

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE VETERINARIA



**TESIS DOCTORAL**

**Utilización de elementos reguladores en *cis* y *trans* para la mejora de vectores  
baculovirus**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Javier López Vidal**

Directora

Silvia Gómez Sebastián

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Utilización de elementos reguladores en *cis* y *trans* para la  
mejora de vectores baculovirus**

Memoria para optar al grado de doctor

presentada por

Javier López Vidal

Directores

José Ángel Martínez Escribano

Silvia Gómez Sebastián

**Madrid, 2014**



Dr. José Ángel Martínez Escribano, investigador del Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), y Dra. Silvia Gómez Sebastián, jefa del Área de Investigación y Desarrollo Exploratorio de Alternative Gene Expression S.L., hacen constar:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Utilización de elementos reguladores en *cis* y *trans* para la mejora de vectores baculovirus”, cuya memoria presenta el licenciado en veterinaria D. Javier López Vidal para optar al grado de doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que así conste a los efectos oportunos del interesado, se expide la presente certificación.

Fdo. José Ángel Martínez Escribano

Fdo. Silvia Gómez Sebastián

Madrid, 5 de febrero de 2014



Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación a cargo del proyecto MEC Programa Consolider-Ingenio 2010 (CSD2006-2007) y de la empresa Alternative Gene Expression S.L. (ALGENEX)



## AGRADECIMIENTOS

Resulta laborioso reunir en unas líneas a todas las personas que han intervenido a lo largo de estos años en la culminación de la tan anhelada meta.

En primer lugar quisiera expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a los directores, por su apoyo y continua orientación, seguimiento y supervisión.

Quisiera extender mi gratitud a los compañeros de ALGENEX. Tanto a los actuales (Carmen Núñez y Carmen Alvarado, Susana, Edel, Miguel Cid, Manuel, Miguel Andrade y Gabriela) como a los que han formado parte de ella (Ismael, Rodrigo, Lorena, Javier, José Luis, Marta, Rafael, Eduardo, Ismael y Benoit). También al resto de compañeros del laboratorio y del Departamento de Biotecnología que, sin saberlo, han contribuido a la finalización de la presente tesis doctoral. Este trabajo les pertenece en parte a todos ellos.

En especial a José Ángel, Covadonga y X. Casabiell, por la motivación hacia la búsqueda del conocimiento que han despertado en mí.

Por último, a mi familia, por su gran comprensión y colaboración desde el principio. A Irene, por estar siempre ahí. A mi hijo Roi, sin su colaboración, esto habría acabado mucho antes.



# ABREVIATURAS

**AcMNPV:** *Autographa californica multiple nucleopolyedrovirus*

**AJHSP-1:** *acidic juvenile hormone-suppressible protein 1*

**BEVS:** *baculovirus expression vector system*

**BJHSP-1:** *basic juvenile hormone-suppressible protein 1*

**BJHSP-2:** *basic juvenile hormone-suppressible protein 2*

**BmNPV:** *Bombyx mori nucleopolyedrovirus*

**Br-C:** lugar putativo de unión para el factor *Broad-Complex*

**BV:** *budded virus*

**cdNA:** *complementary DNA*

**CO:** cuerpo de oclusión

**CpGV:** *Cydia pomonella granulovirus*

**CRE:** *cAMP Response Element*

**EcR:** lugar putativo de unión para la hormona ecdisona

**EpMNPV:** *Epiphyas postvittana multiple nucleopolyedrovirus*

**GV:** granulovirus

**hpi:** horas posinfección

**hrs;** *homologous regions sequences*

**IAP:** *inhibitor of apoptosis*

**ie:** *immediate early*

**kb:** quilobases

**kDa:** quilodalton

**LdMNPV:** *Lymantria dispar multiple nucleopolyedrovirus*

**LEF:** *late expression factor*

**MNPV:** nucleopoliedrovirus múltiple

**MOI:** *multiplicity of infection*

**mRNA:** *messenger RNA*

**NC:** nucleocápsida

**NPV:** nucleopoliedrovirus

**ODV:** *occlusion-derived virus*

**OpMNPV:** *Orgyia pseudotsugata multiple nucleopolyedrovirus*

**ORF:** *open reading frame*

**pb:** par de bases

**PCR:** *polymerase chain reaction*

**pfu:** *plaque-forming unit*

**PIF:** *per os infectivity factor*

**polh:** poliedrina

**PTS:** proteína total soluble

**RT-PCR:** *reverse transcription polymerase chain reaction*

**SDS-PAGE:** *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

**SeNPV:** *Spodoptera litura nucleopolyedrovirus*

**SNPV:** nucleopoliedrovirus simple

**TRE:** *TPA response element*

**VLf-1:** *very late factor 1*

**vFGF:** *baculovirus-encoded fibroblast grow factor*

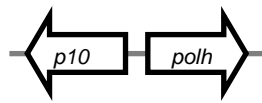


## DEFINICIONES

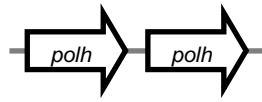
**Casete de expresión:** región codificante de un transgén flanqueada por un conjunto de secuencias reguladoras necesarias para su expresión.

**Enhancer:** secuencia de DNA bicatenario a la que se unen activadores y otros factores que aumentan la transcripción de un gen.

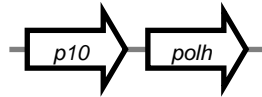
**Promotores en disposición *back to back*:** dos promotores diferentes en serie con orientación diferente.



**Promotor en tándem:** un mismo promotor repetido en serie con la misma orientación.



**Promotor híbrido o quimera:** dos promotores diferentes en serie con la misma orientación.





## RESUMEN

Desde que en la década de los 70 se produjo la primera molécula proteica recombinante, en la industria farmacéutica se han ido imponiendo los productos biológicos a los sintetizados químicamente. Actualmente, diversas tecnologías compiten por satisfacer la demanda de la industria, y para ello tanto la reducción de los costes como la cantidad y la funcionalidad de las proteínas recombinantes generadas son factores determinantes. La tecnología denominada *Baculovirus Expression Vector System* (BEVS) ha evolucionado hasta convertirse en uno de los sistemas de vectores eucariotas más versátiles y robustos para la expresión de proteínas recombinantes, hasta el punto de haber numerosos productos en el mercado obtenidos mediante este sistema, principalmente en el campo de las vacunas. Sin embargo, la calidad y la cantidad de la proteína recombinante obtenida son, todavía, dos de los principales desafíos pendientes que restan competitividad a este sistema de expresión.

El objetivo de esta tesis fue dar un impulso a esta tecnología tratando de solventar algunas de sus principales desventajas. Para ello, se han caracterizado nuevos elementos genéticos reguladores (promotores, transactivadores y secuencias *enhancer*) que una vez combinados han permitido desarrollar un nuevo casete de expresión optimizado.

Para llevar a cabo estos estudios se han empleado técnicas bioquímicas y de biología molecular (PCR, RT-PCR, SDS-PAGE, MALDI-TOF, electroforesis automatizada, análisis fluorimétrico, citometría de flujo, *western blot*, microscopía óptica, microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión, entre otras). Además, para llegar a las conclusiones finales se han analizado más de 40 nuevos baculovirus recombinantes, tanto en células de insecto en cultivo (Sf21, Sf9 y Tn-5) como en larvas del insecto *Trichoplusia ni* (*T. ni*).

Entre los hallazgos de este trabajo cabe citar la caracterización de nuevos promotores de expresión génica derivados de *T. ni* para su uso en el vector baculovirus (AcMNPV), entre ellos destacó el denominado *pB2*, por su actividad más temprana y homogénea que la del promotor de baculovirus *polh*, empleado de manera convencional en este sistema. Además, la cooperación sinérgica entre esta secuencia y el promotor *p10* del baculovirus (*pB2p10*) resultó de interés biotecnológico. El análisis

de la secuencia *pB2* permitió la determinación de sus regiones esenciales y más activas (fragmento *pB2<sub>9</sub>*) en AcMNPV. Por otra parte, se ha caracterizado funcionalmente la co-expresión de una segunda copia de los factores reguladores transcripcionales IE1 e IE0 de AcMNPV mediante la inserción en el genoma del virus del cDNA *Ac-ie-01*, codificante para ambos factores. Como resultado se observó un mayor incremento del crecimiento de la población celular respecto a la infectada con el baculovirus convencional y un aumento de la supervivencia celular tras la infección, reflejado en una mayor viabilidad celular a tiempos tardíos posinfección. Por último, la generación de un casete de expresión compuesto por el cDNA *Ac-ie-01* y la secuencia *enhancer hr1* de AcMNPV, operativamente unida al promotor *p10* o a híbridos de *p10* con otros promotores, resultó en una mayor proliferación celular a tiempos tempranos de la infección, un mejor mantenimiento de la integridad celular a tiempos tardíos y en un incremento de la producción de proteína recombinante de hasta cuatro veces respecto a un vector baculovirus convencional. Además, se observó una reducción de la proteólisis y de las formas proteicas aberrantes, características de este sistema de expresión. El nuevo casete se probó con éxito tanto con una proteína reportadora (proteína verde fluorescente) como con una proteína vacunal de interés comercial (proteína de la cápsida del circovirus tipo 2).

En definitiva, el nuevo casete desarrollado confirió capacidades productivas no alcanzadas con anterioridad por esta tecnología. La proliferación celular en las primeras horas de la infección junto con el aumento de la viabilidad celular en su fase final, tienen como consecuencia un mejor procesamiento de las proteínas recombinantes obtenidas tanto en células de insecto como en larvas de *T. ni*. Este casete de expresión se ha validado en un modelo de expresión de una proteína formadora de pseudopartículas víricas, obteniendo incrementos de productividad respecto a un baculovirus convencional de 4 y 2 veces en células y larvas *T. ni*, respectivamente.

## ABSTRACT

Since the 70s, when the first recombinant protein was produced, biologics constitute a new alternative to therapeutic molecules based on chemicals. Nowadays, different technologies compete to meet industry demand. This is the reason because improvements in technologies able to produce recombinant molecules are of extraordinary relevance in order to reduce production costs or produce more functional molecules. *The Baculovirus Expression Vector System* (BEVS) technology has evolved to become one of the most versatile and powerful eukaryotic vector system for recombinant protein expression and there are numerous BEVS-derived products on the market, primarily vaccines. *However*, the BEVS technology has pending challenges to be more competitive, focused principally in the improvement of quality and productivity parameters of the recombinant protein obtained.

The main aim of this thesis was to boost this technology, trying to solve some of its main drawbacks. For this purpose, it has been characterized new regulatory genetic elements (promoters, transactivators and enhancer sequences) which combined constituted a novel optimized expression cassette.

To carry out these studies different techniques of biochemistry and molecular biology have been employed (RT-PCR, SDS-PAGE, MALDI-TOF, microfluidic electrophoresis, fluorimetric analysis, flow cytometry, *western blot*, optic microscopy, fluorescence microscopy and electronic transmission microscopy, among others). In addition, more than 40 different recombinant baculovirus vectors were obtained and studied to reach the conclusions of this work, analysing those baculoviruses in both insect cell cultures (Sf21, Sf9 y Tn-5), and insect larvae of the lepidopter *Trichoplusia ni* (*T. ni*).

Among the main findings of the present work can be mentioned the functional characterization of *T. ni*-derived promoters in the AcMNPV vector, from which, that denominated *pB2*, presented an earlier and more homogeneous promoter activity than that achieved by the conventional baculovirus promoter *polh*. Furthermore, the synergistic cooperation between *pB2* and promoter *p10* (*pB2p10*) showed potential interesting biotechnological properties for baculovirus vectors. A more exhaustive analysis of the *pB2* sequence determined the more active and essential region for its

promoter activity (fragment *pB2<sub>9</sub>*) in the context of the *AcMNPV* baculovirus. On the other hand, it has also been studied the implication of the co-expression of a second copy of transcriptional regulators IE1/IE0 in *AcMNPV*. This analysis was carried out by insertion of the *Ac-ie-01* cDNA, encoding for IE1/IE0, into the baculovirus genome. As a result, an early increase in cell number and in cell viability late after infection was observed with respect to those cells infected with a conventional baculovirus. Finally, the development of a baculovirus vector expression cassette, containing the cDNA *Ac-ie-01* and an enhancer sequence (*hr1*), operatively *cis*-linked to the *p10* promoter or to chimeric promoters containing *p10*, conferred a reduction of the characteristic proteolysis and aberrant forms frequently found in this expression system. All these properties conferred by the novel expression cassette increased the productivity yields of the baculovirus vector in around 4-fold with respect to a standard baculovirus vector. The expression cassette was successfully used for expression of a reporter protein (green fluorescence protein) and also for a vaccine antigen of commercial interest (the porcine *circovirus type 2 capsid protein*).

In conclusion, this novel cassette developed confers production capabilities not previously reached in the BEVS technology. The cell proliferation at early post-infection times and the increased cell viability in the final phase of infection resulted in an improved recombinant protein processing in insect cells. Similar properties have been also showed when using *T. ni* larvae in the production process. This expression cassette has been validated with a protein model, with commercial interest, able to form virus-like particles, achieving productivity increments of 4 times when using cells in culture, and of 2 times when using *T. ni* larvae as living biofactories, always comparing to the use of a conventional baculovirus expressing the same protein.

# ÍNDICE



# **I INTRODUCCIÓN ..... 1**

<b>I.1 Características generales de los baculovirus.....</b>	<b>3</b>
<b>I.2 Estructura vírica.....</b>	<b>4</b>
<b>I.3 Ciclo replicativo de los baculovirus.....</b>	<b>6</b>
I.3.1 Infección primaria.....	6
I.3.2 Infección secundaria.....	6
<b>I.4 Regulación de la transcripción en los baculovirus.....</b>	<b>8</b>
I.4.1 Expresión de genes tempranos.....	10
I.4.1.1 Elementos reguladores en <i>cis</i> de los genes tempranos.....	10
I.4.1.2 Elementos reguladores en <i>trans</i> de los genes tempranos.....	11
I.4.2 Expresión de genes tardíos y muy tardíos.....	15
I.4.2.1 Elementos reguladores en <i>cis</i> de los genes tardíos y muy tardíos.....	16
I.4.2.2 Elementos reguladores en <i>trans</i> de los genes tardíos y muy tardíos.....	16
<b>I.5 Regulación del ciclo celular y apoptosis.....</b>	<b>17</b>
<b>I.6 Replicación del DNA de los baculovirus.....</b>	<b>18</b>
<b>I.7 Papel de los baculovirus en la biotecnología.....</b>	<b>19</b>
I.7.1 El sistema BEVS.....	22
I.7.1.1 Desventajas del sistema BEVS.....	23
I.7.1.2 Insectos como factoría biológica.....	25

# **II OBJETIVOS ..... 27**

# **III MATERIALES Y MÉTODOS ..... 31**

<b>III.1 Materiales.....</b>	<b>33</b>
III.1.1 Sistema Bac-to-Bac®.....	33
III.1.2 Cepas bacterianas.....	33
III.1.3 Líneas celulares.....	34
III.1.4 Insectos.....	34
III.1.5 Vectores.....	34
III.1.6 Anticuerpos y fluoróforos.....	39
III.1.7 Medios de cultivo.....	39
III.1.8 Análisis bioinformático.....	40
<b>III.2 Métodos.....</b>	<b>41</b>
III.2.1 Crecimiento y mantenimiento de cultivos.....	41
III.2.1.1 Bacterias.....	41
III.2.1.2 Líneas celulares de insecto.....	41
III.2.2 Identificación de las hexamerinas en extractos de larvas.....	41
III.2.3 Extracción y caracterización de ácidos nucleicos.....	42

III.2.3.1	Extracción de DNA plasmídico de bacterias.....	42
III.2.3.2	Extracción de DNA de b́acmido.....	43
III.2.3.3	Extracción de RNA de larvas.....	43
III.2.3.4	Cuantificación del DNA y RNA.....	44
III.2.4	Digestiones enzimáticas.....	44
III.2.5	Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	44
III.2.6	Purificación de DNA desde geles de agarosa.....	45
III.2.7	Reacción de defosforilación y ligación de los vectores.....	45
III.2.8	Amplificación por PCR.....	45
III.2.9	PCR con transcripción inversa (RT-PCR).....	46
III.2.10	Obtención de células químicamente competentes por el método de cloruro de rubidio.....	47
III.2.11	Transformación de células competentes por choque térmico.....	47
III.2.12	Generación y amplificación de baculovirus recombinantes.....	48
III.2.12.1	Generación de los b́acmidos recombinantes.....	48
III.2.12.2	Obtención y amplificación de los baculovirus recombinantes.....	48
III.2.12.3	Titulación de los baculovirus recombinantes.....	49
III.2.12.4	Infección con los baculovirus recombinantes.....	49
III.2.12.4.1	Inoculación de larvas.....	49
III.2.12.4.2	Inoculación de células de insecto.....	49
III.2.13	Análisis y caracterización de las proteínas recombinantes.....	50
III.2.13.1	Procesado de las muestras.....	50
III.2.13.1.1	Obtención de los extractos proteicos de larvas.....	50
III.2.13.1.3	Obtención de los extractos proteicos de cultivos celulares.....	50
III.2.13.2	Determinación de la concentración de proteína total soluble.....	51
III.2.13.3	Electroforesis desnaturizante de proteínas (SDS-PAGE).....	51
III.2.13.4	Electrotransferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.....	52
III.2.13.5	Inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa. <i>Western blot</i> .....	52
III.2.13.6	Caracterización de la expresión de las proteínas recombinantes.....	53
III.2.13.6.1	Electroforesis automatizada.....	53
III.2.13.6.2	Análisis fluorimétrico.....	53
III.2.13.6.3	Análisis por citometría de flujo.....	53
III.2.13.6.4	Análisis cuantitativo por <i>western blot</i> .....	54
III.2.13.6.5	Microscopía óptica y de fluorescencia.....	54
III.2.13.6.6	Purificación de pseudopartículas virales o VLPs.....	54
III.2.13.6.7	Microscopía electrónica.....	55
III.2.13.7	Determinación del contenido de DNA por método fluorimétrico.....	55
III.2.13.8	Análisis del ciclo celular.....	55

## **IV RESULTADOS..... 57**

<b>IV.1</b>	<b>Determinación de la actividad promotora de elementos reguladores del lepidóptero</b>	
	<b><i>Trichoplusia ni</i> (<i>T. ni</i>) en AcMNPV</b>	<b>59</b>
IV.1.1	Caracterización funcional de la región 5´ de los genes <i>AJHSP-1</i> , <i>BJHSP-1</i> y <i>BJHSP-2</i> del lepidóptero <i>T. ni</i> en el sistema BEVS	59
IV.1.2	Análisis de las regiones esenciales para la actividad promotora de la secuencia <i>pB2</i> en AcMNPV	63
<b>IV.2</b>	<b>Generación de promotores híbridos (insecto-baculovirus) e influencia de la incorporación de un elemento <i>enhancer</i> en AcMNPV</b>	<b>66</b>
IV.2.1	Cooperación sinérgica entre la secuencia <i>pB2</i> y los promotores de baculovirus <i>polh</i> y <i>p10</i>	66
IV.2.2	Relevancia de la incorporación de una copia adicional de la región homóloga 1 ( <i>hr1</i> ) de AcMNPV	68
<b>IV.3</b>	<b>Caracterización funcional de los factores reguladores IE0 e IE1</b>	<b>69</b>
<b>IV.4</b>	<b>Combinación de elementos en <i>cis</i> y factores en <i>trans</i> en un casete de expresión para el baculovirus AcMNPV</b>	<b>73</b>
<b>IV.5</b>	<b>Caracterización del casete de expresión en un modelo <i>in vivo</i></b>	<b>84</b>
<b>IV.6</b>	<b>Expresión de la proteína de la cápsida (<i>cap</i>) del circovirus porcino tipo 2 (PCV2)</b>	<b>86</b>
<b>V</b>	<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>93</b>
<b>V.1</b>	<b>Caracterización de un nuevo promotor derivado del lepidóptero <i>T. ni</i> para su uso en el sistema BEVS</b>	<b>95</b>
<b>V.2</b>	<b>Desarrollo de un casete de expresión para mejorar la capacidad productiva del sistema BEVS</b>	<b>99</b>
V.2.1	Efecto <i>enhancer</i> de la secuencia <i>hr1</i>	99
V.2.2	Efecto de la co-expresión de una segunda copia de los factores transactivadores IE0 e IE1. Implicación en los resultados observados	100
V.2.2.1	Regulación de la muerte celular inducida por baculovirus. Implicaciones biotecnológicas	102
V.2.3	Configuración final del casete de expresión	103
<b>V.3</b>	<b>Validación del nuevo casete de expresión en un modelo de interés industrial para la producción de pseudopartículas víricas (<i>virus-like particles</i>; VLPs)</b>	<b>104</b>
<b>VI</b>	<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>107</b>
<b>VII</b>	<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>111</b>
<b>VIII</b>	<b><u>ANEXO I</u></b>	<b>143</b>
<b>IX</b>	<b><u>ANEXO II</u></b>	<b>157</b>

IX.1	Secuencias nucleotídicas .....	159
IX.2	Secuencias aminoacídicas .....	164
<b>X</b>	<b><u>PUBLICACIONES Y PATENTES</u></b> .....	<b>166</b>
X.1	Patentes no publicadas.....	170
X.2	Publicaciones sometidas.....	170
X.3	Publicaciones en preparación.....	171

# I INTRODUCCIÓN



## I.1 Características generales de los baculovirus

La familia *Baculoviridae* es un amplio grupo de virus DNA, de doble cadena circular superenrollada (80-180 kb), que solo infecta a los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* e *Himenoptera* [1]. El nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) fue el primer baculovirus en ser secuenciado [2] y se considera el arquetipo de la familia. Tiene un tamaño de 133.894 pb en las que se predicen 154 ORFs de más de 150 nucleótidos. Los baculovirus se caracterizan por la formación de una matriz proteica cristalina, denominada cuerpo de oclusión (CO), en la que se embebe un fenotipo determinado del virus. Tradicionalmente se han dividido, según la morfología de los COs, en dos géneros: los nucleopoliedrovirus (NPVs) y los granulovirus (GVs). Los primeros generan COs compuestos por la proteína poliedrina y, en función del número de nucleocápsidas (NCs) que englobe la envoltura, se subdividen en SNPVs, si solo presentan una (simples) o MNPVs si son varias (múltiples). Estos últimos se subdividen, a su vez, en dos grupos (I y II) en función de la filogenia molecular [3]. Los GVs generan COs formados por la proteína granulina y suelen contener un solo virión. A partir de la revisión taxonómica de la familia *Baculoviridae* realizada en el año 2006, se propuso una nueva división en función de las características biológicas, morfológicas y filogenéticas [4]. En la Tabla 1 se muestran los 61 baculovirus secuenciados hasta enero de 2014 [5].

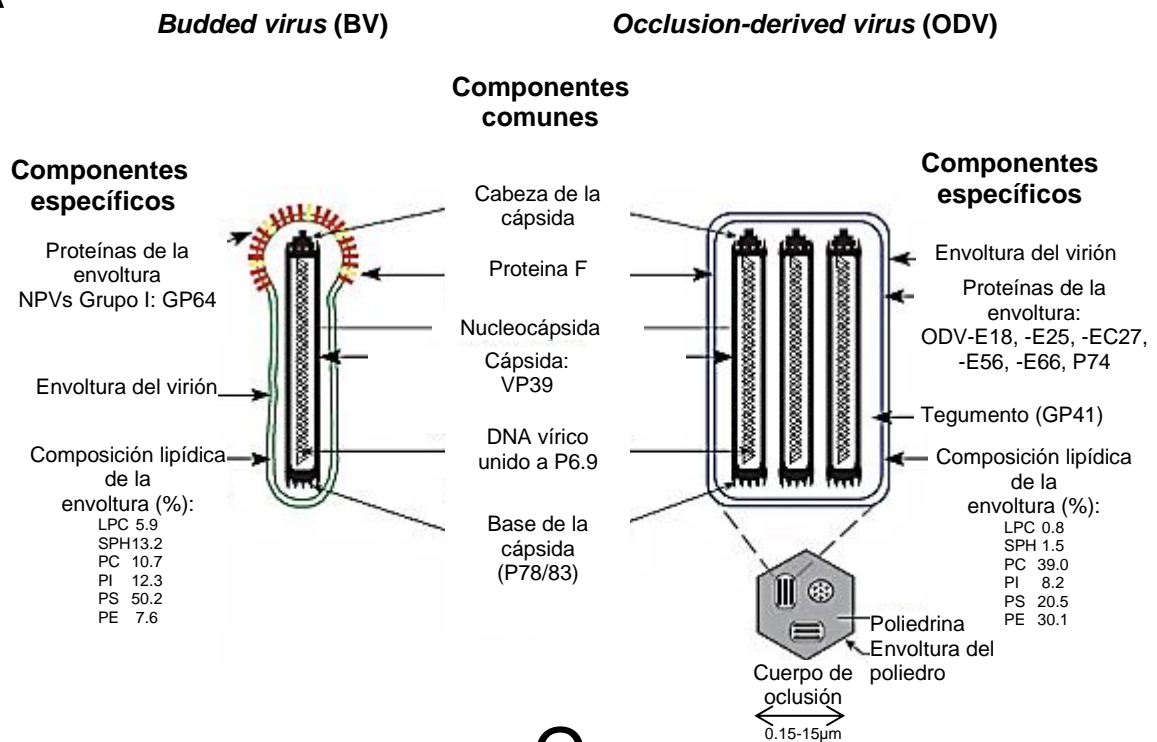
Familia	<i>Baculoviridae</i> (61)	Miembros
Género	<i>Alphabaculovirus</i> (42)	NPVs específicos de lepidópteros
	<i>Betabaculovirus</i> (15)	GVs específicos de lepidópteros
	<i>Gammabaculovirus</i> (3)	NPV específico de himenópteros
	<i>Deltabaculovirus</i> (1)	NPVs específicos de dípteros

Tabla 1. Estructura taxonómica y características principales de la familia *Baculoviridae*

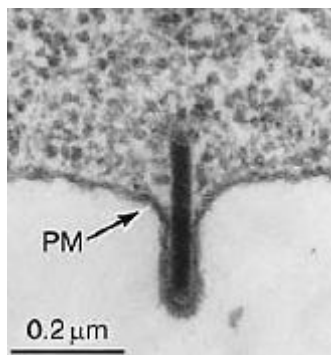
## I.2 Estructura vírica

Los baculovirus, a lo largo de su ciclo vital, presentan dos fenotipos diferenciados estructural y funcionalmente [6, 7]: el virión ODV (*occlusion-derived virus*) y el virión BV (*budded virus*) (Figura 1). Sin embargo, ambos son genotípicamente idénticos [8]. Los primeros constituyen una estructura de resistencia y son los responsables de la infección primaria en el insecto. Los segundos tienen como función la diseminación de la infección por el organismo. En cuanto al estudio proteómico de los fenotipos, la forma BV presenta 34 proteínas víricas asociadas, entre ellas la glicoproteína GP64, fundamental para la infección *in vitro* [9]. Por su parte, en el ODV se identifican 44 proteínas [10-14], no estando presente la proteína GP64 entre ellas, pero sí un grupo de proteínas denominadas PIFs (*per os infectivity factors*), imprescindibles para la infección *in vivo* [15]. En ambos fenotipos la proteína VP39 es la mayoritaria de la NC [16]. Al complejo formado por el DNA altamente condensado y la proteína P6.9 se le denomina núcleo de la NC [17].

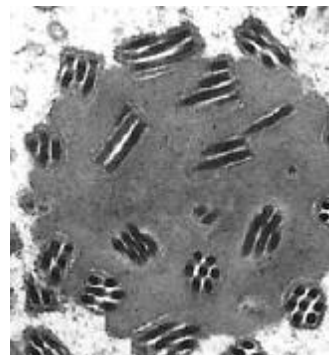
A



B



C



**Figura 1. Fenotipos de los viriones de baculovirus**

A) Representación esquemática de las principales características fenotípicas de los viriones de baculovirus (BV y ODV) donde: LPC, lisofosfatidilcolina; SPH, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina y PE, fosfatidiletanolamina. B) Microfotografía de microscopía electrónica de transmisión donde se aprecia la salida de un BV de una célula de insecto infectada por AcMNPV, adquiriendo la envoltura vírica a partir de la membrana plasmática (PM). C) Microfotografía de microscopía electrónica de transmisión de un CO de MNPV, observándose múltiples nucleocápsidas en un mismo virión. Figura tomada de la referencia [18].

## **I.3 Ciclo replicativo de los baculovirus**

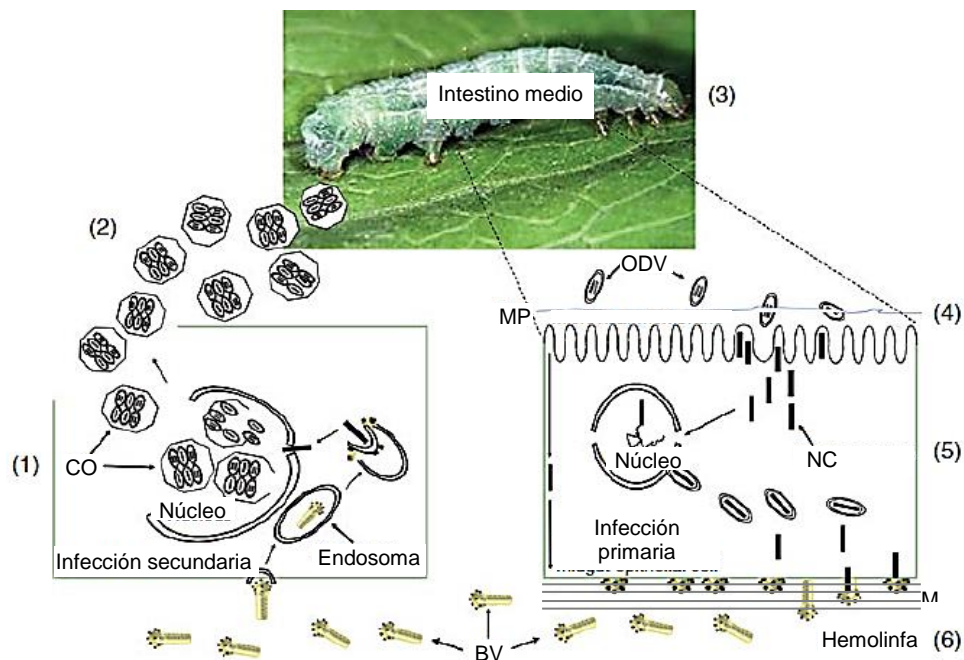
### **I.3.1 Infección primaria**

Los baculovirus presentan un ciclo replicativo bifásico, estrechamente relacionado con sus dos fenotipos. El ciclo natural de infección (Figura 2) comienza cuando una larva susceptible de ser infectada ingiere alimento contaminado con COs y éstos se disuelven en el ambiente alcalino del intestino medio, liberando los ODVs al lumen intestinal. Esta región del intestino, carente de cutícula, presenta una membrana, denominada peritrófica, capaz de bloquear en un primer momento el tránsito de los ODVs hacia las células del epitelio intestinal [19]. Sin embargo, mediante un mecanismo que parece estar ligado a la presencia de proteasas en el CO [20], los ODVs atraviesan esta barrera, y contactan con la membrana del epitelio intestinal, las NCs son transportadas al núcleo y, tras su decapsulación, se inicia la expresión de los genes víricos junto con la replicación del DNA vírico y el ensamblaje de las NCs de la progenie. Las nuevas NCs atraviesan la membrana nuclear y el citoplasma hasta llegar a la membrana plasmática, donde emergen ahora con el fenotipo BV y son liberadas al espacio extracelular, adquiriendo la envoltura. Para atravesar la lámina basal, última barrera frente a la infección generalizada, resulta crucial la proteína vírica vFGF, responsable del inicio de una cascada de eventos que abre la puerta a la diseminación del virus por todo el organismo [21].

### **I.3.2 Infección secundaria**

El BV entra en la célula principalmente por la vía endocítica dependiente de clatrina [22]. Las partículas víricas se internalizan y, mediante la fusión de la proteína GP64 con la membrana del endosoma tardío y en unas condiciones de pH ácido, se liberan las NCs desnudas al citoplasma [23]. Estas son transportadas al núcleo por un mecanismo de polimerización de actina [24] y entran en él a través de los poros nucleares [25]. Una vez allí, tiene lugar la transcripción y replicación del DNA vírico y, finalmente, una nueva progenie de NCs es ensamblada. Por un proceso todavía no dilucidado, las NCs generadas hasta el cese de la replicación del DNA formarán BVs, y se dirigirán hacia la membrana plasmática mientras que,

pasado ese momento, serán retenidas en el núcleo de la célula para conformar la nueva progenie de ODVs, que se embeberá en una matriz proteica cristalina (CO). La gran producción de CO resulta de la hiperexpresión de los genes muy tardíos *p10* y *poliedrina*, los cuales son esenciales para la infección *in vivo*, pero dispensables para la infección de cultivos celulares. Tras la muerte y licuefacción de la larva, estas nuevas estructuras de resistencia serán liberadas al ambiente, donde permanecerán hasta ser ingeridas por un nuevo hospedador. Mediante un estudio de cuantificación del DNA vírico por RT-PCR en células infectadas, se determinó que en una célula son 2.000 NCs las destinadas a generar BV, mientras que el número de copias de genoma que permanecen en el núcleo asciende a 84.000 [26].

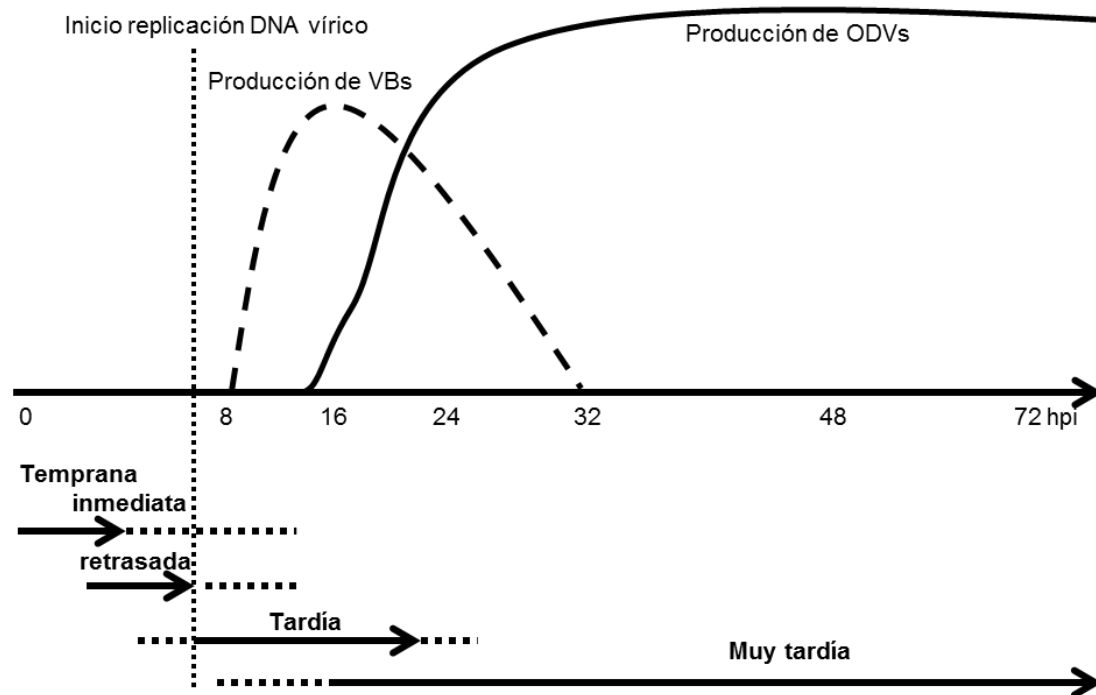


**Figura 2. Representación esquemática del ciclo infeccioso de los baculovirus**

Los baculovirus tienen un ciclo de vida bifásico, donde los dos fenotipos del virus se encargan de la transmisión horizontal y vertical. La infección entre hospedadores la realiza el fenotipo ODV, ocluido en el CO durante la fase tardía de la infección (1). Los COs persisten en la naturaleza hasta ser ingeridos por una larva (2). Los COs se disuelven en el ambiente alcalino del intestino medio de la larva (3). A continuación los ODVs traspasan la PM e infectan las células del epitelio intestinal (4). Las NC son transportadas al núcleo y comienza la replicación (5). Las células epiteliales infectadas producen la forma BV del virus que, a través del sistema traqueal y la hemolinfa, disemina la infección por el hospedador (6). ODV, *occlusion-derived virus*; BV, *budded virus*; CO, cuerpo de oclusión; NC, nucleocápsida; MP, membrana peritrófica; MB, membrana basal. Figura tomada de la referencia [27].

## I.4 Regulación de la transcripción en los baculovirus

En el baculovirus *AcMNPV*, objeto de estudio en esta tesis, la expresión de genes ocurre de forma secuencial en cuatro fases [28]: temprana-inmediata (0-6 horas posinfección, hpi), temprana-retrasada (3-6 hpi), tardía (6-24 hpi) y muy tardía (15-72 hpi) (Figura 3).

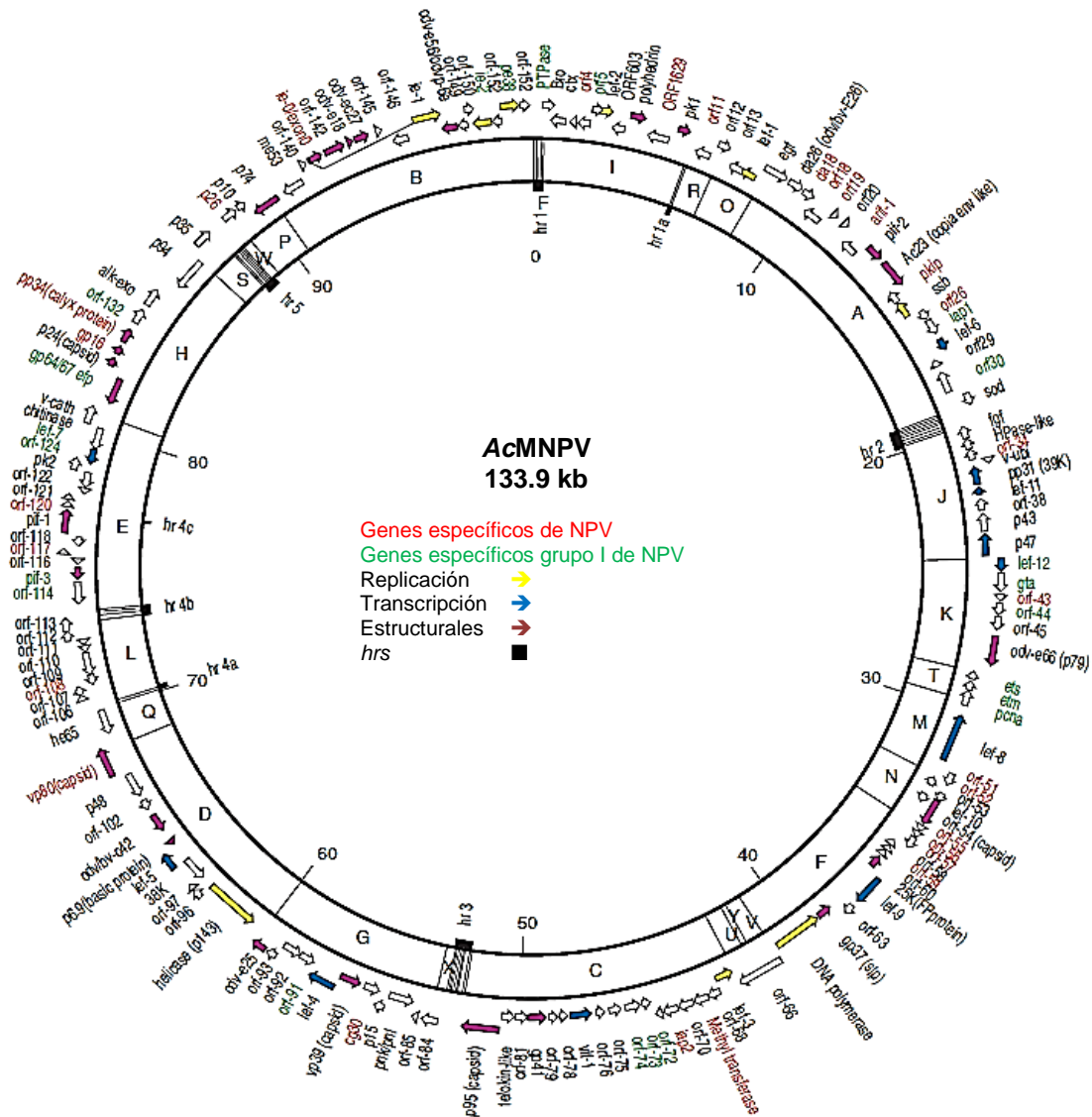


**Figura 3. Fases de la expresión génica en *AcMNPV***

Figura realizada a partir de las referencias [28-30].

Una particularidad de esta familia vírica es que la transcripción de los genes tempranos (inmediatos y retrasados) tiene lugar por medio de la maquinaria transcripcional celular [31], mientras que los genes tardíos y muy tardíos son transcritos por una RNA polimerasa II sintetizada por el virus [32]. Esta última es resistente a  $\alpha$ -amanitina [33] y está compuesta por multisubunidades codificadas por los genes *p47*, *lef-4*, *lef-8* y *lef-9* [34]. Transcurridas las primeras 6-8 hpi comienza la transcripción de los genes tardíos, junto con la replicación del DNA vírico y la producción de las formas BV, mientras que la transcripción de los genes muy tardíos (*p10* y *poliedrina*) se inicia a las 16 hpi, siendo los niveles de mRNA muy elevados en este último período [35]. El genoma del baculovirus no presenta una disposición

espacial particular de los genes que se expresan en un mismo período de tiempo, distribuyéndose éstos de manera aleatoria (Figura 4).



**Figura 4. Mapa genómico del baculovirus tipo AcMNPV**

Se muestran los 154 ORFs que codifican para proteínas de un tamaño igual o superior a 50 aa. Los diferentes grupos funcionales de genes se representan con flechas de colores (los involucrados en la replicación, la transcripción o los genes estructurales). Los genes específicos de NPVs se muestran escritos en rojo y los específicos del grupo I de NPV en verde. El círculo interno representa el mapa de restricción de la cepa C6 de AcMNPV al ser digerido con la enzima *EcoRI* (fragmentos A-W). La localización de las regiones homólogas repetidas *hrs* (que contienen diversos lugares de restricción *EcoRI*) se identifican en el mapa con el siguiente símbolo (■). Figura modificada de la referencia [36].

### I.4.1 Expresión de genes tempranos

La transcripción de los genes de expresión temprana se mantiene hasta el inicio de la replicación del DNA vírico. Los genes tempranos se pueden diferenciar en dos tipos: los tempranos-inmediatos (*ie*; *immediate-early*) y los tempranos-retrasados. Estos últimos dependen de proteínas codificadas por los primeros para poder ser activados. Los productos de los genes tempranos son proteínas multifuncionales implicadas en la replicación del DNA vírico y en la transcripción de los genes tardíos, e interaccionan con otras proteínas víricas y celulares.

#### I.4.1.1 Elementos reguladores en *cis* de los genes tempranos

La mayoría de los promotores de los genes tempranos de AcMNPV contienen elementos relacionados con los promotores de su hospedador. Un ejemplo es el motivo TATA, que puede realizar la función de iniciador y que en los baculovirus se asocia con el sentido del lugar de comienzo de la transcripción y el control de su tasa de iniciación. Otro elemento común entre los genes tempranos es la secuencia consenso de inicio de la transcripción CAGT, que además facilita y estabiliza el ensamblaje del complejo transcripcional [37].

En el genoma de los miembros de la familia *Baculoviridae* se observa la presencia de regiones ricas en AT, entre las que destacan las denominadas *hrs* (*homologous repeated sequences*), que contienen secuencias semipalindrómicas repetidas [38]. En AcMNPV las *hrs* se componen de unidades de unas 70 pb repetidas en tándem, cuya región central alberga un semipalíndromo de 28 pb caracterizado por contener una diana *EcoRI* [39]. Se han identificado 8 regiones (nº acceso GenBank: L22858.1) que contienen de 2 a 8 repeticiones de esta unidad (*hr1*, *hr1a*, *hr2*, *hr3*, *hr4a*, *hr4b*, *hr4c* y *hr5*) (Figura 4). Su principal función es la de actuar como origen de replicación del DNA vírico, determinada mediante ensayos de replicación transitoria [40], pero también se ha vinculado a estas secuencias con la estabilización del genoma del virus [41]. Además, son intensificadores (*enhancers*) de la transcripción de los genes tempranos (*39k*, *ie2*, *p143* y *p35*) [42-44] de manera independiente a su orientación y posición respecto al promotor [38, 43, 45], y esta función resulta potenciada, a su vez, por la interacción con el producto del gen vírico

*ie1* [38, 46, 47] o con factores celulares [48, 49]. Con respecto a este último punto, se han localizado secuencias internas de elementos de respuesta CRE y TRE, responsables del anclaje de factores celulares a las *hrs* y de la activación de la transcripción en ensayos de transcripción transitoria [50].

