AgMNPV-I*Ppo*I y pIERUPOD-47 fueron muy eficientes, ya que todas las especies analizadas resultaron ser clones dobles recombinantes. Sin embargo, todos presentaron las mismas estructuras genómicas aberrantes. En función de estos resultados, se rediseñó el vector de transferencia evitando la inclusión de secuencias repetidas.

Construcción de una versión alternativa del plásmido de transferencia de segunda generación (plERUPOD- P_{p10}).

Se construyó una versión alternativa del vector de transferencia original de segunda generación y se lo denominó pIERUPOD- P_{p10} . En éste, el promotor de poliedrina que dirigía la expresión del gen *E1* fue sustituido por el de *p10*, otro promotor muy tardío cuya secuencia fue amplificada a partir de AgMNPV-2D.

Generación de recombinantes a partir de pIERUPOD-P_{p10}.

La única especie recombinante obtenida a partir de las cotransfecciones con AgMNPV-I*Ppol* y pIERUPOD-P_{*p*10}, era exactamente igual a una de las dos especies generadas por las cotransfecciones con AgMNPV-I*Ppol* y pIERUPOD-47 (cf-47d). Este resultado sugería que las especies recombinantes aberrantes que se obtuvieron en las cotransfecciones con pIERUPOD-47, no eran consecuencia ni de la duplicación de las secuencias del promotor de poliedrina ni de las 600 bases agregadas de *E1* entre ambos P_{*polh*}, ya que pIERUPOD-P_{*p*10} producía exactamente los mismos recombinantes, y en este vector no había secuencias repetidas.

Una de las posibilidades era que el genoma de AgMNPV-I*Ppo*I presentara regiones con alta homología a las secuencias heterólogas que se estaban tratando de introducir, lo cual produciría eventos de recombinación homóloga inesperados. Sin embargo, cuando se alineó la secuencia de la región heteróloga de pIERUPOD- P_{p10} con AgMNPV-2D, los resultados indicaron que no se encontraba homología significativa (B. Ribeiro y J.L. Wolff, comunicación personal).

Descartada esta posibilidad, se consideró factible que la estructura secundaria característica que pueden formar las secuencias IRES interfiriera durante los eventos de recombinación homóloga, generando la escisión del gen *E1*. Para explorar esta posibilidad, se decidió proceder a la eliminación de estas secuencias, construyendo nuevas versiones alternativas de pIERUPOD.

Construcción de otras versiones alternativas del vector de transferencia original a partir de pIERUPOD-P_{p10}: pEUPOD y pRUPOD.

Se construyeron dos versiones alternativas de pIERUPOD- P_{p10} . En una de ellas se eliminaron las secuencias IRES y el gen *DsRed1*, de manera que sólo quedó el gen *E1* con las señales de poliadenilación de SV40 bajo el control del promotor de *p10* (pEUPOD). En la otra se eliminaron las secuencias IRES y el gen *E1*, de manera que sólo quedó el gen *DsRed1* con las señales de poliadenilación de SV40 bajo el control del promotor de *p10* (pEUPOD). En la otra se eliminaron las secuencias IRES y el gen *E1*, de manera que sólo quedó el gen *DsRed1* con las señales de poliadenilación de SV40 bajo el control del promotor de *p10* (pRUPOD).

Generación de recombinantes partir de pEUPOD y pRUPOD.

Los resultados de las cotransfecciones de pEUPOD y de pRUPOD con DNA linealizado de AgMNPV-I*Ppo*I, permitieron comprobar que las secuencias IRES tampoco eran las

responsables de la generación de las especies recombinantes aberrantes. Estando ausentes las secuencias IRES cuestionadas, se volvieron a generar especies inesperadas y aberrantes. Las que se produjeron a partir de la cotransfección con pRUPOD, eran idénticas a las especies producidas a partir de una de las cotransfecciones con pIERUPOD-47 (cf-47d) y de la cotransfección con pIERUPOD- P_{p10} (cf-p10b). Las que se generaron a partir de la cotransfección con pEUPOD eran muy similares a las producidas a partir de la cotransfección con pEUPOD eran muy similares a las producidas a partir de la cotransfección con pEUPOD eran muy similares a las producidas a partir de la cotransfección con pEUPOD eran muy similares a las producidas a partir de la cotransfección cf-47c.

Análisis comparativo de los recombinantes obtenidos con las diferentes versiones de plásmidos de transferencia (plERUPOD-21, plERUPOD-47, plERUPOD-p10, pEUPOD y pRUPOD).

Para intentar comprender el patrón de fragmentos observado en los ensayos de restricción realizados sobre las diferentes especies recombinantes obtenidas a lo largo de este trabajo de tesis, se hizo un análisis de *Southern blot* utilizando diversas sondas.

El análisis detallado de los resultados de las PCRs, análisis de restricción y *Southern blots* realizados sobre todas las especies recombinantes, permitieron clasificarlas en dos grupos en base a las similitudes observadas. En el *grupo I* (que incluye las especies recombinantes producidas a partir de cf-47c y cf-pEa) se dedujo que hubo inserciones y/o duplicaciones. En el *grupo II* (que incluye las especies recombinantes producidas a partir de cf-47c y cf-pEa) se dedujo que hubo inserciones y/o duplicaciones. En el *grupo II* (que incluye las especies recombinantes producidas a partir de cf-47d, cf-p10b y cf-pRa) se dedujo que hubo deleciones.

Estos resultados, como los datos aportados por Wu *et al.* (1999), sugieren que el mecanismo de replicación del DNA de los baculovirus podría ser promiscuo en cuanto a la elección de molde y/o a la elección del *partner* de recombinación. Estos datos deben tomarse en cuenta al evaluar la seguridad en el uso de baculovirus modificados genéticamente como biopesticidas o como vectores en terapia génica.

Estrategias alternativas para mejorar la infectividad de AgMNPV-2D.

Selección de AgMNPV recombinantes en larvas

Frente a la dificultad de aislar el recombinante buscado por cultivo celular, se ensayó hacerlo en larvas de *A. gemmatalis*. Se infectaron larvas *per os* con cuerpos de inclusión aislados a partir del sobrenadante de una de las cotransfecciones con pIERUPOD-p10 (cf-p10b). En teoría, las únicas especies que podían producir cuerpos de inclusión eran los simples y doble recombinantes. Como las especies recombinantes virales extrañas que se estaban aislando a partir de cultivo celular eran incapaces de producir cuerpos de inclusión,

serían inviables en larvas, ya que este sistema estaría ejerciendo una presión de selección positiva que favorecería a las especies capaces de producir PIBs. Sin embargo, en este estudio solamente se logró aislar un genotipo que resultó indistinguible del clon salvaje AgMNPV-2D, tanto a nivel de su patrón de restricción como de su virulencia. Este resultado sugiere que el proceso de recombinación homóloga tuvo lugar a nivel de los promotores de poliedrina.

El stock AgMNPV-2D

Se observó que la infectividad en larvas de nuestro *stock* de AgMNPV-2D amplificado por cultivo celular, era inferior al informado en la bibliografía. Con el fin de recuperar el genotipo AgMNPV-2D infectivo, se alimentaron larvas de *A. gemmatalis* con dieta contaminada con el *stock* de AgMNPV-2D. El análisis de la progenie de estas infecciones indicó que el *stock* de AgMNPV-2D era una población viral heterogénea en lugar de un clon. A la luz de los resultados comentados en el párrafo anterior, será conveniente utilizar el AgMNPV-2D recuperado, con genotipo definido, como referencia para los estudios que se proyectan.

Perspectivas

No se descarta la posibilidad de lograr AgMNPVs recombinantes en futuros experimentos, diseñando los vectores de transferencia en base al conocimiento de la secuencia nucleotídica del genoma viral completo y eliminando todas las secuencias cortas con cierta homología para evitar que ocurran reorganizaciones del DNA por recombinación homóloga inter e intramolecular.

Por otra parte, el clon AgMNPV-2D recuperado con patrón de restricción definido, deberá ser utilizado como referencia en los diferentes experimentos replanteados, incluyendo las co-infecciones con LdMNPV y las infecciones con los AgMNPVs recombinantes que se obtengan.

Sin embargo, como ya se ha mencionado, los resultados presentados aquí sugieren una importante promiscuidad en el mecanismo de replicación del DNA de los baculovirus en cuanto a la elección de molde y/o a la elección del compañero de recombinación. Este factor debe tomarse en cuenta en relación a la bioseguridad en el uso de baculovirus modificados genéticamente como biopesticidas.

Por otro lado, se deben considerar las potenciales consecuencias ecológicas de la liberación de baculovirus modificados genéticamente. En general, las modificaciones resultan en una transmisibilidad reducida del virus introducido en relación al salvaje. Debido a esta transmisibilidad reducida, podría esperarse que la liberación de baculovirus modificados

tenga poco impacto ecológico en poblaciones naturales de insectos, ya que las cepas salvajes rápidamente dominarían sobre las modificadas.

Sin embargo, este no es necesariamente el caso. Dushoff y Dwyer (2001) propusieron un modelo matemático que muestra que el resultado más probable de la competencia entre cepas modificadas genéticamente y salvajes, es que alguna de ellas se extinguirá. Específicamente, las cepas modificadas que matan más rápidamente sólo se extinguirán si su transmisibilidad es suficientemente más reducida que la de la cepa salvaje. El modelo mostró que las interacciones competitivas entre cepas nativas e introducidas, puede tener importantes implicancias en el uso de agentes de control microbianos. Sobre todo, el modelo muestra que el estado actual de conocimiento probablemente es insuficiente para predecir el resultado de la competencia entre diferentes cepas.

En resumen, la utilización de los baculovirus modificados genéticamente como bioinsecticidas debe ser considerada con mucha cautela, no sólo buscando reducir al máximo las consecuencias de la aparente promiscuidad que presentan a nivel replicativo y recombinogénico, sino también en cuanto a su posible persistencia en el ambiente.

Sin embargo, a pesar de lo antes expuesto, es importante tener en cuenta que en el uso irracional de pesticidas químicos (organoclorados, organofosforados, carbamatos), se deben considerar múltiples aspectos cuyos efectos nocivos no son posibles amenazas (como en el caso de los baculovirus modificados genéticamente), sino que han sido ampliamente registrados y establecidos. Entre otros, se encuentra el desarrollo de resistencia por parte de las plagas, que implica la utilización de dosis cada vez mayores. El amplio espectro de muchos de ellos; que no sólo diezma las poblaciones de enemigos naturales existentes, importantes para un correcto equilibrio de las poblaciones de insectos, sino que también puede afectar a los mamíferos. Su persistencia en el ambiente, que lleva a una contaminación prolongada y a su acumulación gradual en animales de los estratos superiores de las cadenas tróficas.

Éstos son algunos de los peligros con los que nos enfrentamos diariamente, especialmente en países en desarrollo como el nuestro, entre otros, debido a la falta de recursos económicos. Por esto, es importante continuar con la búsqueda de estrategias alternativas de biocontrol, como lo son los baculovirus modificados genéticamente, que puedan ser incluidas exitosamente en planes de manejo integrado de plagas.

SECCIÓN IV MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Reactivos comerciales

Productos químicos, enzimas, medios de cultivo de bacterias y 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 Invitrogen (EE.UU.). Todos estos reactivos y enzimas poseían grado de Biología Molecular.

Los componentes de los medios de cultivo para bacterias se adquirieron en Difco (Detroit, EE.UU.). Las cajas de Petri fueron provistos por Nunc (Nunc, Roskilde, Dinamarca) y Corning (EE.UU.).

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), 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 KH₂PO₄ (0,17 M) y K₂HPO₄ (0,72 M).

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

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-HCI 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM.

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

RNAsa libre de DNAsa: 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 1000 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-HCI, 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%.

Soluciones para la generación de adapters mediante hibridación de oligonucleótidos sintéticos

Buffer annealing (10X): Tris-HCI (pH 7.5) 100 mM; EDTA 1 mM

NaCI: 100 mM final

Hibridaciones de ácidos nucleicos (Southern blot)

Soluciones para transferencia de ácidos nucleicos a membrana

Solución de depurinación: HCI 0.2 N.

Solución 1 de desnaturalización: NaOH 0.4 M; NaCl 3 M. Para un litro se pesaron 16 g de NaOH y 175 g de NaCl.

Solución 2 de desnaturalización: NaOH 8 mM; NaCl 3 M. Para un litro se pesaron 0.32 g de NaOH y 175 g de NaCl.

Solución de neutralización: NaH₂PO₄ 0.2 M; Na₂HPO₄ 0.2 M. Para un litro se pesaron 24 g de NaH₂PO₄ y 71.63 g de Na₂HPO₄.

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

Buffer de hibridación: el fabricante sólo especifica que contiene 12% p/v urea. Se agrega NaCl a concentración final de 0.5 M y reactivo de bloqueo (también provisto por el fabricante) a una concentración final de 4% p/v.

Buffer de lavado primario: [Urea 2 M; SDS 0.1%; fosfato de sodio 50 mM (pH 7); 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.

Soluciones de deshibridación para Southern

Solución 1: NaOH 0.2 M; SDS 0,1% p/v.

Solución 2: SSC 2X

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.

Buffers utilizados en reacciones enzimáticas

Buffer de ligación 10 X: Tris-HCl 660 mM (pH 7.6), MgCl₂ 66 mM, ditiotreitol 100 mM, ATP 660 μM.

Buffer de Klenow 10 X: Tris-HCl 500 mM (pH 7.2), MgCl₂ 100 mM, ditiotreitol 1 mM.

Buffer E 1X: Tris-HCl 6 mM, MgCl₂ 6 mM, NaCl 100 mM, ditiotreitol 1 mM (pH 7.5).

Buffer NEB II 1X: Tris-HCI 10 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM, ditiotreitol 1 mM (pH 7.9).

Buffer NEB III 1X: Tris-HCI 50 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCI 100 mM, ditiotreitol 1 mM (pH 7.9).

Buffer NEB IV 1X: Tris-acetato 20 mM, acetato de Mg 10 mM, acetato de K 50 mM, ditiotreitol 1 mM (pH 7.9).

Buffer de Taq polimerasa, 10 X: Tris-HCl 100 mM (pH 9), 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, NH₄ 2(SO₄) 100 mM; MgSO₄ 20 mM, BSA 1 mg/ml; Tritón X-100 1%.

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

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)

Buffer de corrida 1 X: Tris base 25 mM, glicina 250 mM (pH 8.3), SDS 0.1%.

El gel de poliacrilamida se preparó de acuerdo con las cantidades indicadas en la tabla III.1.

 Tabla III.1. Reactivos necesarios para preparar geles de SDS-PAGE 12%.

Soluciones	Gel separador (<i>running</i>) 12%	Gel concentrador (s <i>tacking</i>) 5%
Agua bidestilada	3.3 ml	6.8 ml
Tris-HCI 1.5 M	2.5 ml (pH 8.8)	1.25 (pH 6.8)
SDS 10%	100 μl	100 μl
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0.8)%	4 ml	1.7 ml
Persulfato de amonio (PSA)	100 μl	50 μl
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilen- diamina)	4 µl	5 μl
Volumen final	10 ml	10 ml

Métodos

Técnicas que involucran DNA

Bacterias y vectores empleados

Para los clones generados en el vector pZErO-2[™] (Invitrogen) se empleó la cepa *E. coli* TOP 10 (Invitrogen, CA). Los clones generados en plásmidos pBluescript (Stratagene) y pIRES (Clontech) fueron propagados en bacterias *E. coli* DH-5α y JM109.