#### **I.4.1.2 Elementos reguladores en *trans* de los genes tempranos**

En AcMNPV, los productos de los genes tempranos-inmediatos regulan la transcripción de los genes tempranos-retrasados y de los tardíos. Son cinco las proteínas codificadas por estos genes: IE1, IE0, IE2, PE58 y ME53.

##### **IE1**

La principal proteína reguladora de la transcripción, y también la más estudiada, es la fosfoproteína IE1 [51], muy conservada entre los *Alfabadulovirus* [52]. Tiene un peso molecular de 66,9 kDa (582 aa) y en ella se pueden diferenciar distintos motivos funcionales (Figura 5A). En el extremo amino terminal se localiza un dominio involucrado en la replicación del DNA vírico [53] y la fosforilación (dominio de replicación, R; 2-23 aa) [54]. A continuación, presenta dos motivos ácidos responsables de la activación transcripcional: el dominio ácido de activación (DAA; 8-118 aa), que comparte características con los motivos GAL4 (levadura) y VP16 (HSV) [46, 55], y el dominio ácido (DA; 168-222 aa). Intercalado entre ambos se halla un pequeño dominio básico, denominado dominio básico I (DBI; 152-161 aa), cuya función se asocia con la unión al DNA, y resulta crucial tanto para la activación transcripcional dependiente de la unión a *hr* como de forma independiente a ésta [46, 56-58]. En el extremo carboxilo terminal se encuentra un segundo dominio básico (BDII; 534-538 aa), implicado en la localización nuclear de la proteína [56]. Finalmente, el dominio hélice-bucle-hélice (HBH; 543-568 aa) media la oligomerización necesaria para la función de activación transcripcional [59-61]. La transcripción del gen *ie1* es muy temprana (15-30 minutos), pero además, sus transcritos se detectan hasta la fase tardía [62], por lo que la acumulación de la proteína se prolonga hasta tiempos muy tardíos de la infección [63].

La proteína IE1 presenta características multifuncionales, ya que es capaz de activar la expresión de genes tempranos (*p35*, *p143*, *he65*, *gp64* y *39K*) y tardíos

[64] del baculovirus mediante la interacción específica con la secuencia central de las *hrs* [59, 60] o de forma independiente a éstas [56]. Además, inhibe la expresión de los genes *ie0*, *ie2* y *pe38* [65, 66]. El promotor del gen *ie1* es estimulado por los productos de estos tres últimos genes (IE0, IE2 y PE38) y por la propia proteína IE1 [65, 67-70]. Asimismo, su compleja regulación aumenta en otros miembros de esta familia vírica, como en el nucleopoliedrovirus de *Bombix mori* (*BmNPV*), donde su expresión está afectada por la hormona ecdisona [71] y por la hormona juvenil [72]. Además de su rol como regulador transcripcional, la proteína IE1 presenta un papel clave en la replicación del genoma vírico [53, 73, 74], como se comentará más adelante.

## IE0

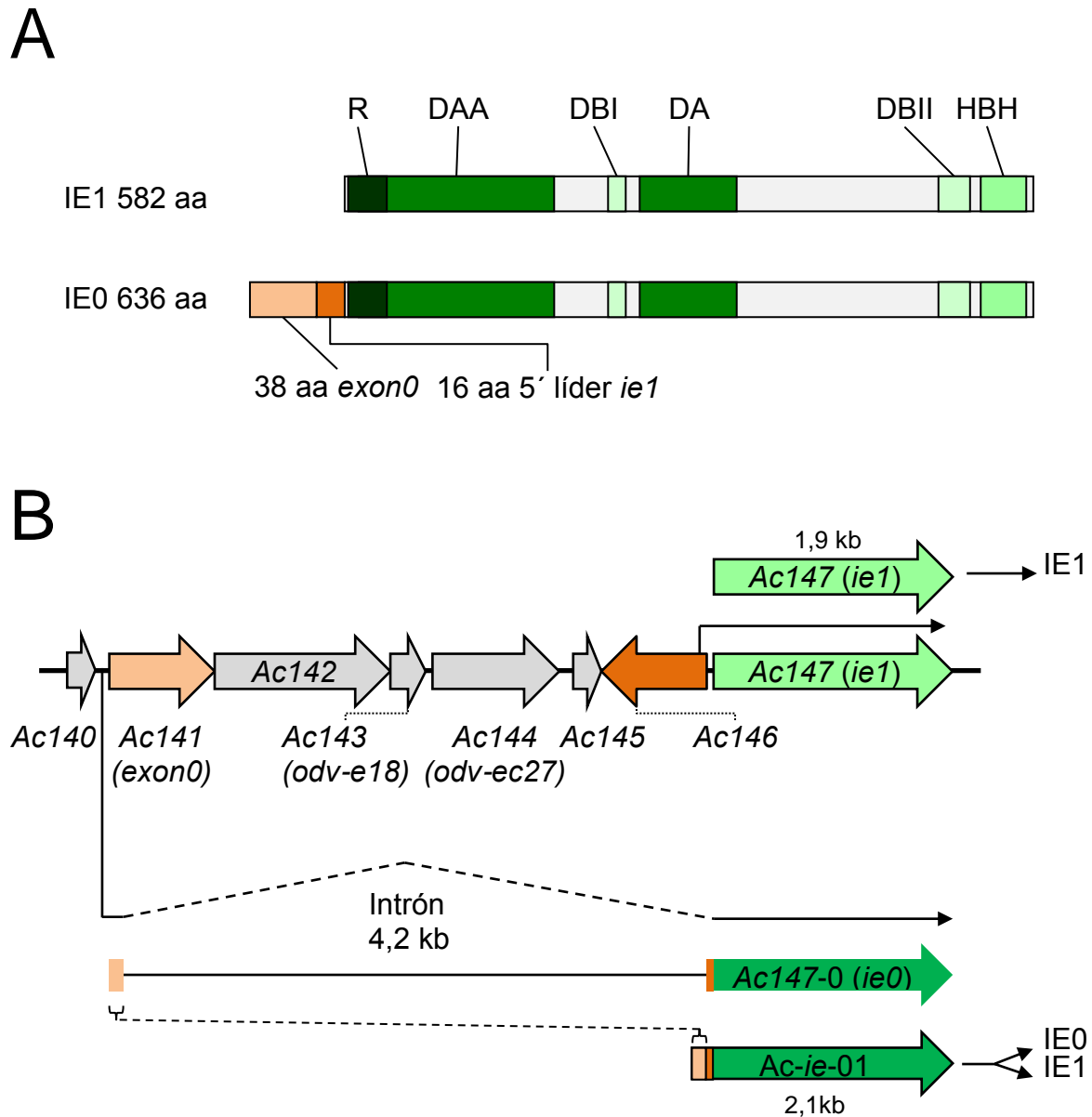
La proteína reguladora IE0, de un peso molecular de 72 kDa (636 aa), tiene una composición aminoacídica idéntica a la de la proteína IE1 salvo por la presencia de 54 aa adicionales en el extremo amino terminal, por lo que presenta al menos los mismos motivos estructurales que la proteína IE1 (Figura 5A). IE0 resulta del proceso de corte y empalme de parte del gen *exon0* (38 aa) al extremo 5' de la región no traducida del mRNA del gen *ie1* (16 aa), más la secuencia aminoacídica completa de IE1 (582 aa) [62, 75] (Figura 5B). Recientemente, se ha documentado la existencia en *AcMNPV* de 12 genes que sufren esta misma maduración de mRNA [76], aportando nuevos datos sobre lo que se creía un proceso raro en los baculovirus [37].

En la secuencia de mRNA del gen *ie0* está presente la señal de inicio de la proteína IE1, por lo que la traducción del transcrito correspondiente al cDNA de este gen (*Ac-ie-01*) conlleva la expresión de los dos factores, IE0 e IE1. Durante la fase temprana de la infección se observa la presencia de un transcrito de 1,9 kb y el correspondiente al proceso de corte y empalme de 2,1 kb [75] (Figura 5B). En el virus silvestre, la expresión del gen *ie0* ocurre muy temprano y alcanza su pico máximo a las 4 hpi. A partir de este punto desciende paulatinamente a un nivel basal, al contrario que IE1 [62]. La relación entre la cantidad de las proteínas IE0 e IE1 varía a lo largo del tiempo, siendo IE0 la principal durante las primeras 4 hpi e IE1 a partir de ese momento [63], esta variación repercute en la formación de homodímeros y heterodímeros [69]. Mientras que en *OpMNPV* estos factores tan

solo están asociados al fenotipo BV [77, 78], en AcMNPV lo están solo a ODV [11, 78].

Los 54 aa adicionales que la proteína IE0 tiene respecto a la proteína IE1 le confieren nuevas propiedades respecto a las propuestas para IE1, tanto en AcMNPV [65], como en el nucleopoliedrovirus múltiple de *Lymantria dispar* (LdMNPV) [79] o en OpMNPV [80]. En AcMNPV, la proteína IE0 solo tiene capacidad de transactivar genes tempranos, entre ellos *ie1*, mediante un mecanismo dependiente de unión a *hrs*. Sin embargo, esta proteína no autorregula su expresión ni modula negativamente otros genes [65]. En ensayos de expresión transitoria y de virus recombinantes se ha visto que los factores IE0 e IE1 estimulan la expresión de genes tardíos y muy tardíos [63, 81], y ambos pueden activar la transcripción de genes en células de mamífero al ser funcional el dominio DAA en estas células [82]. Mediante la construcción de virus recombinantes (AcMNPV) en los que se ha deletado o bloqueado (*knockout*) el gen *ie0/ie1* para generar baculovirus que solo expresen IE0 o IE1 [81], se ha observado que en ausencia de IE1 los niveles de IE0 mantienen un incremento sostenido hasta tiempos muy tardíos de la infección. Tanto si solo se expresa IE0 como si se co-expresan ambos factores (IE0 e IE1), se observa un incremento de la proteína antiapoptótica p35 a tiempos tardíos de la infección [81]. Sin embargo, IE1 es una causa potencial, bien de forma directa o indirecta (mediante la inducción del inicio de la replicación), de la inducción de apoptosis en células infectadas por baculovirus [83].

La importancia de ambos factores y la posibilidad de realizar una variación temporal y cuantitativa de su expresión mediante la sobreexpresión del cDNA que los codifica, *Ac-ie-01*, hacen de este gen un candidato idóneo para su estudio en el campo de la producción de proteínas recombinantes en baculovirus.



**Figura 5. Representación de los dominios funcionales de los factores IE0 e IE1 y del locus del gen *ie0/ie1* del baculovirus *AcMNPV***

Representación de los dominios funcionales de los factores IE0 e IE1 (A). La proteína IE0 tan solo difiere de IE1 en 54 aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal. R: dominio de replicación; DAA: dominio ácido de activación; DBI: dominio básico I; DA: dominio ácido; DBII: dominio básico II; HBH: dominio hélice-bucle-hélice. Mapa esquemático del locus génico *ie0/ie1* (B). El proceso de corte y empalme del mRNA de *ie0* abarca desde la región 5' de *Ac141* (*exon0*) al extremo 5' de la región no traducida del mRNA de *ie1*. Además, en la secuencia de mRNA del gen *ie0* está presente la señal de inicio de la proteína IE1, por lo que la traducción del cDNA de este gen (*Ac-ie-01*) conlleva la expresión de los dos factores, IE0 e IE1. Como resultado, se observa la presencia de un transcrito de 1,9 kb y el correspondiente al proceso de corte y empalme de 2,1 kb, que codifican para ambas proteínas (IE1 e IE0).

**IE2**

La proteína IE2, de 47 kDa (408 aa), es otro de los reguladores transcripcionales descritos en AcMNPV. Presenta un motivo estructural de dedo de zinc y, en ensayos de expresión transitoria en la línea celular Sf21, se ha relacionado con el cese del ciclo celular en la fase S [84]. Además, incrementa la expresión de IE1, y por ello estimula indirectamente la transcripción de genes susceptibles de ser transactivados por IE1 [51, 67, 85]. También estimula la expresión de IE0 y es capaz de autorregular su promotor [44]. En células de mamífero se ha visto que es un activador transcripcional fuerte del promotor inmediatamente temprano principal del citomegalovirus humano (CMV) [86].

**ME53**

La proteína ME53, de 52,6 kDa (449 aa), contiene un motivo estructural de dedo de zinc. Inicialmente fue caracterizada como un transcrito temprano principal [87], pero apenas se conoce su función. Se trata de una proteína asociada a BV y ODV e involucrada tanto en la fase inicial como en la tardía de la infección [88].

**PE38**

La proteína PE38, de 37,4 kDa (321 aa), contiene motivos estructurales de dedo de zinc y cremallera de leucina [89]. Su actividad es determinante para la transactivación de los genes *lef-3*, *DNA-pol*, *he65* y *lef-11* [90], *p143* [67] y *gp64* [91].

Además de estas cinco proteínas (IE1, IE0, IE2, PE58 y ME53), la proteína de 6,7 kDa (58 aa) codificada por la *ORF121* presenta función de activador transcripcional de algunos genes tempranos de forma similar a como lo hace la proteína IE2 [92].

**I.4.2 Expresión de genes tardíos y muy tardíos**

Como ya se ha comentado, la distinción entre la transcripción de los genes tempranos y los genes tardíos está marcada por el inicio de la replicación del genoma vírico ( $\approx 6$  hpi). La fase tardía de la infección se puede dividir a su vez en tardía (6-24 hpi) y muy tardía (15-76 hpi). En la primera se desarrolla la producción

de proteínas estructurales necesarias para el ensamblaje del virión y su liberación, mientras que en la segunda, los viriones se ocluyen en una matriz formada por las proteínas poliedrina y P10, que en este momento se producen en gran cantidad. La enzima responsable de llevar a cabo la transcripción de estos genes es la RNA polimerasa II, codificada por el propio virus, de características únicas entre los virus DNA que replican en el núcleo [93, 94] y que se detallarán más adelante. Al igual que en la fase temprana, una serie de elementos reguladores en *cis* y en *trans* realizan funciones esenciales en la replicación del DNA y la expresión de genes tardíos y muy tardíos.

#### **I.4.2.1 Elementos reguladores en *cis* de los genes tardíos y muy tardíos**

La mayoría de los promotores de los genes tardíos y muy tardíos tienen un motivo conservado (TAAG) que determina el inicio de la transcripción [95, 96]. Asimismo, los genes muy tardíos contienen una secuencia reguladora denominada *burst*, situada entre el promotor y el lugar de inicio de traducción, responsable de sus altos niveles de expresión [97].

#### **I.4.2.2 Elementos reguladores en *trans* de los genes tardíos y muy tardíos**

Los productos de diecinueve genes tempranos, denominados genéricamente *LEFs* (*late expression factors*), son esenciales para la transcripción de los genes tardíos y muy tardíos [98-101]. Sus funciones se relacionan con la replicación del DNA vírico, el reconocimiento de las secuencias promotoras y la estabilización de los transcritos.

En la actualidad, el papel de muchos de los factores reguladores de genes tardíos y muy tardíos no está completamente dilucidado. Entre los LEFs, destaca la proteína VLF-1, de 44,4 kDa (379 aa), como principal factor regulador de los genes muy tardíos [95]. Está presente en ambos fenotipos (BV y ODV) y se une a la secuencia *burst* de los promotores muy tardíos [97, 102] y las secuencias *hrs* del genoma del baculovirus [103]. Además, juega un papel esencial en el empaquetamiento del genoma y el ensamblaje de la cápsida del baculovirus [104,

105]. La predicción de su secuencia aminoacídica reveló la existencia de un dominio conservado relacionado con la familia de las lambda integrasas [106, 107].

Otros ejemplos de LEFs son: la proteína LEF-5, de 31 kDa (265 aa), homóloga del factor de elongación TFIIIS [108] pero que funcionalmente actúa como factor de iniciación en lugar de la elongación [109]. La proteína LEF-6, de 20,4 kDa (173 aa), no es esencial para la replicación ni para la transcripción de genes tardíos, pero su ausencia retrasa el inicio de la transcripción de éstos genes [110]. LEF-10 es una proteína de 8,6 kDa (78 aa), necesaria para la expresión de genes tardíos [111]. LEF-12 (21,1 kDa; 181 aa) es necesaria para la transcripción de genes tardíos cuando el hospedador es *Spodoptera frugiperda* (*S. frugiperda*) pero no cuando es *Trichoplusia ni* (*T. ni*) [98]. La proteína PP31, también denominada 39K, de 21,1 kDa (181 aa) [112] estimula la expresión de genes tardíos [113], mientras que su delección hace descender el nivel de transcripción de 6 genes tardíos [114]. LEF-2 también parece estar involucrada en la expresión de los genes muy tardíos [115]. Asimismo, se ha descrito la influencia de la proteína PK-1 (32 kDa; 272 aa) sobre la expresión de los genes muy tardíos [116] ya que parece formar parte del complejo de iniciación de la transcripción de estos genes [117].

Además, se han identificado otros factores con posible función reguladora de los genes tardíos, como IE0 [63], IE1 [118] y FP25K [119].

## **I.5 Regulación del ciclo celular y apoptosis**

El ciclo celular conlleva una serie de eventos encaminados al crecimiento de la célula y su división. Las células quiescentes se consideran en fase G<sub>0</sub>, mientras que las que se están dividiendo se pueden clasificar en cuatro estados diferentes: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M. En el estado G<sub>1</sub> la célula crece en tamaño y se prepara para la síntesis de DNA, hecho que ocurrirá en la fase S. En la fase G<sub>2</sub> la célula sigue creciendo y se prepara para la división que acontecerá en la fase M. Muchos virus son capaces de alterar el ciclo celular para su beneficio con el objetivo de mejorar la replicación vírica [120]. Un ejemplo es el baculovirus AcMNPV, capaz de detener el ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M o S [30, 121].

La replicación del DNA vírico desencadena la apoptosis inducida por el virus y el cese de la síntesis proteica celular [122-126]. Los baculovirus codifican para distintos productos con actividad antiapoptótica, así, en células Sf21 infectadas con AcMNPV, la expresión de la proteína P35 provoca la supresión de la respuesta apoptótica celular debida a la infección y permite completar el ciclo de replicación vírica [127]. Esta proteína es un inhibidor de diversas caspasas efectoras como CED-3 (*Caenorhabditis elegans*), DrICE (*Drosophila melanogaster*), Sf-caspasa-1 (*Spodoptera frugiperda*) y las caspasas 1, 3, 6, 7, 8 y 10 de mamíferos [128, 129]. Por su parte, en el baculovirus de *Spodoptera littoralis* (SNPV) se ha caracterizado la proteína P49 [130] que, a diferencia de P35, muestra actividad inhibidora de caspasas efectoras e iniciadoras [131]. Asimismo, existe una familia de proteínas, denominadas IAPs (*Inhibitor of Apoptosis*), relacionadas funcionalmente con la regulación de la actividad caspasa, la división y las rutas de supervivencia celular [132]. Originalmente fueron descritas en el baculovirus de *Cydia pomonella* (CpGV) [133], pero hoy en día se han identificado en levaduras, nematodos, insectos y mamíferos [134]. Todas ellas se caracterizan por contener de una a tres copias del dominio de 70 aa denominado BIR (*Baculovirus IAP Repeat*) [135].

## **I.6 Replicación del DNA de los baculovirus**

A lo largo del genoma se distribuyen una serie de regiones que contienen repeticiones directas ricas en AT [136], que en ensayos de replicación transitoria actúan como orígenes de replicación del DNA vírico. Un ejemplo son las ya mencionadas *hrs* [40], pero además esta actividad también ha sido vista en los promotores de genes tempranos [137, 138]. Son seis las proteínas esenciales para la replicación del DNA vírico: DNApol [139], P143 (helicasa) [140], LEF-1 y LEF-2 [141], LEF-3 [142] e IE1 [54]. Además, se han descrito una serie de factores estimuladores de la replicación: DBP [143], LEF-11 [99], ME53 [144], LEF-7 [145], PCNA [146], P35 [147], IE2 [85] y PE-38 [67, 73, 99].

## I.7 Papel de los baculovirus en la biotecnología

La demanda de proteínas recombinantes, por parte de la industria farmacéutica y de la investigación académica, se ha incrementado de manera notoria en los últimos años. Los procesos industriales para obtener una proteína de alta calidad tienen que ser muy productivos, robustos y tener un reducido coste de producción [148]. Para abastecer al mercado se han desarrollado diferentes plataformas de producción [149] (Tabla 2) en función de las características fisicoquímicas de la proteína, del rendimiento del proceso o de consideraciones meramente económicas [150, 151].

	<i>E. coli</i>	Levaduras	Células de mamíferos	Células de insecto	Insecto	Plantas
Coste producción	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Bajo	Bajo
Bioseguridad	++	++	+	++	++	++
Versatilidad	+	+	++	+++	+++	+
Transformación de los productos	+	+	++	++	++	--
Endotoxinas	+	-	-	-	-	-
Escalado de producción	+++	+++	+	+	+++	+++
Glicosilación	-	+	+++	++	++	+
Fosforilación	-	+	++	++	++	+
Acilación	-	+	+	+	+	+
Amidación	-	-	+	+	+	-
Proteólisis	+/-	+/-	+	+	+	+
Plegamiento	+/-	+/-	+++	++	++	+
Secreción	+/-	+	++	++	++	+/-

**Tabla 2. Características de los principales sistemas de expresión**  
Adaptado de la referencia [152].

Los sistemas de cultivo de células procariotas son fáciles de mantener y manipular, siendo en cambio incapaces de realizar las modificaciones postraduccionales que requieren las proteínas eucariotas. Por su parte, los sistemas de cultivo de células eucariotas generalmente producen proteínas correctamente plegadas y solubles, pero sus tiempos de desarrollo suelen ser superiores y, en el caso de células de mamífero, requieren equipos más sofisticados, costosos y pueden demandar mayores controles de seguridad biológica.

Durante las tres últimas décadas los sistemas eucariotas se han convertido en la opción preferente para múltiples aplicaciones biomédicas. Entre ellos, destacan los baculovirus como vectores de expresión de proteínas recombinantes en células de insecto, BEVS (*Baculovirus Expression Vector System*) [153]. El desarrollo del sistema BEVS ha evolucionado [154] hasta llegar a convertirse en una herramienta robusta y versátil [153], capaz de expresar múltiples genes [155], lo que permite generar productos como VLPs complejas [156] o anticuerpos [157, 158].

Las modificaciones postraduccionales, muy semejantes a las células de mamífero, el tiempo reducido de desarrollo del producto y el fácil escalado de la producción [159], son algunas de las características de este sistema que han llamado la atención de la industria biotecnológica y farmacéutica, que en los últimos años la han adoptado de manera genérica como plataforma de obtención de proteínas recombinantes. Además, el poder transducir células de mamífero, de aves y de peces y no replicar en ellas [160-163], ha permitido extender su aplicación a campos como la terapia génica [27, 164-167] o las terapias vacunales [168, 169]. Las ventajas de esta tecnología para la industria se están viendo reflejadas en un incremento de los productos en fase de evaluación o ya aprobados por la Agencia Europea del Medicamento (EMA; *European Medicines Agency*) o por la Agencia Americana de Alimentos y Medicamentos (FDA; *Food and Drug Administration*) (Tabla 3).

FASE CLÍNICA				
DENOMINACIÓN	AGENTE ETIOLÓGICO	COMPAÑÍA/INSTITUCIÓN	FASE	REF
PanBlok®	Influenza H5N1	Protein Sciences Corporation	III	[170]
FluNhance®	Influenza (NA)	Protein Sciences Corporation	II	[171]
SARS (D3252)®	Coronavirus	Protein Sciences Corporation	I	[171]
	Virus respiratorio sincitial	Novavax, Inc	I	[172]
	Influenza A/California/04/09 (H1N1) HA, NA	Novavax, Inc	II	[173, 174]
	Influenza A/Indonesia/05/05 (H5N1) HA, NA	Novavax, Inc	I-II	[175]
	Influenza A/Brisbane/59/07 (H1N1), A/Brisbane/10/07, B/Florida/04/06 (H3N2) HA, NA	Novavax, Inc	II	[176]
Chimigen®	Hepatitis B y C crónica	Akshaya Bio Inc	I	[177]
Diamyd®	Diabetes tipo I (GAD)	Diamyd Medical AB	III	[178]
	Norovirus	LigoCyte Pharmaceuticals	I-II	[179]
	Norovirus	Baylor College of Medicine	I	[180]
	Hepatitis E (ORF2)	GlaxoSmithKline	II	[181]
ASP7374	Influenza A/H1N1, A/H3N2 y B	Astellas Pharma Inc/UMN Pharma Inc	III	[182]
VAI-VP705	Parvovirus B-19	NIH/ Meridian Life Sciences	I-II	[183]
APROBADOS				
DENOMINACIÓN	PATOLOGÍA	COMPAÑÍA	ANTÍGENO Aplicación	REF.
Cervarix®	Cáncer cuello útero	GlaxoSmithKline	L1	[184]
Ingelvac® Circoflex	Circovirus porcino 2	Boehringer Ingelheim	ORF2	[185]
Porcilis® PCV	Circovirus porcino 2	Merk	ORF2	[186]
Circumvent PCV®	Circovirus porcino 2	Intervet/ Schering-Plough's	ORF2	[187]
Porcilis® Pesti®	Peste porcina clásica	Merk	E2	[188]
Provenge®	Cáncer de próstata	Dendreon Corporation	PSA	[189]
Glybera®	Deficiencia de la lipoproteína lipasa	AMT; UniQure	Terapia génica	[190, 191]
FluBlok®	Influenza humano	Protein Sciences Corporation	Influenza trivalente	[192]
Virvagen® omega <sup>†</sup>	Parvovirus canina, virus de la leucemia felina y de la inmunodeficiencia felina	Virbac	Interferón omega felino	[193]

**Tabla 3. Relación de productos en fase clínica o aprobados por EMA o FDA**  
Adaptado de las referencias [194-196]. <sup>†</sup> Producido en larvas del lepidóptero *B. mori*.

### I.7.1 El sistema BEVS

El sistema BEVS está compuesto por dos elementos: el hospedador, donde replica el virus y se genera el producto recombinante, y el baculovirus, en cuyo genoma se inserta el gen de interés.

En cuanto al hospedador, las líneas celulares más empleadas en el sistema BEVS derivan del lepidóptero *S. frugiperda* [la línea Sf21 (IPLB-SF21-AE) y su aislado clonal Sf9 (IPLB-SF9)] y del lepidóptero *T. ni*, [la línea Tn-5 [BTI TN5B1-4, comercializada como High Five™ (Invitrogen, EE.UU.)]. El interés por incrementar el nivel de expresión de la proteína recombinante ha servido para la generación y validación de nuevas líneas celulares [197-200], entre ellas las derivadas del clon Sf9 *expresSF+* (Protein Sciences Corp., EE.UU.) y *SuperSf9* (Oxford Expression Technologies, Reino Unido), y las derivadas de la línea Tn-5: la línea QB-Tn9-4s [201], la línea QAU-BTI-Tn9-4s [202] o la línea BTI-TnAo38 [203].

El baculovirus de uso más habitual es *AcMNPV*, aunque se han desarrollado sistemas con *BmNPV* [204] o con el nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (*SeNPV*) [205].

En la fase tardía de la infección, los baculovirus expresan dos proteínas de manera muy abundante (poliedrina y P10), ambas no esenciales para la replicación del virus. Por ello sus promotores han sido los predilectos para regular la expresión de proteínas recombinantes heterólogas [206]. Los estudios realizados sobre el efecto que acarrea el cambio en la localización natural de los promotores o de su orientación, mostraron la invariabilidad de sus características funcionales [207-209]. Por otra parte, se ha observado que la disposición de dos promotores diferentes en serie pero con diferente orientación (disposición *back-to-back*), no hace variar la funcionalidad de cada uno de ellos [209, 210]. Además, la disposición de dos promotores en la misma orientación (promotor híbrido o quimera), incrementa la actividad transcripcional [211].

### I.7.1.1 Desventajas del sistema BEVS

Las principales limitaciones del sistema BEVS son: la restricción temporal del procesamiento de la proteína, la proteólisis asociada al efecto citopático y la baja expresión de proteínas complejas en comparación a otros sistemas.

En general, la proteína recombinante se extrae de las células fácilmente y en forma soluble. Sin embargo, la aparición de conformaciones anómalas y poco uniformes, determina la aparición de proteína agregada o incorrectamente plegada [125, 212]. Estas formas aberrantes están relacionadas con la actividad de los promotores empleados de forma rutinaria (*polh* y *p10*), ya que son funcionales durante la fase final de la infección, cuando la capacidad de síntesis proteica del hospedador se encuentra ya muy limitada. Para solventar este problema, las investigaciones se han encaminado principalmente hacia el uso de promotores distintos a los convencionales, la adición de elementos en *cis* con actividad *enhancer* y la expresión de factores reguladores en *trans* (Tabla 5), aunque hasta el momento han tenido un éxito limitado, salvo determinadas excepciones.

## PROMOTORES

PROMOTOR	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
<i>polh</i>	Expresión muy tardía, muy fuerte	[213]
<i>p10</i>	Expresión muy tardía, muy fuerte	[214]
<i>vp39</i>	Expresión tardía, fuerte	
<i>vp39-polh</i>	promotor híbrido (tardío + muy tardío)	[16, 211]
<i>ie0, ie1, ie2, pe38, pcna</i> <i>hsp70 (D. melanogaster)</i>	Expresión muy temprana y débil	[215-217]
<i>Actina (B. mori)</i>	Expresión temprana y débil	[218, 219]
	Expresión más temprana que <i>polh</i>	
	Expresión tardía, niveles de proteína secretada mayores que <i>polh</i> y <i>p10</i>	[220, 221]
<i>p6.9</i>		
<i>39k</i>	Expresión temprana	[222]
promotores derivados del <i>bracovirus de Cotesia plutellae</i> ( <i>CpBV</i> )	Expresión temprana	[161, 223]
<i>gp64</i>	Expresión temprana y tardía	[224]
<i>pcna (etl)</i>	Expresión temprana-tardía	[225]
<i>polh-etl</i>	Expresión tardía muy tardía	[226]
<i>p35</i>	Expresión temprana-tardía	[68]
<i>egt</i>	Expresión temprana	[227]
<i>da26</i>	Expresión temprana	[228]

## ADICIÓN DE ELEMENTOS EN CIS Y/O EN TRANS

PROMOTOR	ELEMENTO	CARACTERÍSTICA	REFERENCIA
<i>vp39</i>	<i>hr3 (BmNPV)</i>	Menor agregación de proteínas	[229]
<i>polh (BmNPV)</i>	Secuencia <i>Burst (AcMNPV)</i>	Incremento de expresión	[230]
<i>polh (BmNPV)</i>	Secuencia <i>Burst (BmNPV)</i> y coexpresión de <i>VLF-1 (AcMNPV)</i>	Incremento de expresión	[231]
<i>polh (AcMNPV)</i>	Secuencia líder no traducida de la tropomiosina de langosta	Incremento de expresión	[232]
<i>39k (AcMNPV)</i>	<i>hr5 (AcMNPV)</i>	Incremento de expresión	[38]
<i>ie1 (AcMNPV) o (BmNPV)</i>	<i>hr3 (BmNPV)</i>	Incremento de expresión	[233]
<i>polh (AcMNPV) o hsp70 (D.melanogaster)</i>	<i>hr1 (AcMNPV)</i>	Incremento de expresión	[234]
<i>hsc70-4p (B. mori)</i>	<i>hr3 (BmNPV)</i>	Incremento de la actividad transcripcional	[235]
<i>polh(AcMNPV)</i>	<i>hr1(AcMNPV)</i>	Incremento de expresión	[236]
<i>CMVm; hsp70; p35</i>	5' <i>polh + hr1 (AcMNPV)</i>	Incremento de expresión	[237]
<i>ie1(AcMNPV)</i>	<i>hr5</i>	Expresión temprana de proteínas secretadas	[217]
<i>HSC70-4, TCTP, A3 (B. mori)</i>	<i>hr3 + ie1 (BmNPV)</i>	Incremento de la actividad transcripcional	[238]
<i>p10</i>	Ankirinas de <i>CslV</i>	Incremento de expresión	[239]

Tabla 4. Promotores, elementos en *cis* y factores *en trans* empleados en el sistema BEVS

La degradación de la proteína recombinante es una de las mayores desventajas que presenta el sistema BEVS debido a su naturaleza lítica. Para solventarla, se han delecionado genes que codifican para proteasas u otras proteínas relacionadas con la lisis celular [240, 241], e incluso se ha desarrollado un sistema de vectores de lisis reducida por selección [242] y líneas celulares transformadas de forma transitoria [243] o estable [244-246]. Sin embargo, los rendimientos de producción están por debajo de los obtenidos por el sistema lítico.

Para incrementar la producción se ha considerado la incorporación de elementos en *cis*, como los genes que codifican para las proteínas ankirinas del Ichnovirus de *Campoletis sonorensis* (CslV) [239], consiguiendo aumentar la ventana productiva de las células infectadas.

### **I.7.1.2 Insectos como factoría biológica**

Los insectos son el grupo más exitoso de organismos sobre la Tierra en cuanto a biodiversidad se refiere. Esta gran variedad, que se extiende al nivel molecular [247], pone de manifiesto el potencial que presentan para crear aplicaciones biotecnológicas innovadoras. Aunque todavía es un campo apenas explotado, el empleo de secuencias promotoras de genes de insecto (*D. melanogaster* o *B. mori*) en el sistema BEVS (Tabla 4) es un ejemplo de ello.

La abundante y rápida aparición de proteínas en la fase final del desarrollo de los insectos holometábolos hace de sus promotores potenciales candidatos para su aplicación en el sistema BEVS. Durante la metamorfosis se produce la disgregación de las estructuras larvarias seguida de la formación de los tejidos del adulto. Esta transformación exige la síntesis de una gran cantidad de proteínas, cuya fuente de aminoácidos provendrá de un tipo específico de proteínas de almacenamiento acumuladas en la hemolinfa del insecto en el último estadio larvario.

En el lepidóptero *T. ni*, la mayoría de las proteínas de almacenamiento pertenecen a la familia de las hexamerinas. Son proteínas relacionadas evolutivamente con las hemocianinas y se componen de seis subunidades de unos 80 kDa cada una [248]. Las principales son: la proteína ácida suprimible por hormona juvenil (AJHSP-1; *Acidic juvenile hormone-suppressible protein 1*), la

proteína básica 1 suprimible por hormona juvenil (BJHSP-1; *Basic juvenile hormone-suppressible protein 1*) y la proteína básica 2 suprimible por hormona juvenil (BJHSP-2; *Basic juvenile hormone-suppressible protein 2*). Como sus nombres indican, su expresión está fuertemente regulada por hormonas [249].

A las ya descritas limitaciones del sistema BEVS, se añade un alto coste de producción e inversión en equipamientos (biorreactores). Para evitar este cuello de botella, el uso del insecto como factoría biológica [250-253] reduce gastos, a la vez que permite generar proteínas recombinantes funcionales en mayor cantidad [254], ya que posee una maquinaria muy potente de producción y maduración proteica similar a la de los mamíferos.

La primera aplicación biotecnológica del insecto como biofactoría se remonta a 1985, cuando se obtuvo interferón  $\alpha$  humano en larvas de *B. mori* infectadas con un *BmNPV* recombinante [255]. Además de *B. mori* [254], se han estudiado otros lepidópteros: *Manduca sexta* [256], *Hyalophora cecropia* [257], *Spodoptera exigua* [258] o *Rachiplusia nu* [259]. Sin embargo, es la especie *T. ni* [260-262] la que, por sus características de producción y mantenimiento, resalta sobre las demás. A nivel industrial, destaca la explotación del insecto *T. ni* como factoría biológica mediante la tecnología IBES (*Improved Baculovirus Expression System*) [250, 260-263] por la compañía ALGENEX. [264]. Esta plataforma ha demostrado una alta eficiencia en la producción de proteínas difíciles de expresar en otros sistemas y una reducción drástica en la inversión de capital respecto a distintas tecnologías basadas en biorreactores. Empresas que también emplean larvas de este lepidóptero son Chesapeake PERL [265] y Bionaturis [266]. La compañía Sysmex, mediante la plataforma ProCube [267], utiliza larvas de *B. mori* para la producción de proteínas recombinantes.

## II OBJETIVOS



Desde los años 80 hasta la actualidad, el sistema BEVS ha sido optimizado únicamente por la ingeniería de los biorreactores y, desde el punto de vista biológico, por las mejoras en la metodología para la obtención de los virus recombinantes. La presente tesis doctoral tiene como principal objetivo dar un impulso notable al sistema productivo basado en el uso de vectores baculovirus, mejorando significativamente la productividad del sistema tanto cuantitativa como cualitativamente, para aproximarlos al nivel alcanzado por las tecnologías basadas en células de mamífero. Para lograr esta meta, se han abordado los siguientes objetivos:

- Aislamiento y caracterización de nuevos promotores derivados del insecto *T. ni* que pudieran tener aplicación en el vector AcMNPV.
- Caracterización del efecto de diferentes reguladores transcripcionales, secuencias potenciadoras o *enhancer* y distintos promotores o combinaciones de promotores sobre la expresión de proteínas recombinantes en células de insecto y larvas del lepidóptero *T. ni*.
- Generación de un casete de expresión optimizado que combine elementos reguladores en *cis* y en *trans* derivados del propio baculovirus y que mejore las características productivas del sistema.
- Validación del casete de expresión desarrollado para vectores baculovirus mediante la optimización de la producción de una proteína de alto interés comercial formadora de pseudopartículas víricas (VLPs).



### **III MATERIALES Y MÉTODOS**



## III.1 Materiales

### III.1.1 Sistema Bac-to-Bac®

Para la obtención de los baculovirus recombinantes generados en esta tesis se ha empleado el sistema Bac-to-Bac® (Invitrogen, EE.UU). Éste se basa en la transposición sitio específica de un casete de expresión desde un vector donador, plásmido pFastBac™1 o pFastBac™Dual, a un vector receptor, denominado báculo, que posee la capacidad de replicar en *E. coli* [268]. El gen de interés se clona en un casete de expresión del vector donador, donde es regulado por un promotor específico de baculovirus (*polh* o *p10*). El casete está flanqueado por elementos de transposición miniTn7 y contiene el gen de resistencia a gentamicina y la señal de poliadenilación de la timidina quinasa de HSV y/o la de SV40.

Otra parte fundamental del sistema es la cepa de *E. coli* DH10Bac™. Estas células contienen el báculo, que presenta un mini-replicón F de bajo número de copias, un gen de resistencia a la kanamicina y una secuencia de DNA que codifica para el péptido LacZ $\alpha$ , en el que está insertado el lugar de transposición mini-*att*Tn7. Cuando se produce la transposición del casete de expresión desde el vector donador se interrumpe la fase de lectura del péptido, lo cual permite la identificación de las colonias que portan el báculo recombinante, ya que estas presentan un fenotipo blanco. Además, la cepa contiene un plásmido auxiliar que confiere resistencia a la tetraciclina y codifica para la enzima transposasa, encargada de catalizar la reacción de transposición.

### III.1.2 Cepas bacterianas

Para el clonaje de los genes de interés en el plásmido donador se ha usado la cepa DH5 $\alpha$ ™ (Invitrogen, EE.UU.), mientras que para la generación de los báculos recombinantes se ha empleado la cepa DH10Bac™ (Invitrogen, EE.UU.).

### III.1.3 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas han sido: la línea Sf21 (IPLB-SF21-AE), derivada del tejido ovárico del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (*S. frugiperda*), la línea Sf9 (IPLB-SF9), aislado clonal de la anterior, y la línea Tn-5 (BTI-Tn-5B1-4), derivada de células de ovario del insecto *Trichoplusia ni* (*T. ni*) y comercializada como High Five™ (Invitrogen, EE.UU.).

### III.1.4 Insectos

Para la realización de los ensayos de expresión de las proteínas recombinantes *in vivo*, se emplearon larvas de la especie *T. ni*, proporcionadas por el departamento de producción de ALGENEX [264]. En las instalaciones de la empresa se mantiene un ciclo cerrado de generación de individuos bajo condiciones de biocontrol y buenas prácticas de fabricación.

### III.1.5 Vectores

Se han empleado como vectores donadores el plásmido pFastBac™1, que utiliza el promotor de la proteína poliedrina (*polh*) de AcMNPV para la expresión del gen de interés, y el plásmido pFastBac™Dual, que utiliza los promotores *polh* y *p10* de AcMNPV. Ambos vectores poseen los genes de resistencia a ampicilina y gentamicina y han servido de punto de partida para generar los plásmidos recombinantes desarrollados en esta tesis (Tabla 5). Su representación gráfica se incluye en el anexo I. La síntesis de genes fue llevada a cabo por Mr.Gene GmbH (Alemania) o GeneScript Inc (EE.UU.).

Vectores generados		
Nombre	Finalidad	Breve descripción del clonaje
<b>Control</b>	Control negativo de expresión.	pFastBac™ 1
<b>polhGFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo el promotor <i>polh</i> .	Inserción del gen <i>GFP</i> en los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>SphI</i> del vector pFastBac™ 1.
<b>polhPLGFP</b>	Inserción de un lugar de clonaje múltiple adicional (LCM) entre el promotor <i>polh</i> y el gen <i>GFP</i> .	Inserción de LCM entre los sitios <i>BamHI</i> y <i>EcoRI</i> de <i>polhGFP</i> .
<b>pAGFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo la secuencia de la región 5' del gen <i>AJSP-1</i> ( <i>pA</i> ).	Se amplificó por PCR la secuencia <i>pA</i> con los cebadores <i>AJHSP1 F</i> y <i>AJHSP1 R</i> y a continuación se insertó en los sitios <i>SphI</i> y <i>SpeI</i> de pFastBac™ Dual. La inserción de GFP se hizo en el sitio <i>HindIII</i> .
<b>pB1GFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo la secuencia de la región 5' del gen <i>BJHSP-1</i> ( <i>pB1</i> ).	Se amplificó por PCR la secuencia <i>pB1</i> con los cebadores <i>BJHSP1 F</i> y <i>BJHSP1 R</i> y a continuación se insertó ésta entre los sitios <i>BamHI</i> y <i>SphI</i> de pFastBac™ Dual. La inserción de GFP se hizo en el sitio <i>Kpn I</i> .
<b>pB2GFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo la secuencia de la región 5' del gen <i>BJHSP-2</i> ( <i>pB2</i> ).	Mediante la digestión del plásmido <i>polhpB2GFP</i> (ver más adelante) con <i>BamHI</i> y <i>SphI</i> , se extrajo el promotor <i>pB2</i> y se insertó en las mismas dianas del vector pFastBac™ Dual. La inserción GFP se hizo en el sitio <i>SphI</i> , tras extraerla del vector <i>polhPLGFP</i> .
<b>p10GFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo el promotor <i>p10</i> .	Se deletionó la secuencia <i>pB2</i> del vector <i>pB2p10GFP</i> (descrito más adelante) tras cortarlo con la enzima <i>PstI</i> .
<b>p6.9GFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo el promotor <i>p6.9</i> .	Se extrajo el promotor <i>polh</i> del vector <i>polhPLGFP</i> con las enzimas <i>BstZ17I</i> y <i>XhoI</i> , y en su lugar se insertó la secuencia promotora <i>p6.9</i> , amplificada por PCR desde el vector <i>hr1p6.9GFP</i> (descrito más adelante) con los cebadores <i>p6.9(BstZ17I) F</i> y <i>p6.9(XhoI) R</i> .
<b>polhpB2GFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo el híbrido <i>polhpB2</i> .	Se amplificó por PCR la secuencia <i>pB2</i> con los cebadores <i>BJHSP1 F</i> y <i>BJHSP1 R</i> y se insertó en el sitio <i>NotI</i> del vector <i>polhPLGFP</i> .
<b>pB2polhGFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo el híbrido <i>pB2polh</i> .	Se amplificó por PCR la secuencia <i>polh</i> desde pFastBac™ 1 con los cebadores <i>XholpolhXhoI F</i> y <i>XholpolhXhoI R</i> y se insertó en el sitio <i>XhoI</i> del vector <i>pB2GFP</i> .
<b>p10pB2GFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo el híbrido <i>p10pB2</i> .	Se amplificó por PCR la secuencia <i>p10</i> desde pFastBac™ Dual con los cebadores <i>Saclp10BamHI F</i> y <i>Saclp10BamHI R</i> y se insertó entre los sitios <i>SacI</i> y <i>BamHI</i> del vector <i>pB2GFP</i> .
<b>pB2p10GFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo el híbrido <i>pB2p10</i> .	Se amplificó por PCR la secuencia <i>p10</i> desde pFastBac™ Dual con los cebadores <i>Xholp10XhoI F</i> y <i>Xholp10XhoI R</i> y se insertó en el sitio <i>XhoI</i> del vector <i>pB2GFP</i> .
<b>hr1polhpB2GFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo el híbrido <i>polhpB2</i> e inserción de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de <i>AcMNPV</i> .	Se amplificó por PCR la secuencia <i>hr1</i> a partir del genoma del baculovirus contenido en el vector receptor del sistema Bac-to-Bac® con los cebadores <i>BstZ17Ihr1BstZ17I F</i> y <i>BstZ17Ihr1BstZ17I R</i> y se insertó en el sitio <i>BstZ17I</i> del vector <i>polhpB2GFP</i> .
<b>hr1pB2polhGFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo el híbrido <i>pB2polh</i> e inserción de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de <i>AcMNPV</i> .	Se amplificó por PCR la secuencia <i>hr1</i> a partir del genoma del baculovirus contenido en el vector receptor del sistema Bac-to-Bac® con los cebadores <i>Xbalhr1Sacl F</i> y <i>Xbalhr1Sacl R</i> y se insertó entre los sitios <i>XbaI</i> y <i>SacI</i> del vector <i>pB2polhGFP</i> .
<b>hr1p10pB2GFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo el híbrido <i>p10pB2</i> e inserción de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de <i>AcMNPV</i> .	Se amplificó por PCR la secuencia <i>hr1</i> a partir del genoma del baculovirus contenido en el vector receptor del sistema Bac-to-Bac® con los cebadores <i>Xbalhr1Sacl F</i> y <i>Xbalhr1Sacl R</i> y se insertó entre los sitios <i>XbaI</i> y <i>SacI</i> del vector <i>p10pB2GFP</i> .
<b>hr1pB2p10GFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo el híbrido <i>pB2p10</i> e inserción de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de <i>AcMNPV</i> .	Se amplificó por PCR la secuencia <i>hr1</i> a partir del genoma del baculovirus contenido en el vector receptor del sistema Bac-to-Bac® con los cebadores <i>Xbalhr1Sacl F</i> y <i>Xbalhr1Sacl R</i> y se insertó entre los sitios <i>XbaI</i> y <i>SacI</i> del vector <i>pB2p10GFP</i> .
<b>hr1pB2GFP</b>	Expresión de la proteína GFP bajo el promotor <i>pB2</i> e inserción de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de <i>AcMNPV</i> .	Se amplificó por PCR la secuencia <i>hr1</i> a partir del genoma del baculovirus contenido en el vector receptor del sistema Bac-to-Bac® con los cebadores <i>Xbalhr1Sacl F</i> y <i>Xbalhr1Sacl R</i> y se insertó entre los sitios <i>XbaI</i> y <i>SacI</i> del vector <i>pB2GFP</i> .

Tabla 5. Vectores generados en esta tesis

Vectores generados		
Nombre	Finalidad	Descripción del clonaje
<i>hr1polhGFP</i>	Expresión de la proteína GFP bajo el promotor <i>polh</i> e inserción de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de AcMNPV.	Se extrajo la secuencia <i>pB2</i> de la construcción <i>hr1pB2polhGFP</i> con la enzima <i>NotI</i> .
<i>hr1p10GFP</i>	Expresión de la proteína GFP bajo el promotor <i>p10</i> e inserción de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de AcMNPV.	Se amplificó por PCR la secuencia <i>hr1p10</i> con los cebadores <i>hr1p10(BstZ171) F</i> y <i>XhoI p10XhoI R</i> , empleando como molde la construcción <i>hr1p10pB2GFP</i> , y se insertó entre los sitios <i>BstZ171</i> y <i>XhoI</i> del vector <i>polhPLGFP</i> , al que previamente se había extraído el promotor <i>polh</i> .
<i>hr1p6.9GFP</i>	Expresión de la proteína GFP bajo el promotor <i>p6.9</i> e inserción de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de AcMNPV.	Se extrajo el promotor <i>polh</i> de la construcción <i>polhPLGFP</i> con las enzimas <i>BstZ171</i> y <i>XhoI</i> , y se sustituyó por la secuencia <i>hr1p6.9</i> , amplificada por PCR con los cebadores <i>BstZ171hr1BstZ171 F</i> y <i>p6.9(XhoI) R</i> , empleando como molde la construcción <i>hr1p6.9p10GFP/polhAc-ie-01</i> , descrita más adelante.
<i>pB2s</i>	Secuencia sintetizada del promotor <i>pB2</i> provista de dianas internas.	Se sintetizó la secuencia <i>pB2s</i> flanqueada por las dianas <i>BstZ171</i> y <i>XhoI</i> y se clonó en el vector pFastBac™Dual, retirando en el proceso el promotor <i>p10</i> .
<i>pB2sGFP</i>	Expresión de la proteína GFP bajo el promotor sintetizado <i>pB2s</i> .	Se clonó la secuencia <i>pB2s</i> en los sitios <i>BstZ171</i> y <i>XhoI</i> del vector pFastBac™Dual, la inserción GFP se hizo en el sitio <i>SphI</i> .
<i>pB2<sub>1</sub>GFP</i>	Expresión de la proteína GFP bajo el fragmento <i>SmaI</i> y <i>XhoI</i> del promotor <i>pB2s</i> .	Se extrajo del vector <i>pB2s</i> la región comprendida entre las dianas <i>SmaI</i> (roma) y <i>XhoI</i> y se insertó en las dianas <i>BstZ171</i> (roma) y <i>XhoI</i> del vector pFastBac™Dual, la inserción GFP se hizo en el sitio <i>SphI</i> .
<i>pB2<sub>2</sub>GFP</i>	Expresión de la proteína GFP bajo el fragmento <i>DraI</i> y <i>XhoI</i> del promotor <i>pB2s</i> .	Se extrajo del vector <i>pB2s</i> la región comprendida entre las dianas <i>DraI</i> (roma) y <i>XhoI</i> y se insertó en las dianas <i>BstZ171</i> (roma) y <i>XhoI</i> del vector pFastBac™Dual, la inserción GFP se hizo en el sitio <i>SphI</i> .
<i>pB2<sub>3</sub>GFP</i>	Expresión de la proteína GFP bajo el fragmento <i>HaeIII</i> y <i>XhoI</i> del promotor <i>pB2s</i> .	Se extrajo del vector <i>pB2s</i> la región comprendida entre las dianas <i>HaeIII</i> (roma) y <i>XhoI</i> y se insertó en las dianas <i>BstZ171</i> (roma) y <i>XhoI</i> del vector pFastBac™Dual, la inserción GFP se hizo en el sitio <i>SphI</i> .
<i>pB2<sub>4</sub>GFP</i>	Expresión de la proteína GFP bajo el fragmento comprendido entre las dianas <i>NaeI</i> y <i>XhoI</i> del promotor <i>pB2s</i> .	Se extrajo del vector <i>pB2s</i> la región comprendida entre las dianas <i>NaeI</i> (roma) y <i>XhoI</i> y se insertó en las dianas <i>BstZ171</i> (roma) y <i>XhoI</i> del vector pFastBac™Dual, la inserción GFP se hizo en el sitio <i>SphI</i> .
<i>pB2<sub>5</sub>GFP</i>	Expresión de la proteína GFP bajo el promotor <i>pB2s</i> carente de la región comprendida entre las dianas <i>NaeI</i> y <i>SmaI</i> .	Se sintetizó la secuencia <i>pB2<sub>5</sub></i> flanqueada por las dianas <i>BstZ171</i> y <i>XhoI</i> y se insertó en las mencionadas dianas del vector pFastBac™Dual, la incorporación de GFP se hizo en el sitio <i>SphI</i> .
<i>pB2<sub>6</sub>GFP</i>	Expresión de la proteína GFP bajo el promotor <i>pB2s</i> carente de la región comprendida entre las dianas <i>NaeI</i> y <i>DraI</i> .	Se sintetizó la secuencia <i>pB2<sub>6</sub></i> flanqueada por las dianas <i>BstZ171</i> y <i>XhoI</i> y se insertó en las mencionadas dianas del vector pFastBac™Dual, la inserción GFP se hizo en el sitio <i>SphI</i> .
<i>pB2<sub>7</sub>GFP</i>	Expresión de la proteína GFP bajo el promotor <i>pB2s</i> al que se le ha delecionado el fragmento comprendido entre las dianas <i>SmaI</i> y <i>DraI</i> .	Se extrajo del vector <i>pB2s</i> la región interna comprendida entre las dianas <i>SmaI</i> y <i>DraI</i> y se insertó en las dianas <i>BstZ171</i> (roma) y <i>XhoI</i> del vector pFastBac™Dual, la inserción GFP se hizo en el sitio <i>SphI</i> .

Continuación tabla 5

Vectores generados		
Nombre	Finalidad	Descripción del clonaje
<b><i>pB2<sub>8</sub>GFP</i></b>	Expresión de la proteína GFP bajo el fragmento <i>NaeI</i> y <i>SmaI</i> de <i>pB2s</i> con la región que contiene la caja TATA y el lugar de inicio de transcripción del gen <i>BJHSP2</i> , flanqueada en su extremo 3' por la diana <i>XhoI</i> .	Se sintetizó la secuencia <i>pB2<sub>8</sub></i> flanqueada por las dianas <i>BstZ17I</i> y <i>XhoI</i> y se insertó en las mismas dianas del vector pFastBac™Dual, la inserción GFP se hizo en el sitio <i>SphI</i> .
<b><i>pB2<sub>9</sub>GFP</i></b>	Expresión de la proteína GFP bajo el fragmento <i>NaeI</i> y <i>DraI</i> de <i>pB2s</i> (con los lugares putativos Br-C delecionados) con la región que contiene la caja TATA y el lugar de inicio de transcripción del gen <i>BJHSP2</i> , flanqueada en su extremo 3' por la diana <i>XhoI</i> .	Se sintetizó la secuencia <i>pB2<sub>9</sub></i> flanqueada por las dianas <i>BstZ17I</i> y <i>XhoI</i> y se insertó en las mismas dianas del vector pFastBac™Dual, la inserción GFP se hizo en el sitio <i>SphI</i> .
<b><i>pB2<sub>10</sub>GFP</i></b>	Expresión de la proteína GFP bajo el fragmento <i>NaeI</i> y <i>SmaI</i> de <i>pB2s</i> (carente del lugar putativo Br-C) con la región que contiene la caja TATA y el lugar de inicio de transcripción del gen <i>BJHSP2</i> , flanqueada en su extremo 3' por la diana <i>XhoI</i> .	Se extrajo del vector <i>pB2<sub>9</sub>GFP</i> la región interna comprendida entre las dianas <i>SmaI</i> y <i>DraI</i> .
<b><i>pB2<sub>11</sub>GFP</i></b>	Expresión de la proteína GFP bajo el fragmento <i>NaeI</i> y <i>DraI</i> de <i>pB2s</i> con la región que contiene la caja TATA y el lugar de inicio de transcripción del gen <i>BJHSP2</i> , flanqueada en su extremo 3' por la diana <i>XhoI</i> .	Se sintetizó la secuencia <i>pB2<sub>11</sub></i> flanqueada por las dianas <i>BstZ17I</i> y <i>XhoI</i> y se insertó en las mismas dianas del vector pFastBac™Dual, la inserción GFP se hizo en el sitio de restricción <i>SphI</i> .
<b><i>hr1pB2<sub>9</sub>p10GFP</i></b>	Expresión de la proteína GFP bajo el híbrido <i>pB2<sub>9</sub>p10</i> e inserción de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de AcMNPV.	La secuencia <i>pB2<sub>9</sub></i> se amplificó por PCR del vector <i>pB2<sub>9</sub>GFP</i> con los cebadores <i>pB2<sub>9</sub>F</i> y <i>pB2<sub>9</sub>R</i> , que introducen las dianas <i>BamHI</i> y <i>PstI</i> en los extremos, y se insertó en el vector <i>hr1pB2p10GFP</i> , al que previamente se extrajo la secuencia <i>pB2</i> .
<b><i>polhAc-ie-01</i></b>	Expresión de los factores reguladores IE0 e IE1 bajo el promotor <i>polh</i> .	Se sintetizó la secuencia <i>Ac-ie-01</i> flanqueada por las dianas <i>BglII</i> y <i>SpeI</i> y se insertó en los lugares <i>BamHI</i> y <i>XbaI</i> del vector pFastBac™1.
<b><i>pB2<sub>9</sub>Ac-ie-01</i></b>	Expresión de los factores reguladores IE0 e IE1 bajo el promotor <i>pB2<sub>9</sub></i> .	Se extrajo la secuencia <i>pB2<sub>9</sub></i> flanqueada por las dianas <i>BstZ17I</i> y <i>XhoI</i> de la construcción <i>pB2<sub>9</sub>GFP</i> y se insertó en el vector pFastBac™Dual, a continuación se clonó el cDNA <i>Ac-ie-01</i> en la diana <i>PvuII</i> .
<b><i>pB2<sub>9</sub>Ac-ie-01/hr1pB2<sub>9</sub>p10GFP</i></b>	Vector policistrónico, con una copia extra de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de AcMNPV, que expresa los factores IE0 e IE1 bajo el promotor <i>pB2<sub>9</sub></i> y la proteína GFP bajo el híbrido <i>pB2<sub>9</sub>p10</i> .	La secuencia <i>hr1pB2<sub>9</sub>p10</i> se amplificó por PCR a partir del vector <i>hr1pB2<sub>9</sub>p10GFP</i> con los cebadores <i>hr1F</i> y <i>p10/pH R</i> , que incorporan las dianas <i>BstZ17I</i> y <i>HindIII</i> a los extremos, y se insertó en el vector <i>pB2<sub>9</sub>Ac-ie-01</i> . El clonaje de GFP se hizo en el sitio <i>HindIII</i> .
<b><i>polhAc-ie-01/hr1pB2<sub>9</sub>p10GFP</i></b>	Vector policistrónico, con una copia extra de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de AcMNPV, que expresa los factores IE0 e IE1 bajo el promotor <i>polh</i> y la proteína GFP bajo el híbrido <i>pB2<sub>9</sub>p10</i> .	Se cortó el vector <i>pB2<sub>9</sub>Ac-ie-01/hr1pB2<sub>9</sub>p10GFP</i> con las enzimas <i>BstZ17I</i> y <i>XbaI</i> , y se sustituyó la secuencia <i>pB2<sub>9</sub></i> por el promotor <i>polh</i> , previamente extraído del vector pFastBac™1.

Continuación tabla 5

Vectores generados		
Nombre	Finalidad	Descripción del clonaje
<b><i>polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP</i></b>	Vector policistrónico, con una copia extra de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de AcMNPV, que expresa los factores IE0 e IE1 bajo el promotor <i>polh</i> y la proteína GFP bajo el híbrido <i>p6.9p10</i> .	Se cortó el vector <i>polhAc-ie-01/hr1pB29p10GFP</i> con las enzimas <i>BstZ171</i> y <i>XhoI</i> , y se sustituyó la región <i>hr1pB29p10</i> por la secuencia sintetizada <i>hr1p6.9p10</i> , flanqueada ésta por las mismas dianas.
<b><i>polhAc-ie-01/p10GFP</i></b>	Vector policistrónico, que expresa los factores IE0 e IE1 bajo el promotor <i>polh</i> y la proteína GFP bajo el promotor <i>p10</i> .	Se insertó el gen <i>Ac-ie-01</i> en las dianas <i>BamHI</i> y <i>XbaI</i> del vector pFastBac™Dual, la inserción GFP se hizo en el sitio <i>KpnI</i> .
<b><i>polhAc-ie-01/hr1p10GFP</i></b>	Vector policistrónico, con una copia extra de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de AcMNPV, que expresa los factores IE0 e IE1 bajo el promotor <i>polh</i> y la proteína GFP bajo el promotor <i>p10</i> .	Se cortó el vector <i>polhAc-ie-01/hr1pB29p10GFP</i> con las enzimas <i>BstZ171</i> y <i>XhoI</i> , y se sustituyó la región <i>hr1pB29p10</i> por la secuencia <i>hr1p10</i> , amplificada por PCR a partir del vector <i>hr1p10pB2GFP</i> , empleando los cebadores <i>BstZ171hr1BstZ171 F</i> y <i>XhoIhr1p10XhoI R</i> .
<b><i>polhAc-ie-01/hr1polhGFP</i></b>	Vector policistrónico, con una copia extra de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de AcMNPV, que expresa los factores IE0 e IE1 bajo el promotor <i>polh</i> y la proteína GFP bajo el promotor <i>polh</i> .	Se cortó el vector <i>polhAc-ie-01/p10GFP</i> con las enzimas <i>BstZ171</i> y <i>KpnI</i> , y se sustituyó el promotor <i>p10</i> por la secuencia sintetizada <i>hr1polh</i> , flanqueada ésta por las mismas enzimas. La inserción de GFP se hizo en el sitio <i>KpnI</i> .
<b><i>polhAc-ie-01/hr1polhp10GFP</i></b>	Vector policistrónico, con una copia extra de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de AcMNPV, que expresa los factores IE0 e IE1 bajo el promotor <i>polh</i> y la proteína GFP bajo el híbrido <i>polhp10</i> .	Se cortó el vector <i>polhAc-ie-01/hr1p10GFP</i> con la enzima <i>SacI</i> y se insertó el promotor <i>polh</i> , amplificado por PCR con los cebadores <i>polhSacI F</i> y <i>polhSacI R</i> .
<b><i>polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*</i></b>	Reconstrucción del vector para facilitar el clonaje de genes de interés entre las dianas <i>XhoI</i> y <i>NcoI</i> .	Esta construcción se llevó a cabo con el objetivo de facilitar la inserción de otros genes de interés en el casete de expresión. Se realizó a partir de la construcción <i>polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP</i> y el gen sintético <i>hr1pB29p10LCM</i> , siguiendo el desarrollo indicado en el anexo I.
<b><i>polhAc-ie-01/hr1p6.9p10Cap</i></b>	Vector policistrónico, con una copia extra de la secuencia <i>enhancer hr1</i> de AcMNPV, que expresa los factores IE0 e IE1 bajo el promotor <i>polh</i> y la proteína Cap de PCV-2 bajo el híbrido <i>p6.9p10</i> .	Se cortó el vector <i>polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*</i> con las enzimas <i>XhoI</i> y <i>NcoI</i> , y se sustituyó el gen <i>GFP</i> por la secuencia del gen <i>Cap</i> de PCV2, flanqueada por las dianas anteriormente descritas.

Continuación tabla 5

### III.1.6 Anticuerpos y fluoróforos

Los anticuerpos y fluoróforos usados en esta tesis se detallan en la siguiente tabla.

<b>Anticuerpos</b>				
	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>	<b>Animal obtención</b>	<b>Western blot</b>
<b>Primarios</b>				
<b>Actina</b>	Sigma	A5060	Conejo	1/500
<b>Tubulina</b>	Sigma	T5168	Ratón	1/2000
<b>GFP</b>	Millipore	MAB2510	Ratón	1/1000
<b>Cap</b>	Ingenasa	I36A	Ratón	1/1000
<b>Secundarios</b>				
<b>Anti-ratón-HRP</b>	GE Healthcare	NA931V	Oveja	1/2000
<b>Anti-conejo-HRP</b>	GE Healthcare	NA934V	Mono	1/2000
<b>Fluoróforos</b>				
	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>	<b>Uso/concentración</b>	
<b>Hoechst 33258</b>	Sigma	B2883	Cuantificación/ 1 µg/ml	
<b>Yoduro de propidio</b>	Sigma	P4170	Ciclo celular/ 50 µg/ml	

**Tabla 6. Anticuerpos y fluoróforos usados en esta tesis**

### III.1.7 Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento de bacterias y células eucariotas se detallan en la siguiente tabla.

<b>Medios de bacterias</b>			
	<b>Casa comercial</b>	<b>Composición</b>	<b>Aplicación</b>
<b>SOC</b>	Invitrogen	2% Triptona 0,5% Extracto de levadura 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucosa	Crecimiento de células competentes transformadas por choque térmico
<b>LB (Luria Bertani)</b>	Duchefa Biochemie	1% Triptona 0,5% Extracto de levadura 85,55 mM NaCl 15 g/l Agar bacteriológico (solo medio sólido)	Crecimiento y mantenimiento de cepas bacterianas
<b>Antibióticos para selección bacteriana y otros reactivos empleados</b>			
	<b>Casa comercial</b>	<b>Concentración uso</b>	
<b>Gentamicina</b>	PAN Biotech GmbH	7 µg/ml	
<b>Carbenicilina</b>	Duchefa Biochemie	100 µg/ml	
<b>Kanamicina</b>	Roche	50 µg/ml	
<b>Tetraciclina</b>	Sigma	10 µg/ml	
<b>X-gal</b> (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidasa)	Duchefa Biochemie	100 µg/ml	
<b>IPTG</b> (Isopropil-β-D-tiogalactosidasa)	Sigma	40 µg/ml	
<b>Medios de cultivo de células de insecto</b>			
	<b>Casa comercial</b>	<b>Suplementación</b>	<b>Aplicación</b>
<b>GRACE</b>	Sigma	-	Transfección y titulación de baculovirus
<b>TNM-FH</b>	PAN Biotech GmbH	FBS, Gentamicina, L-Glutamina	Mantenimiento e infección
<b>Suplementos</b>			
	<b>Casa comercial</b>	<b>Aplicación</b>	
<b>Gentamicina</b>	PAN Biotech GmbH	50 µg/ml	
<b>FBS</b>	PAN Biotech GmbH	10% (inactivado por calor: 56°C, 30 minutos)	
<b>L-Glutamina</b>	PAN Biotech GmbH	4,11 mM	

Tabla 7. Medios de cultivo y suplementos empleados en esta tesis

### III.1.8 Análisis bioinformático

Para la identificación de sitios putativos de unión de factores de transcripción en la región 5' del gen *BJHSP-2*, se han usado los programas de detección *in silico* TFsearch [269] y TESS [270], mientras que para la verificación de las secuencias amplificadas por PCR se utilizó la base de datos GenBank [271].

## **III.2 Métodos**

### **III.2.1 Crecimiento y mantenimiento de cultivos**

#### **III.2.1.1 Bacterias**

El crecimiento de las cepas bacterianas se realizó en medio LB líquido, a 37°C y en agitación (180 rpm). Para el mantenimiento de la presión selectiva de los clones recombinantes de la cepa DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> se emplearon los antibióticos carbenicilina y gentamicina, y para los de la cepa DH10Bac<sup>TM</sup> gentamicina, tetraciclina y kanamicina. Los clones se almacenaron en medio LB, en presencia de glicerol al 20% y a una temperatura de -80°C.

#### **III.2.1.2 Líneas celulares de insecto**

Todas las líneas se cultivaron a 27°C en medio TNM-FH suplementado al 10% con FBS inactivado por calor. El recuento celular se realizó por medio de un hemocitómetro y la viabilidad celular se determinó por la exclusión del colorante azul tripán (0,4% (p/v) en PBS). Las líneas Sf21 y Tn-5 se cultivaron en monocapa, mientras que la línea Sf9 se cultivó en suspensión. El medio para cultivar esta última línea se suplementó con Pluronic F-68 (Gibco, EE.UU.) al 0,1% para paliar el estrés hidrodinámico.

### **III.2.2 Identificación de las hexamerinas en extractos de larvas**

El estudio se realizó a partir de extractos de proteína total soluble (PTS) de larvas del lepidóptero *T. ni* resueltos en geles SDS-PAGE al 12% y analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF. Este análisis lo realizó el servicio de proteómica del Centro de Biología Molecular (CBMSO, España). Las bandas proteicas fueron escindidas del gel y sometidas a una digestión trípica siguiendo un protocolo convencional [272]. La determinación del perfil proteico de las muestras se llevó a cabo en un espectrómetro de masas del tipo MALDI-TOF Reflex IV (Bruker

Daltonics, Alemania) y la identificación con el programa MASCOT (Matrix Science Inc, EE.UU.).

### III.2.3 Extracción y caracterización de ácidos nucleicos

#### III.2.3.1 Extracción de DNA plasmídico de bacterias

La extracción del DNA plasmídico se realizó con el kit comercial “*QIAprep Spin Miniprep Kit and a microcentrifuge*” (Qiagen, Alemania), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. El procedimiento se basa en el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly [273] con ligeras modificaciones. Es una técnica de aislamiento y purificación rápida que consiste en la lisis alcalina de las células bacterianas, la neutralización del lisado celular, la precipitación de proteínas y del DNA genómico, y la adsorción del DNA plasmídico a una membrana de sílice en presencia de una alta concentración de sal, para finalizar eluyendo el DNA plasmídico.

El procedimiento se inició con 3 ml de cultivo crecido toda la noche a 37°C en agitación y centrifugado durante 1 minuto a 14.000 x *g*. El sedimento se resuspendió en 250 µl de solución I (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNAasa A), 250 µl de solución II (200 mM NaOH, 1% SDS) y 350 µl de solución III (4.2 M Gu-HCl, 0.9 M acetato potásico, pH 4.8). Este volumen se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 x *g* y el sobrenadante generado se transfirió a una columna, con membrana de sílice, que nuevamente se centrifugó durante 1 minuto a 14.000 x *g*. Tras descartar el permeado, la membrana se lavó con 500 µl de solución IV (5.0 M GuHCl, 30% isopropanol) y se centrifugó de nuevo durante 1 minuto a 14.000 x *g*, volviendo a descartar el permeado. Se lavó con 750 µl de la solución V (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 80% etanol) y se centrifugó durante 2 minutos, descartando nuevamente el permeado. Por último, se transfirió la columna a un tubo limpio y se añadieron 50 µl de tampón de elución (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) y, tras una incubación de 1 minuto, se centrifugó y se retiró la columna, quedando el plásmido eluido en el tampón.

### III.2.3.2 Extracción de DNA de bécrido

La extracción del DNA de bécrido se hizo igualmente por el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly [273] con modificaciones, pero en esta ocasión no se usaron columnas. El procedimiento se inició con la centrifugación durante 1 minuto a 14.000 x *g* de 3 ml de cultivo crecido toda la noche a 37°C en agitación. El sedimento se resuspendió en 300 µl de solución I (15 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNAasa A), 300 µl de solución II (200 mM NaOH, 1% SDS) y 350 µl de solución III (3 M acetato potásico, pH 5.5). El volumen se incubó durante 10 minutos a 4°C y, posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 x *g*. El sobrenadante se transfirió a un tubo con 800 µl de isopropanol y, tras ser incubado durante 10 minutos a 4°C, se centrifugó durante 15 minutos a 14.000 x *g*. Una vez retirado el sobrenadante, se lavó el sedimento con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 x *g*. Se descartó de nuevo el sobrenadante y el sedimento se dejó secar. Acto seguido se resuspendió el DNA en 40 µl de tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA).

### III.2.3.3 Extracción de RNA de larvas

La extracción de RNA total de larvas de *T. ni* se realizó con el reactivo TRIzol® (Invitrogen, EE.UU.), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Este reactivo permite aislar de forma secuencial el RNA total, el DNA y las proteínas de la muestra procesada [274]. El procedimiento se inició con la homogeneización de la muestra en TRIzol® (1 ml de reactivo por cada 100 mg de biomasa) y su posterior centrifugación durante 10 minutos a 12.000 x *g* y 4°C. Se recogió el sobrenadante clarificado y se transfirió a un nuevo tubo donde se añadieron 200 µl de cloroformo por cada ml de TRIzol® empleado y, tras una incubación de 3 minutos, se volvió a centrifugar. La fase acuosa fue retirada y depositada en un nuevo tubo al que se añadieron 500 µl de isopropanol por cada ml de TRIzol®, todo ello se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 x *g* y 4°C. Tras descartar el sobrenadante, el sedimento se lavó con etanol al 75% (1 ml de etanol por cada ml de TRIzol®) y se centrifugó durante 5 minutos a 7.500 x *g* y 4°C. Nuevamente se descartó el

sobrenadante y el sedimento se dejó secar durante 10 minutos para, finalmente, resuspenderlo en agua libre de RNAsa.

#### **III.2.3.4 Cuantificación del DNA y RNA**

El DNA y el RNA se cuantificaron por espectrofotometría utilizando un equipo NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, EE.UU.). La concentración se midió a una absorbancia de 260 nm y su pureza se determinó estableciendo la relación de absorbancia 260/280. Esta relación dio valores óptimos de entre 1,8 y 2,0.

#### **III.2.4 Digestiones enzimáticas**

Las digestiones de DNA con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo utilizando enzimas provistas por New England Biolabs (Reino Unido), Promega (EE.UU.) y Takara Bio Inc. (Japón), siguiendo las recomendaciones proporcionadas por las casas comerciales.

#### **III.2.5 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa**

La separación electroforética se realizó en geles de agarosa al 1% a voltaje constante (~70 V), empleando tampón TAE 1x (40 mM Tris-HCl, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8) en el procedimiento. Para visualizar las bandas de DNA se añadió el colorante *SYBR® Safe DNA gel stain* (Invitrogen, EE.UU.) a la agarosa. Las muestras se prepararon con tampón de carga 6x (0,25% (p/v) azul de bromofenol, 30% (v/v) glicerol) y se emplearon los marcadores de peso molecular de 1 kb (1 *kb DNA Ladder*, Biotools B & M Labs, España) y 100 pb (100 pb *DNA Ladder*, Biotools B & M Labs, España). Los geles fueron visualizados y fotografiados utilizando el equipo *ChemiDoc™ XRS+ imaging systems* (Bio Rad Laboratories, EE.UU.).

### III.2.6 Purificación de DNA desde geles de agarosa

Las bandas resueltas de DNA mediante geles de agarosa se purificaron con el kit comercial “*MinElute Gel Extraction Kit*” (Qiagen, Alemania), siguiendo sus indicaciones. El proceso consistió en los siguientes pasos: tras escindir la banda de DNA del gel de agarosa y pesarla, se añadieron 3 volúmenes de tampón QG por cada volumen de gel, y para su disolución se incubaron a 50°C durante 10 minutos. Seguidamente se añadió un volumen de isopropanol y el total se pasó a una columna que se centrifugó durante 1 minuto a 14.000 x g. Una vez retirado el permeado, la columna se lavó ahora con 500 µl de tampón QG, se centrifugó de nuevo y se descartó otra vez el permeado. Finalmente, se añadieron 750 µl de tampón PE y se centrifugó nuevamente durante 1 minuto, para acto seguido eluir del DNA en 10 µl de agua.

### III.2.7 Reacción de defosforilación y ligación de los vectores

La reacción de defosforilación de los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos digeridos se realizó con el kit “*Rapid Alkaline Phosphatase*” (Roche Diagnostics, EE.UU.). Tras añadir 1 U de enzima por cada microgramo de plásmido abierto, e incubar a 37°C durante 30 minutos, se inactivó la enzima sometiendo la muestra a 65°C durante 10 minutos. Para la ligación de los insertos con los vectores defosforilados se empleó el kit “*Rapid DNA Ligation*” (Roche Diagnostics, EE.UU.) utilizando una relación molar vector:inserto de 1:3. Se procedió añadiendo 1 U de enzima ligasa por reacción (10-20 µl), que se incubó a 16°C durante 5 minutos. A continuación se llevó a cabo la transformación de células de *E. coli* (DH5α) químicamente competentes.

### III.2.8 Amplificación por PCR

Para la reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR) se usó la enzima Ex-Taq™ HS (Takara Bio Inc., Japón), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. La mezcla de reacción contenía básicamente 1,25 unidades de enzima, 5 µl de tampón 10x Ex Taq, 4 µl de dNTP, 1,25 µl de cada cebador, 0,5 µg de DNA

molde y agua miliQ hasta completar 50 µl de volumen. La reacción se hizo en un termociclador Primus 25 Advanced (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Alemania) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 96°C durante 5 minutos y 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos (desnaturalización), 55°C durante 30 segundos (anillamiento) y 72°C durante 30 segundos (elongación), seguido de 10 minutos a 72°C y el mantenimiento final de las muestras a 4°C. Las variaciones de este programa básico dependieron de las características de los oligonucleótidos empleados en cada reacción (temperatura de anillamiento) y del tamaño del amplicón a generar (tiempo de elongación). Los oligonucleótidos usados en esta tesis fueron sintetizados por Invitrogen, y se muestran en la tabla:

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
AJHSP1 F	5'...ATGCCAGAGCAAAGGTCTGC...3'	49
AJHSP1 R	5'...TGTTCCGCCAGTGACAATCC...3'	46
BJHSP1 F	5'...CAAATGTACAAAGATTTCG...3'	39
BJHSP1 R	5'...GTTTGCTGCCACACCACG...3'	47
BJHSP2 F	5'...CTTGAATGTTAGTGAAACCCC...3'	45
BJHSP2 R	5'...CGTGGAGTTAACTCGATGTG...3'	47
pB2 <sub>9</sub> F	5'...ATCGGGATCCAAAAACATCGATTAGGGTGAC...3'	50
pB2 <sub>9</sub> R	5'...ATCGCTGCAGCGTGGAGTTAACTCGATGTG...3'	52
Actina F	5'...TACCACCGGTATCGTGCTGG...3'	51
Actina R	5'...TCGAGCGCGACGTAGCAGAG...3'	53
XholpolhXhol F	5'...ATGCCTCGAGATCATGGAGATAATTTAAATGATAACCATCTCG...3'	60
XholpolhXhol R	5'...GCATCTCGAGCGCGCCCGATGGTGGACGGTATGAATAAT...3'	67
Saclp10BamHI F	5'...ATGCGAGCTCATACGGACCTTTAATTCAACC...3'	57
Saclp10BamHI R	5'...GCATGGATCCGTCGAGTGATTGTAAATAAAATGT...3'	56
Xholp10Xhol F	5'...ATGCCTCGAGATACGGACCTTTAATTCAACC...3'	57
Xholp10Xhol R	5'...GCATCTCGAGGTTCGAGTGATTGTAAATAAAATGT...3'	56
Xbalhr1Sacl F	5'...ATGCTCTAGACTACCCGTAAAGCGAGTTTAGTT...3'	57
Xbalhr1Sacl R	5'...GCATGAGCTCGGAAACATTTTACACGTGCTTTCAATCTTA...3'	59
BstZ17Ihr1BstZ17I F	5'...ATGCGTATACCTACCCGTAAAGCGAGTTTAGTT...3'	57
BstZ17Ihr1BstZ17I R	5'...GCATGTATACGGAAACATTTTACACGTGCTTTCAATCTTA...3'	57
hr1 F	5'...ATCGGTATACATCGATGATTGACCCCAAC...3'	48
hr1 R	5'...ATCGGTTTAAACATCGATTATTGCTCCAATAC...3'	53
p10/pH R	5'...CATGAATTCAAGCTTGCATGC...3'	45
p6.9(BstZ17I) F	5'...ACTGGTATACGGTACCAAATTCGGTTTTGC...3'	55
p6.9(Xhol) R	5'...ATCGCTCGAGCGTATCTCCAGACTGCAGTT...3'	59
hr1p10(BstZ17I) F	5'...AGTCGTATACCTACCCGTAAAGCGAGTTTAG...3'	57
polhSacl F	5'...CGATGAGCTCATCATGGAGATAATTTAAATGATAACC...3'	56
polhSacl R	5'...CGATGAGCTCGCGCCCGATGGTGG...3'	61

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en esta tesis

### III.2.9 PCR con transcripción inversa (RT-PCR)

Para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa sobre un cDNA obtenido por transcripción inversa a partir de un mRNA, se empleó el kit “*QIAGEN® OneStep RT-PCR*” (Qiagen, Alemania) según las recomendaciones de la casa comercial. La mezcla de reacción básica contenía 2 µl de la mezcla enzimática

*QIAGEN OneStep RT-PCR*, 10 µl de tampón 5x *QIAGEN OneStep RT-PCR*, 2 µl de dNTP, 3 µl de cada cebador, 0,5 µg de RNA molde y agua libre de RNAasa hasta completar 50 µl de volumen. La reacción se hizo en un termociclador Primus 25 Advanced (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Alemania) con el siguiente programa: una reacción de transcripción inversa de 30 minutos a 50°C, seguida de una desnaturalización a 95°C durante 15 minutos y 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos (desnaturalización), 48°C durante 30 segundos (anillamiento) y 72°C durante 1 minuto (elongación). Seguido de 10 minutos finales a 72°C y el mantenimiento final de las muestras a 4°C. Los cebadores empleados fueron *BJHSP2 F*, *BJHSP2 R*, *Actina F* y *Actina R* (Tabla 8). El molde fue RNA extraído de larvas de *T. ni* y se usó β-actina como control interno.

### **III.2.10 Obtención de células químicamente competentes por el método de cloruro de rubidio**

Las células *E. coli* (DH5α y DH10Bac) se crecieron hasta llegar a una  $DO_{580nm} = 400-700$ , se transfirieron a un tubo de centrifuga y se mantuvieron a 4°C durante 15 minutos. A continuación, se centrifugaron (6.000 x g) durante 5 minutos a 4°C y el sedimento se resuspendió en 20 ml de tampón I (30 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% (v/v) Glicerol), que a su vez se centrifugó a 4.000 x g durante 5 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en 8 ml de tampón II (10 mM NaMOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% (v/v) Glicerol) y se repartió en alícuotas de 75 µl. Tras una incubación de 30 minutos a 4 °C, se almacenaron a -80 °C para su uso posterior.

### **III.2.11 Transformación de células competentes por choque térmico**

Las cepas *E. coli* químicamente competentes (DH5α y DH10Bac) se transformaron con los productos de ligación. La mezcla de DNA plasmídico y las bacterias fue incubada en hielo durante 30 minutos y sometida a un choque térmico (42°C durante 45 segundos). Seguidamente, se incubó de nuevo en hielo durante 2 minutos y se añadieron 800 µl de medio SOC (Tabla 7). Este caldo se mantuvo en agitación (180 rpm) a 37°C durante 1 hora para la cepa DH5α o 4 horas para la

cepa DH10Bac. Transcurrido este tiempo, el cultivo se sembró en placas de LB-agar suplementadas con ampicilina y gentamicina (DH5 $\alpha$ ) o tetraciclina, kanamicina y gentamicina, junto con X-Gal e IPTG, en el caso de DH10Bac. Las placas se mantuvieron a 37°C durante 24 horas (DH5 $\alpha$ ) o durante 48 horas (DH10Bac).

### **III.2.12 Generación y amplificación de baculovirus recombinantes**

#### **III.2.12.1 Generación de los bácmidos recombinantes**

Las colonias DH10Bac recombinantes se seleccionaron por su resistencia a los antibióticos kanamicina, tetraciclina y gentamicina y por la ausencia de coloración en presencia de IPTG y X-gal. Para el correcto aislamiento se realizó una estría de una de las colonias blancas y, tras 48 horas, se procedió a la replicación de una colonia blanca en LB líquido en presencia de los tres antibióticos de selección (Tabla 7). El bácmido se extrajo según se indica en el apartado III.2.3.2 y se usó para transfectar células Sf21.

#### **III.2.12.2 Obtención y amplificación de los baculovirus recombinantes**

Los baculovirus modificados genéticamente se obtuvieron mediante la transfección del bácmido recombinante (1  $\mu$ g DNA) en células Sf21 en monocapa ( $9 \times 10^5$  células/pocillo) empleando el reactivo *Cellfectin II* (Invitrogen, EE.UU.), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Tras 72 horas, se centrifugó el medio de cultivo a 700 x g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante clarificado constituyó el pase I, que se distribuyó en viales que se almacenaron a 4°C. Para la generación del pase II se infectaron células Sf21 ( $4 \times 10^6$  células) en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con 35  $\mu$ l del pase I. A las 72 hpi, se recogió el sobrenadante siguiendo el procedimiento descrito previamente. El pase III se generó infectando células Sf21 ( $4 \times 10^6$  células) en un frasco de 25 cm<sup>2</sup> a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 pfu/célula y recogiendo el sobrenadante a las 72 hpi.

### III.2.12.3 Titulación de los baculovirus recombinantes

La titulación de los baculovirus se realizó mediante la determinación de las unidades formadoras de placas, pfu (*plaque-forming units*). Para ello, se sembró una placa de 6 pocillos con  $1 \times 10^6$  células por pocillo. Una vez asentadas (1 hora) se les retiró el medio de cultivo y se añadió 1 ml de las diluciones seriadas ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ ) del baculovirus a titular. Tras 1 hora de adsorción, se retiró el inóculo y se añadieron 1,5 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (Invitrogen, EE.UU.) en medio de cultivo TNM-FH. Una vez solidificada la agarosa, se añadieron 1,5 ml de medio TNM-FH suplementado con FBS y gentamicina (Tabla 7), y se mantuvo la placa durante 7 días a 27°C en oscuridad. Trascurrido este tiempo, se añadió a cada pocillo 1,5 ml del colorante rojo neutro (Sigma-Aldrich, Reino Unido) al 0,033% en PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,8 mM  $K_2HPO_4$ ; 10 mM  $Na_2PO_4$ ) y, tras 24 horas, se realizó en recuento de las placas de lisis y el cálculo del título del baculovirus (pfu/ml).

### III.2.12.4 Infección con los baculovirus recombinantes

Todas las infecciones realizadas en esta tesis se hicieron con pases III titulados por duplicado.

#### III.2.12.4.1 Inoculación de larvas

Se emplearon larvas del lepidóptero *T. ni* en el 5º estadio, con un peso medio aproximado de 300 mg. Se inocularon con los baculovirus recombinantes generados (hasta un volumen máximo de 5  $\mu$ l/larva) mediante inyección intrahemocélica. Las larvas se recolectaron a diferentes tiempos posinfección y se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento.

#### III.2.12.4.2 Inoculación de células de insecto

Las líneas celulares Sf21 y Tn-5 se utilizaron en cultivos en monocapa. Mientras que la línea Sf21 se usó en placas de 6 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^6$

células por pocillo, la línea Tn-5 se empleó a una densidad de  $5 \times 10^5$  células por pocillo. Las inoculaciones se hicieron a una MOI de 0,1 ó 5 pfu/célula. Las muestras se recogieron a las 24, 48, 72 y 96 hpi.

La línea celular Sf9 se empleó en cultivo en suspensión (usando *spinner* de 250 ml). Para su infección a una MOI de 0,1 pfu/célula, se partió de 80 ml de medio de cultivo TNM-FH suplementado (FBS, gentamicina y Pluronic F-68 al 0,1%) con una densidad celular de  $2 \times 10^6$  células/ml. La recolección de las muestras se hizo desde las 3 hasta las 120 hpi. A lo largo del ensayo se analizó la evolución de la población celular mediante el seguimiento del recuento y la viabilidad celular.

### **III.2.13 Análisis y caracterización de las proteínas recombinantes**

#### **III.2.13.1 Procesado de las muestras**

##### **III.2.13.1.1 Obtención de los extractos proteicos de larvas**

El proceso mediante el cual se obtuvo el extracto de PTS a partir de la biomasa de larva se realizó en un homogeneizador de laboratorio Bagmixer<sup>R</sup> (Interscience, Francia), añadiendo 8 ml de tampón de extracción (PBS 1x; Tritón X-100 al 0,1%; 1 mM PMSF; 5 mM DTT; pH 7,2) por cada gramo de biomasa. El homogenado obtenido se centrifugó a  $4.000 \times g$  durante 30 minutos y  $4^\circ\text{C}$  y el sobrenadante se clarificó empleando un filtro Miracloth (Calbiochem, Alemania) para, a continuación, repartirlo en alícuotas que se mantuvieron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

##### **III.2.13.1.3 Obtención de los extractos proteicos de cultivos celulares**

Las muestras de cultivos en monocapa y suspensión se recogieron y centrifugaron a  $700 \times g$  durante 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , a continuación, se resuspendió el sedimento en PBS y se procedió a la extracción de la PTS mediante tres ciclos de congelación ( $-196^\circ\text{C}$ ) y descongelación ( $37^\circ\text{C}$ ). Seguidamente se centrifugó a  $17.668 \times g$  durante 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , descartando el sedimento y distribuyendo el

sobrenadante en alícuotas de un solo uso que se mantuvieron a -20°C hasta su posterior análisis.

### III.2.13.2 Determinación de la concentración de proteína total soluble

La determinación de la PTS se realizó mediante el método espectrofotométrico de Bradford empleando *Quick Start™ Bradford Protein Assay* (Bio Rad Laboratories, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las determinaciones se realizaron por duplicado, leyendo la absorbancia a 595 nm, en un espectrofotómetro Boeco S30 (Boeco, Alemania). La cuantificación se realizó a partir de una curva de calibración realizada con 6 diluciones de albúmina bovina (Sigma-Aldrich, Reino Unido).