Preparación de DNA plasmídico

La purificación de DNA plasmídico se efectuó por el método de lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979).

Método de lisis alcalina

Se crecieron bacterias E. coli (DH-5a o TOP10) en medio LB o TB hasta saturación con el antibiótico correspondiente. Se centrifugó 1 ml de estos cultivos a 14000-18000 x g durante 1 min en un tubo Eppendorf y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces sobre el mismo Eppendorf. Se añadieron 100 µl de Solución I al sedimento obtenido y se lo resuspendió con vortex. Se centrifugó nuevamente a 14000-18000 x g durante 1 min y se retiró el sobrenadante. El sedimento lavado de esta manera se resuspendió en 200 µl de Solución I, se agregó 150 ml de Solución II (preparada en el momento). 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 min 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 μ g/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 isoporopanol.

Extracción fenólica

Este método se empleó para separar proteínas de soluciones de ácidos nucleicos de preparaciones de viriones de AgMNPV tratados con proteinasa K. 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 por inversión durante 10 min y se centrifugó durante 5 min a 14-18000 x g y se tomó la fase acuosa tratando de no extraer material de la interfase. El procedimiento se repitió con cloroformo-isoamílico (24:1).

Precipitación de ácidos nucleicos

Los DNAs 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 toda la noche y centrifugadas a 14.000 x g y 4°C durante 30 minutos. Las sales fueron lavadas con solución de etanol 70%, preparado con agua bidestilada estéril. El sedimento se secó a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en agua bidestilada estéril.

Digestión de DNAs con enzimas de restricción

Los DNAs plasmídico o de AgMNPV, previamente purificados, se digirieron con una o varias enzimas de restricción por tiempos variables de acuerdo al experimento (30 min a toda la noche).

Ensayos con I-Ppol

La enzima I-*Ppo*I (Promega) se provee a una concentración de 180 unidades/ μ I (U/ μ I). Se ensayó la capacidad de I-PpoI de digerir 300 ng de DNA de pAg-I*Ppo*I a diferentes pHs y fuerzas iónicas a 37°C, durante 3 h, usando 18 unidades de enzima (U) en un volumen final de 10 μ I (ver tabla 2, Capítulo 3, Resultados y Discusión). La enzima funcionó óptimamente en *buffer* E con una composición 1X de 6mM Tris-HCI, 6mM MgCI₂, 100mM NaCI, 1mM DTT, pH 7.5.

Los ensayos en los que se utilizó a pAg-I*Ppo*I y pZ-I*Ppo*I como sustratos, se realizaron en las siguientes condiciones experimentales (ver figura 3, Capítulo 3, Resultados y Discusión):

 Diferentes condiciones de *buffer*. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo utilizando 300 ng de cada uno de los plásmidos incubados con 18 U a 37°C en los *buffers* E (6mM Tris-HCl, 6mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM DTT, pH 7.5) e I (25 mM CAPS-CHES pH 10, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT) en un volumen final de 10 μl, por diferentes períodos de tiempo (30min, 2 h, 5 h y 20 h).

- 2) Diferentes tiempos de incubación: Las reacciones de digestión se llevaron a cabo utilizando 300 ng de cada uno de los plásmidos incubados con 18 U por diferentes períodos de tiempo (30min, 2 h, 5 h y 20 h) a 37°C en los *buffers* E (6mM Tris-HCl, 6mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM DTT, pH 7.5) e I (25 mM CAPS-CHES pH 10, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT) en un volumen final de 10 μl.
- 3) Diferentes concentraciones de enzima: Las reacciones de digestión se llevaron a cabo utilizando 300 ng de cada uno de los plásmidos incubados durante 20 h a 37°C en *buffer* E (6mM Tris-HCl, 6mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM DTT, pH 7.5), con diferentes concentraciones de enzima (1, 3, 9 y 18 U) en un volumen final de 10 μl.
- 4) Diferentes concentraciones de DNA: Las reacciones de digestión se llevaron a cabo utilizando diferentes concentraciones de DNA de cada uno de los plásmidos (300 ng, 1 μg y 3 μg), incubados durante 20 h con 18 U a 37°C en *buffer* E (6mM Tris-HCl, 6mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM DTT, pH 7.5), en un volumen final de 10 μl.

Generación de adapters mediante la hibridación de oligonucleótidos sintéticos

Se agregó una concentración final de 24 μ M de cada oligonucleótido, buffer de *annealing* 1X final, NaCl 100 mM final y agua bidestilada necesaria para alcanzar un volumen final de 75 μ l. Esta mezcla se hirvió durante 3 min en baño de agua y se enfrió lentamente hasta alcanzar los 17°C (Sambrook *et al.*, 1989).

Incorporación de nucleótidos a 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. Éstos pueden o no estar marcados, radiactivamente ([α ³²P] dATP) o 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 radiactiva se emplearon las siguientes condiciones: 100 ng de DNA molde; dNTPs sin dATP (50 μ M de cada uno); 0,2 U del fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa; 0,2 μ Ci de [α ³²P] 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.

En las reacciones en las que solamente se hizo *fill-in* se emplearon las siguientes condiciones: 1 μg de DNA molde; dNTPs (2,5 mM de cada uno); 10 unidades (U) del fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa en *buffer* Klenow 1X. La mezcla se homogeneizó y se incubó a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa se inactivó por extracción con fenol-cloroformo-isoamílico y el DNA se precipitó con 0,2 volúmenes de ClLi 4 M y 3 volúmenes de etanol 96%.

Marcación de oligonucleótidos sintéticos por fosforilación con la polinucleótido quinasa del bacteriófago T4

Esta técnica se basa en la marcación de oligonucleótidos de ssDNA por acción de la polinucleótido quinasa del fago T4 (T4 PNK) utilizando [α ³²P] dATP (Sambrook *et al.,* 1989).

En las reacciones se emplearon las siguientes condiciones: 10 pmoles/µl de oligonucleótidos, 15 U de la T4 PNK y 0,2 µCi de [α ³²P] dATP en en el *buffer* de T4 PNK. La mezcla se homogeneizó por agitación y se incubó a 37°C durante 45 min.

Material Radiactivo: Síntesis de [α ³²P] dATP

Los nucleótidos radiactivos empleados en las reacciones de marcación de ácidos nucleicos y del [α ³²P] dATP, fueron sintetizados a partir del precursor [γ ³²P] 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 [α ³²P] dATP sintetizado fue cuantificada 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 enfrió, pero aún se encontraba en estado líquido, se colocó un volumen conveniente sobre un molde acrílico con un peine para generar calles de siembra de muestra. Una vez gelificada la agarosa, el gel se colocó en una cuba de electroforesis y se lo cubrió con *buffer* TAE. Las muestras de DNA se mezclaron con *buffer* de muestra en una relación *buffer*/muestra 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. 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 ³²P, 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-Omat[™] 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 AgMNPV y de las digestiones de plásmidos o como productos de amplificación, se calcularon por comparación con patrones de peso molecular (Tabla III.2).
λ <i>Hin</i> dIII	λ/Kpnl	λ /Xhol	pcDNA II <i>Hin</i> dIII + <i>Hinf</i> i	1 kb <i>ladder</i> (GIBCO BRL)	1 kb <i>ladder</i> (Promega)	100 pb <i>ladder</i> (Productos Bio- Lógicos)
23130	29942	33498	1129	12216	10000	1000
9416	17057	15004	517	11198	8000	900
6557	1503		453	10180	6000	800
4361			396	9162	5000	700
2322			236	8144	4000	600
2027			120	7126	3000ª	500
564			75	6108	2500	300
125			65	5090	2000	200
			20	4072	1500	100
				3054	1000	80
				2036	750	
				1636	500	
				1018	250	
				517		
				506		
				396		
				344		
				298		
				220		
				201		
				154		
				134		
				75		

Tabla III.2. Patrones de peso molecular (en pb). Se muestran en esta tabla los pesos de los fragmentos de los marcadores de peso molecular.

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

Southern blot

Sonda a partir de U-H

La sonda del oligonucleótido U-H se preparó a partir del stock 1 mM. Una dilución adecuada fue sometida al protocolo descripto en el apartado correspondiente (Marcación de oligonucleótidos sintéticos por fosforilación con la T4 PNK). El producto de esta reacción fue precipitado con acetato de sodio y etanol, y el protocolo se encuentra especificado en el apartado correspondiente (Purificación de oligonucleótidos marcados radiactivamente por precipitación con etanol).

Sondas de diferentes fragmentos de DNA clonado en plásmidos (DW, UP+*polh*, P_{*polh*}+*polh*, *E*1, *DsRed*1+SV40polyA)

Los fragmentos de interés clonados en diferentes plásmidos fueron amplificados por PCR. Éstos fueron resueltos en geles de agarosa de concentraciones adecuadas e identificados por su peso molecular (PM). Alternativamente, fueron eluidos por filtración a través de lana de vidrio y precipitados con acetato de sodio y etanol, aislados por adsorción a polvo de sílice (Gene Clean, Bio 101, Inc.) o unidos a una matriz fibrosa de sílice (GFX[™], Amersham Pharmacia Biotech).

Purificación de fragmentos de DNA

Purificación de oligonucleótidos marcados radiactivamente por precipitación con etanol

Luego de la inactivación por calor de T4 PNK (10 min a 68°C), a los 20 µl de reacción se les agregó 40 µl de agua bidestilada y 2 µl de poliacrilamida lineal (PAL; 2.5 µg/µl) y se homogeneizó por agitación. Posteriormente se agregaron 240 µl de acetato de amonio 5 M y se homogeneizó la mezcla. Luego se agregaron 750 µl de etanol frío. Esta mezcla se mantuvo a – 20°C durante 30 min y luego se centrífugo a 14-18000 X g y 4°C durante 20 min. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se lavó el *pellet* resultante con etanol 80%. Se secó a TA y resuspendió en TE pH 7.6 (Sambrook *et al.,* 1989).

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 o de productos de amplificación, 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 Nal saturado durante 5 min a 60°C. Posteriormente, se agregaron 5 μ l de polvo de sílice y la resuspensión se incubó con agitación constante durante 5 min. La solución fue centrifugada durantes 10 segundos a 14-18.000 X g, el sobrenadante se descartó y el sedimento fue lavado 3 veces con 700 μ l de solución New Wash (NaCl, etanol y agua). Este sedimento fue secado durante 5 min a 60°C. Luego fue resuspendido en 10 μ l de agua bidestilada y se centrifugó 30 seg a 14-18.000 X g y el sobrenadante conteniendo el DNA de interés se transfirió a otro tubo que fue conservado a -20 °C hasta su uso.

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

El fragmento identificado por su PM, fue eluído por filtración a través de lana de vidrio. La lana de vidrio se colocó en un tubo *Eppendorf* de 500 μ l al cual se le había perforado el fondo. Este *Eppendorf* se colocó dentro de otro *Eppendorf* de 1.500 μ l. El taco de agarosa se colocó sobre la lana de vidrio del *Eppendorf* más pequeño. Se centrifugó a 14000 x g durante 1 min. Al filtrado se le agregaron 0.2 vol de CILi y 3 vol de etanol. La muestra se homogeneizó por agitación y se colocó durante 30 min a –80°C. Luego se centrifugó durante 30 min a 14-18000 X g y 4°C. Se lavó con etanol al 70%. El *pellet* se secó a 60°C durante 5 min y resuspendió en agua bidestilada.

Purificación de fragmentos de DNA por unión de DNA a una matriz fibrosa de sílice (kit GFX[™], Amersham Pharmacia Biotech)

Los fragmentos de DNA se purificaron a partir de geles de agarosa, productos de amplificación o digestiones, por unión a una matriz fibrosa de sílice. En caso de tratarse de un gel de agarosa, la banda correspondiente al fragmento de DNA a purificar se extrajo del gel, se pesó y, por cada 10 mg de peso del taco de agarosa, se agegaron 10 µl *buffer* de captura y se incubó a 60°C hasta que la agarosa se disolvió completamente (5 a 15 min). Posteriormente, este volumen se transfirió a una columna provista por el fabricante y se centrifugó a 14-18000 X g durante 30 seg. Se descartó el líquido y se lavó la columna (con el DNA adherido) con 500 µl de *buffer* de lavado. Luego se agregaron 50 µl de agua bidestilada (*buffer* de elución) a la columna, se dejó 1 min a TA y se centrifugó a 14-18000 X g durante 1 min. La solución eluida contenía el DNA. En caso de tratarse de una solución de DNA, la única diferencia radicaba en el paso inicial. Se agregaban 500 µl *buffer* de captura a la columna y allí se colocaba la solución de DNA y se homogeneizaba la mezcla. El resto del procedimiento era igual.

Adsorción de ácidos nucleicos a membranas de nylon

El DNA de AgMNPV-2D, AgMNPV-I*Ppo*I, las diferentes versiones recombinantes generadas a partir de este último y las versiones originales y alternativas del plásmido de transferencia de segunda generación, digerido con las enzimas de restricción correspondientes, fue resuelto por electroforesis en geles de agarosa 0,6% a voltaje constante no mayor a 3 V/cm, teñido con bromuro de etidio (Br-Et) y fotografiado con un aparato de documentación de geles Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak Digital Science). Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue sumergido en solución de depurinación (HCI 0.2 M) durante 10 minutos, lavado con agua bidestilada, tratado durante 1 h con la solución 1 de

desnaturalización (NaOH 0.4 M; NaCl 3 M) con agitación, otros 15 minutos con la solución 2 de desnaturalización (NaOH 8 mM; NaCl 3 M) y finalmente 30 min en solución de transferencia (SSC 10 X). El gel fue transferido a una membrana Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech) por capilaridad durante 2 h, usando *buffer* de transferencia (SSC 10 X), según Sambrook *et al.* (1989). Después de la transferencia, las membranas se neutralizaron durante 10 min con *buffer* de neutralización (NaH₂PO₄ 0,2 M; Na₂HPO₄ 0,2 M), se colocaron entre dos adherentes de nylon y los ácidos nucleicos se fijaron por exposición a luz UV (310 nm) durante 15 min. en transiluminador. Luego se colocaron en horno a 60°C durante 15 min.

Hibridaciones con sondas radiactivas

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

La membrana fue incubada 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 μg/ml] durante 2 h. a 65 °C y luego 2 h 42 °C, en tubos de vidrio con rotación suave. Posteriormente, se añadió la sonda previamente calentada a 100 °C durante 5 min. y luego enfriada en hielo. La hibridación se efectuó a 42 °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 sondas quimioluminiscentes

Marcación de sondas DW, UP+*poliedrina* (UP+*polh*), promotor de *poliedrina*+*poliedrina* (P_{*polh*}+*polh*), *DsRed1* y *enhancin1* (*E1*)

Las sondas de las secuencias DW, UP+*polh*, P_{*polh*}+*polh*, *DsRed1* y *E1* se marcaron con el kit AlkPhos DIRECT (Amersham Pharmacia Biotech; Buckinghamshire, England). Para ello se tomaron 10 µl de DNA a 10 ng/µl (100 ng) de las secuencias correspondientes amplificadas por PCR y se los desnaturalizó por calentamiento a 100°C en baño de agua. Inmediatamente después se enfrió la solución en hielo durante 5 min. Luego se añadieron 5 µl de *buffer* de reacción, 1 µl de reactivo de marcación y 5 µl de solución *cross-linker*. La solución se homogeneizó y el tubo se incubó durante 30 min a 37°C.