### III.2.13.3 Electroforesis desnaturizante de proteínas (SDS-PAGE)

El análisis electroforético de los extractos proteicos se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes en geles de poli(acrilamida) discontinuos SDS-PAGE. El gel concentrador se hizo al 4% de acrilamida:bisacrilamida (Bio Rad Laboratories, EE.UU.), mientras que el separador se hizo al 12%. Como tampón de electroforesis se empleó una solución compuesta por 125 mM Tris Base; 192 mM Glicina y SDS al 0,1% (p/v). Como patrón de peso molecular se utilizó “BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder” (Invitrogen, EE.UU) en los geles que se iban a transferir a una membrana y “BenchMark™ Protein Ladder” (Invitrogen, EE.UU.) en los geles que se iban a teñir con azul de Coomassie.

Se analizaron 10 µg de PTS por carril que se diluyeron 1:1 (v/v) en tampón de carga 2x (125 mM Tris-HCl; SDS 4% (p/v); β-mercaptoetanol 10% (p/v); Glicerol 20% (v/v) y azul de bromofenol 2‰). Las muestras se desnaturizaron a 100°C durante 3 minutos. Las electroforesis se realizaron en cubetas *Miniprotean II* (Bio Rad Laboratories, EE.UU.), a voltaje constante de 80 V hasta que las proteínas superasen el gel concentrador y a 180 V durante la migración de éstas en el gel separador. Las proteínas se visualizaron con la tinción de los geles durante 5 minutos en una solución de azul de Coomassie (Sigma-Aldrich, Reino Unido) al

0,3% (p/v); metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 30% (v/v). Los geles se destiñeron en una solución de metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v).

#### **III.2.13.4 Electrotransferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa**

Los extractos de PTS resueltos electroforéticamente en SDS-PAGE, fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa *Hybond ECL* (GE Healthcare, Reino Unido) con el equipo *Mini Trans-blot cell* (Bio Rad Laboratories, EE.UU.). Se empleó como tampón de transferencia una solución constituida por: 25 mM Tris-HCl; 190 mM Glicina; SDS al 0,37% (p/v) y metanol al 20% (v/v). La transferencia se realizó en frío y a voltaje constante (100V) durante 1 hora. Las membranas electrotransferidas se analizaron por medio de una tinción reversible con *Ponceau S* al 0,1% (Sigma-Aldrich, Reino Unido).

#### **III.2.13.5 Inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa.**

##### ***Western blot***

Las membranas fueron incubadas en solución de bloqueo (leche desnatada al 4%; PBS-T (PBS 1x con 0,1% (v/v) TWEEN 20) durante toda la noche a 4°C. A continuación, se incubaron con los anticuerpos primarios (ver apartado III.1.6) diluidos en tampón de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Transcurrida dicha incubación, se realizaron tres lavados (dos lavados en PBS-T de 10 minutos y uno de 5 minutos) y se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes (ver apartado III.1.6), diluidos en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, las membranas fueron lavadas en PBS-T como se ha descrito anteriormente. Para el revelado, se empleó *ECL detection kit* (GE Healthcare, Reino Unido) siguiendo las recomendaciones del fabricante; el análisis de bandas se realizó con el sistema de captación de imágenes *ChemiDoc™ XRS Gel Imaging System* (Bio Rad Laboratories, EE.UU.).

### **III.2.13.6 Caracterización de la expresión de las proteínas recombinantes**

#### **III.2.13.6.1 Electroforesis automatizada**

Cada una de las muestras (12 µg de PTS) fue cargada en un chip *Pro260* (Bio Rad Laboratories, EE.UU.) y analizada en el bioanalizador *Experion®* (Bio Rad Laboratories, EE.UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este sistema resuelve y cuantifica muestras de proteínas en un rango de 10 a 260 kDa con una sensibilidad similar a la tinción de Coomassie. El sistema se fundamenta en la tecnología microfluídica, mediante la cual se puede obtener el porcentaje de la proteína de interés respecto al total de proteínas presentes en la muestra al emplear el marcador de peso molecular *Pro260* (Bio Rad Laboratories, EE.UU.), optimizado para este sistema electroforético.

#### **III.2.13.6.2 Análisis fluorimétrico**

La cuantificación fluorimétrica de la emisión de la proteína reportadora verde fluorescente (GFP) se llevó a cabo en el lector de placas Tecan GENios (Tecan, Suiza), a partir de 20 µg de PTS de cada muestra, aplicando  $\lambda_{Ex}$ = 485 nm y  $\lambda_{Em}$ = 535 nm, como longitudes de onda de excitación y de emisión, respectivamente.

#### **III.2.13.6.3 Análisis por citometría de flujo**

Para llevar a cabo este procedimiento, las células se resuspendieron en tampón de citometría (PBS 1x; 0,1% BSA y azida sódica al 0,01%) y se analizaron en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, EE.UU.). En cada ensayo se analizaron  $10^5$  células con los parámetros FSC y SSC con amplificación de señal lineal, mientras que la amplificación para la fluorescencia (FL-1) fue logarítmica. El análisis de resultados se realizó utilizando el programa WinMDI 2.9.

#### **III.2.13.6.4 Análisis cuantitativo por *western blot***

La cuantificación de la proteína Cap fue realizada mediante *western blot*. La cantidad de proteína obtenida fue normalizada con un standard de proteína Cap de concentración conocida; así se relacionó la densidad de las bandas inmunorreactivas con la concentración final de proteína recombinante en cada muestra.

#### **III.2.13.6.5 Microscopía óptica y de fluorescencia**

Para la visualización de las células se empleó un microscopio invertido de fluorescencia Leica DMIL (Leica Microsystems GmbH, Alemania), dotado de cámara y del filtro necesario para la detección de la emisión de fluorescencia de la proteína GFP ( $\lambda_{Em}$ = 535 nm).

#### **III.2.13.6.6 Purificación de pseudopartículas virales o VLPs**

Para llevar a cabo la purificación de VLPs [275] se partió de células Sf9 infectadas con los baculovirus recombinantes a una MOI de 0,1 pfu/célula. A las 96 hpi se recogieron las muestras, se lavaron 3 veces en PBS y finalmente el sedimento se resuspendió en agua destilada y fue tratado con DNAsa I (Roche Diagnostics, EE.UU.) durante 1 hora. A continuación se añadió Sarkosyl (Sodium N-lauroylsarcosine, Sigma-Aldrich, Reino Unido) y EDTA hasta una concentración final del 2% y 5 mM, respectivamente, incubando las muestras a 4°C durante toda la noche. Se centrifugaron a baja velocidad (2.000 x g, 5 minutos) y los sobrenadantes se volvieron a centrifugar (131.453 x g; 2 horas y 30 minutos). El sedimento se resuspendió en PBS, se extrajo dos veces con Vertrel XF (Sigma-Aldrich, Reino Unido), y se centrifugó de nuevo (131.453 x g; 2 horas y 30 minutos). Finalmente, el sedimento se resuspendió en PBS y se guardó a 4°C hasta su empleo. La concentración de proteína de las preparaciones de VLPs se realizó mediante el método Bradford.

### **III.2.13.6.7 Microscopía electrónica**

Las muestras purificadas de VLPs se analizaron en el servicio de microscopia electrónica del Centro Nacional de Biotecnología. Las muestras (5 µl) se depositaron en rejillas cubiertas de cobre con película de polivinilo, durante 1 minuto. La rejilla se sumergió en acetato de uranilo al 2% durante 2 minutos, dejándose secar al aire a temperatura ambiente. Las preparaciones fueron observadas empleando un microscopio electrónico JEM 2000 Ex (JEOL, Japón).

### **III.2.13.7 Determinación del contenido de DNA por método fluorimétrico**

Como medida indirecta de la estimación del crecimiento celular se realizó el método descrito para diversas líneas celulares, basado en la determinación de la fluorescencia emitida por el fluorocromo Hoechst 33258 gracias a su capacidad de intercalarse en el DNA [276]. Las muestras de células Sf21 ( $2 \times 10^5$ ) infectadas con el baculovirus recombinante a una MOI de 0,1 ó 5 pfu/célula y recogidas a diferentes tiempos (16, 24, 48 y 72 hpi), se centrifugaron ( $12.000 \times g$ , 10 s), y el sedimento fue resuspendido en 200 µl de tampón de lisis (150 mM NaCl, 150 mM Citrato sódico) y mantenido durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Seguidamente, se sometieron las muestras a tres ciclos de sonicación de un minuto. De este volumen se cogieron 100 µl y se mezclaron con otros 100 µl de Hoechst 33258 (1 µg/ml) en tampón TNE 1x (10 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA), y se dejaron durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, se depositaron alícuotas de 100 µl en una placa de 96 pocillos y se cuantificó la emisión del cromógeno Hoechst 33258 en un lector de placas Tecan GENios (Tecan, Suiza), empleando como longitud de onda de excitación y emisión 360 nm y 465 nm, respectivamente.

### **III.2.13.8 Análisis del ciclo celular**

Para ver las alteraciones del ciclo celular causadas por la infección de los baculovirus recombinantes en células Sf9 infectadas a una MOI de 0,1 pfu/célula, se extrajeron muestras cada 3 horas y se procedió con el protocolo de análisis por

citometría de flujo descrito en la referencia [30]. Según este protocolo, las células fijadas con etanol al 70% se pasaron a través de una jeringa de 23-gauge y se lavaron dos veces en PBS 1X, a continuación se resuspendieron en 500 µl de solución de marcaje (50 µg/ml yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, Reino Unido) en PBS 1x y 5 µg/ml RNasa (Sigma-Aldrich, Reino Unido)), y se mantuvieron durante 15 minutos a 37°C. Para su análisis se usó el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, EE.UU.) y el programa FlowJo 8.5.2 (Tree Star, EE.UU.), descartando las partículas fuera del tamaño normal de la población y contando al menos  $5 \times 10^4$  células en cada muestra.

## **IV RESULTADOS**

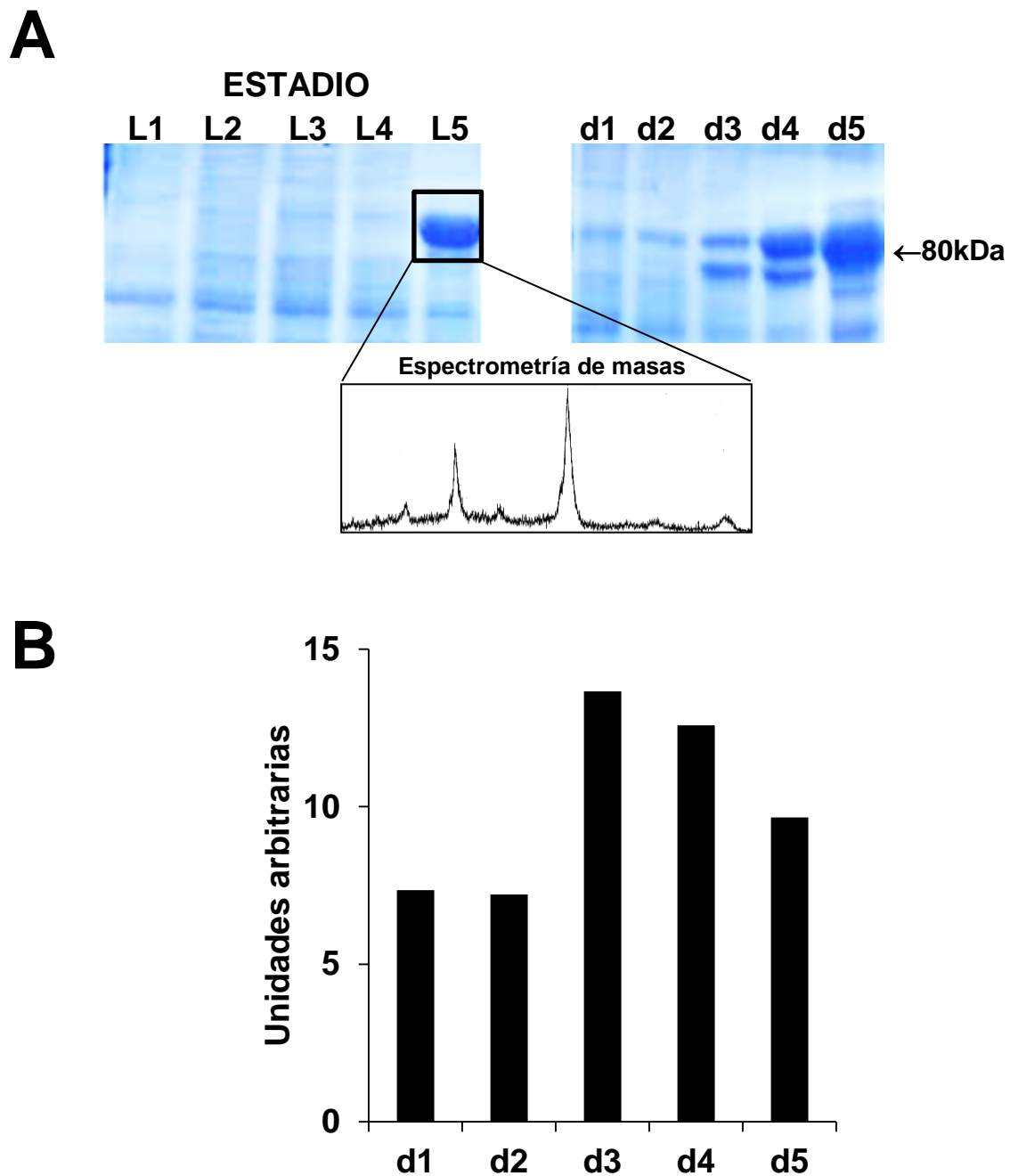


## **IV.1 Determinación de la actividad promotora de elementos reguladores del lepidóptero *Trichoplusia ni* (*T. ni*) en AcMNPV**

### **IV.1.1 Caracterización funcional de la región 5' de los genes *AJHSP-1*, *BJHSP-1* y *BJHSP-2* del lepidóptero *T. ni* en el sistema BEVS**

La incipiente relevancia del sistema BEVS en la industria biotecnológica confirma la importancia de explorar nuevos promotores que palien las deficiencias de los usados hasta ahora. Una posible fuente de promotores son los insectos del orden *Lepidoptera*, origen de las líneas celulares utilizadas en la producción de proteína recombinante en este sistema. Esta tesis ha centrado la búsqueda en el lepidóptero *Trichoplusia ni* (*T. ni*), hospedador natural del baculovirus AcMNPV y fuente de la línea celular Tn-5. Su alta actividad metabólica, reflejada en un incremento diario del 20% del peso corporal [277, 278] y la continua reorganización de los tejidos durante la metamorfosis, ha permitido conjeturar la existencia de promotores fuertes que dirijan la incesante síntesis de proteínas en este insecto.

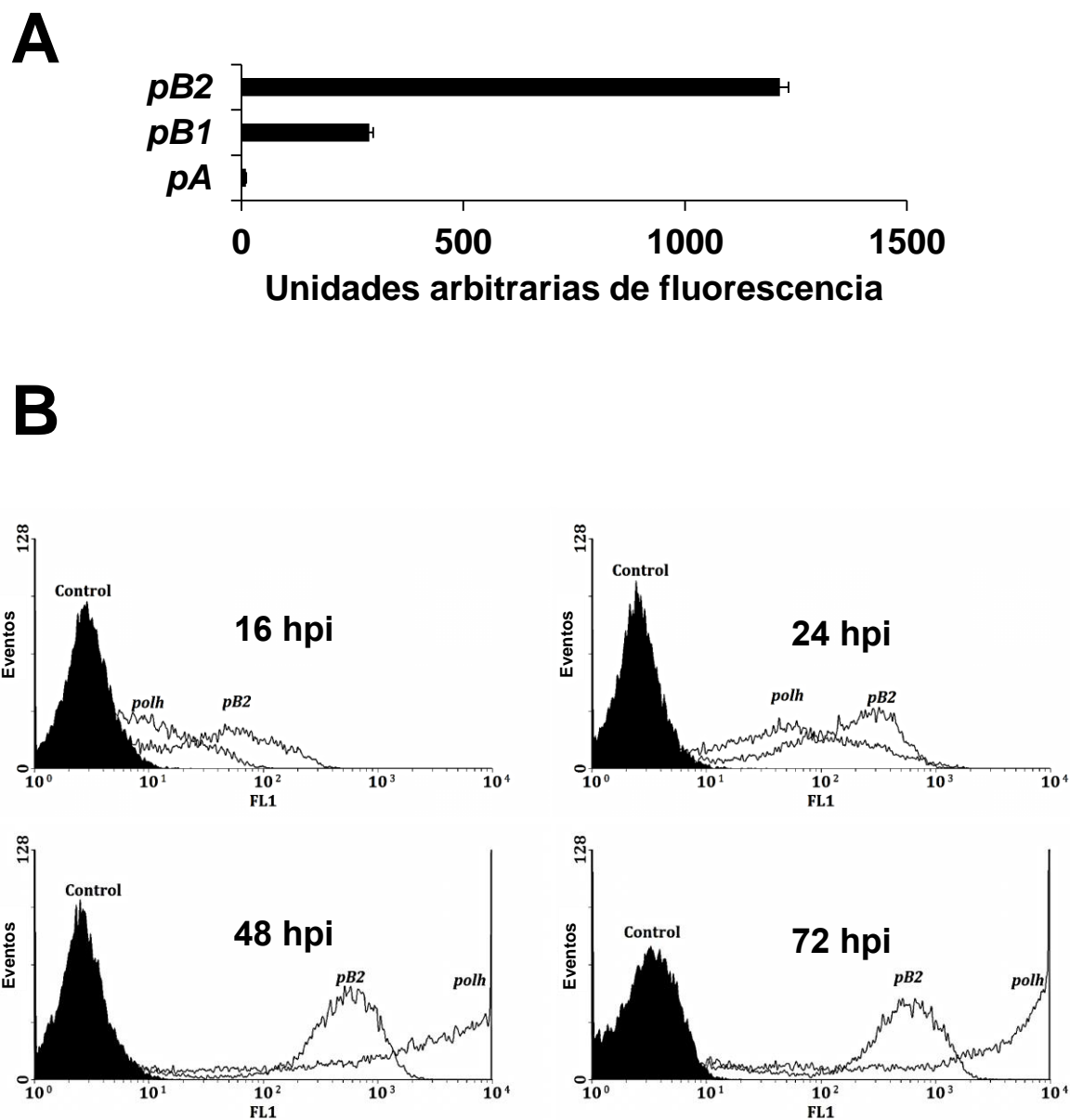
El primer paso fue analizar las proteínas más abundantes del extracto de larva en los diferentes estadios (L1 a L5). Para ello se separaron los extractos solubles por SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie. En el estadio L5 apareció una banda proteica de 80 kDa (Figura 6A) que representó el 60% de la proteína total, y evidenció una dinámica de acumulación creciente. Tras someter la banda a un análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF, se identificaron tres proteínas: la proteína ácida suprimible por la hormona juvenil 1 (*AJHSP-1*), la proteína básica suprimible por la hormona juvenil 1 (*BJHSP-1*) y la proteína básica suprimible por la hormona juvenil 2 (*BJHSP-2*), siendo esta última la más abundante. La principal función de estas proteínas es ser fuente de aminoácidos para la reorganización tisular durante la metamorfosis. El análisis semicuantitativo del mRNA del gen *BJHSP-2* por RT-PCR determinó un pico de transcripción el tercer día del estadio L5 (Figura 6B), coincidiendo con el inicio de la acumulación de las proteínas presentes en la banda de movilidad electroforética de 80 kDa.



**Figura 6. Acumulación de las proteínas de almacenamiento en *T. ni***

A) Patrón electroforético (SDS-PAGE y tinción Coomassie) de las proteínas solubles de la larva a lo largo de su desarrollo (L1-L5) y específico del último estadio (L5d1-L5d5). Una banda de 80 kDa, presente solo en el estadio L5, representó el 60% de la proteína total soluble. B) Análisis de los niveles de transcritos del gen *BJHSP-2* durante el estadio L5 mediante RT-PCR. Incremento de la transcripción el tercer día del estadio, coincidiendo con el inicio de la acumulación de las proteínas presentes en la banda de 80 kDa.

La abundante acumulación de proteína en un período de tiempo tan corto sugería la presencia de promotores fuertes tras de su expresión. La secuencia de la región 5' no traducida de los genes *AJHSP-1*, *BJHSP-1* y *BJHSP-2* ya había sido descrita por Jones [279] por lo que, para contrastar la hipótesis previa, se diseñaron cebadores específicos con los que se amplificó por PCR la citada región en los tres genes, empleando como molde el genoma completo de *T. ni*. Los amplicones se denominaron *pA*, *pB1* y *pB2*, correspondiéndose con los promotores de los genes *AJHSP-1*, *BJHSP-1* y *BJHSP-2*, respectivamente. Se incorporaron al baculovirus AcMNPV, en sustitución del promotor *polh*, y se infectaron células Sf21 a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 pfu/célula, recogiendo las muestras a las 72 hpi. La actividad promotora se caracterizó mediante el análisis de la expresión de la proteína reportadora GFP. Todos los baculovirus generados expresaron GFP, destacando sobre los demás *pB2GFP* (Figura 7A). Mediante la infección de células con los baculovirus *polhGFP* o *pB2GFP* a una MOI de 5 pfu/célula, y la caracterización de su dinámica temporal de expresión por citometría de flujo, se observó que el baculovirus *pB2GFP* propiciaba una expresión más temprana y homogénea, pero menos fuerte a tiempos tardíos, que el baculovirus *polhGFP* (Figura 7B).



**Figura 7. Caracterización de la actividad promotora de las secuencias *pA*, *pB1* y *pB2*, derivadas del lepidóptero *T. ni*, en el baculovirus AcMNPV**

Las secuencias sustituyeron al promotor *polh* en el baculovirus, empleado para infectar células Sf21 (5 MOI) y determinar la expresión de GFP. A) Determinación del grado de acumulación de GFP mediante cuantificación fluorimétrica de extractos de células infectadas con los baculovirus recombinantes generados. B) Dinámica de la expresión de la proteína GFP en células infectadas por los baculovirus: silvestre (control), *polhGFP* o *pB2GFP*, mediante citometría de flujo. Los resultados son la media obtenida a partir de tres ensayos independientes.

#### IV.1.2 Análisis de las regiones esenciales para la actividad promotora de la secuencia *pB2* en *AcMNPV*

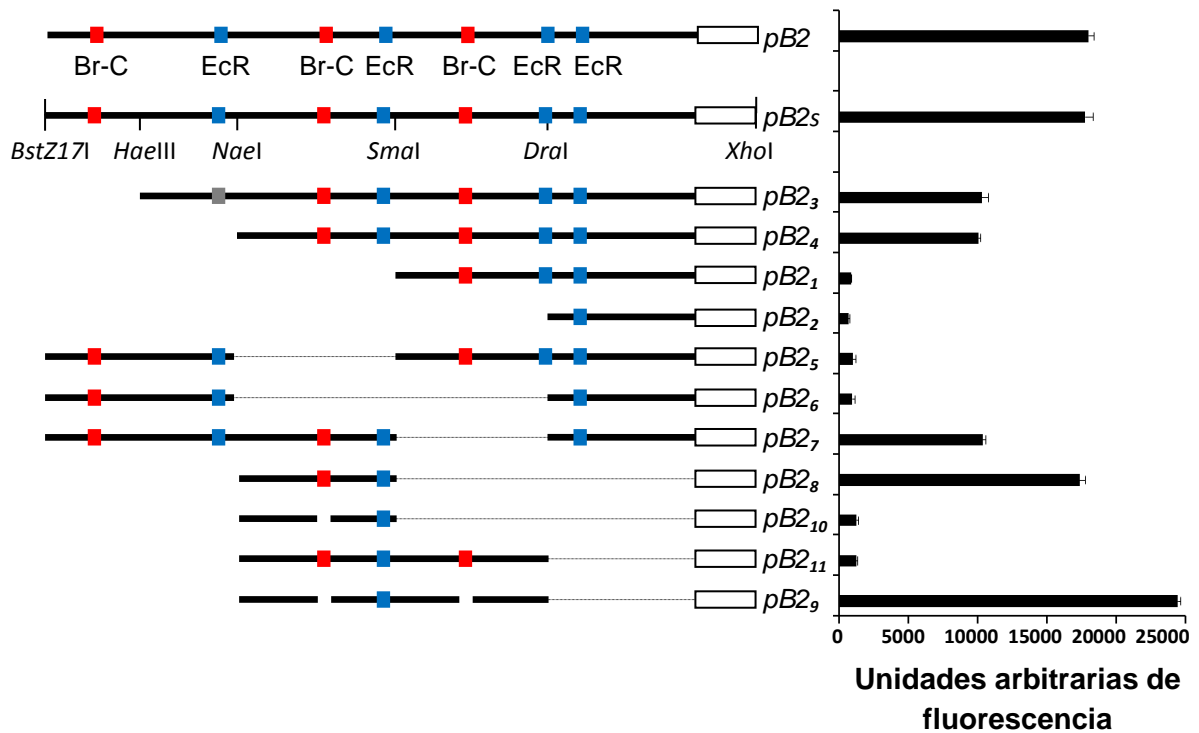
La secuencia *pB2*, que se caracterizó en el laboratorio [280], presentó varias diferencias respecto a la secuencia anotada del extremo 5' del gen *BJHSP2* (nº acceso GenBank: U41640): 2 inserciones, 8 deleciones y 17 mutaciones (Figura 8). El análisis bioinformático de la secuencia predijo 7 lugares de unión vinculados a elementos de respuesta a hormonas, de los cuales 4 correspondían a elementos putativos de respuesta a la hormona ecdisona (EcR) y 3 a lugares putativos *Broad-Complex* (Br-C) (Figura 8).

U41640	-----ACCCOCTGCGACACAAGTATTACATTCCTTAGTGCTTGAATCCTTTAAAGAAAGAAAAGCCAACTTTTCAGAAATCTTAG	77
<i>pB2</i>	CTTGAATGTTAGTGAAAGCCOCTGCGACACAAGTATTACATTCCTTAGTGCTTGAATCCTTTAGCGAAAGCAAAGCCAACTTTTCAGAAATCTTAG	93
	<b>Br-C</b>	
U41640	CACITGTTAACTCGGAAAAAGACCAACAGATGTTTTATTTTCCACTACTACAATTCACCTTAGAAATGTAACCCATTATCATTATTACGC	170
<i>pB2</i>	CACITGTTAACTCGGAAAAAGACCAACAGAT-----TTCCACTACTACAATTCGACATTAGAAATGTAACCCATTATCATTATTACGC	179
U41640	CTCATTTCATCCAAATAAGTTTAAAGTATGTTGAGATAAAAAGTGGCTTACCATTGAACCTTGACATGGGGAOCTCTTGCACTCTGTATCTCAA	263
<i>pB2</i>	CTCATTTCATCCAAATAAGTTTAAAGTACGTTGAGATAAAAAGTGGCTTACCATTGAACCTTGACATGGGGAOCTCTTGCACTCTGTATCTCAA	272
U41640	GTCAACTTTCCTATCCAAATATTTGATAACATTTGACATGATATTAAGTAAGATTTGTTACTAAGGCTTACATTGTAATATTACTGACGCCAA	356
<i>pB2</i>	GTCAACTTTCCTATCCAAATATTTGATAACATTTGACATGATATTAAGTAAGATTTGTTACTAAGGCTTACATTGTAATATTACTGACGCCAA	365
U41640	GTTCTTTTATCAATAAATAGCTGAAAACAAAAAAAAAA-CATCGATTAGGGTGACTGAAGGTTACATTTGGGGTAGGTTATGGTTAATACGTAA	448
<i>pB2</i>	GTTCTTTTATCAATAAATAGCTGAAAACAAAAAAAAAA-CATCGATTAGGGTGACTGAAGGTTACATTTGGGGTAGGTTATGGTTAATACGTAA	458
	<b>EcR</b>	
U41640	TGGTTAAACACAAAACGTATA-CATGGATTGACTTTTATAAAITTTATATAAAGTGTAATAATATTTTTAATGAGTGGACGGTCGGTCAAT	540
<i>pB2</i>	TGGTTAAACACAAAACG-ATATCATGGATTGACTTTTATAAATTTTATATAAAGTGTAATAATATTTTTAATGAGTGGACGGTCGGTCAAT	550
	<b>Br-C</b>	<b>EcR</b>
U41640	GTCTTGCCATTTGACGTACATAACATATTAGGTGATTATATAAATAACTCAAATATTACTTGCAGTTTAAAGTTTCATCATAATCTGATCAT	633
<i>pB2</i>	<b>GTCT</b> TGCCATTTGACGTACATAACATATTAGGTGATTATATAAATAACTCAAATATTACTTGCAGTTTAAAGTTTCATCATAATCTGATCAT	643
U41640	AAGTTTCACCCAAACAGAAACAAAAGCATAACTATCTGCTATTGTAATATCTTTAGCTTCCCATGAAGAAAGATTACCGTAACCATCACTAG	726
<i>pB2</i>	AAGTTTCACCCAAACAGAAACAAAAGCATAACT <b>ATCTGCTATTGAA</b> TATCTTTTAGCTTCCCATGAAGAAAGATTACCGTAACCATCACTAG	736
	<b>Br-C</b>	
U41640	GATTTTATACAGATTGTAGAAAATAAAGTATTCTCAGTCTCTTTTTCAGTTTAAATCTGCTGGCATTTTTCACAAGTCGCTGTATCAGTCAATGT	819
<i>pB2</i>	GATTTTATACAGATTGTAGAAAATAAAGTATTCTCAGTCTCTTTTTCAGTTTAAATCTGCTGGCATTTTTCACAAGTCGCTGTATCAGTCAATGT	829
	<b>EcR</b>	
U41640	TTATACAATATGTCAATGTACTTTTCGTAATTAATCAGAAAAAATATTCTACTAGTTTGTATAAGCTATCACITTTGTACATTGTATTGCCCT	912
<i>pB2</i>	TTATACAATAT <b>GTCAATGTAC</b> TTTCGTAATTAATCAGAAAAAATATTCTACTAGTTTGTATAAGCTATCACITTTGTACATTGTATTGCCCT	922
	<b>EcR</b>	
U41640	TTACAGTTCATCAGGTATTTATGAATGACATATTGGAGAAACATCGTAATCAGTTCAGTATAAAAAGGGGTGCAITTCGGTAAGAGTACAGT	1005
<i>pB2</i>	TTACAGTTCATCAGGTATTTATGAATGACATATTGGAGAAACATCGTAATCAGTTCAGTATAAAAAGGGGTGCAITTCGGTAAGAGTACAGT	1015
		↑
U41640	TGAACTCACATCGAGTTAACTCCACGATGAGGGCTGTCTATTATTTCGTTGTGAGCCTGGCCGCTGGCCATG3CTAGGCTGAGATTGACGA	1098
<i>pB2</i>	TGAACTCACATCGAGTTAACTCCACG-----	1041
U41640	CACCACACTGG	1109
<i>pB2</i>	-----	

**Figura 8. Análisis de la secuencia *pB2*, aislada del lepidóptero *T. ni*, e identificación de los elementos reguladores presentes**

Alineamiento de la región promotora del gen *BJHSP2* (nº acceso GenBank: U41640) y secuencia *pB2*, caracterizada en esta tesis. Se indica: el lugar de inicio de la transcripción (↑), la caja TATA (subrayada), los lugares putativos de unión EcR (azul) y Br-C (rojo) y las posiciones no conservadas entre ambas secuencias (gris).

En función de la distribución de estos elementos en la secuencia *pB2* se sintetizó la secuencia denominada *pB2s*, en la que se habían incorporado sitios de restricción para la posterior generación de versiones truncadas de la secuencia promotora. Dicha incorporación no supuso ninguna modificación en el grado de expresión de la proteína GFP, tal y como pudo comprobarse mediante la obtención del correspondiente baculovirus recombinante (Figura 9). La finalidad del fraccionamiento fue dilucidar el posible papel regulador que estos elementos pudiesen estar ejerciendo sobre la actividad promotora de la secuencia en AcMNPV. Cada fragmento generado se introdujo en el baculovirus en sustitución del promotor *polh* y, tras la infección de las células, se cuantificó su actividad mediante análisis fluorimétrico de la expresión de la proteína GFP (Figura 9). Toda la serie de deleciones en el extremo 5' (*pB2<sub>1</sub>*, *pB2<sub>2</sub>*, *pB2<sub>3</sub>* y *pB2<sub>4</sub>*) conllevó un descenso en la expresión de la proteína GFP en relación a *pB2s* (95%, 96%, 42% y 43%, respectivamente). Además, la eliminación de la región comprendida entre las dianas *NaeI* y *SmaI* o entre *NaeI* y *DraI*, fragmentos *pB2<sub>5</sub>* y *pB2<sub>6</sub>*, respectivamente, suprimió la actividad promotora de *pB2s*. Por otra parte, la región entre *NaeI* y *SmaI*, fragmento *pB2<sub>8</sub>*, parecía contener los principales elementos reguladores, ya que presentaba un nivel de actividad similar al de la secuencia *pB2s*. De estos datos se dedujo el papel crucial de esta región en la actividad transcripcional del promotor *pB2*. También se observó que la deleción del lugar putativo de unión a Br-C del fragmento *pB2<sub>8</sub>*, provocaba un descenso de su actividad promotora, como reflejó la construcción *pB2<sub>10</sub>*, sugiriendo la importancia de su papel como elemento regulador. Al analizar la actividad del fragmento *NaeI* y *DraI* (*pB2<sub>9</sub>*), en el que se habían eliminado los dos lugares putativos Br-C, se apreció un incremento de la fluorescencia de un 37% respecto a la secuencia completa (*pB2s*), resultando el fragmento con mayor actividad promotora de todos los analizados. Sorprendentemente, cuando este fragmento contenía los dos sitios putativos de unión a Br-C (*pB<sub>11</sub>*), la actividad promotora se abolía por completo. De este resultado se dedujo que los sitios putativos de unión a Br-C podían ser deletéreos para la actividad promotora en determinadas circunstancias en células Sf21.



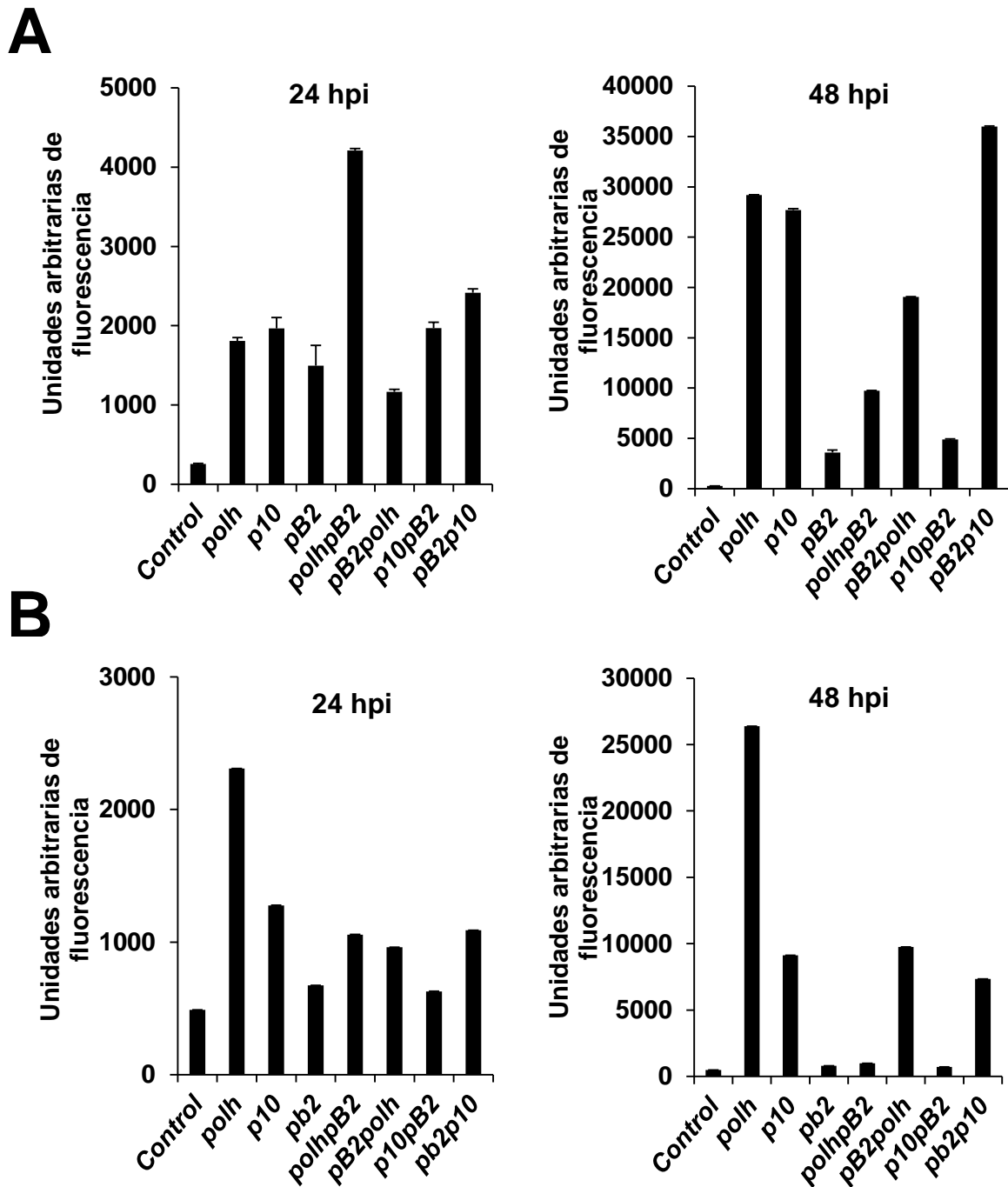
**Figura 9. Esquema ilustrado de las versiones truncadas de la secuencia *pB2* y su actividad promotora**

Los fragmentos se incorporaron al baculovirus *AcMNPV*, empleado para infectar células Sf21 (5 MOI) y determinar por análisis fluorimétrico la expresión de la proteína GFP a las 72 hpi. Los lugares de unión a Br-C y EcR se indican en rojo y azul, respectivamente. El motivo TATA y el lugar de inicio de transcripción se indican como una caja blanca. Los resultados son la media obtenida a partir de tres ensayos independientes.

## IV.2 Generación de promotores híbridos (insecto-baculovirus) e influencia de la incorporación de un elemento *enhancer* en *AcMNPV*

### IV.2.1 Cooperación sinérgica entre la secuencia *pB2* y los promotores de baculovirus *polh* y *p10*

Los datos obtenidos en el apartado anterior indicaron que la secuencia *pB2* presentaba una actividad promotora más temprana y uniforme que *polh*, pero más débil en la fase final. Con el propósito de integrar las características del promotor *pB2* con las de los promotores muy tardíos de *AcMNPV* (*polh* y *p10*), se construyeron las siguientes secuencias promotoras híbridas: *pB2polh*, *polhpB2*, *pB2p10* y *p10pB2*. Para monitorizar su actividad se generaron los correspondientes baculovirus recombinantes, empleando la proteína GFP como reportadora. Los resultados mostraron que la posición de la secuencia *pB2* en el híbrido influía de manera considerable en la expresión de la proteína (Figura 10A). Así, cuando se localizaba aguas abajo del extremo 3' de la secuencia *polh* (*polhpB2*), la construcción presentaba una expresión más temprana (24 hpi) a la dirigida por los promotores *polh* y *p10*, mientras que si se localizaba aguas arriba (*pB2polh*), la expresión caía por debajo de los promotores de referencia. La quimera *pB2p10* alcanzó los mejores niveles de expresión a las 48 hpi, incrementando la expresión inducida por los promotores *polh* y *p10* en un 22% y un 28%, respectivamente. A la misma hora, el nivel de expresión del híbrido *p10pB2* fue un 83% y un 82% menor. Sorprendentemente, al realizar la caracterización en la línea Tn-5, ninguna de las combinaciones de promotores analizadas lograron mejorar los niveles de *polh* (Figura 10B).

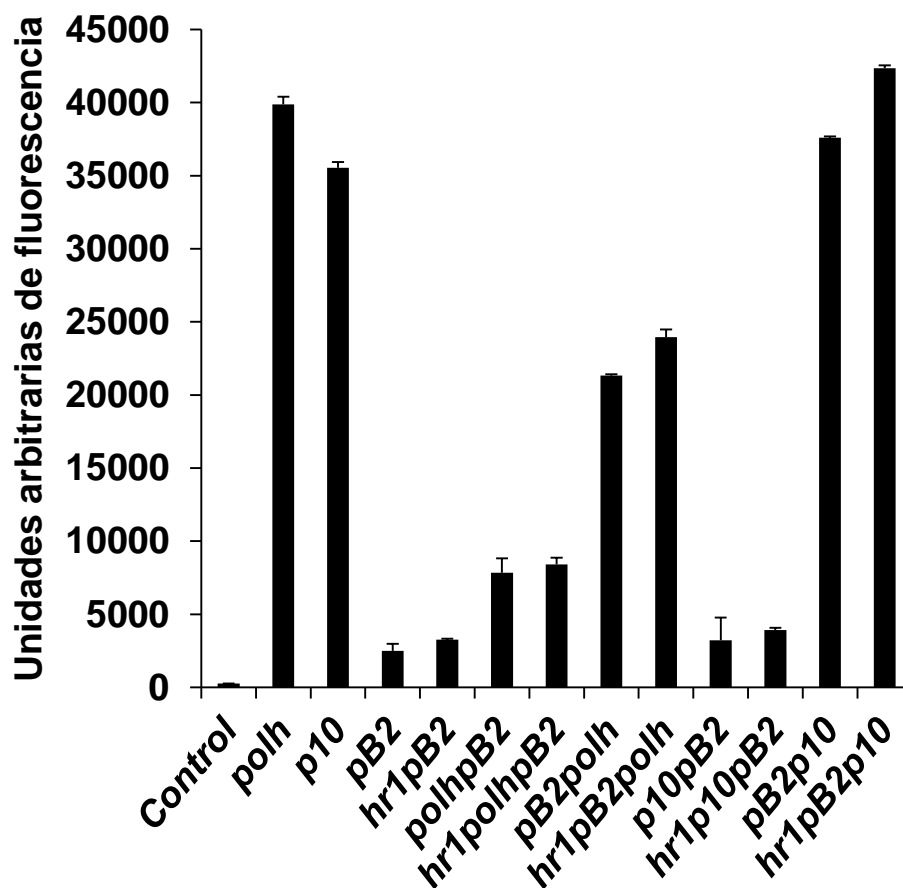


**Figura 10. Análisis comparativo de la expresión de la proteína GFP por los promotores híbridos generados**

Las quimeras se incorporaron al baculovirus, empleado para infectar células Sf21 (A) y Tn-5 (B) a una MOI de 5 pfu/célula y determinar la expresión de la proteína GFP por ensayo fluorimétrico. Los resultados son la media obtenida a partir de tres ensayos independientes.

#### IV.2.2 Relevancia de la incorporación de una copia adicional de la región homóloga 1 (*hr1*) de AcMNPV

La incorporación de una copia de la región homóloga 1 (*hr1*) del baculovirus AcMNPV, precediendo al promotor *polh*, potencia la transcripción del gen heterólogo [236]. Por este motivo, se estudió el efecto de la inserción en el promotor *pB2* y en las quimeras. Se crearon las construcciones (*hr1pB2polh*; *hr1pB2p10*, *hr1polhpB2*, *hr1p10pB2* y *hr1pB2*) y sus correspondientes baculovirus, que se emplearon para infectar células Sf21 a una MOI de 5 pfu/célula (Figura 11). El análisis del patrón de expresión de la proteína GFP reveló un incremento de la expresión en todos los casos.



**Figura 11. Expresión de la proteína GFP tras la inserción de una copia adicional de la región homóloga 1 en los baculovirus recombinantes**

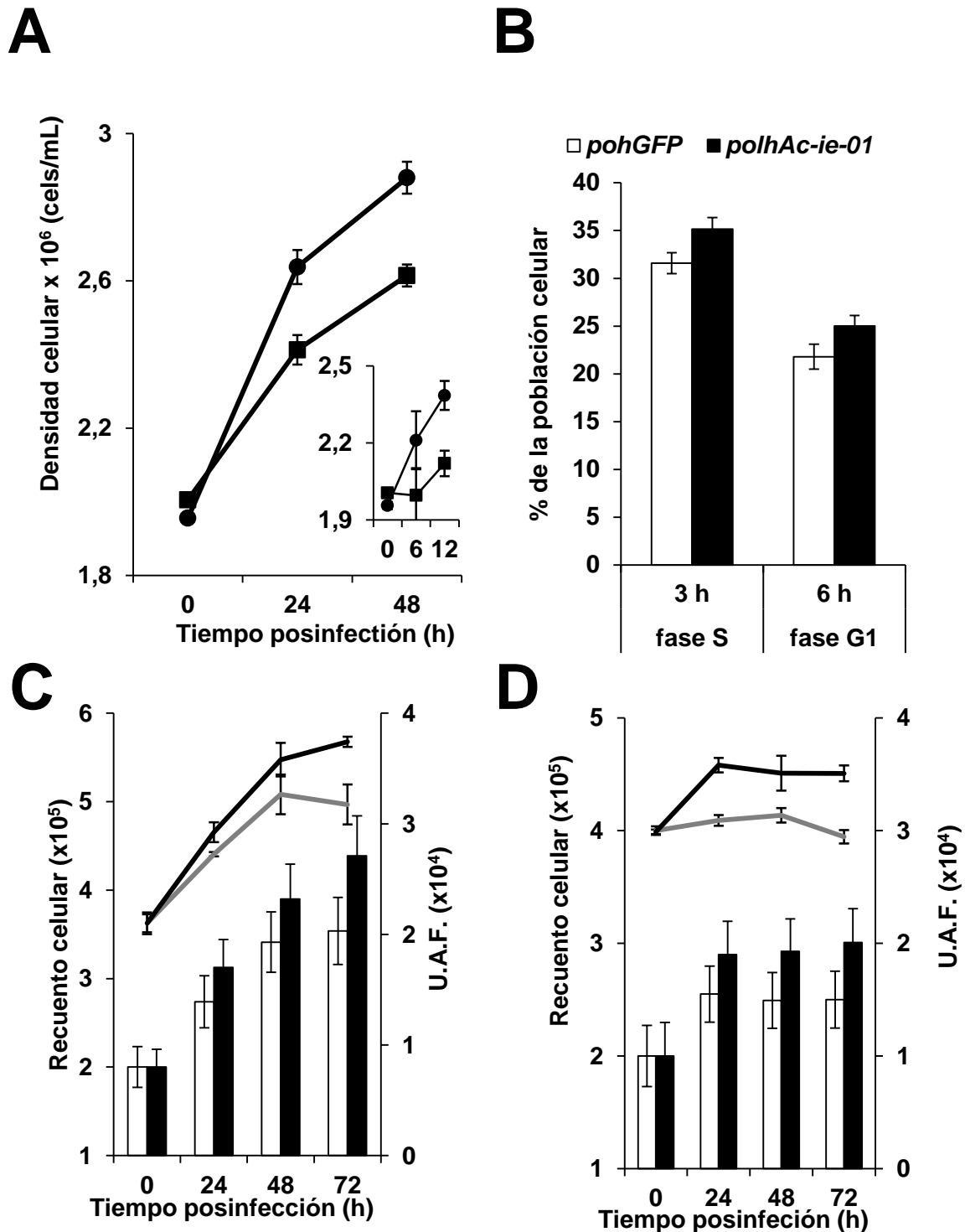
La secuencia *hr1* se incorporó a los baculovirus, empleados para infectar células Sf21 a una MOI de 5 pfu/célula y determinar la expresión de GFP, a las 72 hpi, por ensayo fluorimétrico. Los resultados son la media obtenida a partir de tres ensayos independientes.

### IV.3 Caracterización funcional de los factores reguladores IE0 e IE1

Los promotores muy tardíos de *AcMNPV*, *polh* y *p10*, se emplean de forma rutinaria para expresar proteínas heterólogas en el sistema BEVS. Sin embargo, la expresión en esta fase de la infección coincide temporalmente con el inicio de las alteraciones moleculares, estructurales y funcionales provocadas en la célula por el efecto citopático de la infección vírica. El virus *AcMNPV* codifica para una serie de proteínas capaces de modular la respuesta celular a la infección, entre ellas la proteína IE1 y la proteína IE0. Por este motivo, se estudió el efecto en el curso de la infección de la inserción en el genoma del baculovirus de una segunda copia codificante para estas dos proteínas (cDNA *Ac-ie-01*), expresadas bajo un promotor fuerte. Para ello, se generó el baculovirus *polhAc-ie-01*, que expresaba el cDNA que codifica para ambas proteínas bajo el promotor *polh*, y se infectaron células Sf9 y Sf21 para estudiar el efecto provocado con esta incorporación.

En la línea celular Sf9 se observó desde muy temprano (6 hpi) un mayor incremento (10%) de la población celular al ser infectada con el baculovirus *polhAc-ie-01* respecto a la infección con el baculovirus control, *polhGFP* (Figura 12A). Este dato se confirmó en la línea celular Sf21 al realizar una medida indirecta de crecimiento celular mediante la cuantificación del DNA con el fluoróforo *Hoechst 33258* (Figura 12C y D). El análisis del ciclo celular de las primeras 6 hpi determinó el punto donde ocurría la divergencia entre las poblaciones de células, observándose en las infectadas por el baculovirus *polhAc-ie-01* un incremento de la fase S a las 3 hpi, que más tarde se reflejaba en un aumento de la fase G1 (Figura 12B). Esto se correlacionaba con el incremento del número de células visto a ese tiempo (Figura 12A).

En la línea Sf21, cultivada en monocapa, e infectada a una MOI de 5 (Figura 12C) o 0,1 (Figura 12D), se observó un comportamiento similar.

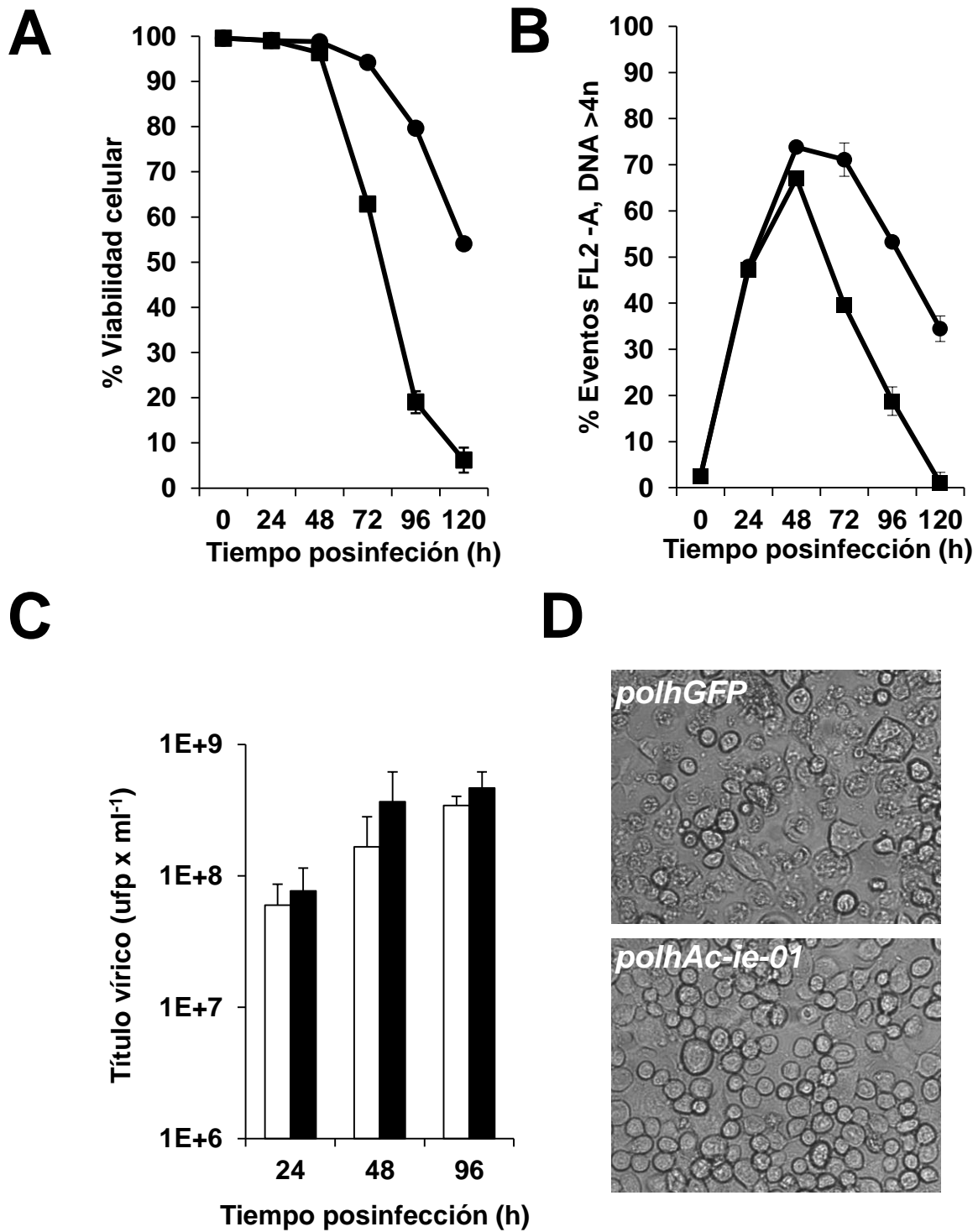


**Figura 12. Efecto de la sobreexpresión de los factores IE0 e IE1 sobre la proliferación celular**  
 A) Recuento celular de la línea celular Sf9 infectada a una MOI de 0,1 pfu/célula con los baculovirus *polhGFP* (■) o *polhAc-ie-01* (●). B) Afectación del ciclo celular de células Sf9 durante la fase temprana de infección. Cuantificación fluorimétrica del DNA (líneas) y recuento celular (barras) de la línea Sf21 infectada a una MOI de 0,1 pfu/célula (C) o 5 pfu/célula (D) con los baculovirus *polhGFP* (barras blancas y líneas grises) o *polhAc-ie-01* (barras y líneas negras). U.A.F.; Unidades arbitrarias de fluorescencia. Los resultados son la media obtenida a partir de tres ensayos independientes.

A continuación, se valoró la posible relación de la sobreexpresión de estos factores en la prolongación de la vida en las células infectadas por el baculovirus. Para ello, se estudió la viabilidad celular de la línea Sf9 a lo largo de la infección con los baculovirus *polhAc-ie-01* y *polhGFP* (Figura 13A). Este dato permitió establecer que la sobreexpresión de IE0 e IE1 incrementaba la viabilidad celular (Figura 13A). Adicionalmente, y como medida indirecta de la lisis celular, se determinó el contenido de DNA vírico intracelular a partir de los datos del ciclo celular, ya que este valor se corresponde con la región superior a 4N. De manera complementaria, la medida del DNA vírico intracelular se correlacionaba con la viabilidad celular (Figura 13B), siendo mayor en las células infectadas por el baculovirus *polhAc-ie-01*.

La determinación del título de virus extracelular no mostró diferencias significativas, sugiriendo que los hallazgos descritos eran independientes de aspectos relacionados a la carga vírica (Figura 13C).

El efecto de la sobreexpresión de los factores IE0 e IE1 se observó en las líneas derivadas del lepidóptero *S. frugiperda* (Sf21 y Sf9) y en la línea Tn-5, derivada de *T. ni*. La mayor adherencia al sustrato de esta última permitió ver el efecto protector frente a la infección, apreciándose una monocapa celular (96 hpi) intacta en las células infectadas con el baculovirus *polhAc-ie-01* y muy deteriorada en las infectadas por *polhGFP*. (Figura 13D).



**Figura 13. Efecto de la sobreexpresión de los factores IE0 e IE1 sobre la viabilidad celular y la producción de virus en células infectadas**

A) Viabilidad celular de la línea celular Sf9 infectada a una MOI de 0,1 pfu/célula con los baculovirus *polhGFP* (■) o *polhAc-ie-01* (●) y contenido de DNA vírico intracelular (>4N) determinado por citometría de flujo (B). C) Título de virus extracelular del baculovirus *polhGFP* (blanco) y *polhAc-ie-01* (negro). D) Microfotografías obtenidas por microscopía óptica (20x) de células Tn-5 infectadas a 96 hpi y a una MOI de 5 pfu/célula.

#### **IV.4 Combinación de elementos en *cis* y factores en *trans* en un casete de expresión para el baculovirus AcMNPV**

Estudios previos demostraron que las proteínas inmediatamente tempranas del baculovirus, IE0 e IE1, estaban involucradas en la activación transcripcional de diferentes promotores víricos mediante la interacción con las secuencias *hr* o de manera independiente a éstas [56-58]. Con el objeto de incrementar la actividad promotora de las construcciones portadoras de una copia adicional de la secuencia *hr1* que habíamos generado, nos planteamos incluir el cDNA *Ac-ie-01*, que codifica para ambos factores (IE0 e IE1). Se trataba con ello de combinar elementos en *cis* y factores en *trans* en un casete de expresión policistrónico.

En la Figura 14 se muestra la distribución de los elementos del casete de expresión propuesto, donde el componente central es la región homóloga 1 (*hr1*) y, en torno a ella, se dispone el promotor que dirige la expresión del cDNA *Ac-ie-01* (en sentido levógiro) y el promotor que dirige la expresión del gen de interés (en sentido dextrógiro).

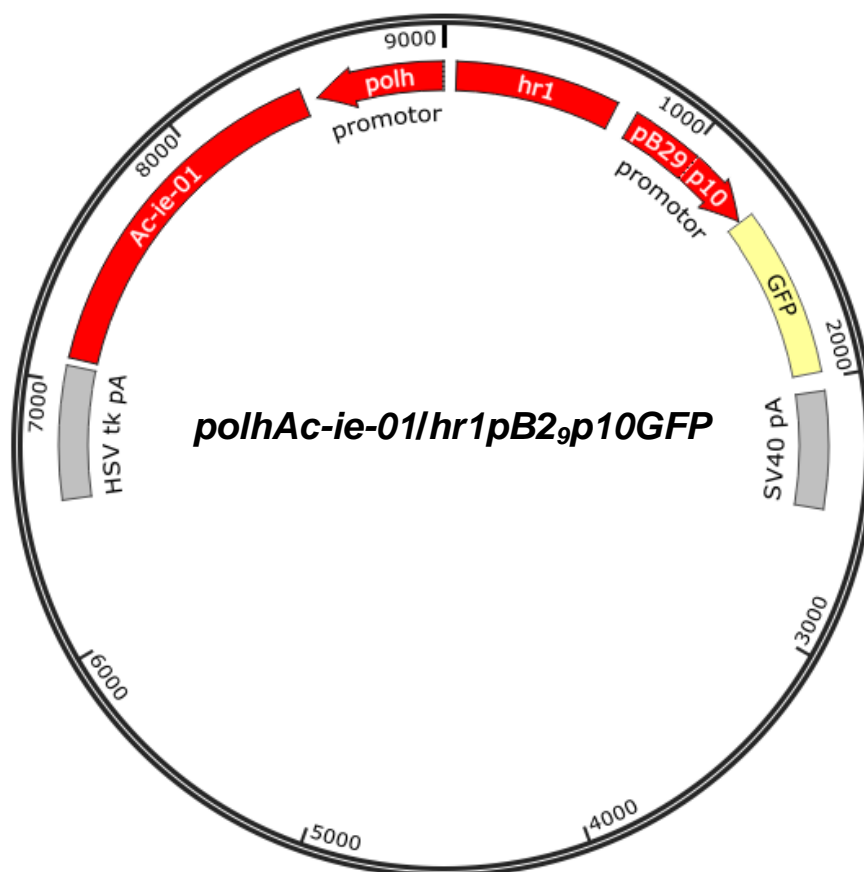


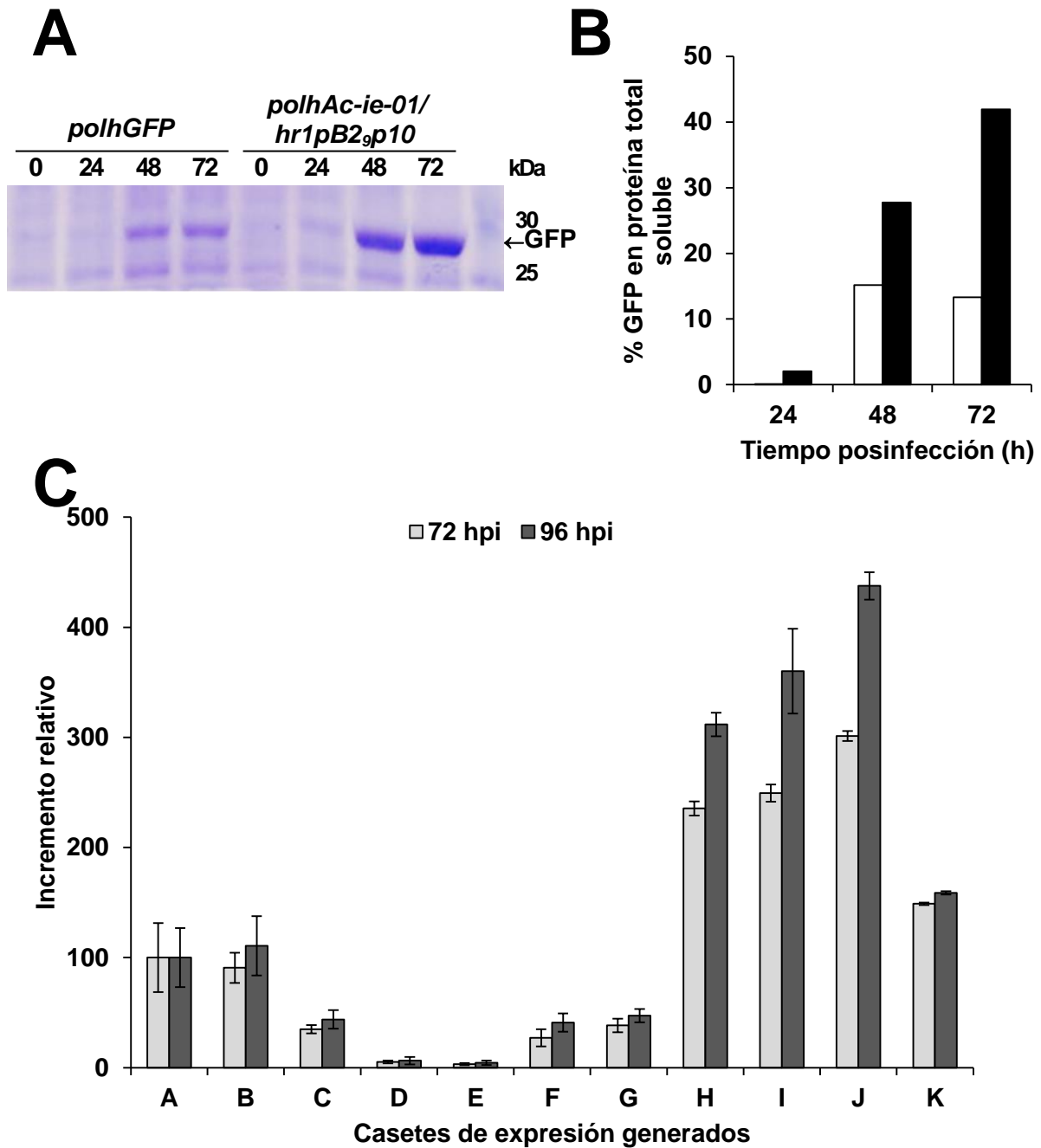
Figura 14. Modelo propuesto de casete de expresión

A la secuencia promotora *hr1pB2p10*, la más eficiente hasta el momento, se le sustituyó el promotor *pB2* por el fragmento *pB2<sub>9</sub>*, de mayor fuerza (Figura 9), dando lugar a la secuencia *hr1pB2<sub>9</sub>p10*, utilizada para dirigir la expresión del gen de interés (GFP). Como resultado final, se generó la construcción *polhAc-ie-01/hr1pB2<sub>9</sub>p10GFP* y su correspondiente baculovirus.

El nivel de producción de proteína recombinante se determinó realizando infecciones sincronizadas (5 MOI) en células Sf21, en las cuales se comparaba la expresión de la proteína GFP obtenida por baculovirus recombinante con el casete *polhAc-ie-01/hr1pB2<sub>9</sub>p10GFP* frente al baculovirus convencional (*polhGFP*). Se observó una mayor expresión de la proteína GFP en células infectadas con el nuevo casete respecto a las infectadas con el baculovirus *polhGFP* (Figura 15A), superando el 40% de la PTS frente a un 15% en el baculovirus convencional (Figura 15B). Además, se identificó una dinámica de expresión diferente, incrementándose en el tiempo con el nuevo casete (Figura 15B).

A partir de estos resultados, se estudió qué otros promotores podrían incluirse en el casete de expresión desarrollado para incrementar su rendimiento. Así, se seleccionaron los más usados en el sistema BEVS, *polh* y *p10* (de expresión muy tardía), y el promotor tardío *p6.9*, de menor actividad pero más temprana. Así, se generaron las construcciones: *polhAc-ie-01/hr1polhGFP*; *polhAc-ie-01/hr1p10GFP*; *polhAc-ie-01/p10GFP*; *polhAc-ie-01/hr1p6.9GFP*; *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* y *polhAc-ie-01/hr1polhp10GFP*.

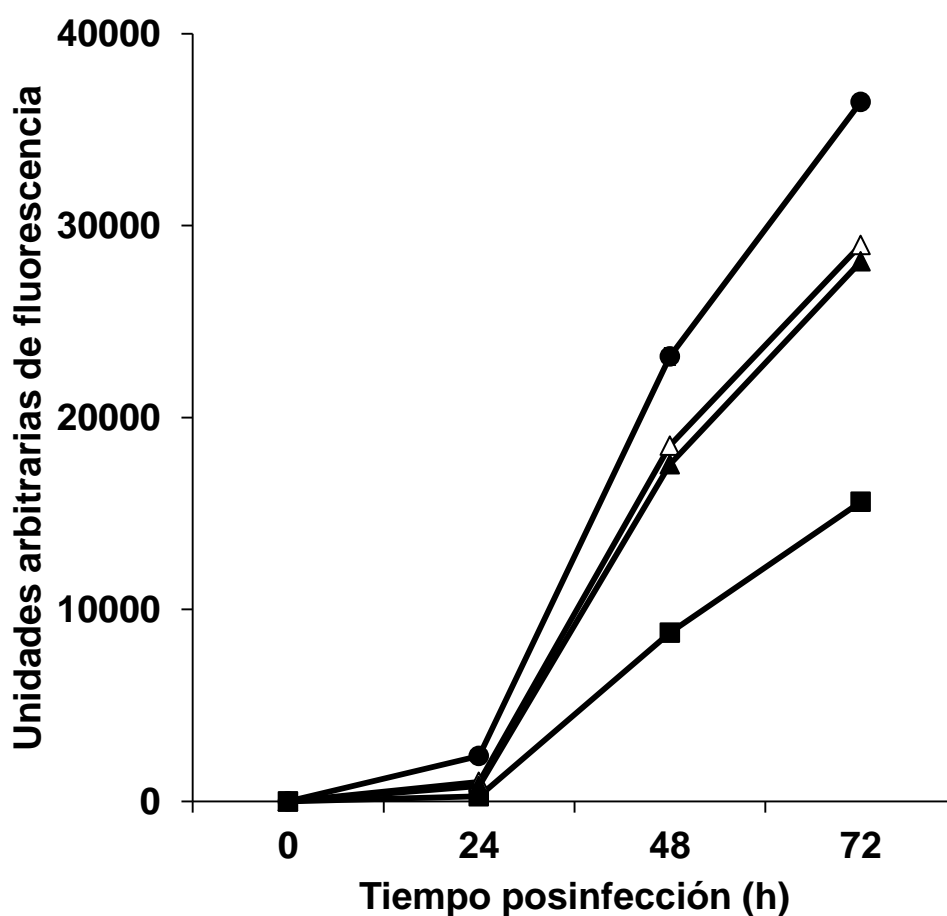
La funcionalidad de las nuevas propuestas de casete de expresión se verificó con la generación de los respectivos baculovirus, usados para infectar de forma sincrónica (5 MOI) células Sf21. Como muestra la Figura 15C, la presencia del promotor *p10* influyó en gran medida en los niveles de expresión del casete, ya que su presencia (solo o formando parte de una quimera) determinó un incremento en la expresión de la proteína reportadora respecto a los promotores *polh*, *p10* o *p6.9* individualmente. Al suprimir la secuencia *hr1* del casete (*polhAc-ie-01/p10GFP*), la expresión de la proteína GFP cayó de forma drástica, lo que sugirió la importancia de este elemento en la actividad del casete. De manera sorprendente, cuando el promotor *polh* fue el encargado de expresar el gen reportador GFP, dentro de la estructura del casete (*polhAc-ie-01/hr1polhGFP*), apenas se logró detectar expresión, sugiriendo este hecho que la sobreexpresión de las proteínas IE0 e IE1 pudiese ser negativa para la actividad promotora de *polh*, incluso en presencia de la secuencia *hr1* (Figura 15C). Fue necesaria la incorporación de la secuencia *p10* a continuación del promotor *polh* (*polhAc-ie-01/hr1polhp10GFP*) para detectar un incremento de la expresión de GFP.



**Figura 15. Análisis comparativo de la expresión de la proteína GFP por el nuevo casete y los promotores convencionales del sistema BEVS**

El casete de expresión inicial y sus variantes se incorporaron al baculovirus, que fue empleado para infectar células Sf21 a una MOI de 5 pfu/célula y determinar la expresión de GFP. A) Tinción con azul de Coomassie de la separación (SDS-PAGE) de la PTS de las células infectadas con los baculovirus *polhGFP* o *polhAc-ie-01/hr1pB2<sub>9</sub>p10GFP* (casete inicial). B) Producción de GFP (porcentaje respecto a la proteína total soluble) mediante electroforesis automática microfluídica de los extractos proteicos, en blanco (*polhGFP*) y en negro (*polhAc-ie-01/hr1pB2<sub>9</sub>p10GFP*). C) Determinación de la expresión de la proteína GFP por ensayo fluorimétrico de los diferentes casetes de expresión generados: A, *polh*; B, *p10*; C, *p6.9*; D, *pB2*; E, *polhAc-ie-01/hr1polhGFP*; F, *polhAc-ie-01/p10GFP*; G, *polhAc-ie-01/hr1p6.9GFP*; H, *polhAc-ie-01/hr1p10GFP*; I, *polhAc-ie-01/hr1pB2<sub>9</sub>p10GFP*; J, *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* y K, *polhAc-ie-01/hr1polhp10GFP*. Los resultados son la media obtenida a partir de tres ensayos independientes.

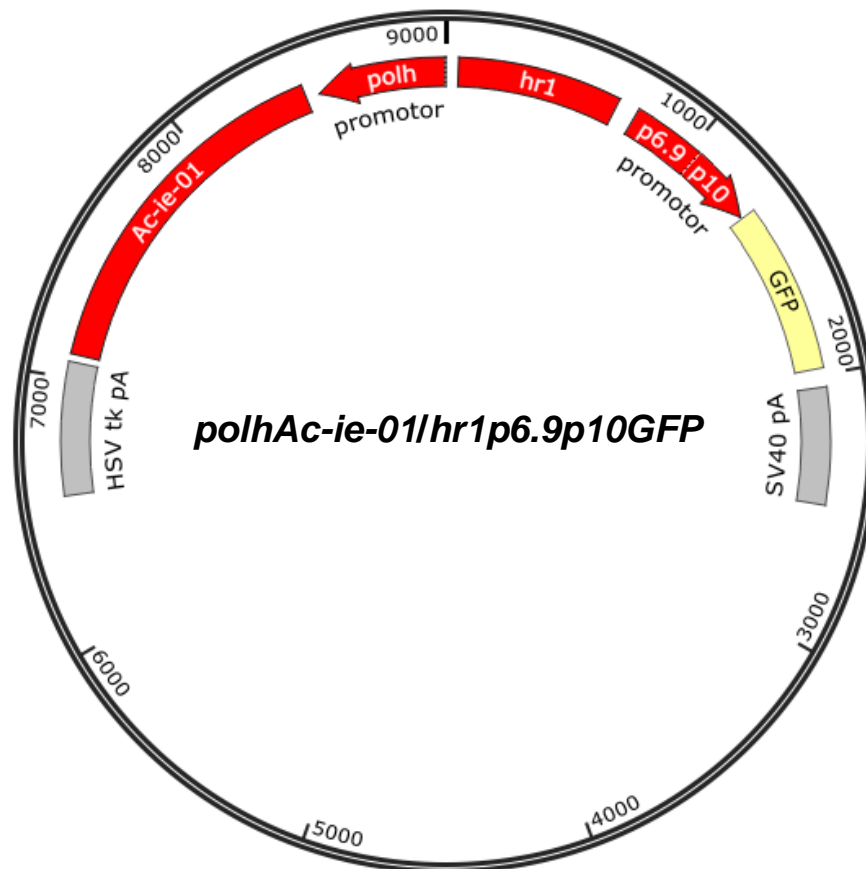
En el baculovirus silvestre (AcMNPV), los factores IE0 e IE1 se expresan muy temprano y en un nivel bajo tras ser infectada la célula. Sin embargo, su sobreexpresión en el baculovirus que contiene el casete desarrollado está dirigida por el promotor *polh*, fuerte y muy tardío. A continuación, nos planteamos usar un promotor más temprano para expresar el cDNA *Ac-ie-01*, empleando finalmente el que habíamos caracterizado en el laboratorio, *pB2<sub>9</sub>*. El nuevo baculovirus *pB2<sub>9</sub>Ac-ie-01/hr1pB2<sub>9</sub>p10GFP* se comparó con *polhAc-ie-01/hr1pB2<sub>9</sub>p10GFP*, *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* y con *polhGFP*. Como se observa en la Figura 16, el cambio de promotor no alteró los niveles de expresión de la proteína GFP.



**Figura 16. Influencia del promotor empleado para expresar el cDNA *Ac-ie-01* en la expresión de la proteína recombinante GFP**

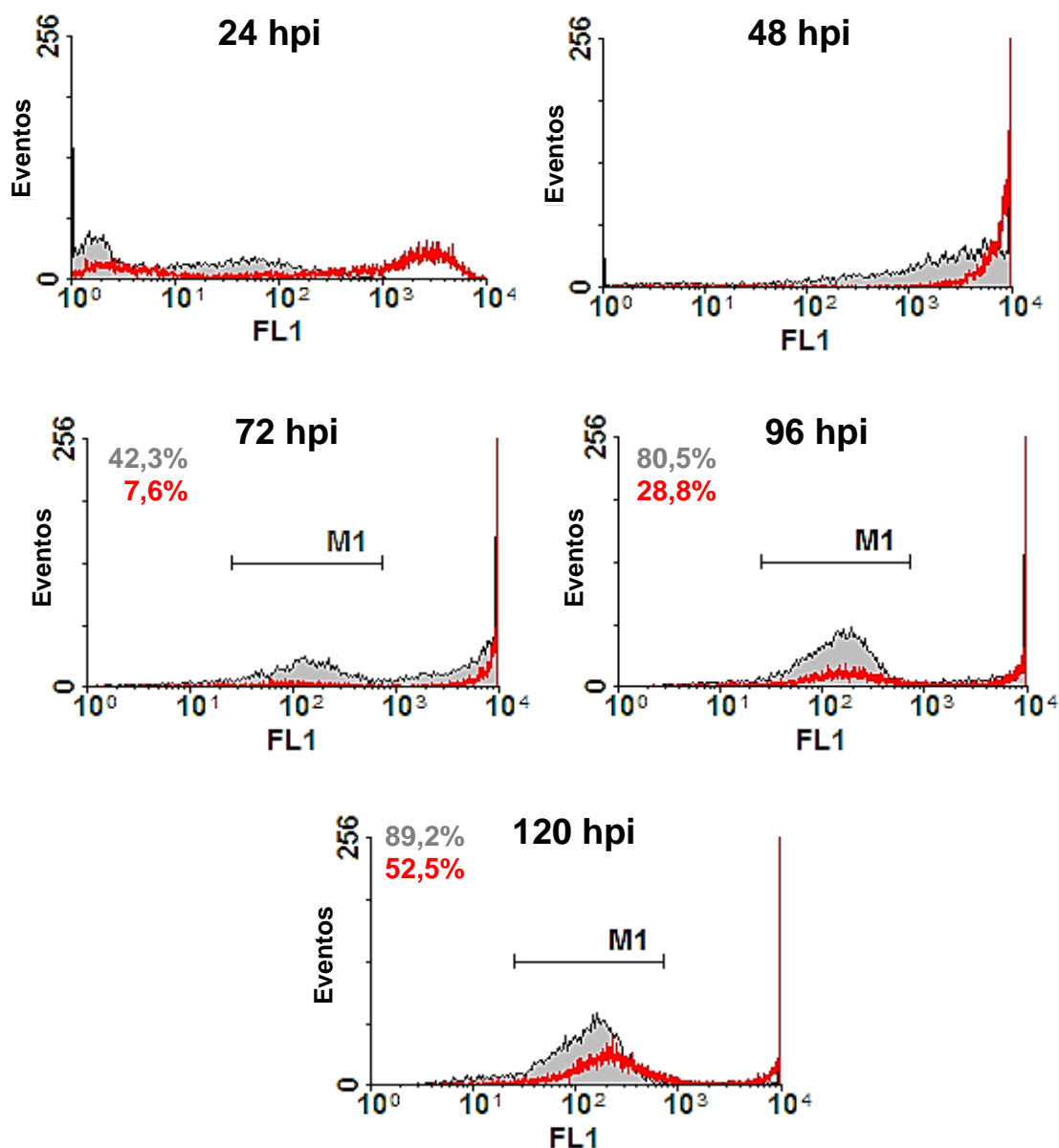
Las variantes del casete de expresión se incorporaron al baculovirus, que fue empleado para infectar células Sf21 a una MOI de 5 pfu/célula y determinar la expresión de la proteína GFP por cuantificación fluorimétrica. Los baculovirus comparados fueron: *polhGFP* (■), *pB2<sub>9</sub>Ac-ie-01/hr1pB2<sub>9</sub>p10GFP* (△), *polhAc-ie-01/hr1pB2<sub>9</sub>p10GFP* (▲) y *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* (●). Los resultados son la media obtenida a partir de tres ensayos independientes.

A partir de los resultados obtenidos con los diferentes casetes de expresión desarrollados, se seleccionó el óptimo (*polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*) (Figura 17). El baculovirus genéticamente modificado, portador de esta construcción, fue sometido a un estudio más exhaustivo, que se detalla a continuación.



**Figura 17. Casete de expresión final**

En primer lugar, se caracterizó el baculovirus portador del casete mediante la infección de células Sf9 en suspensión, simulando unas condiciones de producción más cercanas a las de la industria (biorreactores). Las células cultivadas a una concentración de  $2 \times 10^6$ /ml e infectadas a una MOI de 0,1 pfu/célula, sirvieron para analizar la dinámica de expresión de la proteína GFP por citometría de flujo (Figura 18). Esto permitió observar una expresión más abundante y temprana, desde las 24 hpi, de la proteína reportadora en las células infectadas con el baculovirus *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* respecto a *polhGFP*. Se apreció también una mayor pérdida de fluorescencia con el paso del tiempo en las células infectadas por el baculovirus *polhGFP*, que se reflejó en un incremento de los eventos en la zona media del histograma (región M1; Figura 18).

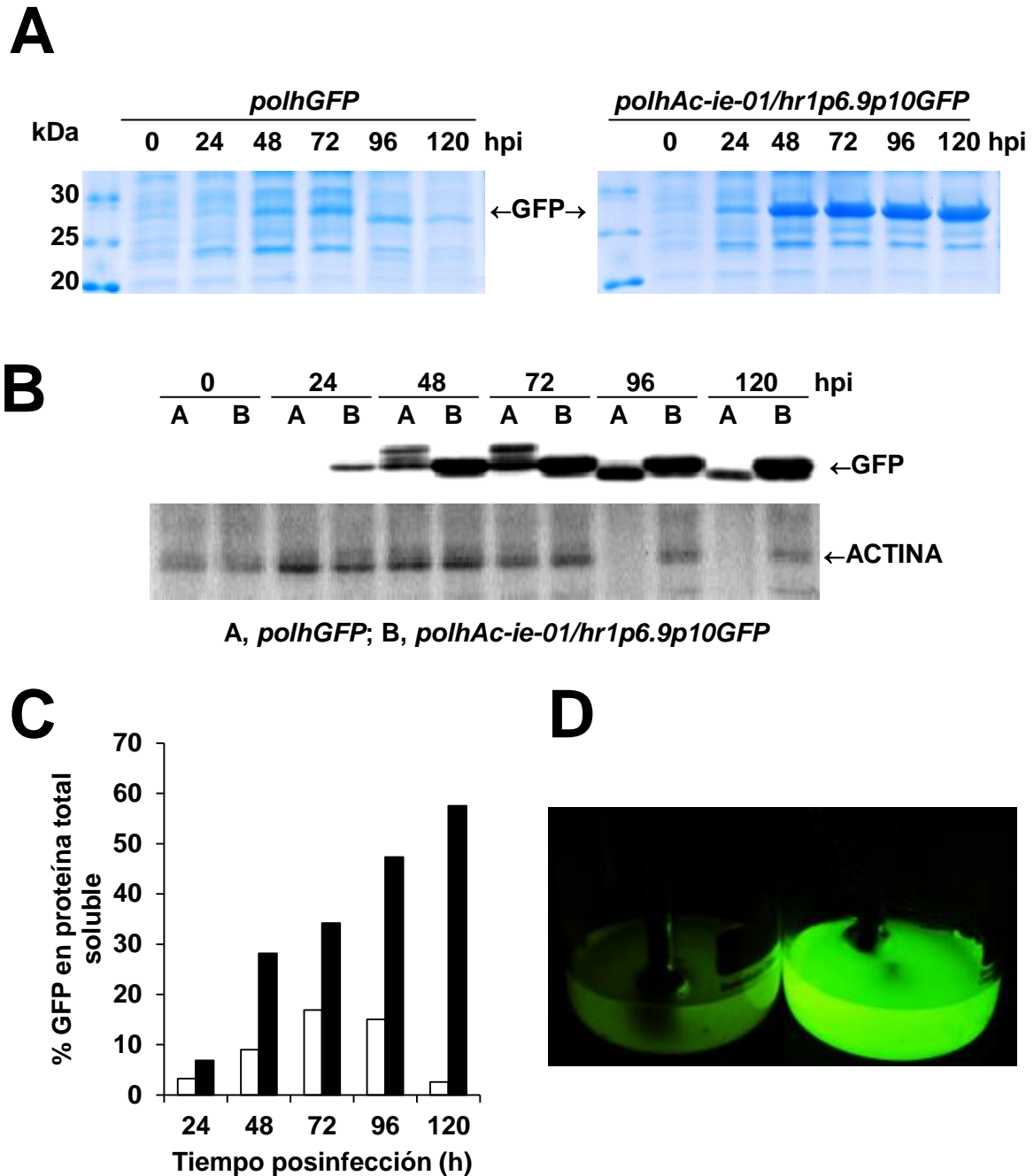


**Figura 18. Análisis del perfil de expresión de la proteína GFP del casete de expresión final**  
 El casete de expresión se incorporó al baculovirus, denominado *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* (rojo), y con él se infectaron células Sf9 a una MOI de 0,1 pfu/célula. Como control se usó el baculovirus *polhGFP* (gris). La expresión se caracterizó por citometría de flujo. El % indicado se corresponde con los eventos localizados en la región central del histograma (M1).

El patrón de expresión de la proteína GFP en las células infectadas se analizó separando electroforéticamente los extractos proteicos solubles obtenidos de los cultivos celulares y tiñéndolos con azul de Coomassie. Desde las 24 hpi, se observó una única banda del tamaño esperado y constante a lo largo de la infección con el baculovirus *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*. En contraste, las células infectadas con el baculovirus convencional, *polhGFP*, mostraron una menor expresión de la proteína GFP (Figura 19A) e incluso, a tiempos tardíos (96 y 120 hpi), una

disminución en el tamaño de la banda. Para corroborar este hallazgo y comprobar la identidad de la banda se realizó una inmunodetección con un anticuerpo monoclonal anti-GFP, mientras que se utilizó un anticuerpo monoespecífico anti-Actina para determinar el estado de una proteína constitutiva y como control de carga. Así, se confirmó que en las células infectadas con el baculovirus *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* la banda detectada desde las 24 hpi era GFP, y mantenía el tamaño esperado de forma constante. Sin embargo, con el baculovirus *polhGFP* se apreció una banda del tamaño deseado a las 48 y 72 hpi, además de formas de un mayor tamaño que podrían sugerir un procesamiento anómalo de la proteína recombinante, y una banda de tamaño menor probablemente como consecuencia de la degradación por proteasas celulares a tiempos tardíos (Figura 19B). Asimismo, se observó que la cantidad de actina en las células infectadas con el baculovirus convencional disminuía a partir de las 48 hpi, llegando a desaparecer la señal a las 96 hpi. Por el contrario, con el baculovirus *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* la cantidad de actina se mantuvo constante a lo largo de la infección (Figura 19B). Estos resultados, junto con los obtenidos en el ensayo de citometría de flujo, apuntaban a un descenso del efecto citopático del virus sobre la célula cuando se usaba el baculovirus portador del casete (*polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*).

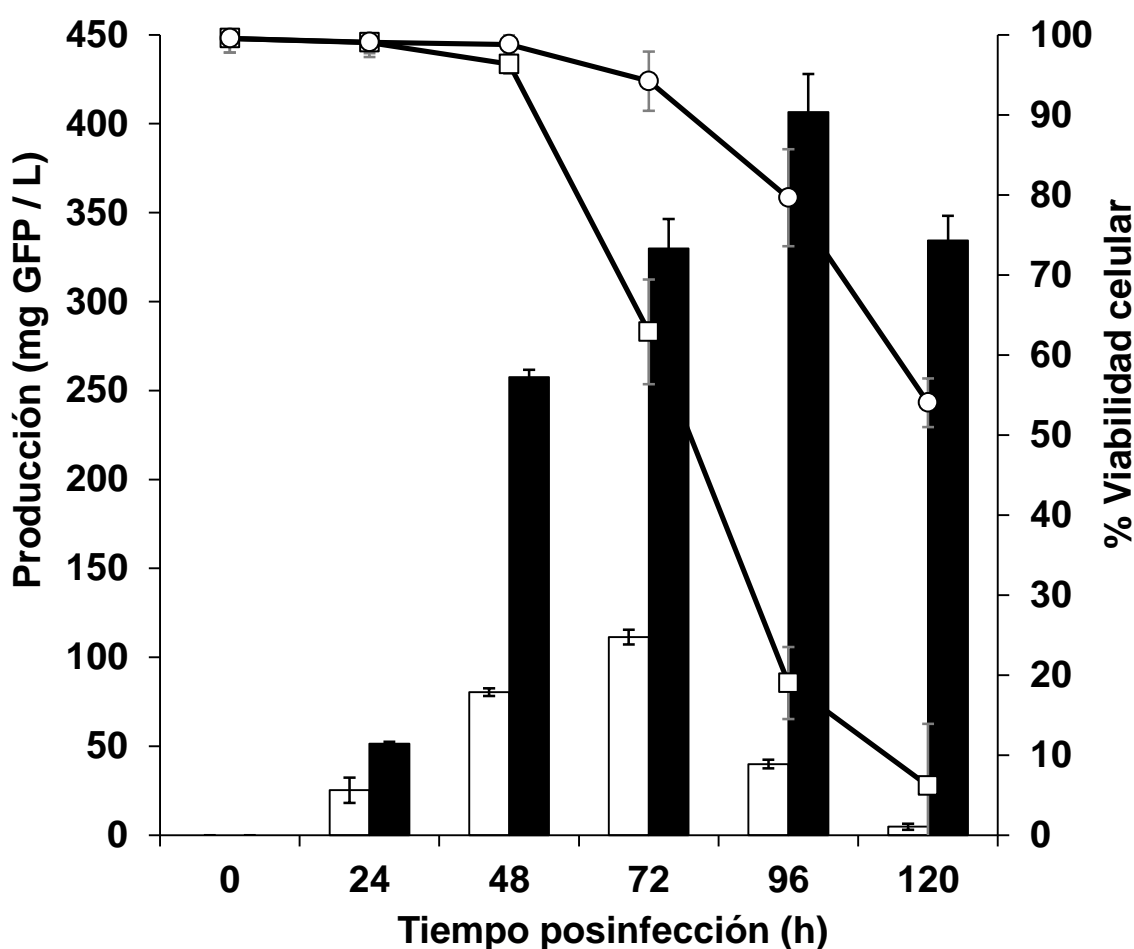
El análisis de los extractos celulares mediante electroforesis microfluídica (Figura 19C) determinó que, a partir de las 96 hpi, en las células infectadas con el baculovirus *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*, la proteína recombinante representaba más del 50% de la proteína total soluble, mientras que en las células infectadas con el baculovirus *polhGFP* solo alcanzaba un 17%. Además, en este caso, a partir de las 72 hpi la cantidad de GFP descendía de forma drástica. Estos datos se correspondían con los resultados observados por citometría de flujo y la inmunodetección de actina. La diferencia en el nivel de expresión de la proteína recombinante en los cultivos celulares infectados con ambos virus, sometidos a luz UV, queda patente en la Figura 19D.