Hibridación, lavado y revelado con las sondas DW, UP+polh, Ppolh, DsRed1 y E1

Las sondas DW, UP+*polh*, P_{*polh*}+*polh*, *DsRed1* y *E1* se colocaron en la *buffer* de hibridación [NaCl 0.5 M; reactivo de bloqueo 4% (p/v)] y se incubaron toda la noche a 55 o a 60°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); 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. (cada lavado) a TA con solución de lavado secundario (Tris base 50 mM, NaCl 100 mM, 2 mM Mg⁺²). La membrana se secó parcialmente, se añadió el reactivo de detección, se lo incubó 5 min 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 2 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

Las reacciones de amplificación de los ácidos nucleicos se realizaron principalmente en un ciclador térmico *Eppendorf* (Mastercycler Gradient) y algunas veces en un ciclador Idaho (1605 *Air ThermoCycler*; IT Idaho Technology, ID, EE.UU.). En las reacciones en las que se iba a utilizar el producto de amplificación para clonación, se usaba la PLATINUM *Pfx* DNA Polimerasa con actividad *proof-reading* (Promega). En estas reacciones se utilizaba el *buffer* de esta enzima 1 X; 1 mM MgSO₄; 1 mg/ml de BSA (sólo cuando se usaba el ciclador Idaho); 0,25 mM

de cada dNTP; 1 µM de los *primers* correspondientes (Tabla III.3); 0.5 U de la PLATINUM *Pfx* DNA Polimerasa y aproximadamente 0,1 a 0,3 ng de DNA molde (DNA de diferentes plásmidos), en un volumen final de 10 µl. Cuando los productos de amplificación no se iban a utilizar para clonado, se usaba *buffer* de *Taq* Polimerasa 1 X; 2 mM MgCl₂; 1 mg/ml de BSA (sólo cuando se usaba el ciclador Idaho); 0,25 mM de cada dNTP; 1 µM de los *primers* correspondientes (Tabla III.3); 1 U de la enzima *Taq* Polimerasa y aproximadamente 0,1 a 0,3 ng de DNA molde (alternativamente, DNA genómico viral y DNA de diferentes los plásmidos construidos), en un volumen final de 10 µl.

Perfiles de ciclado utilizados en las diferentes etapas de la tesis

Ciclado para amplificar las secuencias UP (ciclador Idaho)

Cebadores (primers) utilizados: Uup-Rsr y Lup-Sfi

Tamaño del fragmento amplificado: 641 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	45 seg.	1
2.	Desnaturalización	94°C	2 seg.	10
	Hibridación	53.8°C	2 seg.	
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	1 min.	
3.	Desnaturalización	94°C	2 seg.	25
	Hibridación	64°C	2 seg.	
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	1 min.	
4.	Extensión final	68°C	1 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias *DsRed1* + SV40 polyA (ciclador Eppendorf) Primers utilizados: Ured-Xma y Lred-Sfi

Tamaño del fragmento amplificado: 898 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	2 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	57.5°C	10 seg.	10
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	1 min.	
3.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	66.8°C	10 seg.	25
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	1 min.	
4.	Extensión final	68°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias UP + *DsRed1*-SV40 polyA (ciclador Eppendorf) Primers utilizados: Ured-Xma y Uup-Rsr

Tamaño del fragmento amplificado: 1539 pb

	Etapa 1 <u>Sin</u> primers	T٥	Tiempo	No. de ciclos	Etapa 2 <u>Con</u> primers	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	2 min.	1	1.	94°C	2 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.		2.	94ºC	10 seg.	
	Hibridación	53.8°C	10 seg.	10		66°C	10 seg.	35
	Extensión	68°C	2 min.			68°C	2 min.	
3.	Extensión final	68°C	2 min.	1	3.	68°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias del promotor *poliedrina* (P_{polh}) (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: Uprom-Nde y Lpr(c)-Sgf

Tamaño del fragmento amplificado: 147 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	2 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	44.5°C	10 seg.	10
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	30 seg.	
3.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	50.8°C	10 seg.	25
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	30 seg.	
4.	Extensión final	68°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias del ORF de *E1* (ciclador Idaho)

Primers utilizados: Uenh-Sgf y Lenh-NheEco

Tamaño del fragmento amplificado: 2363 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	45 seg.	1
2.	Desnaturalización	94°C	2 seg.	
	Hibridación	58.1°C	2 seg.	10
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	2 min.	
			45 seg.	
3.	Desnaturalización	94°C	2 seg.	
	Hibridación	63.6°C	2 seg.	25
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	2 min. 45	
			seg.	
4.	Extensión final	68°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias P_{polh} + *E1* (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: Uprom-Nde y Lenh-NheEco

Tamaño del fragmento amplificado: 2510 pb

	Etapa 1	T⁰	Tiempo	No. de	Etapa 2	T⁰	Tiempo	No. de
	<u>Sin</u> primers			ciclos	<u>Con</u> primers			ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	2 min.	1	1.	94°C	2 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.		2.	94°C	10 seg.	
	Hibridación	50.8°C	10 seg.	10		63.2°C	10 seg.	35
	Extensión	68°C	3 min.			68°C	3 min.	
3.	Extensión final	68°C	2 min.	1	3.	68°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias DW (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: Udw-Spe y Ldw-BgI

Tamaño del fragmento amplificado: 517 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	2 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	56.3°C	10 seg.	10
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	45 seg.	
3.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	59.5°C	10 seg.	25
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	45 seg.	
4.	Extensión final	68°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias promotor de *poliedrina* + ORF *poliedrina* (P_{polh}+polh) (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: Uprom-Nde y Lorf-Spe

Tamaño del fragmento amplificado: 885 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	2 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	55.8°C	10 seg.	10
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	1 min.	
3.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	60.4°C	10 seg.	25
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	1 min.	
4.	Extensión final	68°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias P_{polh} + polh + DW (ciclador Eppendorf) Primers utilizados: Uprom-Nde y Ldw-BgI

Tamaño del fragmento amplificado: 1402 pb

	Etapa 1	T⁰	Tiempo	No. de	Etapa 2	T⁰	Tiempo	No. de
	<u>Sin</u> primers			ciclos	<u>Con</u> primers			ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	2 min.	1	1.	94°C	2 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.		2.	94°C	10 seg.	
	Hibridación	59°C	10 seg.	10		63°C	10 seg.	35
	Extensión	68°C	1 min.			68°C	1 min.	
			45 seg.				45 seg.	
3.	Extensión final	68°C	2 min.	1	3.	68°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias del promotor de p10 (P_{p10}) (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: Upr10-Nde y Lpr10-Sgf

Tamaño del fragmento amplificado: 199 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	2 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	53.4°C	10 seg.	10
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	1 min.	
3.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	59.6°C	10 seg.	25
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	1 min.	
4.	Extensión final	68°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias de P_{p10} (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: Upr10-Nde y Lpr10-orfPH

Tamaño del fragmento amplificado: 199 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	2 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	55.5°C	10 seg.	10
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	30 seg.	
3.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	57.5°C	10 seg.	25
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	30 seg.	
4.	Extensión final	68°C	2 min.	1

pág. 298

Ciclado para amplificar las secuencias de *polh* (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: UorfPH-p10 y Lorf-Spe

Tamaño del fragmento amplificado: 738 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	2 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	58°C	10 seg.	10
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	1 min.	
3.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	60.2°C	10 seg.	25
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	1 min.	
4.	Extensión final	68°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias P_{p10} + polh (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: Upr10-Nde y Lorf-Spe

Tamaño del fragmento amplificado: 937 pb

	Etapa 1 Sin primoro	T⁰	Tiempo	No. de	Etapa 2	T٥	Tiempo	No. de
	<u>Sin</u> primers			CICIOS	<u>con</u> primers			CICIOS
1.	Desnaturalización inicial	94°C	2 min.	1	1.	94°C	2 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.		2.	94°C	10 seg.	
	Hibridación	56°C	10 seg.	10		56°C	10 seg.	35
	Extensión	68°C	1 min.			68°C	1 min.	
			10 seg.				10 seg.	
3.	Extensión final	68°C	2 min.	1	3.	68°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias *DsRed1* + SV40 polyA (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: Ured-IPpol y Lred-IPpol

Tamaño del fragmento amplificado: 898 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	2 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	58°C	10 seg.	10
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	1 min.	
3.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	65.4°C	10 seg.	25
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	1 min.	
4.	Extensión final	68°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias de plERUPOD a partir de plERU + plERUPOD fallido (ciclador Eppendorf)

Primer utilizado: Uprom-Nde

Tamaño del fragmento amplificado: 8452 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	2 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	20 seg.	
	Hibridación	67.6°C	20 seg.	35
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	12 min.	
3.	Extensión final	68°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias de pRUPOD (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: Ured-Xma y Lpr10-Sgf

Tamaño del fragmento amplificado: 5504 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	2 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	64.7°C	10 seg.	35
	Extensión o síntesis de DNA	68°C	6 min.	
3.	Extensión final	68°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias de ambos promotores de *poliedrina*, $P_{\text{polh}}+P_{\text{polh}}$ (ciclador Eppendorf)

Primer utilizado: Lpr(c)-Sgf

Tamaño del fragmento amplificado: 894 pb (en el caso de pIERUPOD-47)

232 pb (en el caso de pIERUPOD-21)

	Etapa	T٥	Tiempo	No. De ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	1 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	46.6°C	10 seg.	35
	Extensión o síntesis de DNA	72°C	1 min.	
3.	Extensión final	72ºC	2 min.	1

Ciclado para amplificar las secuencias de ambos promotores, $P_{p10}+P_{polh}$ (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: Lpr10-Sgf y Lpr(c)-Sgf

Tamaño del fragmento amplificado: 346 pb

	Etapa	T٥	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	1 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	44.5°C	10 seg.	35
	Extensión o síntesis de DNA	72°C	40 seg.	
3.	Extensión final	72ºC	2 min.	1

Ciclado para amplificar el sitio I-*Ppo*I + las secuencias DW del clon 2₄ AgMNPV-I*Ppo*I (virus parental) (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: U-B y phn-Back (también Agphn-Back)

Tamaño del fragmento amplificado: 198 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	1 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	48°C	10 seg.	35
	Extensión o síntesis de DNA	72ºC	30 seg.	
3.	Extensión final	72ºC	2 min.	1

Ciclado para amplificar el sitio I-*Ppo*I + las secuencias DW del clon 8₂ AgMNPV-I*Ppo*I (virus parental) (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: L-B y phn-Back (también Agphn-Back)

Tamaño del fragmento amplificado: 198 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	1 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	48°C	10 seg.	35
	Extensión o síntesis de DNA	72°C	30 seg.	
3.	Extensión final	72°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar secuencias DW + secuencias del plásmido pBS (identifica simples recombinantes UP) (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: T7 y L-B

Tamaño del fragmento amplificado: 911 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	1 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	42°C	10 seg.	35
	Extensión o síntesis de DNA	72°C	1 min	
			10 seg.	
3.	Extensión final	72°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar secuencias UP + secuencias del plásmido pBS (identifica simples recombinantes DW) (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: M13 y U-H

Tamaño del fragmento amplificado: 897 pb

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	1 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	42°C	10 seg.	35
	Extensión o síntesis de DNA	72°C	1 min	
			10 seg.	
3.	Extensión final	72°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar parte de las secuencias UP + parte del ORF de *poliedrina* (virus parental) (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: Uup-orf y Lup-orf

Tamaño del fragmento amplificado: 632 pb

	Etapa	T٥	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	1 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	53.6°C	10 seg.	35
	Extensión o síntesis de DNA	72°C	1 min.	
3.	Extensión final	72°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar $P_{p10} + E1 + SV40$ polyA en el caso de pEUPOD y $P_{p10} + DsRed1 + SV40$ polyA en el caso de pRUPOD (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: Upr10-Nde y Lred-Sfi

Tamaño de los fragmentos amplificados: **2774 pb** ($P_{p10} + E1 + SV40$ polyA)

1097 pb (P_{*p*10} + *DsRed1* + SV40polyA)

	Etapa	T ⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	1 min.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	56°C	10 seg.	35
	Extensión o síntesis de DNA	72°C	3 min.	
3.	Extensión final	72°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar secuencias de P_{polh} (ciclador Idaho)

Primers utilizados: prom-f y prom-i

Tamaño del fragmento amplificado: **150 pb**

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	15 seg.	1
2.	Desnaturalización	94°C	1 seg.	
	Hibridación	56°C	1 seg.	35
	Extensión o síntesis de DNA	72°C	30 seg.	
3.	Extensión final	72°C	2 min.	1

Ciclado para amplificar secuencias de I-*Ppol* + P_{polh} (ciclador Idaho)

Primers utilizados: U-H y prom-i

Tamaño del fragmento amplificado: **179 pb**

	Etapa	T⁰	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	15 seg.	1
2.	Desnaturalización	94°C	1 seg.	
	Hibridación	56°C	1 seg.	35
	Extensión o síntesis de DNA	72°C	30 seg.	
3.	Extensión final	72°C	2 min.	1

pág. 303

Ciclado para amplificar secuencias de I-*Ppol* + P_{polh} (ciclador Idaho) *Primers* utilizados: L-H y prom-i

Tamaño del fragmento amplificado: 179 pb

	Etapa	T٥	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	15 seg.	1
2.	Desnaturalización	94°C	1 seg.	
	Hibridación	56°C	1 seg.	35
	Extensión o síntesis de DNA	72°C	30 seg.	
3.	Extensión final	72ºC	2 min.	1

Ciclado para amplificar secuencias del gen toxina (ciclador Eppendorf)