**Figura 19. Expresión de la proteína GFP en células Sf9 cultivadas en suspensión e infectadas con los baculovirus *polhGFP* o *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* a una MOI de 0,1 pfu/célula**

A) Análisis de la expresión de la proteína GFP mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. B) Análisis de la expresión de la proteína GFP por inmunodetección utilizando un suero específico en extractos de células infectados con cada baculovirus. C) Cuantificación de la GFP expresada en relación a la PTS de células infectadas mediante electroforesis microfluídica. En blanco, células infectadas con el virus *polhGFP*, en negro células infectadas con el virus *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*. D) Fotografía tomada de los cultivos infectados con los baculovirus *polhGFP* (izquierda) o *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* (derecha) a las 72 hpi, e iluminados con luz UV.

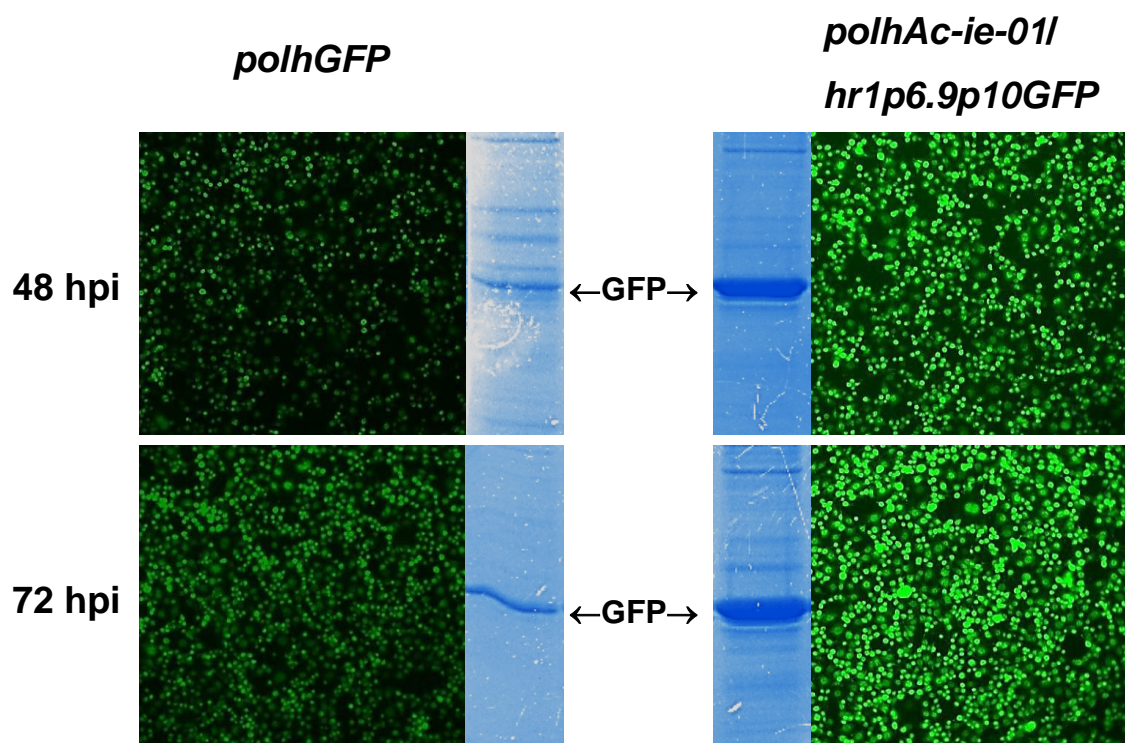
El paso siguiente fue comprobar la relación, a lo largo del tiempo, entre el nivel de producción de la proteína recombinante y la viabilidad celular del cultivo. El pico máximo de producción de GFP (111 mg/L) de las células infectadas por el baculovirus convencional, *polhGFP*, se localizó a las 72 hpi (Figura 20) y coincidió con una viabilidad celular del 63%, alejada de la empleada como referencia (80%) para recoger los productos en un biorreactor. En las células infectadas con el baculovirus *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*, el máximo de producción GFP (406 mg/L) se alcanzó a las 96 hpi, coincidiendo con un 80% de la población viable (Figura 20). A 120 hpi, la viabilidad celular fue superior al 50%, frente a un 5% en las células infectadas por el baculovirus convencional *polhGFP* (Figura 20).



**Figura 20.** Cuantificación de la producción de GFP y de la viabilidad celular en células Sf9 cultivadas en suspensión e infectadas con los baculovirus *polhGFP* o *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*

La cantidad de GFP (mg/L) se representa con barras blancas (*polhGFP*) o negras (*polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*) y la viabilidad celular (%) se representa con líneas (círculos para *polhGFP*, cuadrados para *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*, ○).

Por último, se quiso verificar la reproducibilidad de los resultados en una línea celular derivada de lepidóptero *T. ni* (Figura 21). Para ello, se infectó un cultivo de la línea Tn-5, a una MOI de 5 pfu/célula, con los baculovirus *polhGFP* o *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* y se analizó la expresión de la proteína GFP en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie y el nivel de fluorescencia mediante microscopía de fluorescencia. Como puede verse en la Figura 21, tanto la intensidad de fluorescencia como la cantidad de proteína recombinante acumulada, permitieron determinar que las propiedades del nuevo casete de expresión se reproducían en ambos tipos celulares.

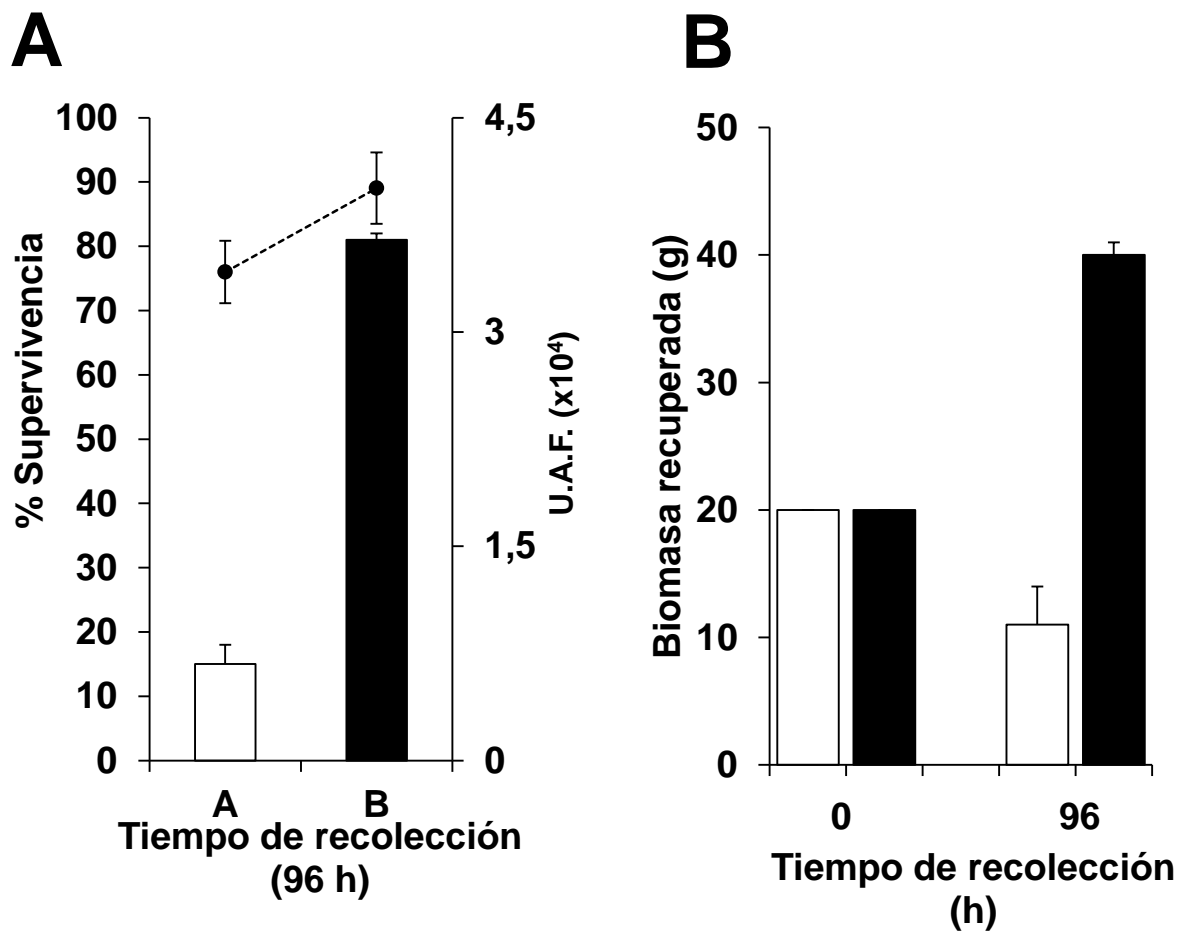


**Figura 21. Expresión de la proteína GFP en células Tn-5 infectadas con los baculovirus *polhGFP* o *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* a una MOI de 5 pfu/célula**  
Análisis de la expresión de la proteína GFP mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie y microfotografías obtenidas por microscopía de fluorescencia (10x).

## IV.5 Caracterización del casete de expresión en un modelo *in vivo*

La caracterización del casete en un modelo *in vivo* se realizó en larvas del lepidóptero *T. ni*. Este insecto posee características (un alto rendimiento, un reducido coste de producción y la posibilidad de automatización) que lo hacen muy atractivo para su uso como factoría biológica. El estudio se realizó con los baculovirus *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* y *polhGFP*.

Inicialmente, se comprobó si el efecto citopático inherente a la infección era paliado también en este modelo. Para ello, se infectaron larvas con una dosis de  $5 \times 10^5$  pfu/larva y se observó la tasa de supervivencia a las 96 hpi. Mientras que el 81% de las larvas infectadas con el baculovirus *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* se recuperó en buenas condiciones, el porcentaje bajó al 15% en las infectadas con el baculovirus *polhGFP* (Figura 22A). En consecuencia, la biomasa recolectada al final del proceso fue el doble que la de partida en las primeras, y la mitad que la inicial en las segundas (Figura 22B). Los niveles de expresión de la proteína reportadora GFP fueron superiores en las larvas inoculadas con el baculovirus *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* (Figura 22A). Si consideramos que la proteína recombinante generada en larvas de insecto guarda relación con la biomasa recuperada y, en la mayoría de las ocasiones, con la dosis de virus inoculada, podemos afirmar que el casete de expresión permite superar ampliamente el nivel de producción establecido para este modelo. Por último, los resultados mostraron unas propiedades del baculovirus portador del casete semejantes a las observadas en el modelo celular.



**Figura 22. Efecto de la sobreexpresión de los factores IE0 e IE1 sobre la supervivencia de larvas de *T. ni* y rendimiento productivo**

A) Supervivencia de larvas *T. ni* infectadas con los baculovirus *polhGFP* (barra blanca) o *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* (barra negra) a una dosis de  $5 \times 10^5$  pfu/ larva y recolectadas a 96 hpi. La cuantificación de la expresión de la proteína GFP en las mismas larvas se muestra con una línea discontinua. U.A.F; Unidades arbitrarias de fluorescencia. B) Biomasa recuperada al final del proceso productivo. La cantidad inicial fue de 20 g de biomasa.

## IV.6 Expresión de la proteína de la cápsida (cap) del circovirus porcino tipo 2 (PCV2)

Tras los resultados de expresión de la proteína reportadora, se quiso verificar su extrapolación a proteínas de interés biosanitario. Para ello, se seleccionó la proteína de la cápsida de PCV2 (ORF2; Cap). Esta proteína constituye una de las vacunas animales de subunidades más exitosas de la actualidad, siendo comercializada por varias compañías, y producida en el sistema BEVS. La proteína Cap se autoensambla para formar pseudopartículas víricas (*virus-like particles*; VLPs), que mimetizan la estructura del virus nativo pero, al carecer de genoma vírico, son totalmente inocuas.

Para analizar la expresión de esta proteína en el casete de expresión, se generaron los baculovirus *polhCap* y *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10Cap* (Figura 23), y se infectaron células Sf9 en suspensión a una MOI de 0,1 pfu/célula.

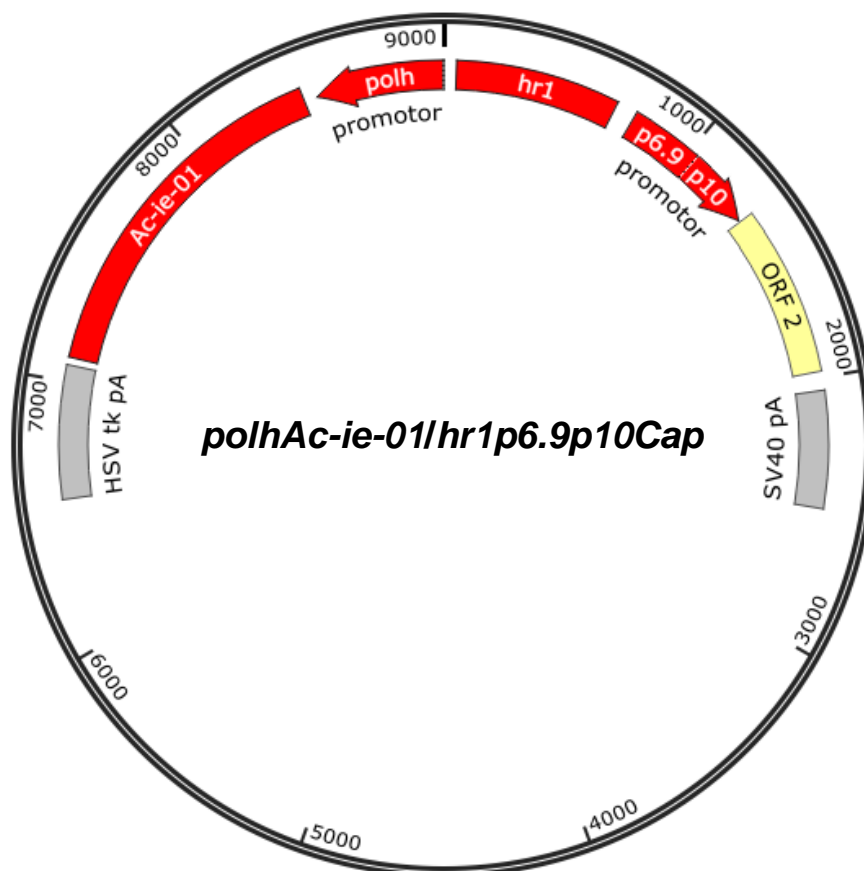
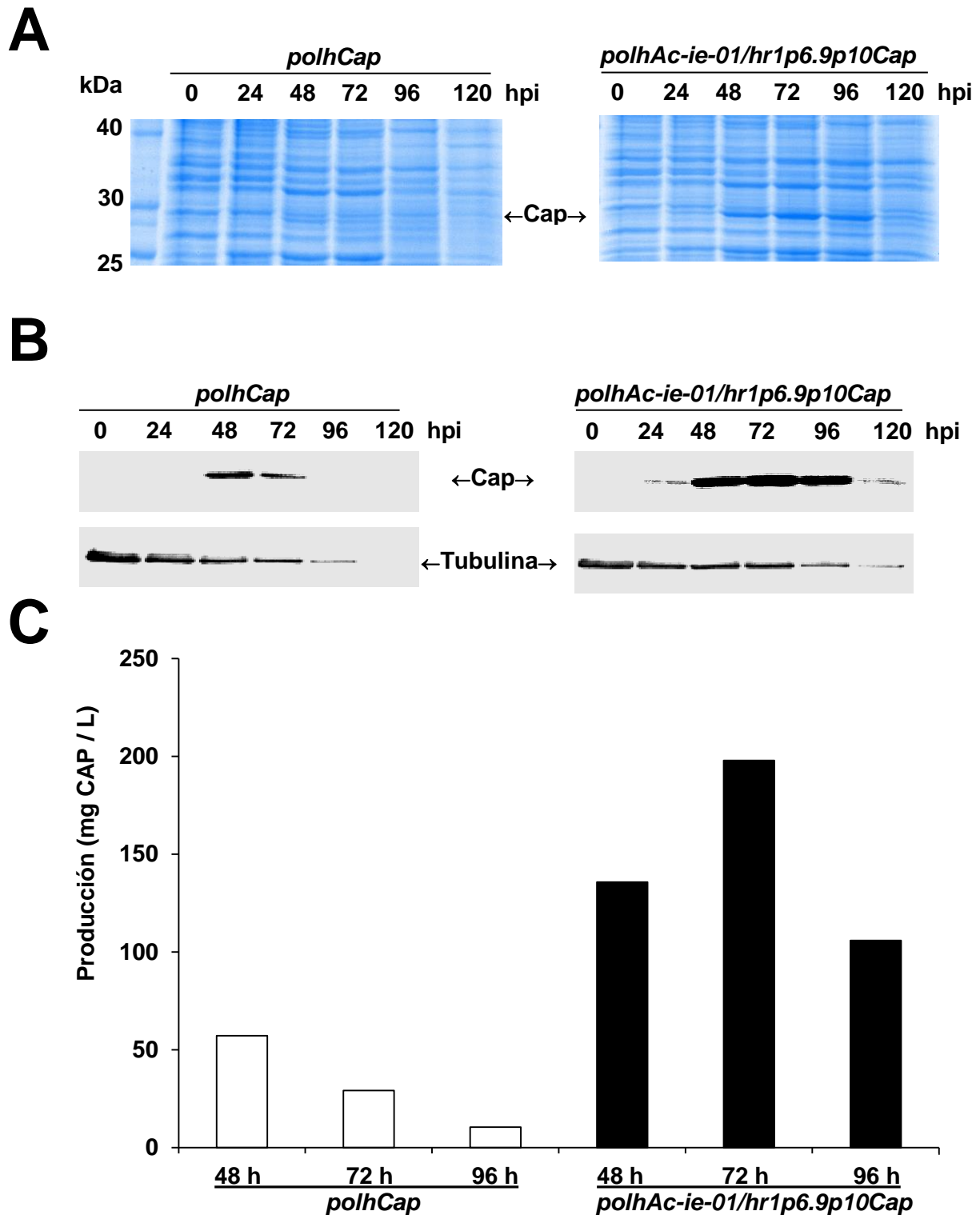


Figura 23. Casete de expresión

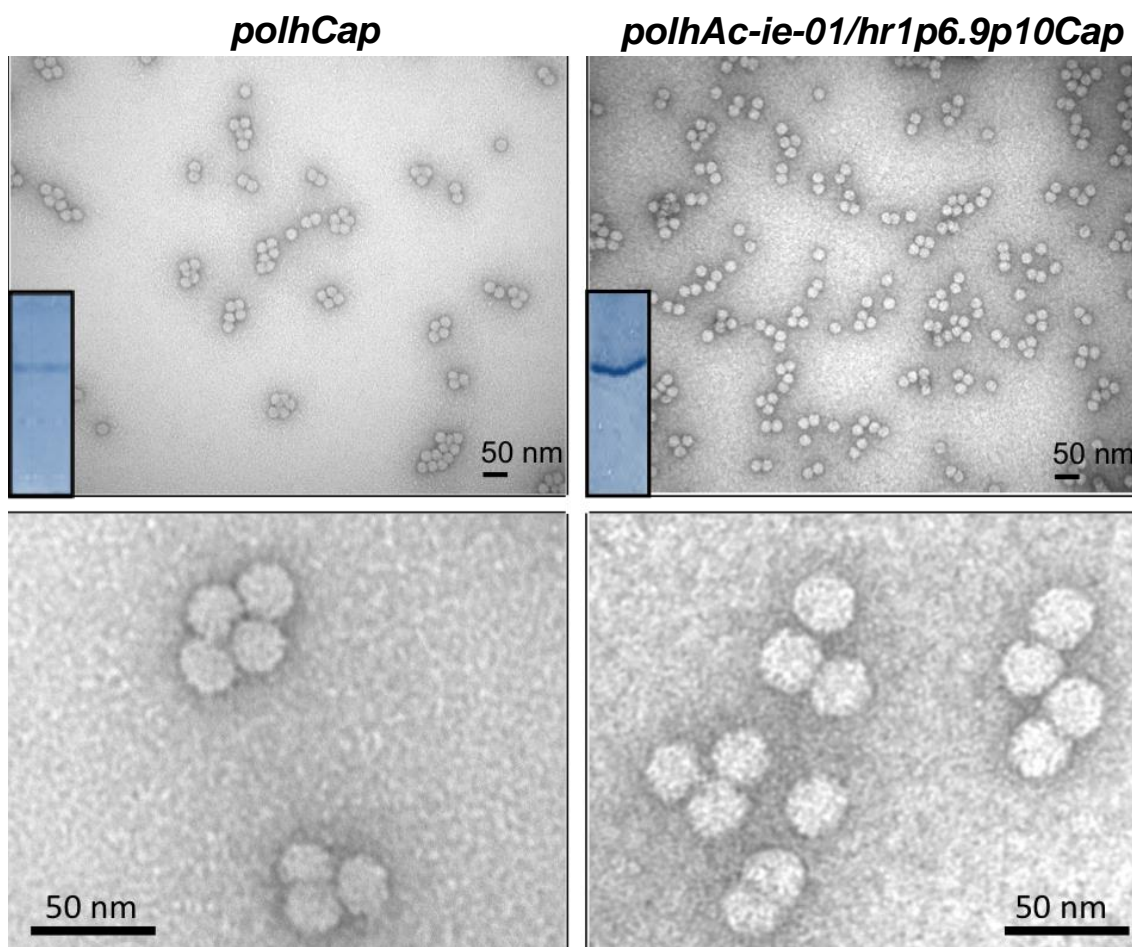
La monitorización de la expresión de la proteína recombinante Cap se hizo mediante geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. Mientras la detección de la banda, 28 kDa, apenas fue manifiesta en los extractos de células infectadas con el baculovirus *polhCap*, sí lo fue claramente en *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10Cap* (Figura 24A). Su inmunodetección, con un anticuerpo monoclonal, delató diferencias cuantitativas claras en el patrón de expresión (Figura 24B). Los extractos de células infectadas con *polhCap* mostraron un pico máximo de expresión a las 48 hpi, mientras que en los correspondientes a *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10Cap* se detectó expresión desde las 24 hpi y su acumulación se incrementó hasta las 72 hpi (Figura 24B). Al emplear el anticuerpo frente a la proteína constitutiva tubulina, se observó una señal que se hacía más débil con el paso del tiempo en las muestras infectadas *polhCap*, sugiriendo un mayor daño celular producido por este baculovirus.

La semicuantificación por *western blot* de la proteína Cap reveló que el uso del baculovirus portador del casete incrementaba en aproximadamente 4 veces la producción lograda por el baculovirus convencional (Figura 24C).



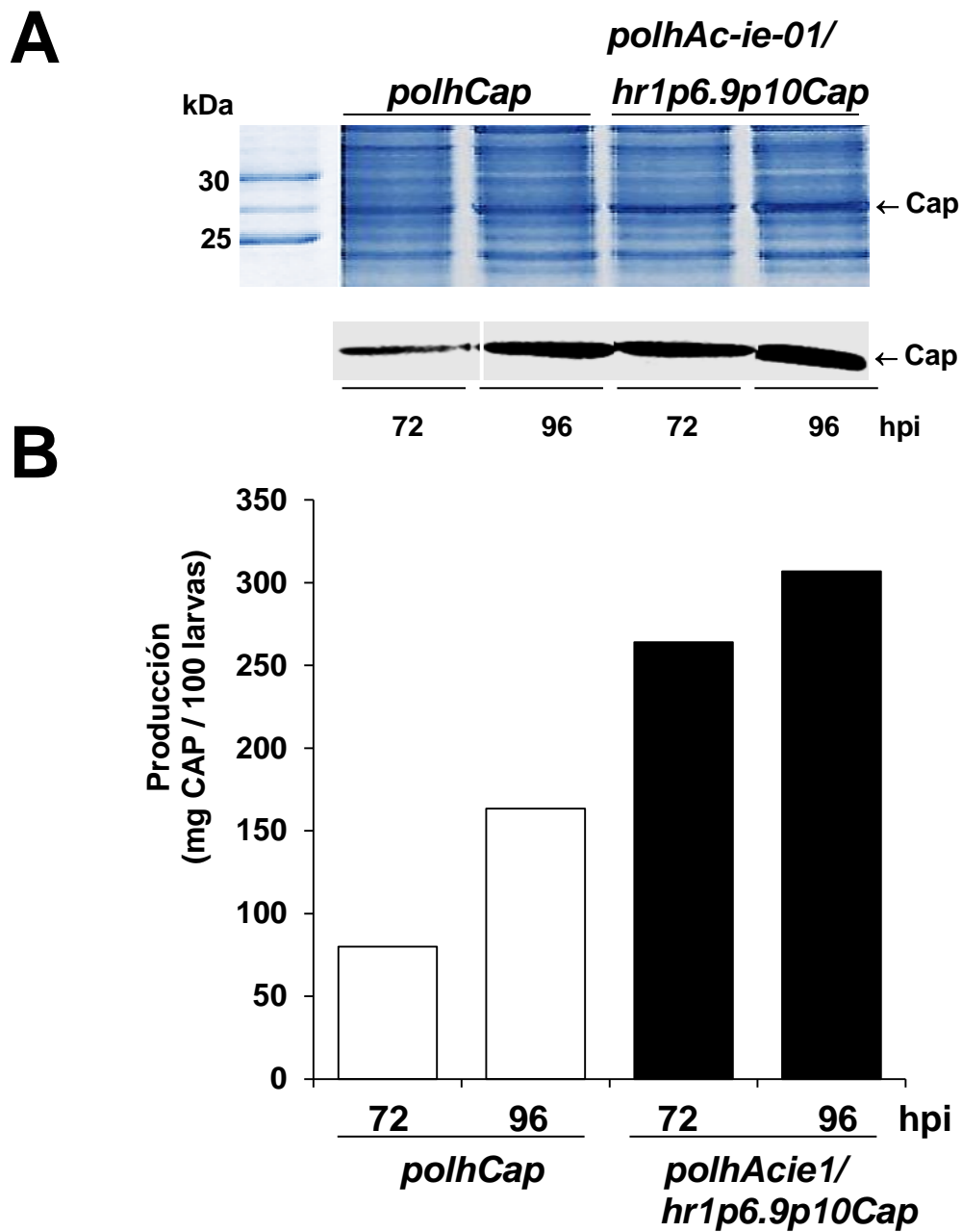
**Figura 24.** Expresión de la proteína Cap de PCV-2 en células Sf9 en suspensión e infectadas con los baculovirus *polhCap* o *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10Cap* a una MOI de 0,1 pfu/célula  
 A) Análisis de los productos de expresión por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de la proteína Cap. C) Semicuantificación por *western blot* de la producción de proteína Cap.

Para verificar la correcta formación de las VLPs, se purificaron éstas a partir de células Sf9 infectadas tras 96 hpi con los baculovirus *polhCap* o *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10Cap*, a una MOI de 0,1 pfu/célula, y se procesaron para su análisis por microscopía electrónica de transmisión (Figura 25). Como puede observarse en la figura, existe una diferencia cuantitativa de las VLPs teñidas entre los dos baculovirus usados, mientras que el tamaño y forma de las mismas eran idénticos en ambos casos.



**Figura 25. Identificación por microscopía electrónica y purificación de las VLPs generadas** Insertadas en las figuras se muestran las tinciones de las VLPs mediante azul de Coomassie de geles SDS-PAGE, en los que se resolvieron las muestras de VLPs analizadas mediante microscopía electrónica (geles cargados con idéntico volumen de las VLPs purificadas).

El estudio de expresión en larvas de *T. ni* se hizo con los mismos baculovirus que en el apartado anterior. Se infectaron larvas a una dosis de  $5 \times 10^5$  pfu/larva, obteniéndose una mayor expresión en aquellas infectadas por el baculovirus *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10Cap* (Figura 26A). Al igual que sucedía con la proteína reportadora, el baculovirus empleado determinó la tasa de supervivencia y, en consecuencia, la biomasa recuperada al final del proceso productivo. Considerando ambos parámetros, se pudo concluir que el nuevo casete de expresión permitía duplicar la productividad en este modelo, alcanzando valores próximos a 300 mg/100 larvas infectadas (Figura 26B). Estos valores de producción significaron que 100 larvas infectadas tenían una producción equivalente aproximadamente a 1,5 L de cultivo celular.



**Figura 26.** Expresión de la proteína Cap de PCV2 en larvas de *T. ni* infectadas con  $5 \times 10^5$  pfu/larva con los baculovirus *polhCap* o *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10Cap*

A) Análisis de los productos de expresión por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie e inmunodetección de la proteína Cap. B) Semicuantificación por *western blot* de la producción de proteína Cap.



## V DISCUSIÓN



## V.1 Caracterización de un nuevo promotor derivado del lepidóptero *T. ni* para su uso en el sistema BEVS

Las principales plataformas de producción industrial de proteínas recombinantes son las bacterias, las levaduras y las células de mamífero e insecto [281, 282]. El sistema de células de insecto infectadas por baculovirus (BEVS), se ha ido abriendo paso por su versatilidad y robustez [283]. Sin embargo, sus limitaciones han supuesto un desafío continuo para muchos investigadores [284] y desde su primera aplicación biotecnológica [285] hasta la fecha, han sido numerosas las estrategias ensayadas para mejorarlo [154].

Los promotores muy tardíos del baculovirus, *polh* y *p10*, se emplean de forma rutinaria para expresar las proteínas recombinantes debido a su alta productividad [213, 214]. No obstante, la expresión en la fase tardía de la infección y el deterioro simultáneo de la maquinaria celular de procesamiento postraducciona [286-288], determinan que las modificaciones postraduccionales de las proteínas recombinantes sean insuficientes o defectuosas, siendo frecuente la aparición de formas degradadas, incompletas o insolubles [125, 212]. Asimismo, como consecuencia de la muerte y lisis celular asociada a la infección, se produce un incremento de enzimas liberadas en la célula y al medio de cultivo [289], lo que provoca la degradación de las proteínas y, por tanto, un descenso de la calidad del producto generado.

A priori, la utilización de promotores más tempranos, permitiría aumentar el rango temporal de expresión y, por tanto el tiempo para el correcto procesamiento de la proteína sintetizada *de novo*. Por este motivo, diversos laboratorios han ensayado con varios promotores tempranos [215, 217] y con los tardíos *p6.9* [208, 221] y *vp39* [211, 229]. Sin embargo, la mejora en la calidad de la proteína recombinante se acompañó de un nivel de producción significativamente inferior al de los promotores convencionales en todos los casos. Otras estrategias en esta dirección y con similares resultados fueron: la modificación de los promotores del baculovirus [230, 231], la generación de promotores sintéticos [290], híbridos [211, 226, 291, 292] o dispuestos en tándem [293], así como el empleo de promotores de otros virus, como los del bracovirus de *Cotesia plutellae* [223, 294] o del virus del

sarcoma de Rous [295], y de insectos como *D. melanogaster* [215] o *B. mori* [218, 219].

La presente tesis doctoral ha fijado su objetivo en la optimización del sistema BEVS, y para ello ha seguido dos vías. La primera se centró en la caracterización de un nuevo promotor derivado de insecto para su aplicación en este sistema, y la segunda en el diseño de un casete de expresión con elementos propios del baculovirus AcMNPV para mejorar la calidad y cantidad de la proteína recombinante.

La amplia experiencia en el uso del lepidóptero *T. ni* con fines biotecnológicos del laboratorio [260, 262, 280, 296], permitió observar que en los extractos proteicos de larvas, analizados mediante geles de SDS-PAGE y teñidos con azul de Coomassie, se apreciaba una banda mayoritaria de una movilidad electroforética en torno a los 80 kDa. Esta banda llegaba a representar el 60% de la PTS de la larva y, curiosamente, solo se presentaba en el último estadio larvario, L5 (Figura 6). Antes de la elaboración de esta tesis doctoral, el grupo de Jones había caracterizado un grupo de proteínas de almacenamiento de *T. ni*, junto a sus secuencias promotoras [279, 297] y el papel regulador de las hormonas del insecto en su expresión [298]. Estas proteínas se denominan hexamerinas y se caracterizan por su aparición y acumulación en un corto período de tiempo en un momento específico del desarrollo larvario.

El análisis de la banda de 80 kDa mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y su búsqueda en la base de datos del NCBI con el programa Mascot (Matrix Science Inc, EE.UU.) [299], indicó que estaba compuesta por tres hexamerinas (AJHSP-1, BJSHP-1 y BJHSP-2). Su acumulación en un periodo de tiempo tan corto sugería una fuerte actividad transcripcional de los genes, y el estudio de la actividad de sus promotores en el sistema BEVS confirmó que el promotor del gen *BJSHP-2*, denominado *pB2*, fue el más activo (Figura 7A).

Al analizar la dinámica de expresión de la proteína reportadora GFP con el promotor *pB2*, se constató que hasta las 24 hpi fue superior a la del promotor *polh*. Sin embargo, más allá de este punto no se incrementaba la expresión como, por otra parte, sí sucedía con el promotor *polh* (Figura 7B). Posteriormente, se generaron promotores híbridos (insecto-baculovirus), con los que también se

consiguió mejorar el nivel de producción de GFP respecto al alcanzado por los promotores convencionales a las 24 hpi, en concreto con las construcciones *polhpB2* y *pB2p10* (Figura 10A). Sorprendentemente, el promotor *polhpB2* llegaba a su nivel máximo de expresión a las 24 hpi, mientras que *pB2p10* seguía aumentando la producción hasta un nivel similar al obtenido con los promotores convencionales a tiempos tardíos de la infección. Cuando se determinó el comportamiento de los nuevos promotores generados en la línea celular Tn-5 (Figura 10B), derivada de *T. ni*, se observó un perfil de expresión claramente diferente al obtenido en la línea Sf21, derivada de *S. frugiperda*, sugiriendo la existencia de mecanismos de regulación distintos en función de la célula hospedadora. Siguiendo esta hipótesis, cabe resaltar que la expresión del gen *BJSHP-2* presenta una fuerte dependencia del momento de desarrollo en que se encuentre el insecto [248, 300], ya que sobre este gen ejerce una fuerte regulación negativa la hormona juvenil [301]. Por todo ello, resultaba plausible la existencia de elementos reguladores susceptibles de ser funcionales en un ambiente adecuado. Mediante el análisis bioinformático de la secuencia promotora *pB2* se determinaron dos tipos de lugares de unión putativa de elementos respondedores a hormonas, denominados EcR y Br-C (Figura 8). En *D. melanogaster*, el gen *Br-C* es el principal regulador de la metamorfosis [302] y su transcripción está provocada por un incremento de los niveles de la hormona ecdisona, que a su vez activa otros genes involucrados en los cambios asociados a la metamorfosis. La presencia de elementos putativos de unión a la hormona ecdisona en la secuencia *pB2* (Figura 8) sugiere que esta pueda estar involucrada en la regulación transcripcional del gen y, por tanto, module su actividad promotora, como sucede en promotores de *B. mori* [303, 304]. En relación con el rol modulador de las hormonas en insectos, recientemente se ha publicado el papel que tiene la hormona juvenil en la regulación de los genes sensibles a la hormona ecdisona [297]. En este sentido, será interesante realizar en el futuro una batería de ensayos donde se verifique la capacidad inductora o inhibidora de estas hormonas sobre la secuencia *pB2* o los derivados generados en esta tesis, lo que posiblemente abrirá las puertas al desarrollo de nuevos sistemas de expresión inducibles por hormonas [305]. Puesto que en la presente tesis doctoral todos los ensayos se han realizado en un ambiente

libre de hormonas, los resultados sugieren que también existe la intervención de factores específicos del tipo celular (Figura 10).

El estudio de las regiones esenciales para la actividad promotora de la secuencia *pB2* reveló que el fragmento *Nael-Dral* era el más relevante (Figura 9). La eliminación del lugar Br-C, contenido en el fragmento *pB2*<sub>10</sub>, determinó la abolición de la actividad promotora. Sin embargo, el fragmento *pB2*<sub>9</sub>, que carecía de este mismo sitio Br-C, incrementó su actividad, indicando la existencia de otros elementos regulatorios que compensen la ausencia del lugar Br-C en el fragmento *SmaI-Dral*.

En conclusión, el promotor híbrido *pB2p10* permitió una expresión más temprana que la de los promotores convencionales, *polh* o *p10*, descubrimiento con potencial utilidad en el sistema BEVS, ya que adelanta e incrementa el tiempo de expresión de la proteína recombinante. Se consiguieron además niveles de producción a tiempos tardíos similares a los de los promotores convencionales. Según la posición de la secuencia *pB2* en los promotores híbridos se observó una actividad diferente en cada caso, lo que apuntaba a la existencia de elementos internos reguladores putativos, activables en función de su localización. Además, esto descartaba una posible función de “*enhancer*” de la secuencia *pB2*, al no potenciarse la actividad promotora de forma independiente a su posición en el promotor híbrido (Figura 10A). Asimismo, estos resultados denotan la gran influencia que sobre la expresión tiene el hospedador (Figura 10B). Por otro lado, el incremento en la expresión de la proteína recombinante puede deberse a diversas razones: la generación de múltiples lugares de inicio de transcripción que incrementen los niveles de RNA, la formación de estructuras secundarias que modifiquen o alteren la tasa de transcripción, o incluso la generación de nuevos elementos de regulación al crear los promotores híbridos.

## V.2 Desarrollo de un casete de expresión para mejorar la capacidad productiva del sistema BEVS

Tras los avances logrados que acabamos de discutir en el apartado anterior, nos propusimos el desarrollo de un casete de expresión más complejo para incrementar cuantitativa y cualitativamente los productos recombinantes generados en este sistema. Ello se hizo en base a los conocimientos, previamente publicados, sobre funciones de diferentes elementos genéticos reguladores en los baculovirus.

La fácil manipulación del baculovirus *AcMNPV* [306] y su capacidad de incorporar insertos de gran tamaño [307] y en un número amplio [308], ha permitido estudiar los efectos de la inserción de elementos reguladores heterólogos [232] y secuencias *enhancer*, así como de la co-expresión de factores de transcripción [229, 234, 236]. Sin embargo, hasta la fecha, los resultados han aportado poco al avance de esta tecnología productiva. En línea con esos enfoques, nos propusimos combinar elementos de regulación génica del baculovirus [elementos en *cis* (*hr1*) y factores en *trans* (IE0 e IE1), estos últimos codificados por el cDNA *Ac-ie-01*], en un único casete de expresión. Los componentes (*hr1* y el cDNA *Ac-ie-01*) se ligaron operativamente con distintos promotores, o combinaciones de promotores, para formar diferentes versiones de un casete de expresión. De la incorporación secuencial de los elementos surgieron más de 40 variantes y sus respectivos baculovirus.

### V.2.1 Efecto *enhancer* de la secuencia *hr1*

Las regiones homólogas repetidas (*hrs*) actúan en los baculovirus como elementos intensificadores de promotores tempranos [42]. Este efecto también se ha descrito en el promotor tardío *vp39* [229] y el muy tardío *polh* [236] del baculovirus, y en los promotores derivados del insecto *D. melanogaster* [234]. En todos los casos se produce un incremento de la expresión al combinar este elemento intensificador con el promotor. Cuando se estudió la extrapolación del efecto a los promotores híbridos generados en esta tesis (Figura 11), se observó un menor grado de intensificación que el referido para otros promotores, quizás

asociado a un efecto modulador de la propia secuencia *pB2* sobre *hr1*, como se había visto en alguno de los promotores híbridos utilizados (Figura 10). Pese a ello, la incorporación de una copia (*hr1*) en la construcción *pB2p10*, sirvió para superar de forma discreta los niveles de expresión de los promotores convencionales empleados en el sistema BEVS (Figura 11).

### **V.2.2 Efecto de la co-expresión de una segunda copia de los factores transactivadores IE0 e IE1. Implicación en los resultados observados**

Los factores de transcripción desempeñan un papel central en un gran número de procesos biológicos [309]. Tradicionalmente, se han definido por su habilidad para unirse a secuencias de DNA específicas y regular la transcripción de los genes [310]. En los baculovirus, la proteína multifuncional IE1 es clave en la regulación de la expresión de los genes tempranos y tardíos [44, 47, 65, 83, 311]. Su caracterización ha revelado que la actividad transactivadora se localiza en el tercio amino terminal de la proteína e incrementa más de 200 veces la transcripción de los genes tempranos del baculovirus [46, 57, 82, 311]. Esta región cuenta con dos dominios ácidos separados por uno básico, necesario para la unión específica al DNA [56]. La proteína IE0, que tan solo se diferencia de IE1 en los 54 aa adicionales del extremo amino terminal [312], tiene por ahora escasos antecedentes bibliográficos [80, 313]. De la misma manera, hay pocas referencias de la interacción entre ambos factores [63, 65, 81] o de su relación con otras proteínas [314, 315].

En las células infectadas con el baculovirus portador del cDNA *Ac-ie-01* se observó, desde tiempos muy tempranos, un mayor incremento del crecimiento de la población celular respecto a las infectadas con el baculovirus convencional. Apoyando este dato, se identificó una mayor proporción de la población que finalizaba con éxito la mitosis (Figura 12A y B). Esto sugería que la sobreexpresión de los factores determinaba una demora en la detención del ciclo celular en las células infectadas con AcMNPV [30, 121]. Paradójicamente, el efecto identificado a

las 6 hpi precedía a la sobreexpresión de los factores IE0 e IE1, ya que se había empleado el promotor muy tardío *polh* (>16 hpi) para su expresión.

Estos resultados, junto con la transcripción temprana de los factores (a los 15 minutos de la infección) [62], y la regulación positiva que sobre su propia expresión ejercen [65, 67-70] en el baculovirus silvestre, nos han permitido postular diferentes hipótesis para explicarlos. Puesto que todos los ensayos se realizaron con un tercer pase del baculovirus (ver apartado III.2.12.4), el efecto podría deberse a la presencia de los factores en el inóculo, bien como proteínas asociadas a la envoltura del BV o de manera independiente al virión. Mientras que en el virus silvestre AcMNPV se ha identificado su presencia en la envoltura del ODV, esto no ha ocurrido en el BV. Sin embargo, en OpMNPV sí está presente en el fenotipo BV [10]. Esta divergencia ha cuestionado el procedimiento de la caracterización del BV en AcMNPV y ha puesto de manifiesto la necesidad de realizar estudios más profundos al respecto [11]. Por otra parte, se ha descrito la capacidad que tiene AcMNPV de incorporar en su envoltura proteínas celulares de manera aleatoria o específica [11], y factores heterólogos de forma inespecífica, como la enzima cloranfenicol acetil transferasa [316]. Dado que en esta tesis se han sobreexpresado ambos factores empleando un promotor muy fuerte (*polh*), a diferencia de lo que ocurre en el virus silvestre, cabe la posibilidad de que fuesen incorporados de manera inespecífica en la envoltura del virión o bien, que como producto de la lisis celular, estuviesen libres en el inóculo. Es importante señalar que si en un principio se negaba la capacidad de los factores de transcripción de ser internalizados por una célula [317], posteriormente se ha comprobado que algunos pueden ser transferidos de célula a célula y tener actividad paracrina [318, 319], como la homeoproteína *hoxa-5*, que es captada por la célula y transportada al núcleo celular [320], o el para-factor de transcripción *Nkx3.1*, que regula la expresión de genes y la proliferación celular [321]. Tampoco se puede descartar que los hallazgos se deban a un efecto indirecto de la activación de otros genes [64], como pudiera ser el gen *p35*, que codifica para una proteína antiapoptótica [322], cuya expresión está estimulada por el factor IE0 [54] y que además forma parte de la envoltura del VB.

Otra observación surgida en esta tesis, igualmente derivada de la sobreexpresión de los factores IE0 e IE1, fue el aumento de la supervivencia celular

tras la infección, reflejado en una mayor viabilidad celular a tiempos tardíos posinfección (Figura 13). Este fenómeno es extremadamente importante porque amplía la ventana temporal del proceso productivo del sistema BEVS, permitiendo que las células estén durante más tiempo en unas condiciones óptimas para el procesamiento de la proteína sintetizada *de novo*.

La determinación de la vehiculización de estos factores, su mecanismo de acción, así como su cuantificación y caracterización, junto con las posibles interacciones entre sí y con otros factores, deberá ser objeto de trabajo en el futuro. Un estudio preliminar realizado en el laboratorio, en la línea celular de mamífero Vero, ha mostrado un incremento en el número de células de un cultivo transducido con el baculovirus que sobreexpresaba los factores antes mencionados, respecto a otro transducido con un baculovirus convencional, de forma similar a lo observado en las células de insecto infectadas por los mismos baculovirus. Este nuevo hallazgo tendría una potencial aplicación biotecnológica para la producción en líneas celulares de mamífero transgénicas o infectadas por virus.

Finalmente, los resultados sugieren la existencia de una cascada de acontecimientos en el cultivo infectado, desde tiempos muy tempranos, en el que se identifica una mayor proliferación celular seguida de una demora del efecto citopático, que tiene como resultado el retraso de la muerte celular.

### **V.2.2.1 Regulación de la muerte celular inducida por baculovirus. Implicaciones biotecnológicas**

Ante la infección por un virus, la célula puede responder activando la vía apoptótica [323]. Esta medida tratará de contener la replicación vírica y, por tanto, la diseminación de la infección [324, 325]. Frente a esta medida, los virus han desarrollado un amplio conjunto de contramedidas [326-329], y en el caso particular de los baculovirus, son tres las proteínas con función antiapoptótica: P35, P49 e IAP [127].

La posibilidad de trasladar algunas de estas estrategias al campo biotecnológico ha sido un fuerte aliciente para muchos investigadores, cuyo objetivo fue prolongar la duración del ciclo infectivo y así incrementar la acumulación de

proteína recombinante y mejorar la conformación de esta. Un ejemplo de ello es la expresión de forma estable del gen *p35* en la línea Sf9 [245] o en la línea Sf21 [330]. Resultados similares se observaron al suplementar con la hemolinfa de los lepidópteros *Lonomia oblique* (*L. oblique*) [331] o *B. mori* [332] un cultivo infectado con baculovirus, sugiriendo la presencia de componentes en la hemolinfa capaces de inhibir la apoptosis. En *B. mori* se identificó la proteína 30K como la responsable de tal efecto [333] y, posteriormente, se generó una línea celular estable de mamífero [334-336]. Mediante la expresión de la proteína P-vank-1 del ichnovirus de *Campoplex sonorensis* (CslV) en la línea celular Sf-9 se retrasó la muerte y lisis celular de las células infectadas [337], permitiendo incrementar la producción de proteína recombinante [239].

Otro ejemplo de modulación de la vía apoptótica fue la supresión de la expresión de la principal caspasa efectora en *T. ni* [338] y *S. frugiperda* [339], mediante iRNA, cuyo resultado fue un mantenimiento de la viabilidad celular y una producción de proteína recombinante 2 veces mayor.

En la presente tesis se ha observado un retraso de la muerte celular (Figura 13A) que coincidió con la demora de los síntomas citopatogénicos asociados al proceso infectivo (Figura 13D), junto con un incremento de la producción (Figura 20), una mayor homogeneidad y una menor degradación de la proteína recombinante (Figura 19B). Esto ha hecho posible mejorar, de forma clara, las características productivas del sistema BEVS. Al igual que en los casos anteriores, esto sugiere la existencia de un mecanismo capaz de regular la apoptosis. Sin embargo, el esclarecimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a los fenómenos descritos en la presente tesis doctoral, deben ser aclarados. Para ello, están en curso nuevas investigaciones en el laboratorio.

### V.2.3 Configuración final del casete de expresión

La incorporación en el genoma del baculovirus del cDNA *Ac-*ie-01** (apartado IV.3) y de la secuencia *enhancer hr1* (apartado IV.2.2), de forma independiente, dio como resultado la aparición de nuevas características favorables para el vector AcMNPV. En base a ello, se desarrollaron distintos casetes de expresión

compuestos por el cDNA *Ac-ie-01*, la secuencia *hr1* y diferentes promotores o combinaciones de promotores (Figura 15C). Su caracterización funcional evidenció la importancia del promotor *p10* en la conformación de las versiones del casete más productivas, solo o como parte de un promotor híbrido. Mientras que las construcciones donde el elemento promotor estaba compuesto por las secuencias *p10*, *polhp10*, *pB2<sub>9</sub>p10* o *p6.9p10* incrementaron en 3.1, 1.5, 3.6 y 4.3 veces el nivel de expresión de los promotores convencionales, la ausencia de la secuencia *p10* determinaba una menor expresión (Figura 15C). El baculovirus portador del casete más productivo (*polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*) generó una producción de GFP sin precedentes, en comparación a los baculovirus convencionales (Figura 15C).

En definitiva, los hallazgos detallados en esta tesis indican que en el nuevo casete de expresión desarrollado existen elementos capaces de desencadenar un mecanismo que incremente la población en los primeros momentos de la infección (Figura 12A) y retrasar la muerte celular (Figura 13A). Esto determina un aumento de la cantidad (Figura 20) y la calidad (Figura 19B) de la proteína recombinante, con formas de la proteína foránea más uniformes y menos degradadas. Estas propiedades se ven reflejadas de igual manera en el modelo de larvas de *T. ni* (Figura 22), redundando en una mayor productividad y supervivencia del insecto infectado a dosis altas (biomasa). Asimismo, el baculovirus portador del nuevo casete de expresión incrementó, de manera totalmente novedosa, la producción de proteína recombinante en células y larvas de insecto, además de ser más temprana que la generada por los baculovirus convencionales utilizados por la industria y la academia.

### **V.3 Validación del nuevo casete de expresión en un modelo de interés industrial para la producción de pseudopartículas víricas (*virus-like particles*; VLPs)**

Las vacunas tienen una gran repercusión sobre la salud humana y animal, desde la erradicación de enfermedades a la prevención de epidemias recurrentes. Sin embargo, su elevado coste de producción limita el desarrollo de las vacunas [340] destinadas a la prevención en sanidad animal [194] o a países en vías de

desarrollo [341]. Ante esta perspectiva, los incrementos de producción expuestos en la presente tesis doctoral permitirían hacer comercialmente viables determinadas vacunas de subunidades, puesto que se reducirían considerablemente sus costes. A su vez, un incremento significativo de la producción redundaría en un mejor abastecimiento de vacunas en una situación de pandemia (influenza) o a poblaciones de menor riesgo pero susceptibles de infectarse o transmitir la infección (*Human papillomavirus*; HPV).

Las vacunas de subunidades se basan en el uso de componentes específicos de los patógenos, generalmente localizados en su superficie, por lo que se consideran más seguras que las vacunas inactivadas o las vivas atenuadas. Sin embargo, su menor inmunogenicidad requiere el uso de dosis mayores, el refuerzo de su administración, el empleo de adyuvantes o el desarrollo de estrategias alternativas. Las VLPs representan el mayor avance en la optimización de las vacunas de subunidades [342]. Están formadas por proteínas estructurales del virus que tienen la capacidad de autoensamblarse y mimetizar la morfología del patógeno. Además, no son infectivas y exponen los epítomos antigénicos, correctamente conformados, de una manera repetitiva, facilitando su reconocimiento por el sistema inmune [195].

Las características del sistema BEVS han permitido catalogarlo como una herramienta adecuada para la producción de VLPs [156, 159, 343]. El gran interés que suscita el uso de pseudopartículas víricas [344, 345] en terapias vacunales preventivas en animales, nos ha llevado a contrastar si los resultados observados en la expresión de una proteína reportadora con el baculovirus portador del nuevo casete de expresión eran trasladables a la producción de VLPs. Para ello, se seleccionó como modelo la proteína de la cápsida del circovirus porcino tipo 2 (PCV2), agente etiológico de una de las enfermedades que mayores pérdidas económicas ha provocado en el sector porcino a nivel mundial en los últimos años [346, 347]. Sin embargo, las vacunas comercializadas frente a este agente se han mostrado como una excelente herramienta para reducir el fuerte impacto que tiene sobre el sector [348, 349].

Así, y como parte final de la tesis, se estudió un modelo de producción de la proteína Cap con un baculovirus modificado con el nuevo casete de expresión.

Al igual que en el caso de la proteína reportadora GFP, se observó que el baculovirus portador del casete inducía en las células una producción 4 veces superior (Figura 24C) a la del baculovirus convencional, junto a una menor degradación de las proteínas constitutivas de la célula y de la proteína recombinante generada (Figura 24B). Como consecuencia, se obtuvo una mayor generación de VLPs correctamente conformadas, tal y como se comprobó mediante microscopía electrónica (Figura 25). Similar fue el éxito logrado al expresar esta proteína en larvas de *T. ni*, llegando a duplicar su producción al emplear el nuevo casete de expresión (Figura 26).

Pese a estar a la espera de más resultados de expresión de nuevos modelos de proteínas recombinantes con el nuevo casete de expresión, es posible definirlo ya como una herramienta que incrementa de manera considerable el nivel de producción con respecto al alcanzado por los baculovirus convencionales descritos hasta la fecha.

A modo de resumen, podemos decir que el nuevo casete de expresión desarrollado en la presente tesis doctoral, ha permitido dar un paso adelante en la optimización del sistema BEVS, ya que desde su origen en los años 80 no se había alcanzado una mejoría cuantitativa y cualitativa de la expresión de proteínas heterólogas como la observada en este trabajo. El nuevo casete de expresión para baculovirus es un elemento versátil y funcional en diferentes tipos celulares de insecto (Sf21, Sf-9, Tn-5), formas de cultivo (monocapa, suspensión), multiplicidades de infección (baja y alta) y, operativo en un modelo *in vivo*. Desde un punto de vista académico, destacan las nuevas funciones atribuibles a los factores de transcripción del baculovirus, sobre las que habrá que incidir dadas las aplicaciones biotecnológicas que pueden mediar.

## **VI CONCLUSIONES**



En base a los resultados aportados en esta tesis doctoral, se pueden enunciar las siguientes conclusiones:

- I. Por vez primera se han aislado, y caracterizado en el vector baculovirus, promotores derivados del lepidóptero *T. ni*, siendo el denominado *pB2* el más potente entre los estudiados. Dentro de este promotor, se ha determinado la secuencia mínima indispensable para su función, denominándose *pB2<sub>g</sub>*. La combinación de esta secuencia mínima con el promotor *p10*, posee interesantes propiedades de interés biotecnológico.
- II. Se ha demostrado que los transactivadores IE0 e IE1, codificados por el cDNA *Ac-ie-01*, al ser sobreexpresados en un vector baculovirus, inducen proliferación celular en las primeras horas de la infección y aumentan la viabilidad en el tiempo de las células infectadas.
- III. Se ha desarrollado un nuevo casete de expresión para baculovirus que combina elementos reguladores en *cis* (secuencia potenciadora *hr1*), factores reguladores en *trans* (IE0 e IE1) y promotores, siendo fundamental la presencia de la secuencia *p10*. Este casete otorga al vector baculovirus capacidades productivas no conseguidas con anterioridad para este sistema.
- IV. El baculovirus portador del nuevo casete de expresión desarrollado mejora el procesamiento de las proteínas recombinantes obtenidas en células de insecto, disminuyendo formas aberrantes y la proteólisis característica de este sistema productivo.
- V. Las propiedades del baculovirus portador del casete de expresión desarrollado, observadas en cultivos celulares de insecto, son extrapolables a larvas de *T. ni* infectadas, usadas como biofactorías. El nuevo casete aumenta considerablemente la supervivencia de las larvas cuando estas son infectadas con altas dosis de virus, a la vez que genera una mayor producción de proteína recombinante por unidad de biomasa.
- VI. El nuevo casete de expresión desarrollado se ha modelizado para la producción de una proteína vírica formadora de pseudopartículas víricas, la proteína Cap del circovirus porcino tipo 2. Los resultados obtenidos indican que gracias al nuevo casete de expresión es posible producir hasta 4 veces más proteína recombinante en células de insecto y hasta 2 veces más en larvas de *T. ni* en comparación a un baculovirus convencional. Este aumento de producción se ha correlacionado con una mayor formación de estructuras semejantes a virus, observadas mediante microscopía electrónica.



## **VII BIBLIOGRAFÍA**



- [1] Herniou EA, Arif BM, Becnel JJ, Blissard GW, Bonning B, Harrison R, et al. Family Baculoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus Taxonomy: IX Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*: Elsevier Inc; 2012. p. 167-74.
- [2] Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee RD. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 1994;202:586-605.
- [3] Zanotto PM, Kessing BD, Maruniak JE. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *J Invertebr Pathol*. 1993;62:147-64.
- [4] Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, et al. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch Virol*. 2006;151:1257-66.
- [5] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=10442>. Última actualización el 27 de enero de 2014.
- [6] Ihalainen TO, Laakkonen JP, Paloheimo O, Yla-Herttuala S, Airene KJ, Vihinen-Ranta M. Morphological characterization of baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Virus Res*. 2010;148:71-4.
- [7] Summers MD, Volkman LE. Comparison of biophysical and morphological properties of occluded and extracellular nonoccluded baculovirus from in vivo and in vitro host systems. *J Virol*. 1976;17:962-72.
- [8] Smith GE, Summers MD. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology*. 1978;89:517-27.
- [9] Monsma SA, Oomens AG, Blissard GW. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J Virol*. 1996;70:4607-16.
- [10] Braunagel SC, Russell WK, Rosas-Acosta G, Russell DH, Summers MD. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:9797-802.
- [11] Wang R, Deng F, Hou D, Zhao Y, Guo L, Wang H, et al. Proteomics of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus budded virions. *J Virol*. 2010;84:7233-42.
- [12] Slack J, Arif BM. The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Adv Virus Res*. 2007;69:99-165.

- [13] Braunagel SC, Summers MD. Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope. *Curr Drug Targets*. 2007;8:1084-95.
- [14] Wang R-r, Hu Z-h, Wang H-l, Deng F. Virion proteomics of large DNA viruses. *Virologica Sinica*. 2009;24:268-84.
- [15] Peng K, van Lent JW, Boeren S, Fang M, Theilmann DA, Erlandson MA, et al. Characterization of novel components of the baculovirus per os infectivity factor complex. *J Virol*. 2012;86:4981-8.
- [16] Thiem SM, Miller LK. Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol*. 1989;63:2008-18.
- [17] Wilson ME, Mainprize TH, Friesen PD, Miller LK. Location, transcription, and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide. *J Virol*. 1987;61:661-6.
- [18] Theilmann DA, Blissard GW. Baculoviruses: Molecular Biology of Nucleopolyhedroviruses. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV, editors. *Desk encyclopedia of general virology*: Elsevier Ltd; 2010. p. 434-44.
- [19] Peng J, Zhong J, R RG. A baculovirus enhancin alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *J Insect Physiol*. 1999;45:159-66.
- [20] Wang P, Granados RR. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:6977-82.
- [21] Means JC, Passarelli AL. Viral fibroblast growth factor, matrix metalloproteases, and caspases are associated with enhancing systemic infection by baculoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:9825-30.
- [22] Long G, Pan X, Kormelink R, Vlak JM. Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*. 2006;80:8830-3.
- [23] Hefferon KL, Oomens AG, Monsma SA, Finnerty CM, Blissard GW. Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology*. 1999;258:455-68.
- [24] Ohkawa T, Volkman LE, Welch MD. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *J Cell Biol*. 2010;190:187-95.
- [25] Au S, Pante N. Nuclear transport of baculovirus: revealing the nuclear pore complex passage. *J Struct Biol*. 2012;177:90-8.

- [26] Rosinski M, Reid S, Nielsen LK. Kinetics of baculovirus replication and release using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng.* 2002;77:476-80.
- [27] Airene KJ, Hu YC, Kost TA, Smith RH, Kotin RM, Ono C, et al. Baculovirus: an insect-derived vector for diverse gene transfer applications. *Mol Ther.* 2013;21:739-49.
- [28] Passarelli AL, Guarino LA. Baculovirus late and very late gene regulation. *Curr Drug Targets.* 2007;8:1103-15.
- [29] King LA, Possee RD. *The baculovirus expression system: a laboratory guide.* Chapman & Hall London 1992.
- [30] Braunagel SC, Parr R, Belyavskiy M, Summers MD. *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection results in Sf9 cell cycle arrest at G2/M phase. *Virology.* 1998;244:195-211.
- [31] Hoopes RR, Jr., Rohrmann GF. In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:4513-7.
- [32] Fuchs LY, Woods MS, Weaver RF. Viral Transcription During *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Infection: a Novel RNA Polymerase Induced in Infected *Spodoptera frugiperda* Cells. *J Virol.* 1983;48:641-6.
- [33] Gula MA, Buller PL, Weaver RF. alpha-Amanitin-Resistant Viral RNA Synthesis in Nuclei Isolated from Nuclear Polyhedrosis Virus-Infected *Heliothis zea* Larvae and *Spodoptera frugiperda* Cells. *J Virol.* 1981;38:916-21.
- [34] Guarino LA, Xu B, Jin J, Dong W. A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. *J Virol.* 1998;72:7985-91.
- [35] Kool M, Vlak JM. The structural and functional organization of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Arch Virol.* 1993;130:1-16.
- [36] Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV. *Desk encyclopedia of general virology:* Academic Press; 2010.
- [37] Rohrmann GF. *Baculovirus Molecular Biology.* Third ed. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2013.
- [38] Guarino LA, Summers MD. Interspersed Homologous DNA of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Enhances Delayed-Early Gene Expression. *J Virol.* 1986;60:215-23.

- [39] Miller LK. The baculoviruses: Springer; 1997.
- [40] Kool M, Voeten JT, Goldbach RW, Tramper J, Vlak JM. Identification of seven putative origins of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus DNA replication. *J Gen Virol*. 1993;74 ( Pt 12):2661-8.
- [41] Pijlman GP, de Vrij J, van den End FJ, Vlak JM, Martens DE. Evaluation of baculovirus expression vectors with enhanced stability in continuous cascaded insect-cell bioreactors. *Biotechnol Bioeng*. 2004;87:743-53.
- [42] Guarino LA, Gonzalez MA, Summers MD. Complete Sequence and Enhancer Function of the Homologous DNA Regions of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *J Virol*. 1986;60:224-9.
- [43] Rodems SM, Friesen PD. The hr5 transcriptional enhancer stimulates early expression from the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome but is not required for virus replication. *J Virol*. 1993;67:5776-85.
- [44] Carson DD, Summers MD, Guarino LA. Transient expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early gene, IE-N, is regulated by three viral elements. *J Virol*. 1991;65:945-51.
- [45] Theilmann DA, Stewart S. Tandemly repeated sequence at the 3' end of the IE-2 gene of the baculovirus *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus is an enhancer element. *Virology*. 1992;187:97-106.
- [46] Rodems SM, Pullen SS, Friesen PD. DNA-dependent transregulation by IE1 of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: IE1 domains required for transactivation and DNA binding. *J Virol*. 1997;71:9270-7.
- [47] Leisy DJ, Rohrmann GF. The *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus IE-1 protein complex has two modes of specific DNA binding. *Virology*. 2000;274:196-202.
- [48] Habib S, Hasnain SE. A 38-kDa host factor interacts with functionally important motifs within the *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus homologous region (hr1) DNA sequence. *J Biol Chem*. 1996;271:28250-8.
- [49] Viswanathan P, Venkaiah B, Kumar MS, Rasheedi S, Vrati S, Bashyam MD, et al. The homologous region sequence (hr1) of *Autographa californica* multinucleocapsid polyhedrosis virus can enhance transcription from non-baculoviral promoters in mammalian cells. *J Biol Chem*. 2003;278:52564-71.
- [50] Landais I, Vincent R, Bouton M, Devauchelle G, Duonor-Cerutti M, Ogliastro M. Functional analysis of evolutionary conserved clustering of bZIP binding sites in the

baculovirus homologous regions (hrs) suggests a cooperativity between host and viral transcription factors. *Virology*. 2006;344:421-31.

[51] Guarino LA, Summers MD. Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *J Virol*. 1986;57:563-71.

[52] Cohen D, Marek M, Davies B, Vlak J, van Oers M. Encyclopedia of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus genes. *Virologica Sinica*. 2009;24:359-414.

[53] Pathakamuri JA, Theilmann DA. The acidic activation domain of the baculovirus transactivator IE1 contains a virus-specific domain essential for DNA replication. *J Virol*. 2002;76:5598-604.

[54] Taggart DJ, Mitchell JK, Friesen PD. A Conserved N-terminal Domain Mediates Required DNA Replication Activities and Phosphorylation of the Transcriptional Activator IE1 of *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus. *J Virol*. 2012.

[55] Forsythe IJ, Shippam CE, Willis LG, Stewart S, Grigliatti T, Theilmann DA. Characterization of the acidic domain of the IE1 regulatory protein from *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology*. 1998;252:65-81.

[56] Olson VA, Wetter JA, Friesen PD. The highly conserved basic domain I of baculovirus IE1 is required for hr enhancer DNA binding and hr-dependent transactivation. *J Virol*. 2003;77:5668-77.

[57] Slack JM, Blissard GW. Identification of two independent transcriptional activation domains in the *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus IE1 protein. *J Virol*. 1997;71:9579-87.

[58] Okano K, Vanarsdall AL, Mikhailov VS, Rohrmann GF. Conserved molecular systems of the Baculoviridae. *Virology*. 2006;344:77-87.

[59] Olson VA, Wetter JA, Friesen PD. Baculovirus transregulator IE1 requires a dimeric nuclear localization element for nuclear import and promoter activation. *J Virol*. 2002;76:9505-15.

[60] Olson VA, Wetter JA, Friesen PD. Oligomerization mediated by a helix-loop-helix-like domain of baculovirus IE1 is required for early promoter transactivation. *J Virol*. 2001;75:6042-51.

[61] Okano K, Mikhailov VS, Maeda S. Colocalization of baculovirus IE-1 and two DNA-binding proteins, DBP and LEF-3, to viral replication factories. *J Virol*. 1999;73:110-9.

[62] Kovacs GR, Guarino LA, Graham BL, Summers MD. Identification of spliced baculovirus RNAs expressed late in infection. *Virology*. 1991;185:633-43.

- [63] Huijskens I, Li L, Willis LG, Theilmann DA. Role of AcMNPV IE0 in baculovirus very late gene activation. *Virology*. 2004;323:120-30.
- [64] Passarelli AL, Miller LK. Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: ie-1, ie-n, and lef-2. *J Virol*. 1993;67:2149-58.
- [65] Kovacs GR, Guarino LA, Summers MD. Novel regulatory properties of the IE1 and IE0 transactivators encoded by the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Virol*. 1991;65:5281-8.
- [66] Carson DD, Summers MD, Guarino LA. Molecular analysis of a baculovirus regulatory gene. *Virology*. 1991;182:279-86.
- [67] Lu A, Carstens EB. Immediate-early baculovirus genes transactivate the p143 gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 1993;195:710-8.
- [68] Nissen MS, Friesen PD. Molecular analysis of the transcriptional regulatory region of an early baculovirus gene. *J Virol*. 1989;63:493-503.
- [69] Kremer A, Knebel-Morsdorf D. The early baculovirus he65 promoter: On the mechanism of transcriptional activation by IE1. *Virology*. 1998;249:336-51.
- [70] Blissard GW, Rohrmann GF. Baculovirus gp64 gene expression: analysis of sequences modulating early transcription and transactivation by IE1. *J Virol*. 1991;65:5820-7.
- [71] Kojima K, Oritani K, Nakatsukasa T, Asano S, Sahara K, Bando H. Ecdysone response element in a baculovirus immediate-early gene, ie1, promoter. *Virus Res*. 2007;130:202-9.
- [72] Zhou Y, Xiao Q, Zhang Z, He J, Zhang Y. Foreign insect hormones stimulating the transcription of the ie-1 promoter of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus in vivo and in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002;66:1488-94.
- [73] Kool M, Ahrens CH, Goldbach RW, Rohrmann GF, Vlak JM. Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:11212-6.
- [74] Nagamine T, Kawasaki Y, Iizuka T, Matsumoto S. Focal distribution of baculovirus IE1 triggered by its binding to the hr DNA elements. *J Virol*. 2005;79:39-46.
- [75] Chisholm GE, Henner DJ. Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. *J Virol*. 1988;62:3193-200.

- [76] Chen YR, Zhong S, Fei Z, Hashimoto Y, Xiang JZ, Zhang S, et al. The transcriptome of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* cells. *J Virol*. 2013;87:6391-405.
- [77] Theilmann DA, Stewart S. Analysis of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus trans-activators IE-1 and IE-2 using monoclonal antibodies. *J Gen Virol*. 1993;74 ( Pt 9):1819-26.
- [78] Choi J, Guarino LA. Expression of the IE1 transactivator of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus during viral infection. *Virology*. 1995;209:99-107.
- [79] Pearson MN, Rohrmann GF. Splicing is required for transactivation by the immediate early gene 1 of the *Lymantria dispar* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 1997;235:153-65.
- [80] Theilmann DA, Willis LG, Bosch BJ, Forsythe IJ, Li Q. The baculovirus transcriptional transactivator ie0 produces multiple products by internal initiation of translation. *Virology*. 2001;290:211-23.
- [81] Stewart TM, Huijskens I, Willis LG, Theilmann DA. The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ie0-ie1 gene complex is essential for wild-type virus replication, but either IE0 or IE1 can support virus growth. *J Virol*. 2005;79:4619-29.
- [82] Dai X, Willis LG, Huijskens I, Palli SR, Theilmann DA. The acidic activation domains of the baculovirus transactivators IE1 and IE0 are functional for transcriptional activation in both insect and mammalian cells. *J Gen Virol*. 2004;85:573-82.
- [83] Schultz KL, Wetter JA, Fiore DC, Friesen PD. Transactivator IE1 is required for baculovirus early replication events that trigger apoptosis in permissive and nonpermissive cells. *J Virol*. 2009;83:262-72.
- [84] Prikhod'ko EA, Miller LK. Role of baculovirus IE2 and its RING finger in cell cycle arrest. *J Virol*. 1998;72:684-92.
- [85] Yoo S, Guarino LA. The *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ie2 gene encodes a transcriptional regulator. *Virology*. 1994;202:746-53.
- [86] Liu CY, Wang CH, Hsiao WK, Lo HR, Wu CP, Chao YC. RING and coiled-coil domains of baculovirus IE2 are critical in strong activation of the cytomegalovirus major immediate-early promoter in mammalian cells. *J Virol*. 2009;83:3604-16.
- [87] Knebel-Morsdorf D, Kremer A, Jahnel F. Baculovirus gene ME53, which contains a putative zinc finger motif, is one of the major early-transcribed genes. *J Virol*. 1993;67:753-8.

- [88] de Jong J, Arif BM, Theilmann DA, Krell PJ. Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus me53 (ac140) is a nonessential gene required for efficient budded-virus production. *J Virol.* 2009;83:7440-8.
- [89] Krappa R, Knebel-Morsdorf D. Identification of the very early transcribed baculovirus gene PE-38. *J Virol.* 1991;65:805-12.
- [90] Jiang SS, Chang IS, Huang LW, Chen PC, Wen CC, Liu SC, et al. Temporal transcription program of recombinant Autographa californica multiple nucleopolyhedrosis virus. *J Virol.* 2006;80:8989-99.
- [91] Milks ML, Washburn JO, Willis LG, Volkman LE, Theilmann DA. Deletion of pe38 attenuates AcMNPV genome replication, budded virus production, and virulence in *heliothis virescens*. *Virology.* 2003;310:224-34.
- [92] Gong M, Jin J, Guarino LA. Mapping of ORF121, a factor that activates baculovirus early gene expression. *Virology.* 1998;244:495-503.
- [93] Vanarsdall AL, Mikhailov VS, Rohrmann GF. Baculovirus DNA replication and processing. *Curr Drug Targets.* 2007;8:1096-102.
- [94] Passarelli A. Baculovirus RNA polymerase: Activities, composition, and evolution. *Virologica Sinica.* 2007;22:94-107.
- [95] McLachlin JR, Miller LK. Identification and characterization of vlf-1, a baculovirus gene involved in very late gene expression. *J Virol.* 1994;68:7746-56.
- [96] Rankin C, Ooi BG, Miller LK. Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression. *Gene.* 1988;70:39-49.
- [97] Yang S, Miller LK. Activation of baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1. *J Virol.* 1999;73:3404-9.
- [98] Rapp JC, Wilson JA, Miller LK. Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression. *J Virol.* 1998;72:10197-206.
- [99] Lu A, Miller LK. The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication. *J Virol.* 1995;69:975-82.
- [100] Li L, Harwood SH, Rohrmann GF. Identification of additional genes that influence baculovirus late gene expression. *Virology.* 1999;255:9-19.

- [101] Hefferon KL. Baculovirus late expression factors. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2004;7:89-101.
- [102] Mistretta TA, Guarino LA. Transcriptional activity of baculovirus very late factor 1. *J Virol.* 2005;79:1958-60.
- [103] Mikhailov VS, Rohrmann GF. Binding of the baculovirus very late expression factor 1 (VLF-1) to different DNA structures. *BMC Mol Biol.* 2002;3:14.
- [104] Vanarsdall AL, Okano K, Rohrmann GF. Characterization of the role of very late expression factor 1 in baculovirus capsid structure and DNA processing. *J Virol.* 2006;80:1724-33.
- [105] Li Y, Wang J, Deng R, Zhang Q, Yang K, Wang X. vlf-1 deletion brought AcMNPV to defect in nucleocapsid formation. *Virus Genes.* 2005;31:275-84.
- [106] Yang S, Miller LK. Control of baculovirus polyhedrin gene expression by very late factor 1. *Virology.* 1998;248:131-8.
- [107] Yang S, Miller LK. Expression and mutational analysis of the baculovirus very late factor 1 (vlf-1) gene. *Virology.* 1998;245:99-109.
- [108] Harwood SH, Li L, Ho PS, Preston AK, Rohrmann GF. AcMNPV late expression factor-5 interacts with itself and contains a zinc ribbon domain that is required for maximal late transcription activity and is homologous to elongation factor TFIIS. *Virology.* 1998;250:118-34.
- [109] Guarino LA, Dong W, Jin J. In vitro activity of the baculovirus late expression factor LEF-5. *J Virol.* 2002;76:12663-75.
- [110] Lin G, Blissard GW. Analysis of an *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus lef-6-null virus: LEF-6 is not essential for viral replication but appears to accelerate late gene transcription. *J Virol.* 2002;76:5503-14.
- [111] Lu A, Miller LK. Identification of three late expression factor genes within the 33.8- to 43.4-map-unit region of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol.* 1994;68:6710-8.
- [112] Guarino LA, Dong W, Xu B, Broussard DR, Davis RW, Jarvis DL. Baculovirus phosphoprotein pp31 is associated with virogenic stroma. *J Virol.* 1992;66:7113-20.
- [113] Todd JW, Passarelli AL, Miller LK. Eighteen baculovirus genes, including lef-11, p35, 39K, and p47, support late gene expression. *J Virol.* 1995;69:968-74.

- [114] Yamagishi J, Burnett ED, Harwood SH, Blissard GW. The AcMNPV pp31 gene is not essential for productive AcMNPV replication or late gene transcription but appears to increase levels of most viral transcripts. *Virology*. 2007;365:34-47.
- [115] Merrington CL, Kitts PA, King LA, Possee RD. An *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus lef-2 mutant: consequences for DNA replication and very late gene expression. *Virology*. 1996;217:338-48.
- [116] Mishra G, Chadha P, Chaudhury I, Das RH. Inhibition of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV) polyhedrin gene expression by DNAzyme knockout of its serine/threonine kinase (pk1) gene. *Virus Res*. 2008;135:197-201.
- [117] Mishra G, Chadha P, Das RH. Serine/threonine kinase (pk-1) is a component of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) very late gene transcription complex and it phosphorylates a 102 kDa polypeptide of the complex. *Virus Res*. 2008;137:147-9.
- [118] Choi J, Guarino LA. A temperature-sensitive IE1 protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus has altered transactivation and DNA binding activities. *Virology*. 1995;209:90-8.
- [119] Harrison RL, Jarvis DL, Summers MD. The role of the AcMNPV 25K gene, "FP25," in baculovirus polh and p10 expression. *Virology*. 1996;226:34-46.
- [120] Davy C, Doorbar J. G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology*. 2007;368:219-26.
- [121] Ikeda M, Kobayashi M. Cell-cycle perturbation in Sf9 cells infected with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Virology*. 1999;258:176-88.
- [122] Clem RJ, Miller LK. Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. *Mol Cell Biol*. 1994;14:5212-22.
- [123] LaCount DJ, Friesen PD. Role of early and late replication events in induction of apoptosis by baculoviruses. *J Virol*. 1997;71:1530-7.
- [124] Thiem S, Cheng X-W. Baculovirus host-range. *VIROLOGICA SINICA*. 2009;24:436-57.
- [125] Schultz KL, Friesen PD. Baculovirus DNA replication-specific expression factors trigger apoptosis and shutoff of host protein synthesis during infection. *J Virol*. 2009;83:11123-32.

- [126] Vandergaast R, Schultz KL, Cerio RJ, Friesen PD. Active depletion of host cell inhibitor-of-apoptosis proteins triggers apoptosis upon baculovirus DNA replication. *J Virol*. 2011;85:8348-58.
- [127] Clem RJ. Baculoviruses and apoptosis: a diversity of genes and responses. *Curr Drug Targets*. 2007;8:1069-74.
- [128] Zhou Q, Krebs JF, Snipas SJ, Price A, Alnemri ES, Tomaselli KJ, et al. Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry*. 1998;37:10757-65.
- [129] LaCount DJ, Hanson SF, Schneider CL, Friesen PD. Caspase inhibitor P35 and inhibitor of apoptosis Op-IAP block in vivo proteolytic activation of an effector caspase at different steps. *J Biol Chem*. 2000;275:15657-64.
- [130] Du Q, Lehavi D, Faktor O, Qi Y, Chejanovsky N. Isolation of an apoptosis suppressor gene of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *J Virol*. 1999;73:1278-85.
- [131] Zoog SJ, Schiller JJ, Wetter JA, Chejanovsky N, Friesen PD. Baculovirus apoptotic suppressor P49 is a substrate inhibitor of initiator caspases resistant to P35 in vivo. *EMBO J*. 2002;21:5130-40.
- [132] Smolewski P, Robak T. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) as potential molecular targets for therapy of hematological malignancies. *Curr Mol Med*. 2011;11:633-49.
- [133] Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*. 1993;67:2168-74.
- [134] O'Riordan MX, Bauler LD, Scott FL, Duckett CS. Inhibitor of apoptosis proteins in eukaryotic evolution and development: a model of thematic conservation. *Dev Cell*. 2008;15:497-508.
- [135] Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle*. 2008;7:1036-46.
- [136] Kool M, Goldbach RW, Vlak JM. A putative non-hr origin of DNA replication in the HindIII-K fragment of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol*. 1994;75 ( Pt 12):3345-52.
- [137] Habib S, Hasnain SE. Differential activity of two non-hr origins during replication of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *J Virol*. 2000;74:5182-9.

- [138] Wu Y, Carstens EB. Initiation of baculovirus DNA replication: early promoter regions can function as infection-dependent replicating sequences in a plasmid-based replication assay. *J Virol.* 1996;70:6967-72.
- [139] Tomalski MD, Wu JG, Miller LK. The location, sequence, transcription, and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene. *Virology.* 1988;167:591-600.
- [140] Laufs S, Lu A, Arrell K, Carstens EB. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p143 gene product is a DNA-binding protein. *Virology.* 1997;228:98-106.
- [141] Evans JT, Leisy DJ, Rohrmann GF. Characterization of the interaction between the baculovirus replication factors LEF-1 and LEF-2. *J Virol.* 1997;71:3114-9.
- [142] Yu M, Carstens EB. Identification of a domain of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus single-strand DNA-binding protein LEF-3 essential for viral DNA replication. *J Virol.* 2010;84:6153-62.
- [143] Mikhailov VS, Vanarsdall AL, Rohrmann GF. Isolation and characterization of the DNA-binding protein (DBP) of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Virology.* 2008;370:415-29.
- [144] Xi Q, Wang J, Deng R, Wang X. Characterization of AcMNPV with a deletion of me53 gene. *Virus Genes.* 2007;34:223-32.
- [145] Chen CJ, Thiem SM. Differential infectivity of two *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus mutants on three permissive cell lines is the result of lef-7 deletion. *Virology.* 1997;227:88-95.
- [146] Iwahori S, Ikeda M, Kobayashi M. Association of Sf9 cell proliferating cell nuclear antigen with the DNA replication site of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol.* 2004;85:2857-62.
- [147] Gong M, Guarino LA. Expression of the 39k promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is increased by the apoptotic suppressor P35. *Virology.* 1994;204:38-44.
- [148] Sodoyer R. Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *BioDrugs.* 2004;18:51-62.
- [149] Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol.* 2007;127:335-47.
- [150] Brondyk WH. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods Enzymol.* 2009;463:131-47.

- [151] Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* 2009;27:297-306.
- [152] van Oers MM. Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus vectors. *Adv Virus Res.* 2006;68:193-253.
- [153] Hitchman RB, Possee RD, King LA. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. *Recent Pat Biotechnol.* 2009;3:46-54.
- [154] Li SF, Wang HL, Hu ZH, Deng F. Genetic modification of baculovirus expression vectors. *Virol Sin.* 2012;27:71-82.
- [155] Sokolenko S, George S, Wagner A, Tuladhar A, Andrich JM, Aucoin MG. Co-expression vs. co-infection using baculovirus expression vectors in insect cell culture: Benefits and drawbacks. *Biotechnol Adv.* 2012;30:766-81.
- [156] Fernandes F, Teixeira AP, Carinhas N, Carrondo MJ, Alves PM. Insect cells as a production platform of complex virus-like particles. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12:225-36.
- [157] Palmberger D, Rendic D, Tauber P, Krammer F, Wilson IB, Grabherr R. Insect cells for antibody production: evaluation of an efficient alternative. *J Biotechnol.* 2011;153:160-6.
- [158] Furuta T, Ogawa T, Katsuda T, Fujii I, Yamaji H. Efficient production of an antibody Fab fragment using the baculovirus-insect cell system. *J Biosci Bioeng.* 2010;110:577-81.
- [159] Vicente T, Roldao A, Peixoto C, Carrondo MJ, Alves PM. Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. *J Invertebr Pathol.* 2011;107 Suppl:S42-8.
- [160] Hofmann C, Sandig V, Jennings G, Rudolph M, Schlag P, Strauss M. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:10099-103.
- [161] Choi JY, Kwon SJ, Roh JY, Yang TJ, Li MS, Park BS, et al. Analysis of promoter activity of selected *Cotesia plutellae* bracovirus genes. *J Gen Virol.* 2009;90:1262-9.
- [162] Huang F, Cao S, Cui X, Xiong C, Wang M, Lu Y, et al. Efficient gene delivery into fish cells by an improved recombinant baculovirus. *J Virol Methods.* 2011;173:294-9.
- [163] Song J, Liang C, Chen X. Transduction of avian cells with recombinant baculovirus. *J Virol Methods.* 2006;135:157-62.

- [164] Grabherr R, Ernst W. Baculovirus for eukaryotic protein display. *Current gene therapy*. 2010;10:195-200.
- [165] Makela AR, Oker-Blom C. The baculovirus display technology--an evolving instrument for molecular screening and drug delivery. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2008;11:86-98.
- [166] Chen CY, Lin CY, Chen GY, Hu YC. Baculovirus as a gene delivery vector: recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications. *Biotechnol Adv*. 2011;29:618-31.
- [167] Hu YC. Baculovirus vectors for gene therapy. *Adv Virus Res*. 2006;68:287-320.
- [168] Prabakaran M, Madhan S, Prabhu N, Qiang J, Kwang J. Gastrointestinal delivery of baculovirus displaying influenza virus hemagglutinin protects mice against heterologous H5N1 infection. *J Virol*. 2010;84:3201-9.
- [169] Madhan S, Prabakaran M, Kwang J. Baculovirus as vaccine vectors. *Current gene therapy*. 2010;10:201-13.
- [170] Goji NA, Nolan C, Hill H, Wolff M, Noah DL, Williams TB, et al. Immune responses of healthy subjects to a single dose of intramuscular inactivated influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) vaccine after priming with an antigenic variant. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198:635-41.
- [171] <http://www.proteinsciences.com/>. Última actualización el 27 de enero de 2014.
- [172] Glenn GM, Smith G, Fries L, Raghunandan R, Lu H, Zhou B, et al. Safety and immunogenicity of a Sf9 insect cell-derived respiratory syncytial virus fusion protein nanoparticle vaccine. *Vaccine*. 2013;31:524-32.
- [173] Gavrillov V, Orekov T, Alabanza C, Porika U, Jiang H, Connolly K, et al. Influenza virus-like particles as a new tool for vaccine immunogenicity testing: validation of a neuraminidase neutralizing antibody assay. *J Virol Methods*. 2011;173:364-73.
- [174] Lopez-Macias C, Ferat-Osorio E, Tenorio-Calvo A, Isibasi A, Talavera J, Arteaga-Ruiz O, et al. Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine in a blinded, randomized, placebo-controlled trial of adults in Mexico. *Vaccine*. 2011;29:7826-34.
- [175] Khurana S, Wu J, Verma N, Verma S, Raghunandan R, Manischewitz J, et al. H5N1 virus-like particle vaccine elicits cross-reactive neutralizing antibodies that preferentially bind to the oligomeric form of influenza virus hemagglutinin in humans. *J Virol*. 2011;85:10945-54.

- [176] <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00754455>. Última actualización el 16 de julio de 2013.
- [177] <http://www.akshayabio.com/index.html>. Última actualización el 27 de enero de 2014.
- [178] Hinke SA. Diamyd, an alum-formulated recombinant human GAD65 for the prevention of autoimmune diabetes. *Curr Opin Mol Ther*. 2008;10:516-25.
- [179] Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, Al-Ibrahim MS, Chen WH, Ferreira J, et al. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness. *The New England journal of medicine*. 2011;365:2178-87.
- [180] Ball JM, Graham DY, Opekun AR, Gilger MA, Guerrero RA, Estes MK. Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study. *Gastroenterology*. 1999;117:40-8.
- [181] Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, Mammen MP, Jr., Thapa GB, Thapa N, et al. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *The New England journal of medicine*. 2007;356:895-903.
- [182] [http://www.astellas.com/en/corporate/news/pdf/131021\\_1\\_Eg.pdf](http://www.astellas.com/en/corporate/news/pdf/131021_1_Eg.pdf). Última actualización el 21 de octubre de 2013.
- [183] Bernstein DI, El Sahly HM, Keitel WA, Wolff M, Simone G, Segawa C, et al. Safety and immunogenicity of a candidate parvovirus B19 vaccine. *Vaccine*. 2011;29:7357-63.
- [184] Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:12180-4.
- [185] Fachinger V, Bischoff R, Jedidia SB, Saalmuller A, Elbers K. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine*. 2008;26:1488-99.
- [186] Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, Keranflec'h A, Baudouard MA, Cordioli P, et al. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine*. 2003;21:4565-75.
- [187] Patterson AR, Johnson JK, Ramamoorthy S, Hesse RA, Murtaugh MP, Puvanendiran S, et al. Interlaboratory comparison of Porcine circovirus-2 indirect immunofluorescent antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay results on experimentally infected pigs. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. 2011;23:206-12.

- [188] van Aarle P. Suitability of an E2 subunit vaccine of classical swine fever in combination with the E(rns)-marker-test for eradication through vaccination. *Dev Biol (Basel)*. 2003;114:193-200.
- [189] Small EJ, Fratesi P, Reese DM, Strang G, Laus R, Peshwa MV, et al. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol*. 2000;18:3894-903.
- [190] Miller N. Glybera and the future of gene therapy in the European Union. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11:419.
- [191] Burnett JR, Hooper AJ. Alipogene tiparvovec, an adeno-associated virus encoding the Ser(447)X variant of the human lipoprotein lipase gene for the treatment of patients with lipoprotein lipase deficiency. *Curr Opin Mol Ther*. 2009;11:681-91.
- [192] Treanor JJ, El Sahly H, King J, Graham I, Izikson R, Kohberger R, et al. Protective efficacy of a trivalent recombinant hemagglutinin protein vaccine (FluBlok(R)) against influenza in healthy adults: a randomized, placebo-controlled trial. *Vaccine*. 2011;29:7733-9.
- [193] de Mari K, Maynard L, Sanquer A, Lebreux B, Eun HM. Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2004;18:477-82.
- [194] Cox MM. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*. 2012;30:1759-66.
- [195] Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*. 2012;31:58-83.
- [196] Granados R, Guoxun Li and G. W. Blissard. *Insect Cell Culture and Biotechnology*. VIROLOGICA SINICA. 2007;22:83-93.
- [197] Arif B, Pavlik L. *Insect Cell Culture: Virus Replication and Applications in Biotechnology*. J Invertebr Pathol. 2012.
- [198] Wu YL, Jiang L, Hashimoto Y, Granados RR, Li GX. Establishment, growth kinetics, and susceptibility to AcMNPV of heat tolerant lepidopteran cell lines. *Virol Sin*. 2011;26:198-205.
- [199] Lynn DE. Available Lepidopteran Insect Cell Lines. In: Murhammer DW, editor. *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*. Totowa, NJ2007. p. 117-37.