Primers utilizados: toxF y toxR

Tamaño del fragmento amplificado: 954 pb

	Etapa	T٥	Tiempo	No. de ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94°C	30 seg.	1
2.	Desnaturalización	94°C	10 seg.	
	Hibridación	45°C	10 seg.	35
	Extensión o síntesis de DNA	72°C	1 min.	
3.	Extensión final	72°C	10 seg.	1

	pIERUPOD			pZ-I <i>P</i> pol																pAg-IPpol			Construcción
ORF enhancin1	(P _{polh})	Promotor poliedrina		ORF DsRed1 + SV40polyA	-																	amplifica	Fragmento que
עבףי(כ)-סט ו) Upper (Uenh-Sgf)	Lower	Upper (Uprom-Nde)	Lower (Lred-IPpo)	Upper (Ured-IPpo)	-	(L-Ppol-HD)	Lower	(U-Ppol-HD)	Upper	L-Ppol-B)	(L-B o	Lower	U-Ppol-B)	(U-B o	Upper	L-Ppol-H)	(L-H o	Lower	U-Ppol-H)	(U-H o	Upper	(Nombre)	Upper/Lower
TATAACT <mark>gCgATCgC</mark> TTACAATgAgCAATACgACTACTTTTACgTTgAC P _{polh} SgfI	CATTGTAAGCGATCGCAGTTATAGCAAATTTTACTACAAAGTTG	GCCC <mark>CATATg</mark> AAgTTgCAgCTCAAgCAggATTgT <mark>NdeI</mark>	ATgTCTCTCTTTAAggTAgCCAACCCACAACTAgAATgCAgTgAAAAAAATgC I-PpoI + secuencias flanqueantes óptimas	TTTTGGCTACCTTAAgAgAgTCATgCCACCATggTgCgCTCCTC I-PpoI + secuencias flanqueantes óptimas		I-PpoI + secuencias flanqueantes óptimas	AGCTCCGCTACCTTAAGAGAGCA	I-PpoI + secuencias flanqueantes óptimas	AqCTTqCTCTCTTAAqqTAqCqq		I-PpoI	qATCqCTACCTTAAqAqAq		I-PpoI	GATCCTCTTTAAggTAgC		I-PpoI	AgCTgCTACCTTAAgAgAg		I-PpoI	AgCTCTCTTTAAggTAgC		Secuencia $(5 \rightarrow 3)$

		pIERUPOD-P _{p10} - P _{polh}			pIERUPOD-P _{p10}			1						
(polh)	ORF		Promotor <i>p10</i> (P _{p10})		Promotor p10 (P _{p10})		Upstream (UP)	(DsRed1)	ORF DsRed1 + SV40polyA		Downstream (DW)	poliedrina (polh)	Promotor + ORF	(E1)
Lower (Lorf-Spe)	Upper (UorfPH-p10)	Lower (Lpr10-orfPH)	Upper (Upr10-Nde)	Lower (Lpr10-Sgf)	Upper (Upr10-Nde)	Lower (Lup-Sfi)	(Uup-Rsr)	Lower (Lred-Sfi)	Upper (Ured-Xma)	Lower (Ldw-BgI)	Upper (Udw-Spe)	Lower (Lorf-Spe)	Upper (Uprom-Nde)	Lower (Lenh-NheEco)
GTCggCgCC <mark>ACTAgT</mark> TTAATACgCgggggCCggT DW <mark>SpeI</mark>	$\begin{array}{c} \texttt{CAATATCGTCTAACTATGCCAGATTATAGCTATAGGCCGACC} \\ \texttt{P}_{b10} \end{array}$	ggCATAgTTAgACgATATTgAAATggTTgAAATAAATATACTAATATTTTg $polh$	gCCC <mark>CATATg</mark> CACAgTCAACgCCggCC <mark>Nde1</mark>	gCCC <mark>gCgATCgC</mark> gACgATATTgAAATggTTgAAATAAATATAC <mark>SgfI</mark>	gCCC <mark>CATATg</mark> CACAgTCAACgCCggCC <mark>Nde1</mark>	SV40polyA Sfil	CUCUCGIUCGAIGAUGAAIIGAGUAAUGUG RsrII Conversion	CgCTTAgT <mark>ggCCgAggCggCC</mark> AACTAgAATgCAgTgAAAAAATg UP Sfil GGGG TP Sfil	TCCCCCCgggggCCACCATggTgCgCTCC XmaI	GgAAAgATCTATACACACgTTAggCgAgCgCCg Bglii	GCgTATTAAACTAgTggCgCCgACAAATCgTTggT polh SpeI	GTCggCgCC <mark>ACTAgT</mark> TTAATACgCgggggCCggT DW SpeI	GCCC <mark>CATATg</mark> AAgTTgCAgCTCAAgCAggATTgT NdeI	CC <mark>gCTAgCgATATC</mark> TTACACACgCTgCAgCgg <mark>NheI EcoRV</mark>

Fragmento que	Secuencias	Upper/Lower	Secuencia $(5 \rightarrow 3)$
amplifica	que reconoce	(Nombre)	
		Upper	GAAAAAACAgTCCgAAgAg
parte UP +	UP y polh	(Uup-orf)	UP
parte polh		Lower	CAACAAAACgAgTCCAAg
		(Lup-orf)	polh
	IRES	Upper	GGACGTGGTTTTTCCTTTGA
		(Uires)	IRES
	DW	Lower	CTCCCTCTggAgCTgTA
		(phn-Back o	DW
		Agphn-Back)	
	pBS	Upper	AATACGACTCACTATAG
		(T7)	pBS
	pBS	Lower	AACAgCTATgACCATg
		(M13)	pBS
	Ppolh	Upper	CCCTCgAgAAgTTgCAgCTCAAg
		(prom-f)	P_{polh}
	Ppolh	Lower	CgggggTACCAgTTATAgCAAATT:
		(prom-i)	Ppolh

Clonación

Preparación de bacterias E. coli electrocompetentes

Se crecieron bacterias *E. coli* TOP 10 o las cepas *E. coli* DH 5 α o JM109 hasta saturación. Ese cultivo se 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 3000 X g durante 10-15 min a 4 °C y el sedimento de bacterias se resuspendió en 1000 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

Los diversos productos de amplificación alternativamente fueron eluidos por filtración a través de lana de vidrio y precipitados con CILi y etanol, aislados por adsorción a polvo de sílice (Gene Clean, Bio 101, Inc.) o purificados por unión de DNA a una matriz fibrosa de sílice (GFXTM, Amersham Pharmacia Biotech). Luego se los ligó alternativamente al vector pZerOTM-2 (Invitrogen) previamente linealizado por digestión con *Eco*RV, o al vector pIRES (Clontech) digerido (al igual que el fragmento de PCR) con las enzimas correspondientes. Las reacciones de ligación se realizaron utilizando *buffer* de la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 1 X; 1.5 a 5 unidades de la enzima T4 DNA ligasa (USB) y una relación molar de inserto:vector variable de acuerdo al caso, pero que generalmente se encontraba entre los límites 10:1 y 50:1. Las mezclas se incubaron a 16°C 30 min o toda la noche, dependiendo del vector utilizado. Estas ligaciones se utilizaron para electrotransformar bacterias competentes TOP 10 (Invitrogen), DH 5 α o JM109, de acuerdo al ensayo. Las bacterias transformadas fueron plaqueadas en medio LB sólido conteniendo 100 µg/ml de kanamicina o ampicilina, dependiendo del vector, 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 50 a 100 μ l de bacterias electrocompetentes con 5 μ l de las reacciones de ligación y se incubaron 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 μ F y 200 ohm (Ω), respectivamente. Posteriormente, se añadieron 500 μ l de medio LB sin antibiótico a las bacterias y se las incubó 1 h a 37°C con agitación. Se sembraron 200 y 300 μ l de cultivo en placas de LB con el agregado de antibiótico de selección (Ampicilina 100 μ g/ml o Kanamicina 100 μ g/ml). Las placas se incubaron 18-24 h a 37°C.

El sistema de clonado en pZErO-2[™]/*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-2[™] 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 *lacZ*a-*ccdB*, permitiendo el crecimiento de las bacterias recombinantes.

Selección de clones recombinantes por PCR

Con palillos estériles se tomaron las colonias resultantes de las diferentes transformaciones y cada una se depositó en un tubo *eppendorf* de 0,5 ml. El material remanente en el palillo se utilizó para realizar una estría en medio selectivo LB-agar con Kanamicina (100 μ g/ml) o Ampicilina (100 μ g/ml). Las bacterias depositadas en el tubo se resuspendieron en 10 μ l de agua bidestilada y se hirvieron durante diez minutos. Posteriormente, cada tubo se centrifugó a 14-18.000 X g durante 10 min. Las reacciones de amplificación se realizaron en las condiciones descriptas anteriormente, utilizando 1 μ l del sobrenadante como molde en 10 μ l de volumen final y empleando los *primers* correspondientes. 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.

Selección de clones recombinantes por hibridación de colonias (colony blot)

Las colonias resultantes de la transformación se repicaron por duplicado en medio selectivo LB-agar con antibiótico. Una de las réplicas obtenidas se usó para detectar clones recombinantes por el método de hibridación de colonias.

Las colonias desarrolladas sobre agar se transfirieron a papel de filtro Whatman 541 y se trataron por imbibición sucesiva durante 5 min en las siguientes soluciones (dos veces en cada una) con agitación: NaOH 0,5 M y Tris-HCl 1 M (pH 7,5); SSC 2X; etanol absoluto. Una vez que se secó, la membrana fue tratada de la manera descripta en el apartado correspondiente [Hibridaciones con sondas radiactivas. Prehibridación, hibridación y lavados (para sondas marcadas con [α ³²P] dATP)].

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). Los cromatogramas se visualizaron con el programa Chromas 1.51 (Technelysium, Pty. Ltd., Queensland, Australia).

Técnicas que involucran proteínas

Electroforesis de proteínas en geles de SDS-Page

Geles de SDS-PAGE

Las muestras provenientes de células infectadas y no infectadas 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 12% 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 una concentración de 12% en *buffer* de separación 1 X. El gel concentrador contenía acrilamida (30:0.8) 5% en *buffer* concentrador 1 X. Los detalles de la preparación de estos geles se indican en la tabla III.1. Las muestras se resolvieron aplicando 70 volts (V) durante 30-45 min o hasta que las muestras alcanzaran el gel separador. Posteriormente, se incrementó el voltaje hasta 100-150 V hasta que el azul de bromofenol alcanzara el final del gel. Los geles se tiñeron con solución de tinción durante 30 min a 65°C. La tinción no específica se eliminó con una solución de desteñido.

Técnicas que involucran la generación, análisis y multiplicación de AgMNPVs recombinantes y la multiplicación de AgMNPV salvaje.

Titulación por ensayo de placas

Las titulaciones de los *stocks* virales se realizaron en cajas de cultivo de 60 mm de diámetro, utilizando células UF-LAG-286. En cada placa se sembraron 1.5 x 10⁶ células y se incubaron ON (*overnight* o toda la noche) para permitir su adhesión. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se infectó cada una con 700 µl de diferentes diluciones seriadas del inóculo viral. Se dejó 1 h a TA para favorecer la adsorción, con rotación suave para impedir que se seque la monocapa. Luego se retiró el inóculo viral y se agregaron 4 ml (por caja de cultivo) de una preparación agarosa/TC100 (1,5% final agarosa Sea Plaque, FMC Bioproducts, ME, USA y TC100 0,5X). Una vez solidificado este *overlay* o capa, se agregaron 2 ml de TC100 completo por caja, para impedir que se sequen, y se incubaron a 28°C. Al sexto día se realizó la tinción con RN (O'Reilly *et al*, 1992). Para esto, se retiró el medio líquido de caja y, sobre el primer *overlay*, se agregaron 2 ml de una preparación agarosa + RN + TC100 (1,5% final agarosa Sea Plaque, RN 2 mg/ml final, TC100 0,5X). Nuevamente se incubó a 28°C. Al séptimo día se visualizaron las placas de lisis (blancas).

Infección viral

Las infecciones de los cultivos en monocapa se realizaron en frascos de 80cm² que contenían 6x10⁷ células con una MOI de 0,1 pfu/célula. Las células infectadas se incubaron a 28°C. Los controles de infección negativos se trataron de la misma manera, excepto que el inóculo fue medio de cultivo sin virus. Los efectos citopáticos de la infección se monitorearon por microscopía de contraste de fase.

Purificación de DNA viral a gran escala

Los BV se aislaron a partir del sobrenadante del cultivo de células infectadas. El sobrenadante se clarificó por centrifugación a 1000 X g a 4°C durante 5 min. La precipitación de los viriones se llevó a cabo por ultracentrifugación a través de colchón de sacarosa (O'Reilly *et al.*, 1992). El *pellet* de viriones se resuspendió en *buffer* de lisis (Tris-HCl (pH 7.6) 10 mM; EDTA 10 mM; SDS 0.25%) y se agregó proteinasa K (500 µg/ml) incubando a 37°C durante toda la noche. La purificación del DNA genómico se realizó de acuerdo a las metodologías *standard* (Sambrook *et al.*, 1989).

Purificación de DNA viral a pequeña escala (método miniprep)

Esta metodología fue la que más se utilizó en este trabajo de tesis.

Los BV se aislaron a partir del sobrenadante del cultivo de células infectadas. El sobrenadante se clarificó por centrifugación a 1000 x g a 4°C durante 5 min. La precipitación de los viriones se realizó centrifugando 1,5 ml de este sobrenadante a 14-18000 X g y 4°C durante 30 minutos en un tubo *Eppendorf*. Luego se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces en el mismo *Eppendorf*. El *pellet* de viriones se resuspendió delicadamente en *buffer* de lisis (Tris-HCl (pH 7.6) 10 mM; EDTA 10 mM; SDS 0.25%) y se agregó proteinasa K (500 μ g/ml) incubando a 60°C durante 2 h. La purificación del DNA genómico, inicialmente, se realizó con una única extracción con F:C:IAA (25:24:1). Posteriormente, se incorporó una segunda extracción con C:IAA (24:1). Ver el apartado correspondiente en esta misma sección (Extracción fenólica y Precipitación de ácidos nucleicos).

Ensayos de cotransfección

Se realizaron en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro. Se sembraron 1,5x10⁶ células. Se incubaron ON para favorecer la adhesión a la superficie. Posteriormente se retiró el medio y se cotransfectaron las células con una mezcla de los DNAs viral y del plásmido de transferencia correspondiente, y Tfx-[™]10 (Promega, WI, USA) o Tfx-[™]20 (Promega, WI, USA), alternativamente, según las indicaciones del proveedor. Las células cotransfectadas se incubaron a 28°C. A los 6 días de incubación se recolectó el sobrenadante total.

Ensayo de placas para la detección de recombinantes

Alternativamente, se realizó en cajas de cultivo de 35 o 60 mm de diámetro, de manera equivalente a la titulación. A fin de detectar los recombinantes y de acuerdo al plásmido de transferencia y DNA viral parental utilizados, se agregaron 120 μ g/ml de X-gal a la mezcla de agarosa + medio inicial, o RN a una segunda capa de agarosa + medio que se agregó a los 6 días p.i. (de manera equivalente a la titulación), o ambos. Las diluciones ensayadas variaron desde alícuotas directas del sobrenadante de cotransfección hasta diluciones 10⁻⁶ del mismo. Dependiendo de la cotransfección, se picaron las placas de lisis azules (Capítulos 4, 6 y 8, Resultados y Discusión) o blancas (Capítulos 8, 10 y 12, Resultados y Discusión). Éstas fueron resuspendidas en 750 µl de medio TC100 completo.

Protocolo desarrollado para la extracción de DNA de baculovirus para su análisis

por PCR

El protocolo que se describe a continuación permitió analizar las placas de lisis picadas directamente por PCR. Fue desarrollado en el presente trabajo de tesis para extraer alícuotas de DNA viral de diversas fuentes: placas de lisis picadas y resuspendidas, sobrenadantes de cotransfección, amplificaciones por cultivo celular de sobrenadantes de cotransfección, sobrenadantes de medio de cultivo celular infectado, entre otros. A continuación se describe el procedimiento para extraer DNA a partir de placas de lisis, pero el procedimiento es equivalente, sea cual fuere la fuente de la cual se está extrayendo el DNA.

Luego de resuspender las placas de lisis, 100μ l de esta resuspensión se sometieron al siguiente proceso. Se agregó un volumen (100μ l) de *buffer* de lisis [Tris-Cl (pH 7.6) 10 mM; EDTA 10 mM, SDS 0,25%] y la mezcla se homogeneizó suavemente. A este lisado se le agregó un volumen (200μ l) de C:IAA (24:1) y se homogeneizó suavemente por inversión durante 3 o 4 min. Posteriormente, se centrifugó a 14000 X g durante 5 min. Se recuperaron 150 μ l de la fase superior y se les agregaron 10 μ l de NaAc 3M. El DNA se precipitó con 3 volúmenes de etanol 96% (450μ l) y se centrifugó a 14000 X g durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* de DNA se secó durante 5 min a 60°C. Posteriormente, se lo resuspendió en 20 μ l de agua bidestilada. Se utilizó 1 μ l de esta resuspensión para una reacción de PCR de 10 μ l. Esta preparación de DNA se mantuvo inalterada durante 6 meses a -20° C.

Multiplicación de virus en huéspedes naturales

Los virus de AgMNPV [AgMNPV-2D, AgMNPV formulado, Ag Δ EGT-*lacZ*, cf-p10b (AgMNPV+pIERUPOD-P_{*p*10})] se propagaron en larvas de *A. gemmatalis*.

Se emplearon larvas 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 de los diferentes virus se infectaron larvas de *A. gemmatalis* de segundo y tercer estadio, por suministro de dieta libre de formalina, contaminada superficialmente con los diferentes AgMNPV (Green *et al.*, 1976).

Purificación de OBs

Todos los homogeneizados de larvas infectadas se efectuaron en agua destilada, en un homogeneizador tipo *potter*, y el homogeneizado se filtró a través de varias capas de gasa. Los recuentos virales se efectuaron en una cámara de 0,02 mm de profundidad (Petroff-Hauser) bajo iluminación de campo oscuro.

Purificación de OBs a pequeña escala por centrifugación diferencial

El homogeneizado de larvas en agua destilada se filtró tal como se describió previamente y se purificó por centrifugaciones diferenciales en microcentífugas. 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) y se centrifugó a 14-18.000 X g 10 min. Se resuspendió el sedimento en NaCl 0,5 M, se centrifugó la resuspensión a 14-18.000 X g y se lavó el sedimento con TE, repitiendo la última centrifugación.

Purificación del DNA viral de cuerpos de inclusión virales

Los poliedros de AgMNPV purificados previamente, fueron tratados durante 30 min. a 37 °C con solución de carbonato (Na₂CO₃ 0.1 M final). Luego se agregó Tris-HCl pH 7.6 (0.1 M final) y la solución se centrifugó en microcentrífuga a 7000 x g durante 10 min. para eliminar los gránulos no disueltos. El sobrenadante fue tratado con una solución de EDTA 0.1 M, SDS al 0.5% y proteinasa K (50-400 μ g/ml), durante 120-180 minutos a 60°C. El DNA se purificó mediante una primer extracción con F:C:IAA (25:24:1) y una segunda extracción con C:IAA (24:1), y se concentró por precipitación con etanol (Sambrook *et al.*, 1989). El DNA obtenido fue resuspendido en agua bidestilada estéril 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.

Microscopía

Microscopía óptica

Los preparaciones de poliedros fueron observadas en un microscopio óptico marca Zeiss Winkel.





Referencias Bibliográficas

Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Balinsky, C. A., Moser, B. A., Becnel, J. J., Rock, D. L. & G. F., Kutish (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.

Ahrens, C.H. & Rohrmann, G.F. (1995a). Identification of essential *trans*-acting regions required for DNA replication of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus: *lef*-1 is an essential replication gene. *Virology* 207, 417-428.

Ahrens, C.H. & Rohrmann, G.F. (1995b). Replication of *Orgyia pseudotsugata* baculovirus DNA: ie-1 and lef-2 are essential and ie-2, p34 and Op-iap are stimulatory genes. *Virology* **209**, (in press).

Ahrens, C.H., Carlson, C. & Rohrmann, G.F. (1995b). Identification, sequence and transcriptional analysis of lef-3, a gene essential for *Orgyia pseudotsugata* baculovirus DNA replication. *Virology* **210**, 372-382.

Albariño, C. G. (1997). Caracterización molecular de variantes del virus Junín con diferentes grados de virulencia. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

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.

Arana, E. I. (2003). Desarrollo de vectores para la construcción de recombinantes del virus de la poliedrosis nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (oruga de las leguminosas). Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Arana, E.I., Albariño, C.G., O'Reilly, D.R., Ghiringhelli, P.D. & Romanowski, V. (2001). Generation of a recombinant *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus expressing a foreign gene under the control of a very late promoter. *Virus Genes* **22**, 363-372.

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.

Argast, G.M., Stephens, K.M., Emond, M.J. & Monnat, R.J.J. (1998). I-Ppol and I-Crel homing site sequence degeneracy determined by random mutagenesis and sequential *in vitro* enrichment. *Journal of Molecular Biology* **280**, 345-353.

Arif, B. & Doerfler, W. (1984). Identification and localization of reiterated sequences in the *Choristoneura fumiferana* MNPV genome. *EMBO Journal* **3**, 525-529.

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.

Baird, G.S., Zacharias, D.A. & Tsien, R.Y. (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97,** 11984-11989.

Beames, B. & Summers, M. D. (1988). Comparisons of host cell DNA insertions and altered transcription at the site of insertions in few polyhedra baculovirus mutants. *Virology* **162**, 206-220.

Beames, B. & Summers, M. D. (1989). Location and nucleotide sequence of the 25K protein missing from baculovirus few polyhedra (FP) mutants. *Virology* **168**, 344-353.

Belfort, M. & Perlman, P.S. (1995). Mechanisms of intron mobility. *Journal of Biological Chemistry* 270, 30237-30240.

Belfort, M. & Roberts, R. (1997). Homing endonucleases - keeping the house in order. *Nucl. Acids Res.* 25, 3379-3388.

Beniya, H., Braunagel, S. C. & Summers, M. D. (1998). Autographa californica nuclear polyhedrosis virus : subcellular localization and protein trafficking of BV/ODV-E26 to intranuclear membranes and viral envelopes. *Virology* **240**, 64-75.

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. (1964). Insect viruses. In *Techniques in Experimental Virology,* Chap. 4. Edited by Harris, R. J. C. New York: Academic Press.

Bevis, B.J. & Glick, B.S. (2002). Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nature Biotechnology* 20, 83-86.

Birnbaum, M.J., Clem, R.J. & Miller, L.K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide 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.

Bischoff, D.S., & Slavicek, J.M. (1997). Phenotypic and genetic analysis of *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus few polyhedra mutants: Mutations in the *25K FP* gene may be caused by DNA replication errors. *Journal of General Virology* **71**, 1097-1106.

Bjorson, R.M. & Rohrmann, G.F. (1992). Nucleotide sequence of the polyhedron envelope protein gene region of the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* **73**, 1499-1504.

Bjorson, R.M., Glocker, B. & Rohrmann, G.F. (1992). Characterization of the nucleotide sequence of the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase gene region. *Journal of General Virology* **73**, 3177-3183.

Blissard, G. W. & Rohrmann G. F. (1990). Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology* 35, 127–135.

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. Accession NC_004323.

Braunagel, S. C., Burks, J. K., Rosas-Acosta, G., Harrison, R. L., Ma, H. & Summers, M. D. (1999). Mutations within the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *FP*25*K* gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport. *Journal of Virology* **73**, 8559-8570.

Braunagel, S. C., Parr, R., Belyavskyi, M. & Summers, M. D. (1998). Autographa californica nucleopolyhedrovirus infection results in Sf9 cell cycle arrest at G2/M phase. *Virology* **244**, 195-211.

Brockman, W.W., Lee, T.N.H. & Nathans, D. (1973). The evolution of new species of viral DNA during serial passage of simian virus 40 at high multiplicity. *Virology* **54**, 384-397.

Brown, M., Crawford, A.M. & Faulkner, P. (1979). Genetic analysis of a baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. 1. Isolation of temperature-sensitive mutants and assortment into complementation groups. *Journal of Virology* **31**, 190-198.

Brown, M., Faulkner, P., Cochran, M. A. & Chung K. L. (1980). Characterization of two morphology mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with large cuboidal inclusion bodies. *Journal of General Virology* **50**, 309–316.

Brown, S.E., Maruniak, J.E. & Knudson, D.L. (1985). Baculovirus (MNPV) genomic variants: characterization of *Spodoptera exempta* MNPV DNAs and comparison with the other *Autographa californica* MNPV DNAs. *Journal of General Virology* **66**, 2431-2441.

Bull, J.C., Godfray, H.C. & O'Reilly, D.R. (2003). A few-polyhedra mutant and wild-type nucleopolyhedrovirus remain as a stable polymorphism during serial coinfection in *Trichoplusia ni. Applied Environmental Microbiology.* **69**, 2052-2057.

Burand, J.P., Summers, M.D. & Smith, G.E. (1980). Transfection with baculovirus DNA. *Virology* **101**, 286-290.

Caballero, P., Williams, T. & López-Ferber, M. (2001). Estructura y taxonomía de los baculovirus. In *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*, pp. 15-46. Editado por P., Caballero, M., López-Ferber, & Williams T. Phytoma S.A., Valencia. España.

Carson, D.D., Guarino, L.A. & Summers, M.D. (1988). Functional mapping of an AcNPV immediate early gene which augments expression of the IE-1 trans-activated 39k gene. *Virology* **162**, 444-451.

Carson, D.D., Summers, M.D. & Guarino, L.A. (1991). Molecular analysis of a baculovirus regulatory gene. *Virology* **182**, 279-286.

Carstens, E. B. (1982). Mapping the mutation site of an *Autographa californica* nuclear polyhedron morphology mutant. *Journal of Virology* **43**, 809–818.

Carstens, E. B., Krebs, A. & Gallerneault C. E. (1986). Identification of an amino acid essential to the normal assembly of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra. *Journal of Virology* **58**, 684–688.

Carstens, E.B., Lin-Bai, Y. & Faulkner, P. (1987). A point mutation in the polyhedrin gene of a baculovirus, *Autographa californica* MNPV, prevents crystallization of occlusion bodies. *Journal of General Virology* **68**, 901-905.

Carstens, E.B., Williams, G.V., Faulkner, P. & Partington, S. (1992). Analysis of polyhedra morphology mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: molecular and ultrastructural features. *Journal of General Virology* **73**, 1471-1479.

Cary, L. C., Goebel, M., Corsaro, B. G., Wang, H. G., Rosen, E. & Fraser M. J. (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions with the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* **172**, 156–169.

Chaeychomsri, S., Ikeda, M. & Kobayashi, M. (1995). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **206**, 435-447.

Chakraborty, S. & Reid, S. (1999). Serial passage of a Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus in Helicoverpa zea cell cultures. Journal of Invertebrate Pathology 73, 303-308.

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, 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.

Cherry, C. L. & Summers, M. D. (1985). Genotypic variation among wild isolates of two nuclear polyhedrosis viruses isolated from *Spodoptera littoralis*. *Journal of Invertebrate Pathology* **46**, 289–295.

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.

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.

Clem, R.J., Fechheimer, M. & Miller, L.K. (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254, 1388-1390.

Clem, R.J., Robson, M. & Miller, L.K. (1994). Influence of infection route on the infectivity of baculovirus mutants lacking the apoptosis-inhibiting gene p35 and the adjacent gene p94. *Journal of Virology* **68**, 6759-6762.

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.

Cormack, B.P., Valdivia, R.H. & Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.

Cory, J. S., Hirst, M. L., Williams, T., Hails, R. S., Goulson, D., Green, B. M., Carty, T. M., Possee, R. D., Cayley, P. J. & D. H. L. Bishop (1994). Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. *Nature* **370**, 138–140.

COSAVE (COMITE DE SANIDAD VEGETAL DEL CONE SUR), http://www.cosave.org.py/serietecnica/serietecnica-rt0199esp.htm#soja.

Cowan, P., Bulach, D., Goodge, K., Robertson, A. & Tribe, D.E. (1994). Nucleotide sequence of the polyhedrin gene region of *Helicoverpa zea* single nucleocapsids nuclear polyhedrosis virus: placement of the virus in lepidopteran nuclear polyhedrosis virus group II. *Journal of General Virology* **75**, 3211-3218.

Croizier, G. & Ribeiro H. C. T. (1992). Recombination as a possible major cause of genetic heterogeneity in *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus wild populations. *Virus Research* **26**, 183–196.

Croizier, G., Croizier, L., Quiot, J.M. & Lereclues, D. (1988). Recombination of *Autographa californica* and *Rachoplusia ou* nuclear polyhedrosis viruses in *Galleria melonella* L. *Journal of General Virology* **66**, 2431-2441.

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 Igaucu, Brazil.

Crook, N.E., Clem, R.J. & Miller, L.K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of Virology* 67, 2168-2174.

Crouch, E. A, & Passarelli, A. L. (2002). Genetic Requirements for Homologous Recombination in *Autographa californica* Nucleopolyhedovirus. *Journal of Virology* **76**, 9233-9334.

Dai, X. J., Hajós, J. P., Joosten, N. N., van Oers, M. M., IJkel, W. F. J., Zuidema, D., Pang, Y. & Vlak, J. M. (2000). Isolation of a *Spodoptera exigua* baculovirus recombinant with a 10.6 kbp genome deletion that retains biological activity. *Journal of General Virology* **81**, 2545–2554.

Day, M. F., Common, I. F. B., Farrant, J. L. & Potter, C. (1953). A polyhderal virus disease of pasture caterpillar, *Pterolocera amplicornia* Walker (Anthelidae). *Australian Journal of Biological Sciences* 6, 574-579.

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.

Dujon, B. (1989). Group I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations – a review. *Gene* 82, 91-114.

Duncan, R. & Faulkner, P. (1982). Bromodeoxyuridine-induced mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus defective in occlusion body formation. *Journal of General Virology* **62**, 369-373.

Duncan, R., Chung, K.L. & Faulkner, P. (1983). Analysis of a mutant of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with a defect in the morphogenesis of the occlusion body macromolecular lattice. *Journal of General Virology* **64**, 1531-1542.

Dushoff, J. & Dwyer, G. (2001). Evaluating the risks of engineered viruses: modeling pathogen competition. *Ecological Applications* **11**, 1602-1609.

Ellison, E.L. & Vogt, V.M. (1993). Interaction of the intron-encoded mobility endonuclease I-Ppol with its target site. *Molecular and Cellular Biology* **13**, 7531-7539.

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.

Flick, K.E., Jurica, M.S., Monnat, R.J. & Stoddard, B.L. (1998). DNA binding and cleavage by the nuclear intron-encoded homing endonuclease I-*Ppol. Nature* **394**, 96-101.

Flipsen, J. T. M., Martens, J. W. M., van Oers, M. M., Vlak, J. M. & van Lent, J. W. M. (1995). Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae. *Virology* **208**, 328–335.

Folgueras-Flatschart, A.V., Becht Flatschart, R., Resende, M. & Sogayar, M.C. (2000). Early detection of productive baculovirus DNA transfection. *BioTechniques* 29, 430-434.

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.

Fraser, M. J., Brusca, J. S., Smith, G. E. & Summers, M. D. (1985). Transposon-mediated mutagenesis of a baculovirus. *Virology* 145, 356-361.

Fraser, M.J. & Hink, W.F. (1982). The isolation and characterization of the MP and FP variants of *Galleria melonella* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **117**, 366-378.

Fraser, M.J. (1987). FP mutation of nuclear polyhedrosis viruses: A novel system for the study of transposon-mediated mutagenesis. In, *Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture* (K. Maramorosch, Ed), pp. 265-293. Academic Press, San Diego.

Fraser, M.J., Smith, G.E. & Summers, M.D. (1983). Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: relationships between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria melonella* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* **47**, 287-300.

Friesen, P. D. (1993). Invertebrate transposable elements in the baculovirus genomes: characterization and significances, In *Parasites and pathogenes 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. (1987). Divergent transcription of early 35- and 94-kilodalton protein genes encoded by the HindIII-K genome fragment of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* **61**, 2264-2272.

Friesen, P.D. & Nissen, M.S. (1990). Gene organization and transcription of TED, a lepidopteran retrotransposon integrated within the baculovirus genome. *Molecular and Cellular Biology* **10**, 3067-3077.

Funk, C. J. & Consigli, R. A. (1993). Phosphate cycling on the basic protein of *Plodia interpunctella* granulosis virus. *Virology* 193, 396-402.

Gallo, L. G., Corsaro, B. G., Hughes, P. R. & Granados, R. R. (1991). In vivo enhancement of baculovirus infection by the viral enhancing factor of a granulosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **58**, 203–210.

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.

Giddings, G. (1998). Tansley Review Number 99. The release of genetically-engineered microorganisms and viruses into the environment. *New Phytologist* **140**, 173–184.

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.

Gombart, A.F., Blissard, G.W. & Rohrmann, G.F. (1989). Characterization of the genetic organization of the *Hin*dIII-M region of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata* reveals major differences among baculoviruses. *Journal of General Virology* **70**, 1815-1828.

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.

Gong, M. & Guarino, L.A. (1994). Expression of the 39k promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is increased by the apoptotic suppressor p35. *Virology* **204**, 38-44.

Goodwin, R. H., Tompkins, G. J. & McCawley, P. (1978). Gypsy moth cell lines divergent in viral susceptibility. *In Vitro* 14, 485–494.

Gordon, J.D. & Carstens E.B. (1984). Phenotypic characterization and physical mapping of a temperature sensitive mutant of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus defective in DNA synthesis. *Virology* **138**, 69-81.

Graham, B.J., Bengali, Z. & van de Woude, G.F. (1978). Physical map of the origin of defective DNA in herpes simplex virus type I DNA. *Journal of Virology* 25, 878-887.

Granados, R. R. & Lawler, K. A. (1981). In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* **108**, 297–308.

Granados, R. R. (1978). Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. *Virology* 90, 170-174.

Granados, R.R. & Federici, B.A. (1986). The biology of baculoviruses. Vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida.

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

Gröner, A. (1986). Specificity and safety of baculoviruses, p. 177–202. In R. R. Granados and B. A. Federici (ed.), *The biology of baculoviruses, vol. 1. Biological properties and molecular biology*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Gross, C. H., Russell, R. L. Q. & Rohrmann, S. H. (1994). *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure. *Journal of General Virology* **75**, 1115-1123.

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. & Summers, M. D. (1986b). Interspersed homologous DNA of *Autographa* californica nuclear polyhedrosis virus enhances delayed early gene expression. *Journal of Virology* **60**, 215-223.

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.

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. & Summers, M.D. (1987). Nucleotide sequence and temporal expression of a baculovirus regulatory gene. *Journal of Virology* **61**, 2091-2099.

Guarino, L.A. & Summers, M.D. (1988). Functional mapping of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genes required for late gene expression. *Journal of Virology* **62**, 463-471.

Gutai, M.W. & Nathans, D. (1978). Evolutionary variants of simian virus 40: nucleotide sequence of a conserved SV40 DNA segment containing the origin of viral DNA replication as an inverted repetition. *Journal of Molecular Biology* **126**, 259-274.

Guzo, D., Rathburn, H., Guthrie, K. & Dougherty, E. (1992). Viral and host cellular transcription in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virusinfected gypsy moth cell lines. *Journal of Virology* **66**, 2966–2972.

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.

Hajós, J. P., Pijnenburg, J., Usmany, M., Zuidema, D., Zavodszky, P. & Vlak J. M. (2000). High frequency recombination between homologous baculoviruses in cell culture. *Archives of Virology* **145**, 159–164.

Handermann, M., Schnitzler, P., Rosen-Wolff, A., Raab, K., Sonntag, K.C. & Daral, G. (1992). Identification and mapping of origins of DNA replication within the DNA sequences og the genome of insect iridescent virus type 6. *Virus Genes* **6**, 19-32.

Harrison, R. L. & Summers, M. D. (1995a). Biosynthesis and localization of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus 25K gene product. Virology 208, 279-288.

Harrison, R. L. & Summers, M. D. (1995b). Mutations in the *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus 25 kDa protein gene result in reduced virion occlusion, altered intranuclear envelopment and enhanced virus production. *Journal of General Virology* **76**, 1451-1459.

Harrison, R. L. & Summers, M. D. (1995b). Mutations in the Autographa californica multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus 25 kDa protein gene result in reduced virion occlusion, altered intranuclear envelopment and enhanced virus production. *Journal of General Virology* **76**, 1451-1459.

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., Hatanaka, E., Ishizaki, A. & Matsumoto, T. (1993). Production of defective genomes of the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus by serial passage through cultured cells. *Japanese Journal of Applied Entomological Zoology* **37**, 240-243.

Hashimoto, Y., Hayakawa, T., Ueno, Y., Fujita, T., Sano, Y. & Matsumoto, T. (2000b). Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. *Virology* **275**, 358-372.

Hawley, T.S., Telford, W.G., Ramezani, A. & Hawley, R.G. (2001). Four-color flow cytometric detection of retrovirally expressed red, yellow, green, and cyan fluorescent proteins. *BioTechniques* **30**, 1028-1034.

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.

Heim, R. & Tsien, R.Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescent resonance energy transfer. *Current Biology* **6**, 178-182.

Heim, R., Cubbitt, A.B. & Tsien, R.Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663-664.

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* multicapsi 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.

Heldens, J. G., van Strien, E. A., Feldmann, A. M., Kulcsar, P., Munoz, D., Leisy, D. J., Zuidema, D., Goldbach, R. W. & Vlak, J. M. (1996). *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus deletion mutants generated in cell culture lack virulence in vivo. *Journal of General Virology* **77**, 3127-3134.

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. & Strauss, E. (1976). Replication and passage of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus plaque variants in cloned cell cultures and larval stages of four host species. *Journal of Invertebrate Pathology* **27**, 49-55.

Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual Review of Genetics* **30**, 405-439.

Hodgson, D. J., Vanbergen, A. J., Watt, A. D., Hails, R. S. & Cory, J. S. (2001). Phenotypic variation between naturally co-existing genotypes of a lepidopteran baculovirus. *Evolutionary Ecology Research* **3**, 687–701.

Holland, J.J. (1990). Generation and replication of defective viral genomes. In *Virology*, 2nd edition pp. 151-165. Edited by B.N. Fields & D.M. Knipe. New York: Raven Press.

Hoopes, R. R. & Rohrmann, G. F. (1991). In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *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.

Huang, A.S. & Baltimore, D. (1970). Defective viral particles and viral disease processes. *Nature* **226**, 325-327.

Huang, J. & Levin, D.B. (1999). Identification and functional analysis of a putative non-hr origin of DNA replication from the *Spodoptera littoralis* type B multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* **80**, 2263-2274.

Huang, Y.-S., Bobseine, K.I., Setzer, R.W. & Kawanishi C.Y. (1991). Selection kinetics during serial cell culture passage of mixtures of wild-type *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and its recombinant Ac360- β -gal. *Journal of General Virology* **72**, 2653-2660.

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.

Igarashi, K., Fawl, R., Roller, R.J. & Roizman, B. (1993). Construction and properties of a recombinant herpes simplex virus 1 lacking both S-component origins of DNA synthesis. *Journal of Virology* **67**, 2123-2132.

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.

Jackson, R. J., Howell, M. T. & Kaminski, A. (1990). The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends in Biochemical Science* **15**, 477–483.

Jakobs, S., Subramaniam, V., Schönle, A., Jovin, T.M. & Hell, S.W. (2000). EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Letters* **479**, 131-135.

Jang, S.K. & Wimmer, E. (1990). Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosome entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes Development* **4**, 1560-1572.

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.

Jehle, J. A., Fritsch, E., Nickel, A., Huber, J. & Backhaus, H. (1995). TCl4.7: a novel lepidopteran transposon found in *Cydia pomonella* granulosis virus. *Virology* **207**, 369-379.

Jehle, J. A., Nickel, A., Vlak, J. M. & Backhaus, H. (1998). Horizontal escape of the novel T*c1*-like lepidopteran transposon TCp3.2 into *Cydia pomonella* granulovirus. *Journal of Molecular Evolution* **46**, 215-224.

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.

Jensen, R.L., Newsom, L.D. & Gibbens, J. (1974). The soybean looper: effects of adult nutrition on oviposition, mating frequency, and longevity. *Journal of Economic Entomology* 67, 467-470.

Jiang, C., Baehrecke, E. H. & Thummel, C. S. (1997). Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 124, 4673-4683.

Johnson, D.W. & Maruniak, J.E. (1989). Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2D) DNA. *Journal of General Virology.* **70**, 1877-1883.

Jurica, M.S. & Stoddard, B.L.(1999). Homing endonucleases: structure, function and evolution. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55, 1304-1326.

Keddie, B. A., Aponte, G. W. & Volkman, L. E. (1989). The pathway of infection of *Autographa* californica nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science* 243, 1728–1730.

Kitts, P.A. & Possee, R.D. (1993). A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques* 14, 810-817.

Kitts, P.A. (1996). Construction of baculovirus recombinants. In: *Insect cell culture: Fundamental and applied aspects* (Edited by Vlak J, de Gooijer C, Tramper J and Miltenburger H) Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers 111-123.

Kitts, P.A., Aures, M.D. & Possee, R.D. (1990). Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Research* **18**, 5667-5672.

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.

Kondo, A. & Maeda S. (1991). Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* **65**, 3625–3632.

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.

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., van den Berg, P.M.M.M., Tramper, J., Goldbach, R.W. & Vlak, J.M. (1993a). Location of two putative origins of DNA replication of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **192**, 94-101.

Kool, M., Voeten, J.T.M., Goldbach, R.W., Tramper, J., & Vlak, J.M. (1993b). Identification of seven putative origins of *Autographa californica* MNPV DNA replication. *Journal of General Virology* **74**, 2661-2668.

Kool, M., Voncken, J.W., van Lier, F.L.J., Tramper, J. & Vlak, J.M. (1991). Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties. *Virology* **183**, 739-746.

Kornberg, A. & Baker, T.A. (1992). DNA replication, 2nd. edition. New York: W.H. Freeman.

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 genedelivery 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.

Kovacs, G.R., Choi, J., Guarino, L.A. & Summers, M.D. (1992). Functional dissection of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early 1 transcriptional regulatory protein. *Journal of Virology* **66**, 7429-7437.

Kozuma, K. & Hukuhara, T. (1994). Fusion characteristics of a nuclear polyhedrosis virus in cultured cells: time course and effect of a synergistic factor and pH. *Journal of Invertebrate Pathology* **63**, 63–67.

Krappa, R. & Knebel-Mörsdorf, D. (1991). Identification of the very early transcribed baculovirus gene PE-38. *Journal of Virology* 65, 805-812.

Krell, P.J. (1996). Passage effect of virus infection in insect cells. Cytotechnology 20, 125-137.
Kumar, S. & Miller L.K. (1987). Effects of serial pasaje of AcNPV in cell culture. Virus Research 7, 335-349.

Kuzio, J. & Faulkner, p. (1984). Region of repeated DNA in the genome of *Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **139**, 185-188.

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.

Lambowitz, A.M. & Belfort, M. (1993). Introns as mobile genetic elements. Annual Review of Biochemistry 62, 587-622.

Lauf, U., Lopez, P. & Falk, M.M. (2001). Expression of fluorescently tagged connexins: a novel approach to rescue function of oligomeric DsRed-tagged proteins. *FEBS Letters* **498**, 11-15.

Lee, H. H. & Miller L. K. (1979). Isolation, complementation, and initial characterization of temperature-sensitive mutants of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* **31**, 240–252.

Lee, H. H. & Miller, L. K. (1978). Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* polyhedrosis virus. *Journal of Virology* 27, 754–767.

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.

Lee, J.H. & Johnson, S.J. (1990). Microhabitat distribution of velvetbean caterpillar (Lepidoptera: *Noctuidae*) pupae in soybean fields in Louisiana. *Environmental Entomology* **19**, 740-745.

Lee, J.H., Johnson, S.J. & Wright, V.L. (1990). Quantitative survivorship analysis of the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: *Noctuidae*) pupae in soybean fields in Louisiana. *Environmental Entomology* **19**, 978-986.

Leisy, D. J. & Rohrmann, G. F. (1993). Characterization of the replication of plasmids containing hr sequences in baculovirus infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Virology* **196**, 722–730.

Lepore, L. S., Roelvink, P. R. & Granados, R. R. (1996). Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *Journal of Invertebrate Pathology* 68, 131-40

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.

Liu, J.J. & Carstens, E.B. (1995). Identification, localization, transcription, and sequence analysis of the *Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase gene. *Virology* **209**, 538-549.

Longnecker, R. & Roizman, B. (1986). Clustering of genes dispensable for growth in culture in the S component of the HSV-1 genome. *Science* **236**, 573-576.

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.

Lowery, R., Hung, L., Knoche, K. & Bandziulis, R. (1992). Properties of I-*Ppol*: a rare-cutting intron-encoded endonuclease. *Promega Notes* **38**, 8-12.

Lu, A. & Carstens, E.B. (1991) Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 181, 336-347.

Lu, A. & Carstens, E.B. (1993) Immediate-early baculovirus genes transactivate the p143 gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **195**, 710-718.

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.

Lu, A. & Miller, L.K. (1995). The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication. *Journal of Virology* 69, 975-982.

Lu, A., Craig, A., Casselman, R. & Carstens E. B. (1996). Nucleotide sequence, insertional mutagenesis, and transcriptional mapping of a conserved region of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (map unit 64.8–66.9). *Canadian Journal of Microbiology* **42**, 1267–1273.

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.

Lynn, D. E., Dougherty, E. M., McClintock, J. T. & Loeb, M. (1988). Development of cell lines from various tissues of *Lepidoptera*, p. 39–242. In Y. Kuroda, E. Kurstak, and K. Maramorsch (ed.), *Invertebrate and fish tissue culture*. Springer-Verlag, New York, N.Y.

MacKinnon, E.A., Henderson J.F., Stoltz, D.B. & Faulkner, P. (1974). Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage *in vitro*. Journal of Ultrastructure Research **49**, 419-435.

Maeda, S. & Majima, K. (1990). Molecular cloning and physical mapping of the genome of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* **71**, 1851-1855.

Maeda, S., Mukohara, Y. & Kondo, A. (1990). Characteristically distinct isolates of the nuclear polyhedrosis virus from *Spodoptera litura*. *Journal of General Virology* **71**, 2631–2640.

Majima, K., Kobara, R. & Maeda, S. (1993). Divergence and evolution of homologous regions of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* 67, 7513-7521.

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.

Malitschek, B. & Schartl, M. (1991). Rapid identification of recombinant baculoviruses using PCR. *BioTechniques* **11**, 177-178.

Martens, J.W., van Oers, M.M., van de Bilt, B.D., Oudshoorn, P. & Vlak, J.M. (1995). Development of a baculovirus vector that facilitates the generation of *p10* based recombinants. *Journal of Virological Methods* **52**, 15-19.

Martin, D. W. & Weber P. C. (1997). DNA replication promotes high-frequency homologous recombination during *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus infection. *Virology* 232, 300–309.

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

Maruniak, J.E., Brown, S.E. & Knudson, D.L. (1984). Physical maps of SfMNPV baculovirus DNA and its genomic variants. *Virology* 136, 221-234.

Maruniak, J.E., García-Maruniak, A., Souza, M.L., Zanotto, P.M.A. & Moscardi, F. (1999). Physical maps and virulence of Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus genomic variants. *Archives of Virology* **144**, 1991-2006. McClintock, J. T., Dougherty, E. M. & Weiner, R. M. (1986). Semipermissive replication of a nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica* in a gypsy moth cell line. *Journal of Virology* 57, 197–204.

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.

McDougal, V.V. & Guarino, L.A. (2000). The *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p143 gene encodes a DNA helicase. *Journal of Virology* **74**, 5273-5279.

Merryweather-Clarke, A. T., Hirst, M. & Possee R. D. (1994). Recombination between genetically modified and unmodified *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in *Trichoplusia ni* larvae. *Acta Virologica* **38**, 311–315.

Mikhailov, V.S. & Rohrmann, G.F. (2002). Baculovirus replication factor LEF-1 is a DNA primase. *Journal of Virology* **76**, 2287-2297.

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. (1986). The genetics of baculoviruses. In *The Biology of Baculoviruses*, pp. 217-238. Edited by R. R. Granados & B. A. Federici. Florida: CRC Press.

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.

Miller, L. K. (1997). Introduction to the Baculoviruses. In *The Baculoviruses*. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.

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.

Miyawaki, A. *et al.* **(1997).** Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-887.

Mori, H., Nakazawa, H., Shirai, N., Shibata, N., Sumida, M. & Matsubara F. (1992). Foreign gene expression by a baculovirus vector with an expanded host range. *Journal of General Virology* **73**, 1877–1880.

Morris, T. D. & Miller, L. K. (1992). Promoter influence on baculovirus mediated gene expression in permissive and nonpermissive insect cell lines. *Journal of Virology* 66, 7397–7405.

Morris, T. D. & Miller, L. K. (1993). Characterization of productive and non-productive AcMNPV infection in selected insect cell lines. *Virology* 197, 339–348.

Morse, M. A., Marriott, A. C. & Nuttall, P. A. (1992). The glycoprotein of Thogoto virus (a tickborne orthomyxo-like virus) is related to the baculovirus glycoprotein GP64. *Virology* **186**, 640-646.

Moscardi, F. & Sosa-Gomez, D. R. (1992). Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil, pp. 98-109. *In* L. G. Copping, M. B. Green, and R. T. Rees (eds.), Pest management in soybean. Elsevier, London.

Moscardi, F. (1989). Use of viruses for pest controlin Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virusof the soybean caterpillar, Anticarsia gemmatalis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **84**, 51-56.

Moscardi, F. (1999). Assessment of the application of baculovirus for control of lepidoptera. *Annual Review of Entomology* **44,** 257-289.

Muñoz, D., Castillejo, J.I. & Caballero, P. (1998). Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population of *Spodoptera exigua*. *Applied Environmental Microbiology*. **64**, 4372-7377.

Muñoz, D., Vlak, J. M. & Caballero P. (1997). In vivo recombination between two strains of the genus nucleopolyhedrovirus in its natural host, *Spodoptera exigua*. *Applied Environmental Microbiology* **63**, 3025–3031.

Muscarella, **D.E. & Vogt**, **V.M. (1989).** A mobile group I intron in the nuclear rDNA of *Physarum polycephalum*. *Cell* **56**, 443-454.

Muscarella, D.E., Ellison, E.L., Ruoff, B.M. & Vogt, V.M. (1990). Characterization of I-*Ppol,* an intron-encoded endonuclease that mediates homing of a group I intron in the ribosomal DNA of *Physarum polycephalum*. *Molecular and Cellular Biology* **10**, 3386-3396.

Nissen, M.S. & Friesen, P.D. (1989). Molecular analysis of the transcriptional regulatory region of an early baculovirus gene. *Journal of Virology* **63**, 493-503.

O'Brien, V. (1998). Viruses and apoptosis. Journal of General Virology 79, 1833-1845.

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, D. R. (1997). Auxiliary genes of baculoviruses. In *The Baculoviruses*, pp. 267-300. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.

O'Reilly, D.R., Miller, L.K. & Luckow, V.A. (1992). *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. W.H. Freeman and Company, Oxford, New York: Oxford University Press.

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.

Orkin, S. H. (1992). GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80, 575-581.

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. (2004). Caracterización molecular de un virus de la granulosis de *Epinotia aporema*. Tesis doctoral. Fac. Cs. Exactas, UNLP:

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.

Pearson, M. N. & Rohrmann, G. F. (1995). *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus homologous regions: characterization of their ability to function as replication origins. *Journal of Virology* **69**, 213-221.

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.

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., Bjorson, R.M, Ahrens, C. & Rohrmann, G.F. (1993). Identification and characterization of a putative origin of DNA replication in the genome of a baculovirus pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. Virology **197**, 715-725.

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., Dortmans, J. C. F. M., Vermeesch, A. M. G., Yang, K., Martens, D. E., Goldbach, R. W. & Vlak, J. M. (2002). Pivotal role of the non-*hr* origin of DNA replication in the genesis of defective interfering baculoviruses. *Journal of Virology* **76**, 5605–5611.

Pijlman, G. P., van den Born, E., Martens, D.E. & Vlak, J. M. (2001). *Autographa californica* baculoviruses with large genomic deletions are rapidly generated in infected insect cells. *Virology* **283**, 132-138.

Pijlman, G. P., van Schijndel, J.E. & Vlak, J. M. (2003). Spontaneous excision of BAC vector sequences from bacmid-derived baculovirus expression vectors upon passage in insect cells. *Journal of General Virology* **84**, 2669-2678.

Polvino-Bodnar, M., Orberg, P.K. & Schaffer, P.A. (1987). Herpes simplex virus type 1 oriL is not required for virus replication or for the establishment and reactivation of latent infection in mice. *Journal of Virology* **61**, 3528-3535.

Popham, H. J. R., Bischoff, D. S. & Slavicek, J. M. (2001). Both Lymantria dispar nucleopolyhedrovirus enhancin genes contribute to viral potency. *Journal of Virology* **75**, 8639–8648.

Possee, R. D. & Rohrmann, G. F. (1997). Baculovirus genome and Evolution. In *The Baculoviruses*, pp. 125. Edited by L. K. Miller. New. York: Plenum Press.

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.

Potter, K.N., Faulkner, P. & MacKinnon, E.A. (1976). Strain selection during serial passage of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* 18, 1040-1050.

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.

Rees, S., Coote, J., Stables, J., Goodson, S., Harris, S. & Lee, M.G. (1996). Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques* **20**, 102-110.

Rice, W. C. & Miller, L. K. (1986). Baculovirus transcription in the presence of inhibitors and in nonpermissive *Drosophila* cells. *Virus Research* 6, 155-172.

Roberts, P. & Guillebeau, P. (1999). Velvetbean caterpillar- *Anticarsia gemmatalis* (Huebner). *Georgia IPM- integrated pest management.*

Roelvink, P. W., Corsaro, B. G. & Granados, R. R. (1995). Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancin genes. *Journal of General Virology* **76**, 2693–2705.

Rohrmann, G. F. & Karplus, P. A. (2001). Relatedness of baculovirus and gypsy retrotransposon envelope proteins. *BMC Evolutionary Biology*, 1 :1.

Rohrmann, G. F. (1992). Baculovirus structural proteins. *Journal of General Virology* 73, 749-761.

Roizman, B. & Sears, A.E. (1990). In *Virology*, 2nd edition, pp. 1795-1841. Edited by B.N. Fields & D.M. Knipe. New York: Raven Press.

Roncarati, R. & Knebel-Mrsdorf, D. (1998). Identification of the early actin-rearrangementinducing 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]. Russell, R. L. Q. & Rohrmann, G. F. (1993). A 25 kDa protein is associated with the envelopes of occluded baculovirus virions. *Journal of General Virology* 195, 532-540.

Russell, R. L. Q. & Rohrmann, S. H. (1990). A baculovirus polyhedron envelope protein: immunogold localization in infected cells and mature polyhedra. *Virology* **174**, 177-184.

Sambrook, J. E., Fritsch, F. & Maniatis. T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual,* second edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schorr, J. & Doerfler, W. (1993). Non-homologous recombination between adenovirus and AcNPV DNA fragments in cell-free extracts from insect *Spodoptera frugiperda* nuclei. *Virus Research* 28, 153-170.

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.

Shapiro, D. I., Fuxa, J. R., Braymer, H. D. & Pashley D. P. (1991). DNA restriction polymorphism in wild isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* **58**, 96–105.

Silva, M.T.B. & Moscardi, F. (2002). Field efficacy of the nucleopolyhedrovirus of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae): Effect of formulations, water pH, volume and time of application, and type of spray nozzle. *Neotropical Entomology* **31**, 75-83.

Slavicek, J. M., Hayes-Plazolles, N. & Kelly, M. E. (1995). Rapid formation of few polyhedra mutants of *Lymantria dispar* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus during serial passage in cell culture. *Biological Control* **5**, 251-261.

Slavicek, J.M., Podgwaite, J. & Lanner-Herrera, C. (1992). Properties of two Lymantria dispar nuclear polyhedrosis virus isolates obtained from the microbial pesticide Gypchek. *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 142-148.

Smith, G. E. & Summers M. D. (1978). Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology* 89, 517–527.

Smith, G. E. & Summers M. D. (1980). Restriction maps of *Rachiplusia ou* and *Rachiplusia ou*-Autographa californica baculovirus recombinants. Journal of Virology 33, 311–319.

Smith, G. E., Fraser, M. J. & Summers, M. D. (1983). Molecular engineering of *Autographa californica* nuclear polihedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *Journal of Virology* **46**, 584-593.

Smith, G.E., Fraser, M.J. & Summers, M.D. (1983). Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *Journal of Virology* **46**, 584-593.

Sosa Gómez, D.R. y F. Moscardi (1996). Producción de virus patógenos de ácaros e insectos. p. 223-240. En: *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga.* R. Lecuona (ed.). Talleres Gráficos Mariano Mas, Buenos Aires, Argentina.

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.

Sullivan, K. F. & Kay, S. A. (1999). Green fluorescent proteins. In *Methods in Cell Biology*, Vol. 58. Edited by Sullivan, K. F. & Kay, S. A.. San Diego, California: Academic Press Press.

Summers, M. D., Smith, G. E., Knell, J. D. & Burand J. P. (1980). Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia ou* nuclear polyhedrosis virus recombinants. *Journal of Virology* **34**, 693–703.

Summers, M. E., & Smith, G. E. (1978). Baculovirus Structural Polypeptides. Virology 84, 390-402.

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.

Tanada, Y. (1959). Synergism between two viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera, *Noctuidae*). *Journal of Insect Pathology* **1**, 215–231.

Tanada, Y. (1985). A synopsis of studies on the synergistic property of an insect baculovirus: a tribute to Edward A. Steinhaus. *Journal of Invertebrate Pathology* **45**, 125–138.

Tanada, Y., Hess, R. T. & Omi, E. M. (1975). Invasion of a nuclear polyhedrosis virus in midgut of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*, and the enhancement of a synergistic enzyme. *Journal of Invertebrate Pathology* **26**, 99–104.

Tanada, Y., Himeno, M. & Omi, E. M. (1973). Isolation of a factor, from the capsule of a granulosis virus, synergistic for a nuclear-polyhedrosis virus of the armyworm. *Journal of Invertebrate Pathology* **21**, 31–90.

Tanada, Y., Inoue, H., Hess, R. T. & Omi, E. M. (1980). Site of action of a synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Journal of Invertebrate Pathology* **34**, 249–255.

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.

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.

Tomalski, M.D., Wu, J. & Miller, L.K. (1988). The location, sequence, transcription, and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene. *Virology* 167, 591-600.

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.

Uchima, K., Harvey, J. P., Omi, E. M. & Tanada, Y. (1988). Binding sites on the midgut cell membrane for the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm (*Pseudaletia unipuncta*). *Insect Biochemistry* **18**, 645–650.

Ucker, D. S. (1991). Death by suicide: one way to go in mammalian cellular development? *New Biology* **3**, 103-109.

Van Lier, F.L., van der Meijs, W.C., Grobben, N.G., Olie, R.A., Vlak, J.M. & Tramper, J. (1992). Continuous beta-galactosidase production with a recombinant baculovirus insect-cell system in bioreactors. *Journal of Biotechnology* **22**, 291-298.

Van Oers, M.M., Flipsen, J.T.M., Reusken, C.B.E.M., Sliwinsky, E.L., Goldbach, R.W. & Vlak, J.M. (1993). Functional domains of the p10 protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* **74**, 563-574.

Vaux, D. L. & Haecker, 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. & 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.

Vlazny, D.A. & Frenkel, N. (1981). Replication of herpes simplex virus DNA: localization of replication signals within defective genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **78**, 742-746.

Volkman, L E. & Keddie, B. A. (1990). Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. *Seminars in Virology* 1, 288-297.

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. & 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.

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.

Wall, M.A., Socolich, M. & Ranganathan, R. (2000). The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nature Structural Biology* **7**, 1133-1138.

Wang, H. H., Fraser, M. J. & Cary, L. C. (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses : analysis of TFP3 lepidopteran transposon insertions at the *FP* locus of nuclear polyhedrosis virus. *Gene* 81, 97-108.

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.

Wang, P., Hammer, D. A. & Granados, R. R. (1994). Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. *Journal of General Virology* **75**, 1961–1967.

Wang, T.S.-F. (1991). Eukaryotic DNA polymerase. Annual Review of Biochemistry 60, 513-522.

Watson, J.R. (1916). Life history of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Huebner). *Journal of Economic Entomology* 9, 521-528.

Webb, A.C., Bradley, M.K., Phelan, S.A., Wu, J.K. & Gherke, L. (1991). Use of the polymerase chain reaction for screening and evaluation of recombinant baculovirus clones. *BioTechniques* **11**, 512-519.

Wei, X., Johnson, S.J. & Hammond, A.M. (1998). Sugar feeding strategy of adult velvetbean caterpillar (Lepidoptera: *Noctuidae*). *Environmental Entomology* 27, 1235-1241.

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.

Wickham, T.J., Davis, T., Granados, R.R., Hammer, D.A., Shuler, M.L. & Wood, H.A. (1991). Baculovirus defective interfering particles are responsible for variations in recombinant protein production as a function of multiplicity of infection. *Biotechnology Letters* **13**, 483-488. Wiehler, J., von Hummel, J. & Steipe, B. (2001). Mutants of Discosoma red fluorescent protein with a GFP-like chromophore. *FEBS Letters* **487**, 384-389.

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.

Wittmayer, P.K. & Raines, R.T. (1996). Substrate binding and turnover by the highly specific I-*Ppol* endonuclease. *Biochemistry* **35**, 1076-1083.

Wittmayer, P.K., McKenzie, J.L. & Raines, R.T. (1998). Degenerate DNA recognition by I-*Ppol* endonuclease. *Gene* **206**, 11-21.

Woo, S. D., Kim, W. J., Kim, H. S., Jin, B. R., Lee, Y. H. & Kang S. K. (1998). The morphology of the polyhedra of a host range-expanded recombinant baculovirus and its parents. *Archives of Virology* **143**, 1209–1214.

Wu, C.A.; Nelson, N.J., McGeoch, D.J. & Challberg, M.D. (1988). Identification of herpes simplex virus type I genes required for origin-dependent DNA synthesis. *Journal of Virology* **62**, 435-443.

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.

Wu, Y., Ge, L. & Carstens, E. B. (1999). Replication, integration, and packaging of plasmid DNA following cotransfection with baculovirus viral DNA. *Journal of Virology* **73**, 5473-5480.

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.

Xiong, G. M., Schorr, J., Tjia, S. T. & Doerfler, W. (1991). Heterologous recombination between *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA and foreign DNA in non-polyhedrin segments of the viral genome. *Virus Research* **21**, 65-85.

Yanase, T., Hashimoto, Y. & Matsumoto, T. (1998). Analysis of defective genomes of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus generated by serial undiluted passage in cell culture. *Acta Virologica* **42**, 65-70.

Yang, S. & Miller, L.K. (1998). An efficient way to introduce unique restriction endonuclease sites into a baculovirus genome. *Journal of Virological Methods* **76**, 51-58.

Yarbrough, D., Watcher, R.M., Kallio, K., Matz, M.V. & Remington, S.J. (2001). Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0 A resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 462-467.

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.A., Sampaio, M.J.A., Johnson, D.W., Rocha, T.L. & Maruniak, J.E. (1992). The *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene region: sequence analysis, gene product and structural comparisons. *Journal of General Virology*. **73**, 1049-1056.

Zhang, C. X. & Jin, W. R. (2003). *Helicoverpa armigera* nuclear polyhedrosis virus, complete genome. GenBank, direct Submission: NC_003094.

Zuidema, D., Klinge-Roode, E.C., van Lent, J.W.M. & Vlak, J.M. (1989). Construction and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutant lacking the polyhedral envelope. *Virology* **173**, 98-108.



	700ul	•	700 ul		sin Tfx TM -10	Control (-)		сл	
	700µl	lı 9	691 µl		(~3µg)	3 jul		4	
	الب700	ابا 6 ا	684 µl				10 µl (~3µg)	ω	
	الب000	ابر 6 ا	681 µl	10 μl (~10 μg)	(~3µg)	3 µl		2	
	البو20	ابر 6 ا	674 µl	10 µl (~10 µg)			10 µl (~3µg)	<u> </u>	
					cular	cir	linealizado		
			suero	рТох	-IPpol	SR-	SR-IPpol	No	A BREVIADA
	\$	Tfx [™] -10	medio sin		CCIÓN 14/06/0	OTRANSFEC	0		NOMENCLATURA
	Indon/		цц 00/		(-) sin itxiu	Control		4	
		11 C.2	487.5 µl	μ(~) μ		(<u></u> <u>(</u> <u>(</u>	n Z~) In 00Z	<u>ہ</u> د	
	700µl	6 µ	484 µl	<u>μl (~10 μg)</u>	10	(D)	200 µl (~2 µ	» N	
	700µا	6 µl	249 µl	μl (~5 μg)	л	(ĝ	440 µl (~4 µ		
			suero	Ag-IPpol	p	rcular)	AgMNPV-2D (ci	No	ABREVIADA
	Vŗ	Тfx ^{тм} -10	medio sin	Ó	CCIÓN 12/05/0	COTRANSFE			NOMENCLATURA
apítulos de ste son las	diferentes C; en color cele	adas en los n resaltadas (ntes, mencion Las que estár	fección correspondie s cotransfecciones. las en el Capítulo 13. <i>II</i> .	las de cotrans eviada de esa: iellas analizad las del <i>grupo</i>	En las tabli clatura abre nden a aqu naranja son	ación de los datos. especifica la nomen resaltadas correspo esaltadas en color n	interpret usión, se e ecciones i ue están r	facilitar la lectura e Resultados y Discu <u>Nota</u> : Las cotransfi del <i>grupo I</i> y las qu Capítulo 4:
viada para	iclatura abrev	on la nomen	∍s, se hace cu	encionan varias vece	nes que se mu	ransfeccion	eferencia a las cot	texto, la r	En el cuerpo del t

APÉNDICE: LISTA DE COTRANSFECCIONES MENCIONADAS EN ESTA TESIS DOCTORAL

<i>medio sin</i> <i>suero</i> 950 μl 1000 μl 675 μl 680 μl 680 μl 686 μl	bi/02 pIERUPOD-21 10 μl ~10 μg 10 bi/02 pIERUPOD-21 5 μl ~10 μg 5 μl ~10 μg	DTRANSFECCIÓN 09/6 ealizado Control (-) sin Tfx TM Control (-) sin Tfx TM <u>Control 82</u> <u>4 μl ~0,5 μg</u> 4 μl ~0,5 μg	AgMNPV-IPpol 24 lin 20 μl ~3μg 20 μl ~3μg 10 μl ~0,5 μg 10 μl ~0,5 μg		<u>Capítulo 8:</u> NOMENCLATURA ABREVIADA cf-21a NOMENCLATURA ABREVIADA cf-21b cf-21c
	medio sin suero 950 µl 1000 µl 675 µl 680 µl 681 µl 683 µl 683 µl	b/02 medio sin pIERUPOD-21 suero 10 μl ~10 μg 950 μl 10 μl ~10 μg 950 μl 10 1000 μl 10 1000 μl 10 5 μl ~10 μg 5 μl ~10 μg 675 μl 5 μl ~10 μg 680 μl 5 μl ~10 μg 681 μl 680 μl 680 μl 5 μl ~10 μg 685 μl 680 μl 680 μl 5 μl ~10 μg 683 μl 683 μl 680 μl 680 μl 680 μl 680 μl 680 μl 680 μl 680 μl 683 μl 680 μl 683 μl 683 μl	DTRANSFECCIÓN 09/05/02 medio sin plERUPOD-21 medio sin suero ealizado plERUPOD-21 950 µl Control (-) sin TfxTM10 10 µl ~10 µg 950 µl TRANSFECCIÓN 29/05/02 Medio sin ripleRUPOD-21 Sin TfxTM10 DTRANSFECCIÓN 29/05/02 a dia sin suero circular A Medio sin suero A file ~10 µg 680 µl 680 µl 4 µl ~0,5 µg 5 µl ~10 µg 681 µl 4 µl ~0,5 µg 5 µl ~10 µg 681 µl 686 µl 20TRANSFECCIÓN 24/06/02 medio sin suero 683,5 µl 883,5 µl Gontrol (-) con Tfx10 500 ng 683,5 µl	Cotransfección 09/05/02 medio sin AgMNPV-IPpol 2, linealizado plERUPOD-21 suero 20 μl ~3μg 10 μl ~10 μg 950 μl 20 μl ~3μg Control (-) sin Tfx TM 10 10 μl ~10 μg 950 μl Control (-) sin Tfx TM 10 10 μl ~10 μg 950 μl 1000 μl 10 μl ~0,5 μg circular plERUPOD-21 Medio sin 10 μl ~0,5 μg suero suero 1000 μl 10 μl ~0,5 μg circular 5 μl ~10 μg 680 μl 10 μl ~0,5 μg 4 μl ~0,5 μg 5 μl ~10 μg 680 μl 4 μl ~0,5 μg 6 μl ~10 μg 680 μl 680 μl 10 μl ~0,5 μg 4 μl ~0,5 μg 5 μl ~10 μg 681 μl 4 μl ~0,5 μg 5 μl ~10 μg 683 μl 686 μl 10 μl ~100 ng 0,5 μl ~500 ng 683,5 μl 690 μl	N° COTRANSFECCIÓN 09/05/02 plERUPOD-21 20 μl -3μg medio sín suero 30 μl -3μg medio sín 10 μl -10 μg medio sín 950 μl 950 μl N° CotrANSFECCIÓN 29/05/02 Control (-) sin TfX TM 10 Medio sín suero Medio sín suero N° AgMNPV-IPpol 82 10 μl -0,5 μg plERUPOD-21 circular Medio sín suero Medio sín suero 1 10 μl -0,5 μg 4 μl -0,5 μg 5 μl -10 μg 680 μl 680 μl 2 Control (-) con TfX TM 10 Control (-) con TfX TM 10 5 μl -10 μg 683 μl 683 μl N° AgMNPV-IPpol 24 linealizado Control (-) con TfX TM 10 medio sín 688 μl medio sín 688 μl medio sín 688 μl medio sín 688 μl 3 4 10 μl -00 ng 0,5 μl -500 ng 683,5 μl 683,5 μl 683,5 μl

Nomenclatura Abreviada

No

COTRANSFECCIÓN 31/10/01

pAg-IPpol / Notl 30 µl (~10 µg)

medio sin

Tfx[™]-10

Ş

suero

644 µl 700 µl

- ^μ

700µl 700µl

N -

AgMNPV-2D 20 μl (~2 μg)

Control (-) sin TfxTM-10

Capítulo 6:

700.1	10	207 E		5	0 I 100 pg	1 5	of 17 V
		suero	ERUPOD-47	pll	Ag∆EGT- <i>lacZ</i> circular	No	A BREVIADA
V_{f}	Tfx10	medio sin	/02	VSFECCIÓN 01/10,	II Cotrai		NOMENCLATURA
الم200		700µl		rol (-) sin Tfx10	Cont	6a	
700µl	10 µl	l ⁿ¹ 069		rol (-) con Tfx10	Conti	5a	
700µl	10 µl	ln ¹ 889		2 µl ~100 ng		4a	
ابر700	10 µl	687,5 µl	0,5 µl ~500 ng	2 µl ~100 ng		3a	cf-47e
لبا 700	10 µl	679,5 μl			10 µl ~100 ng	2a	
700µI	10 µl	679,5 µl	0,5 µl ~500 ng		10 µl ~100 ng	1a	cf-47d
٧ŗ	Tfx10	Medio sin suero	pIERUPOD-47	MNPV-I <i>Ppol</i> 2 ₄ circular	AgMNPV-I <i>Ppo</i> I 2₄ Ag linealizado	No	
			02	ISFECCIÓN 01/10/	I COTRAN		
		8/06/02	TRANSFECCIÓN 1 DEL 2	CACIÓN DE LA COT	Amplifi		cf-47c
							A BREVIADA
							NOMENCLATURA
لبا00 V	10 µl	ln ¹ 069		rol (-) con Tfx10	Conti	2	
لبا 700	10 µl	679,5 µl	5 μl ~500 ng	0,	10 µl ~100 ng	_	cf-47b
			ERUPOD-47	do pll	AgMNPV-IPpol 24 linealiza		
		suero				S	ABREVIADA
√ _r	Tfx10	medio sin	92	SFECCIÓN 28/06/U	Cotran		NOMENCLATURA

ابا 069) con Tfx10	Control (-	2b	
lıi 5,789	0,5 l₁ 2,0	2 µl ~100 ng	1b	cf-47∆
suero	pIERUPOD-47	Ag∆EGT- <i>lacZ</i> circular	No	A BREVIADA
medio sir	CCIÓN 01/10/02	II COTRANSFE		NOMENCLATURA

					cf-p10c		ABREVIADA	NOMENCLATURA			cf-p10b	ABREVIADA	NOMENCLATURA					cf-p10a
6	თ	4	ယ	2	<u> </u>		No			2	1	No		5	4	ω	N	<u> </u>
				10 µl ~500 ng	10 µl ~500 ng	linealizado	AgMNPV-I <i>Ppo</i> I 2₄	0	. –		30 μl ~1,5 μ	AgMNPV-IPpol 82 lin	C				5 µl ~100 ng	5 µl ~100 ng
Control (-		2 µl	2 µl			<u>ci</u> .	AgMNF	OTRANSFE		Control (-	ĝ	nealizado	OTRANSFE	Control (-	1 µl	1 µ		
) sin Tfx TM -20		~500 ng	~500 ng			rcular	oV-IPpol 2₄	CCIÓN 12/12/) sin Tfx ^{⊤M} -20		plE	CCIÓN 13/09/) sin Tfx TM -10	~100 ng	~100 ng		
	1 µl ~1,5 µg		1 μl ~1,5 μg		1 μl ~1,5 μg		pIERUPOD-P _{p10}	03			2 μl ~3 μg	ERUPOD-p10	03			0,5 µl ~500 ng		0,5 µl ~500 ng
1 ml	994,5 µl	993,5 µl	lr ¹ 886	988,5 µl	983 µl		suero	Medio sin		1 ml	953µI	suero	Medio sin	ابر 700	l ^{n†} 689	688,5 µl	685 µl	684,5 µl
۰.	4,5 µl	1,5 μΙ	ابر 6	1,5 µl	ابا 6		2:1	Tfx [™] -20		I	15 µl	2:1	Tfx [™] -20		10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml			Vf		1 ml	1 ml		V_{f}	700µl	الب700	700µl	الم700	الم200

Capítulo 10:

Nomenclatura Abreviada

No

AgMNPV-IPpol 82

Cotransfección 11/03/03 AgMNPV-IPpol 8₂ sin digerir

pIERUPOD-Pp10

medio sin

*Tf*x[™]-10

\$

suero

linealizado

<u>Capítulo 12:</u>								
NOMENCLATURA			COTRANSFECCIÓN 2	?6/03/04		medio	Тfx ^{тм} -20	Vŕ
A BREVIADA	No	DNA	viral	DNA pla	smídico	sin	2:1	
		AgMNPV-IPpol 24	AgMNPV-IPpol 82	pRUPOD	pEUPOD	suero		
		linealizado	linealizado					
cf-pRa	-	10 µl ~500 ng		1 μl ~1,5 μg		983 Jul	6 µl	1 ml
cf-pEa	N	10 µl ~500 ng			1 μl ~1,5 μg	983 jul	6 µl	1 ml
cf-pRb	ω		10 μl ~500 ng	1 μl ~1,5 μg		983 Jul	6 µl	1 ml
cf-pEb	4		10 µl ~500 ng		1 µl ~1,5 µg	983 µl	6 µl	1 ml

APÉNDICE