- [200] Lynn DE. Development and characterization of insect cell lines. *Cytotechnology*. 1996;20:3-11.
- [201] Li G-X HY, Granados RR. Growth Characteristics and Expression of Recombinant Proteins by New Cell Clones Derived from *Trichoplusia ni* (BTI Tn5B1-4) High Five<sup>TM</sup> Cells. *Bioprocessing J*. 2003;2:35-8.
- [202] Shan M, Zhang SY, Jiang L, Ma M, Li GX. Susceptibility to AcMNPV and expression of recombinant proteins by a novel cell clone derived from a *Trichoplusia ni* QAU-BTI-Tn9-4s cell line. *Virol Sin*. 2011;26:297-305.
- [203] Hashimoto Y, Zhang S, Chen YR, Blissard GW. BTI-Tnao38, a new cell line derived from *Trichoplusia ni*, is permissive for AcMNPV infection and produces high levels of recombinant proteins. *BMC Biotechnol*. 2012;12:12.
- [204] Jin-shan H, Bi-fang H, Xiu-lian S, Fei D, Hua-lin W, Zhi-hong H. Construction of the Bac-to-Bac system of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *VIROLOGICA SINICA*. 2007;22:218-25.
- [205] Choi JY, Woo SD, Je YH, Kang SK. Development of a novel expression vector system using *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus. *Mol Cells*. 1999;9:504-9.
- [206] Summers MD. Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides. *Adv Virus Res*. 2006;68:3-73.
- [207] Ooi BG, Rankin C, Miller LK. Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene. *J Mol Biol*. 1989;210:721-36.
- [208] Hill-Perkins MS, Possee RD. A baculovirus expression vector derived from the basic protein promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol*. 1990;71 ( Pt 4):971-6.
- [209] Weyer U, Knight S, Possee RD. Analysis of very late gene expression by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and the further development of multiple expression vectors. *J Gen Virol*. 1990;71 ( Pt 7):1525-34.
- [210] Wang XZ, Ooi BG, Miller LK. Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production. *Gene*. 1991;100:131-7.
- [211] Thiem SM, Miller LK. Differential gene expression mediated by late, very late and hybrid baculovirus promoters. *Gene*. 1990;91:87-94.
- [212] Du X, Thiem SM. Responses of insect cells to baculovirus infection: protein synthesis shutdown and apoptosis. *J Virol*. 1997;71:7866-72.

- [213] Possee RD, Howard SC. Analysis of the polyhedrin gene promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Nucleic Acids Res.* 1987;15:10233-48.
- [214] Weyer U, Possee RD. Analysis of the promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene. *J Gen Virol.* 1989;70 ( Pt 1):203-8.
- [215] Morris TD, Miller LK. Promoter influence on baculovirus-mediated gene expression in permissive and nonpermissive insect cell lines. *J Virol.* 1992;66:7397-405.
- [216] Crawford AM, Miller LK. Characterization of an early gene accelerating expression of late genes of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol.* 1988;62:2773-81.
- [217] Jarvis DL, Weinkauff C, Guarino LA. Immediate-early baculovirus vectors for foreign gene expression in transformed or infected insect cells. *Protein Expr Purif.* 1996;8:191-203.
- [218] Johnson R, Meidinger RG, Iatrou K. A cellular promoter-based expression cassette for generating recombinant baculoviruses directing rapid expression of passenger genes in infected insects. *Virology.* 1992;190:815-23.
- [219] Zhang Y, Zhang X, Xia H, Xue Y, Wang J, Tian B, et al. Quantitative analysis of cytoplasmic actin gene promoter and nuclear polyhedrosis virus immediate-early promoter activities in various tissues of silkworm *Bombyx mori* using recombinant *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus as vector. *Acta biochimica et biophysica Sinica.* 2008;40:533-8.
- [220] Sridhar P, Panda AK, Pal R, Talwar GP, Hasnain SE. Temporal nature of the promoter and not relative strength determines the expression of an extensively processed protein in a baculovirus system. *FEBS Lett.* 1993;315:282-6.
- [221] Bonning BC, Roelvink PW, Vlak JM, Possee RD, Hammock BD. Superior expression of juvenile hormone esterase and beta-galactosidase from the basic protein promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus compared to the p10 protein and polyhedrin promoters. *J Gen Virol.* 1994;75 ( Pt 7):1551-6.
- [222] Regev A, Rivkin H, Gurevitz M, Chejanovsky N. New measures of insecticidal efficacy and safety obtained with the 39K promoter of a recombinant baculovirus. *FEBS Lett.* 2006;580:6777-82.
- [223] Choi JY, Kim YS, Wang Y, Kang JN, Roh JY, Shim HJ, et al. Improved baculovirus vectors expressing barnase using promoters from *Cotesia plutellae* bracovirus. *Mol Cells.* 2009;28:19-24.

- [224] Grabherr R, Ernst W, Doblhoff-Dier O, Sara M, Katinger H. Expression of foreign proteins on the surface of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Biotechniques*. 1997;22:730-5.
- [225] Liu YK, Chu CC, Wu TY. Baculovirus ETL promoter acts as a shuttle promoter between insect cells and mammalian cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2006;27:321-7.
- [226] Xia Y, Van Etten JL, Dobos P, Ling YY, Krell PJ. Adenine DNA methyltransferase M.CviRI expression accelerates apoptosis in baculovirus-infected insect cells. *Virology*. 1993;196:817-24.
- [227] O'Reilly DR, Miller LK. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science*. 1989;245:1110-2.
- [228] O'Reilly DR, Passarelli AL, Goldman IF, Miller LK. Characterization of the DA26 gene in a hypervariable region of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *J Gen Virol*. 1990;71 ( Pt 5):1029-37.
- [229] Ishiyama S, Ikeda M. High-level expression and improved folding of proteins by using the vp39 late promoter enhanced with homologous DNA regions. *Biotechnol Lett*. 2010;32:1637-47.
- [230] Manohar SL, Kanamasa S, Nishina T, Kato T, Park EY. Enhanced gene expression in insect cells and silkworm larva by modified polyhedrin promoter using repeated Burst sequence and very late transcriptional factor-1. *Biotechnol Bioeng*. 2010;107:909-16.
- [231] Kato T, Manohar SL, Kanamasa S, Ogata M, Park EY. Improvement of the transcriptional strength of baculovirus very late polyhedrin promoter by repeating its untranslated leader sequences and coexpression with the primary transactivator. *J Biosci Bioeng*. 2012.
- [232] Sano K, Maeda K, Oki M, Maeda Y. Enhancement of protein expression in insect cells by a lobster tropomyosin cDNA leader sequence. *FEBS Lett*. 2002;532:143-6.
- [233] Chen Y, Yao B, Zhu Z, Yi Y, Lin X, Zhang Z, et al. A constitutive super-enhancer: homologous region 3 of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318:1039-44.
- [234] Venkaiah B, Viswanathan P, Habib S, Hasnain SE. An additional copy of the homologous region (hr1) sequence in the *Autographa californica* multinucleocapsid polyhedrosis virus genome promotes hyperexpression of foreign genes. *Biochemistry*. 2004;43:8143-51.
- [235] Tang S, Zhao Q, Yi Y, Zhang Z, Li Y. Homologous region 3 from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus enhancing the transcriptional activity of heat shock cognate 70-4

promoter from *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* in vitro and in vivo. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005;69:1014-7.

[236] Tiwari P, Saini S, Upmanyu S, Benjamin B, Tandon R, Saini KS, et al. Enhanced expression of recombinant proteins utilizing a modified baculovirus expression vector. *Mol Biotechnol.* 2010;46:80-9.

[237] Lo HR, Chou CC, Wu TY, Yuen JP, Chao YC. Novel baculovirus DNA elements strongly stimulate activities of exogenous and endogenous promoters. *J Biol Chem.* 2002;277:5256-64.

[238] Lee JM, Takahashi M, Mon H, Mitsunobu H, Koga K, Kawaguchi Y, et al. Construction of gene expression systems in insect cell lines using promoters from the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biotechnol.* 2008;133:9-17.

[239] Fath-Goodin A, Kroemer J, Martin S, Reeves K, Webb BA. Polydnavirus genes that enhance the baculovirus expression vector system. *Adv Virus Res.* 2006;68:75-90.

[240] Hitchman RB, Possee RD, Siaterli E, Richards KS, Clayton AJ, Bird LE, et al. Improved expression of secreted and membrane-targeted proteins in insect cells. *Biotechnol Appl Biochem.* 2010;56:85-93.

[241] Hitchman RB, Possee RD, Crombie AT, Chambers A, Ho K, Siaterli E, et al. Genetic modification of a baculovirus vector for increased expression in insect cells. *Cell Biol Toxicol.* 2010;26:57-68.

[242] Ho Y, Lo HR, Lee TC, Wu CP, Chao YC. Enhancement of correct protein folding in vivo by a non-lytic baculovirus. *Biochem J.* 2004;382:695-702.

[243] Shen X, Hacker DL, Baldi L, Wurm FM. Virus-free transient protein production in Sf9 cells. *J Biotechnol.* 2013;171C:61-70.

[244] Farrell PJ, Lu M, Prevost J, Brown C, Behie L, Iatrou K. High-level expression of secreted glycoproteins in transformed lepidopteran insect cells using a novel expression vector. *Biotechnol Bioeng.* 1998;60:656-63.

[245] Lin G, Li G, Granados RR, Blissard GW. Stable cell lines expressing baculovirus P35: resistance to apoptosis and nutrient stress, and increased glycoprotein secretion. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2001;37:293-302.

[246] Shishido T, Kurata N, Yoon ME, Tanaka T, Yamaji H, Fukuda H, et al. A high-level expression vector containing selectable marker for continuous production of recombinant protein in insect cells. *Biotechnol Lett.* 2009;31:623-7.

[247] Vilcinskas A. *Insect Biotechnology.* Netherlands: Springer; 2011.

- [248] Telfer WH, Kunkel JG. The function and evolution of insect storage hexamers. *Annu Rev Entomol.* 1991;36:205-28.
- [249] Lawrence I, Gilbert JRT, Burr G, Atkinson. *Metamorphosis Postembryonic Reprogramming of Gene Expression in Amphibian and Insect Cells*: ACADEMIC PRESS, INC; 1996.
- [250] Perez-Martin E, Gomez-Sebastian S, Argilaguuet JM, Sibila M, Fort M, Nofrarias M, et al. Immunity conferred by an experimental vaccine based on the recombinant PCV2 Cap protein expressed in *Trichoplusia ni*-larvae. *Vaccine.* 2010;28:2340-9.
- [251] Medin JA, Gathy K, Coleman MS. Expression of foreign proteins in *Trichoplusia ni* larvae. *Methods Mol Biol.* 1995;39:265-75.
- [252] Perez-Filgueira DM, Resino-Talavan P, Cubillos C, Angulo I, Barderas MG, Barcena J, et al. Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology.* 2007;364:422-30.
- [253] Andersons D, Engstrom A, Josephson S, Hansson L, Steiner H. Biologically active and amidated cecropin produced in a baculovirus expression system from a fusion construct containing the antibody-binding part of protein A. *Biochem J.* 1991;280 ( Pt 1):219-24.
- [254] Kato T, Kajikawa M, Maenaka K, Park EY. Silkworm expression system as a platform technology in life science. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;85:459-70.
- [255] Maeda S, Kawai T, Obinata M, Fujiwara H, Horiuchi T, Saeki Y, et al. Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature.* 1985;315:592-4.
- [256] Gretch DG, Sturley SL, Friesen PD, Beckage NE, Attie AD. Baculovirus-mediated expression of human apolipoprotein E in *Manduca sexta* larvae generates particles that bind to the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:8530-3.
- [257] Hellers M, Gunne H, Steiner H. Expression of post-translational processing of preprocecropin A using a baculovirus vector. *Eur J Biochem.* 1991;199:435-9.
- [258] Chen WS, Villaflores OB, Jinn TR, Chan MT, Chang YC, Wu TY. Expression of recombinant human interferon-gamma with antiviral activity in the bi-cistronic baculovirus-insect/larval system. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75:1342-8.
- [259] Lopez MG, Peralta A, Berinstein A, Fondevila N, Carrillo E, Taboga O. High-level expression of recombinant 3AB1 non-structural protein from FMDV in insect larvae. *J Virol Methods.* 2005;124:221-4.

- [260] Gomez-Casado E, Gomez-Sebastian S, Nunez MC, Lasa-Covarrubias R, Martinez-Pulgarin S, Escribano JM. Insect larvae biofactories as a platform for influenza vaccine production. *Protein Expr Purif.* 2011;79:35-43.
- [261] Millan AF, Gomez-Sebastian S, Nunez MC, Veramendi J, Escribano JM. Human papillomavirus-like particles vaccine efficiently produced in a non-fermentative system based on insect larva. *Protein Expr Purif.* 2010;74:1-8.
- [262] Gomez-Sebastian S, Nunez MC, Garaicoechea L, Alvarado C, Mozgovej M, Lasa R, et al. Rotavirus A-specific single-domain antibodies produced in baculovirus-infected insect larvae are protective in vivo. *BMC Biotechnol.* 2012;12:59.
- [263] Gomez-Sebastian S, Perez-Filgueira DM, Gomez-Casado E, Nunez MC, Sanchez-Ramos I, Tabares E, et al. DIVA diagnostic of Aujeszky's disease using an insect-derived virus glycoprotein E. *J Virol Methods.* 2008;153:29-35.
- [264] [www.algenex.com](http://www.algenex.com). Última actualización el 27 de enero de 2014.
- [265] [www.c-perl.com](http://www.c-perl.com). Última actualización el 27 de enero de 2014.
- [266] <http://www.bionaturis.com/>. Última actualización el 27 de enero de 2014.
- [267] <http://procube.systemex.co.jp>. Última actualización el 27 de enero de 2014.
- [268] Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol.* 1993;67:4566-79.
- [269] <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>. Última actualización el 8 de enero de 2012.
- [270] <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>. Última actualización el 8 de enero de 2012.
- [271] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Última actualización el 27 de enero de 2014.
- [272] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Neubauer G, et al. A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone. *Biochemical Society transactions.* 1996;24:893-6.
- [273] Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7:1513-23.

- [274] Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 1993;15:532-4, 6-7.
- [275] Crisci E, Fraile L, Moreno N, Blanco E, Cabezon R, Costa C, et al. Chimeric calicivirus-like particles elicit specific immune responses in pigs. *Vaccine*. 2012;30:2427-39.
- [276] Rao J, Otto WR. Fluorimetric DNA assay for cell growth estimation. *Anal Biochem*. 1992;207:186-92.
- [277] Gotthard K. Growth strategies and optimal body size in temperate pararginii butterflies. *Integr Comp Biol*. 2004;44:471-9.
- [278] Esperk T, Tammaru T. Does the 'investment principle' model explain moulting strategies in lepidopteran larvae? *Physiological Entomology*. 2004;29:56-66.
- [279] Jones G, O'Mahony P, Chang S, Schachtschabel U. Identification of regulatory sequences of juvenile hormone-sensitive and -insensitive serum protein-encoding genes. *Gene*. 1996;173:209-14.
- [280] Lopez-Vidal J, Gomez-Sebastian S, Sanchez-Ramos I, Escribano JM. Characterization of a *Trichoplusia ni* hexamerin-derived promoter in the AcMNPV baculovirus vector. *Journal of Biotechnology*. 2013.
- [281] Lorence A. *Recombinant Gene Expression Reviews and Protocols*. Third ed. New York: Humana Press; 2012.
- [282] Nettleship JE, Assenberg R, Diprose JM, Rahman-Huq N, Owens RJ. Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. *J Struct Biol*. 2010;172:55-65.
- [283] Mena JA, Kamen AA. Insect cell technology is a versatile and robust vaccine manufacturing platform. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10:1063-81.
- [284] van Oers MM. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *J Invertebr Pathol*. 2011;107 Suppl:S3-15.
- [285] Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol*. 1983;3:2156-65.
- [286] Williams GV, Faulkner P. Replication patterns and cytopathology of cells infected with baculoviruses. *Cytotechnology*. 1996;20:95-110.

- [287] Murphy CI, Lennick M, Lehar SM, Beltz GA, Young E. Temporal expression of HIV-1 envelope proteins in baculovirus-infected insect cells: implications for glycosylation and CD4 binding. *Genet Anal Tech Appl.* 1990;7:160-71.
- [288] O'Reilly DR, Miller, L. K., and Luckow, V. A. Choice of transfer plasmids. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual.* New York 1992. p. 38-50.
- [289] Naggie S, Bentley WE. Appearance of protease activities coincides with p10 and polyhedrin-driven protein production in the baculovirus expression system: effects on yield. *Biotechnol Prog.* 1998;14:227-32.
- [290] Blissard GW, Kogan PH, Wei R, Rohrmann GF. A synthetic early promoter from a baculovirus: roles of the TATA box and conserved start site CAGT sequence in basal levels of transcription. *Virology.* 1992;190:783-93.
- [291] Mans RM, Knebel-Morsdorf D. In vitro transcription of pe38/polyhedrin hybrid promoters reveals sequences essential for recognition by the baculovirus-induced RNA polymerase and for the strength of very late viral promoters. *J Virol.* 1998;72:2991-8.
- [292] Yamshchikov GV, Ritter GD, Vey M, Compans RW. Assembly of SIV virus-like particles containing envelope proteins using a baculovirus expression system. *Virology.* 1995;214:50-8.
- [293] Kojima K, Hayakawa T, Asano S, Bando H. Tandem repetition of baculovirus ie1 promoter results in upregulation of transcription. *Arch Virol.* 2001;146:1407-14.
- [294] Choi JY, Wang Y, Kim Y-S, Kang JN, Roh JY, Woo S-D, et al. Insecticidal activities of recombinant *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus containing a scorpion neurotoxin gene using promoters from *Cotesia plutellae* bracovirus. *Journal of Asia-Pacific Entomology.* 2008;11:155-9.
- [295] Nareoja K, Akerman KE, Nasman J. Enhanced early expression of membrane receptors with the Rous sarcoma virus promoter in baculovirus-infected insect cells. *Biotechnol Appl Biochem.* 2012;59:314-21.
- [296] Todoli F, Rodriguez-Cortes A, Nunez Mdel C, Laurenti MD, Gomez-Sebastian S, Rodriguez F, et al. Head-to-head comparison of three vaccination strategies based on DNA and raw insect-derived recombinant proteins against *Leishmania*. *PLoS One.* 2012;7:e51181.
- [297] Jones G, Jones D, Fang F, Xu Y, New D, Wu WH. Juvenile hormone action through a defined enhancer motif to modulate ecdysteroid-activation of natural core promoters. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2012;161:219-25.

- [298] Jones G, Brown N, Manczak M, Hiremath S, Kafatos FC. Molecular cloning, regulation, and complete sequence of a hemocyanin-related, juvenile hormone-suppressible protein from insect hemolymph. *J Biol Chem.* 1990;265:8596-602.
- [299] Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 1999;20:3551-67.
- [300] Jones G, Schelling D, Chhokar V. Overview of the regulation of metamorphosis-associated genes in *Trichoplusia ni*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 1996;32:429-37.
- [301] Jones G, Manczak M, Horn M. Hormonal regulation and properties of a new group of basic hemolymph proteins expressed during insect metamorphosis. *J Biol Chem.* 1993;268:1284-91.
- [302] Mugat B, Brodu V, Kejzlarova-Lepesant J, Antoniewski C, Bayer CA, Fristrom JW, et al. Dynamic expression of broad-complex isoforms mediates temporal control of an ecdysteroid target gene at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Dev Biol.* 2000;227:104-17.
- [303] Wang HB, Iwanaga M, Kawasaki H. Activation of BMWCP10 promoter and regulation by BR-C Z2 in wing disc of *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2009;39:615-23.
- [304] Yu J, Wu FY, Zou FM, Jia JQ, Wang SP, Zhang GZ, et al. Identification of ecdysone response elements (EcREs) in the *Bombyx mori* cathepsin D promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;425:113-8.
- [305] No D, Yao TP, Evans RM. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:3346-51.
- [306] O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual.* New York: Oxford University Press; 1994.
- [307] Cheshenko N, Krougliak N, Eisensmith RC, Krougliak VA. A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. *Gene Ther.* 2001;8:846-54.
- [308] Bieniossek C, Imasaki T, Takagi Y, Berger I. MultiBac: expanding the research toolbox for multiprotein complexes. *Trends Biochem Sci.* 2012;37:49-57.
- [309] Latchman DS. *Eukaryotic Transcription Factors.* Fifth ed: Academic Press; 2008.
- [310] Hughes TR. *A Handbook of Transcription Factors:* Springer; 2011.

- [311] Kovacs GR, Choi J, Guarino LA, Summers MD. Functional dissection of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early 1 transcriptional regulatory protein. *J Virol.* 1992;66:7429-37.
- [312] Rohrmann GF. Early events in infection: Virus transcription. In: Rohrmann GF, editor. *Baculovirus Molecular Biology*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)2011.
- [313] Luria N, Lu L, Chejanovsky N. Conserved Structural Motifs at the C-Terminus of Baculovirus Protein IE0 are Important for its Functions in Transactivation and Supporting hr5-mediated DNA Replication. *Viruses.* 2012;4:761-76.
- [314] Nie Y, Fang M, Theilmann DA. AcMNPV AC16 (DA26, BV/ODV-E26) regulates the levels of IE0 and IE1 and binds to both proteins via a domain located within the acidic transcriptional activation domain. *Virology.* 2009;385:484-95.
- [315] Liu CY, Wang CH, Wang JC, Chao YC. Stimulation of baculovirus transcriptome expression in mammalian cells by baculoviral transcriptional activators. *J Gen Virol.* 2007;88:2176-84.
- [316] Carbonell LF, Miller LK. Baculovirus interaction with nontarget organisms: a virus-borne reporter gene is not expressed in two mammalian cell lines. *Appl Environ Microbiol.* 1987;53:1412-7.
- [317] Bian J, Popovic ZB, Benejam C, Kiedrowski M, Rodriguez LL, Penn MS. Effect of cell-based intercellular delivery of transcription factor GATA4 on ischemic cardiomyopathy. *Circ Res.* 2007;100:1626-33.
- [318] Prochiantz A, Joliot A. Can transcription factors function as cell-cell signalling molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:814-9.
- [319] Noble M, Proschel C, Mayer-Proschel M. Soluble, chimeric transcription factors that enter cells to modulate cell differentiation and phenotype. In: University Of Utah Research Foundation PBSLCUT, editor. WO2001.
- [320] Chatelin L, Volovitch M, Joliot AH, Perez F, Prochiantz A. Transcription factor *hoxa-5* is taken up by cells in culture and conveyed to their nuclei. *Mech Dev.* 1996;55:111-7.
- [321] Zhou J, Qin L, Tien JC, Gao L, Chen X, Wang F, et al. Nkx3.1 functions as a paracrine transcription factor to regulate gene expression and cell proliferation in a non-cell autonomous manner. *J Biol Chem.* 2012;287:17248-56.
- [322] Riedl SJ, Renshaw MW, Snipas SJ, Salvesen GS. Mechanism-based inactivation of caspases by the apoptotic suppressor p35. *Biochemistry.* 2001;40:13274-80.

- [323] Vieira HL, Pereira AC, Carrondo MJ, Alves PM. Catalase effect on cell death for the improvement of recombinant protein production in baculovirus-insect cell system. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2006;29:409-14.
- [324] Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2001;8:113-26.
- [325] Danthi P. Enter the kill zone: initiation of death signaling during virus entry. *Virology.* 2011;411:316-24.
- [326] Galluzzi L, Brenner C, Morselli E, Touat Z, Kroemer G. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000018.
- [327] Kaminsky V, Zhivotovsky B. To kill or be killed: how viruses interact with the cell death machinery. *J Intern Med.* 2010;267:473-82.
- [328] Hay S, Kannourakis G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol.* 2002;83:1547-64.
- [329] Richard A, Tulasne D. Caspase cleavage of viral proteins, another way for viruses to make the best of apoptosis. *Cell Death Dis.* 2012;3:e277.
- [330] Cartier JL, Hershberger PA, Friesen PD. Suppression of apoptosis in insect cells stably transfected with baculovirus p35: dominant interference by N-terminal sequences p35(1-76). *J Virol.* 1994;68:7728-37.
- [331] Vieira HL, Pereira AC, Peixoto CC, Moraes RH, Alves PM, Mendonca RZ. Improvement of recombinant protein production by an anti-apoptotic protein from hemolymph of *Lonomia obliqua*. *Cytotechnology.* 2010;62:547-55.
- [332] Ha SH, Park TH. Efficient production of recombinant protein in *Spodoptera frugiperda*/AcNPV system utilizing silkworm hemolymph. *Biotechnology Letters.* 1997;19:1087-91.
- [333] Kim EJ, Rhee WJ, Park TH. Inhibition of apoptosis by a *Bombyx mori* gene. *Biotechnol Prog.* 2004;20:324-9.
- [334] Choi SS, Rhee WJ, Kim EJ, Park TH. Enhancement of recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells through anti-apoptosis engineering using 30Kc6 gene. *Biotechnol Bioeng.* 2006;95:459-67.
- [335] Park JH, Wang Z, Jeong HJ, Park HH, Kim BG, Tan WS, et al. Enhancement of recombinant human EPO production and glycosylation in serum-free suspension culture of CHO cells through expression and supplementation of 30Kc19. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011.

- [336] Wang Z, Ma X, Fan L, Rhee WJ, Park TH, Zhao L, et al. Understanding the mechanistic roles of 30Kc6 gene in apoptosis and specific productivity in antibody-producing Chinese hamster ovary cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;94:1243-53.
- [337] Fath-Goodin A, Kroemer JA, Webb BA. The Campoletis sonorensis ichnovirus vankyrin protein P-vank-1 inhibits apoptosis in insect Sf9 cells. *Insect Mol Biol*. 2009;18:497-506.
- [338] Hebert CG, Valdes JJ, Bentley WE. In vitro and in vivo RNA interference mediated suppression of Tn-caspase-1 for improved recombinant protein production in High Five cell culture with the baculovirus expression vector system. *Biotechnol Bioeng*. 2009;104:390-9.
- [339] Lin CC, Hsu JT, Huang KL, Tang HK, Shu CW, Lai YK. Sf-Caspase-1-repressed stable cells: resistance to apoptosis and augmentation of recombinant protein production. *Biotechnol Appl Biochem*. 2007;48:11-9.
- [340] Plotkin SA. Vaccines: past, present and future. *Nat Med*. 2005;11:S5-11.
- [341] Wilson P. Giving developing countries the best shot: An overview of vaccine access and R&D. Médecins Sans Frontières and Oxfam; 2010.
- [342] Jennings GT, Bachmann MF. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol Chem*. 2008;389:521-36.
- [343] Liu F, Wu X, Li L, Liu Z, Wang Z. Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: successes and challenges. *Protein Expr Purif*. 2013;90:104-16.
- [344] Crisci E, Barcena J, Montoya M. Virus-like particles: the new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet Immunol Immunopathol*. 2012;148:211-25.
- [345] Liu F, Wu X, Li L, Ge S, Liu Z, Wang Z. Virus-like particles: Promising platforms with characteristics of DIVA for veterinary vaccine design. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2013;36:343-52.
- [346] Segales J, Kekarainen T, Cortey M. The natural history of porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease? *Vet Microbiol*. 2013;165:13-20.
- [347] Gillespie J, Opriessnig T, Meng XJ, Pelzer K, Buechner-Maxwell V. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2009;23:1151-63.

[348] Grau-Roma L, Fraile L, Segales J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet J.* 2011;187:23-32.

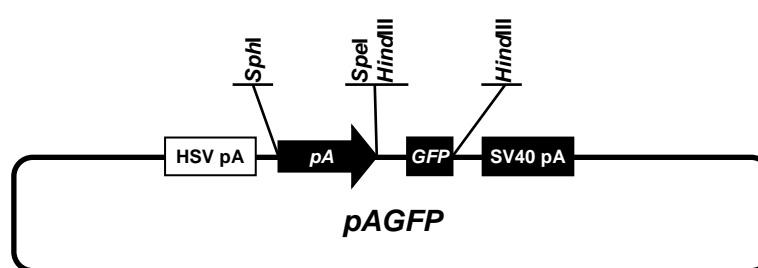
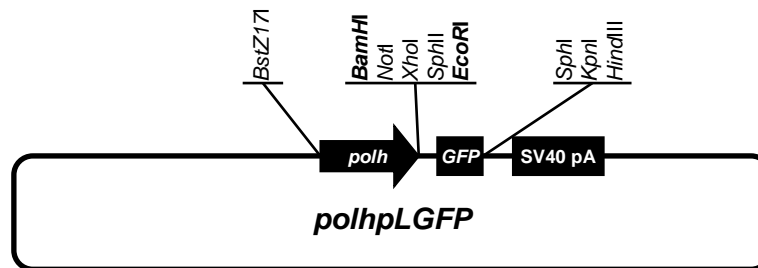
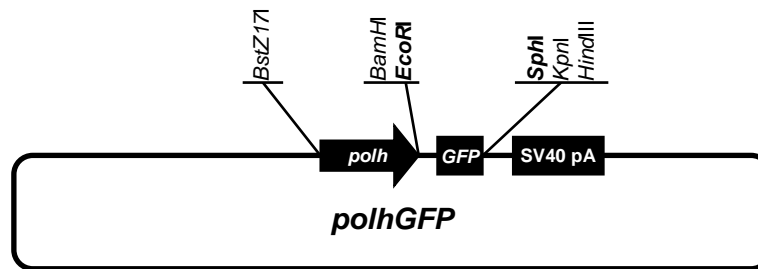
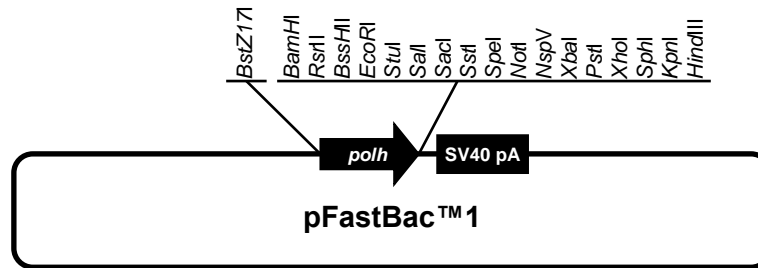
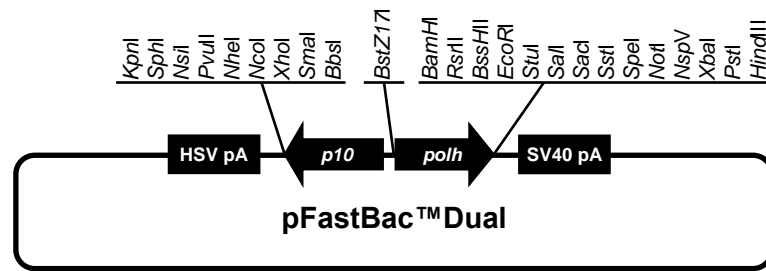
[349] Chae C. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. *Vet J.* 2012;194:151-7.

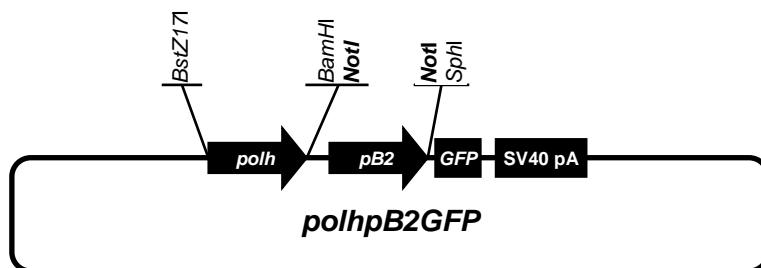
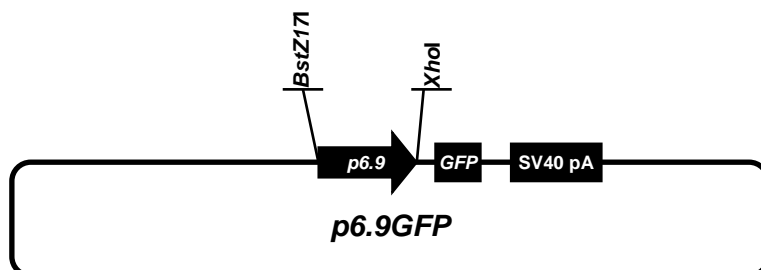
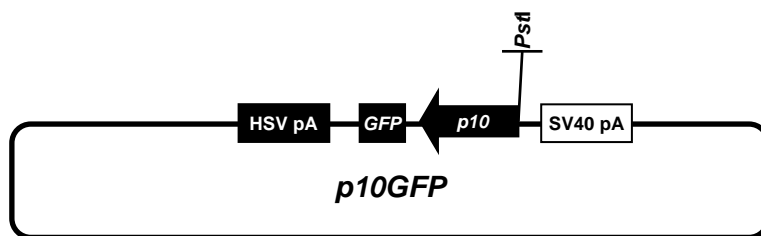
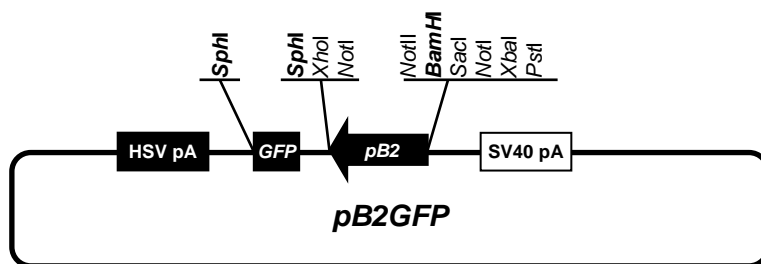
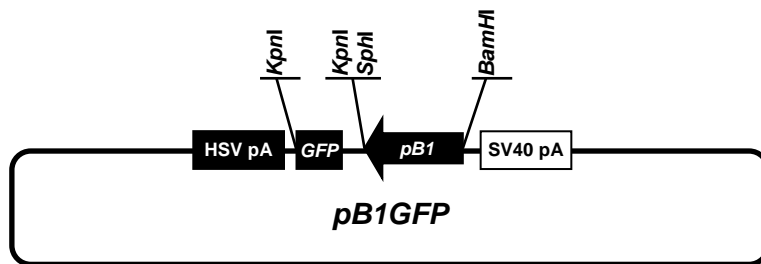


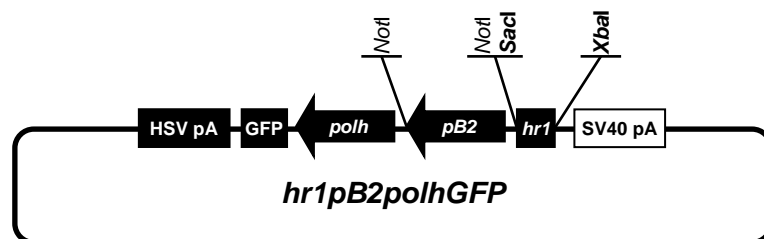
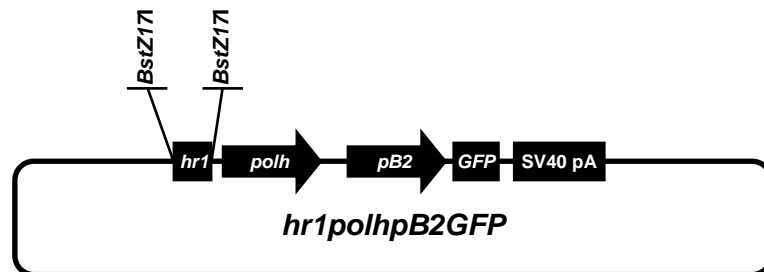
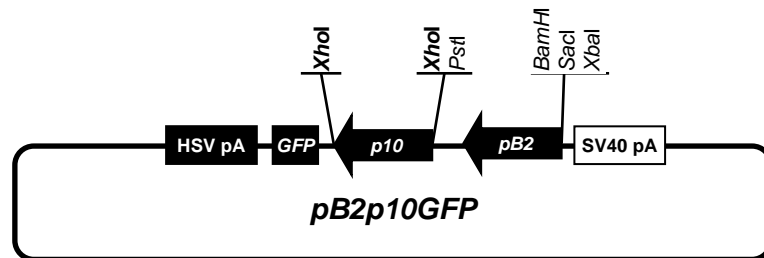
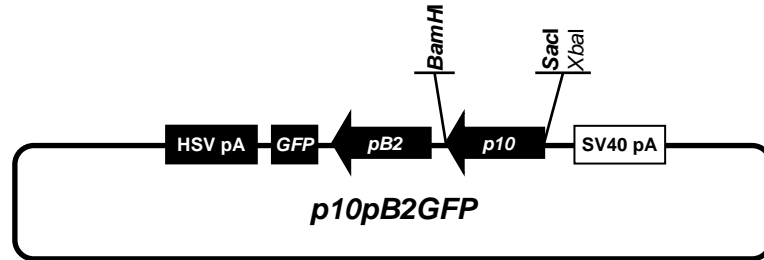
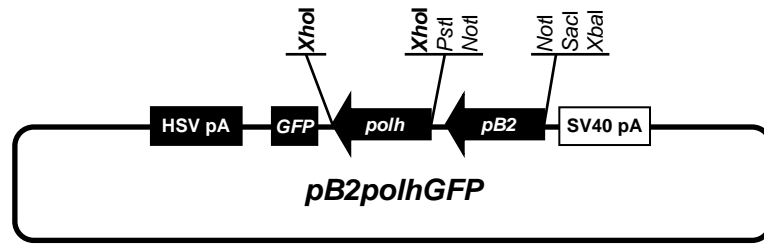
## VIII ANEXO I

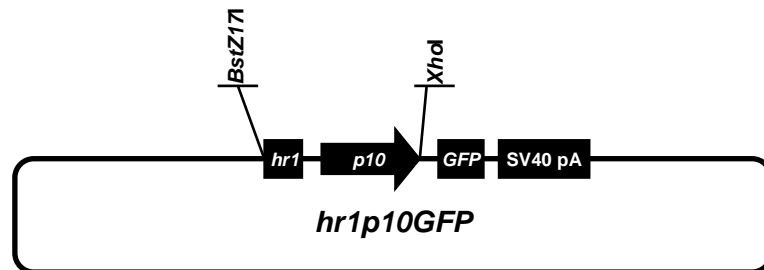
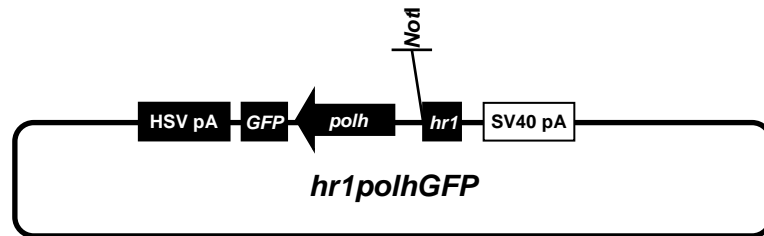
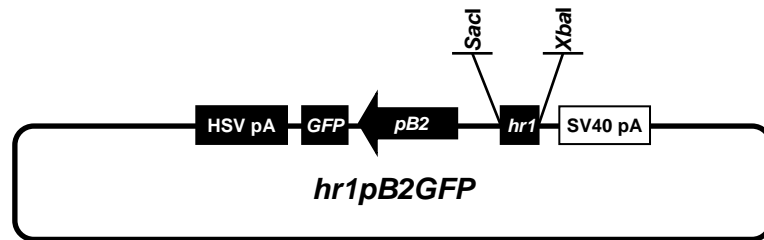
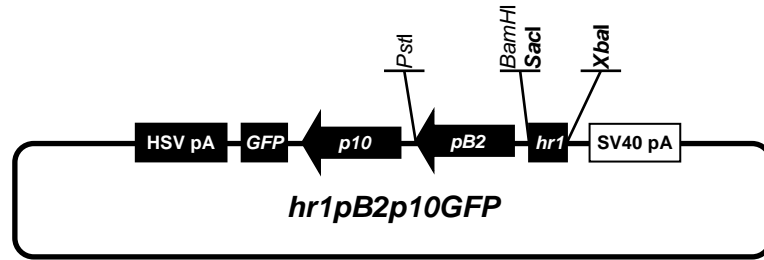
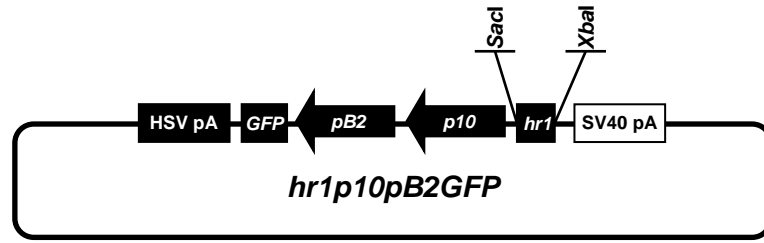


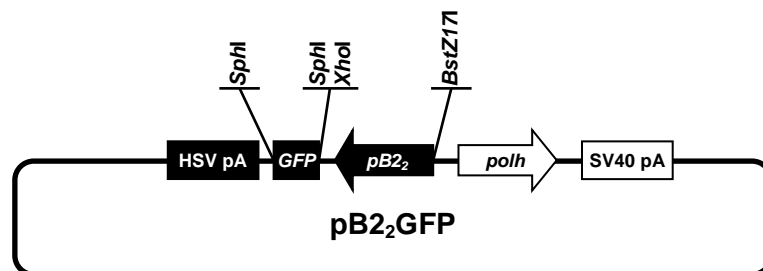
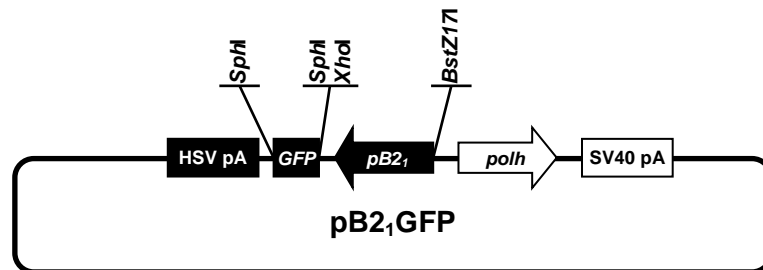
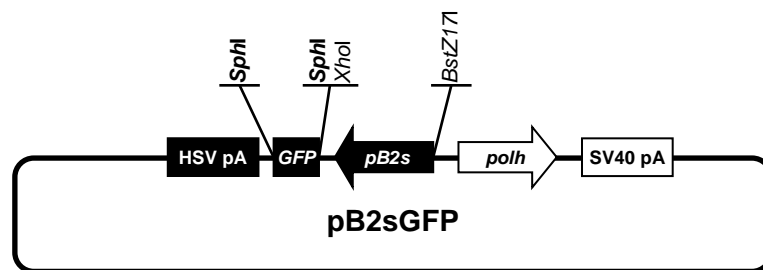
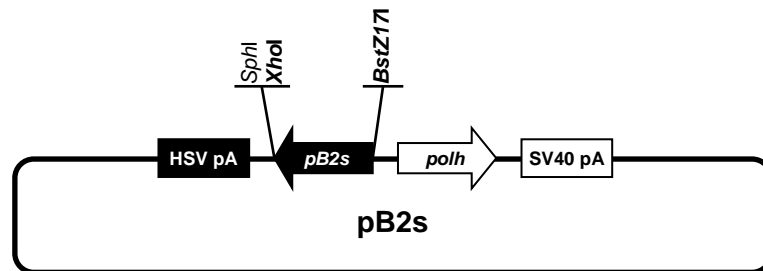
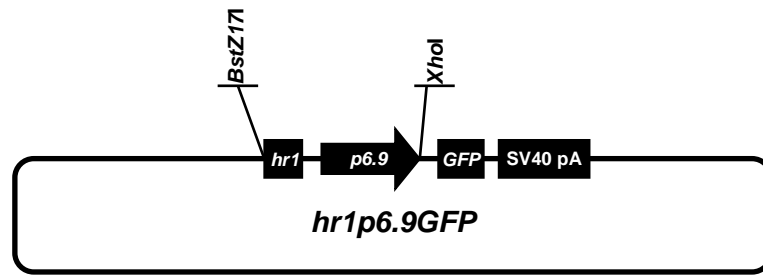
Vectores generados en esta tesis doctoral:

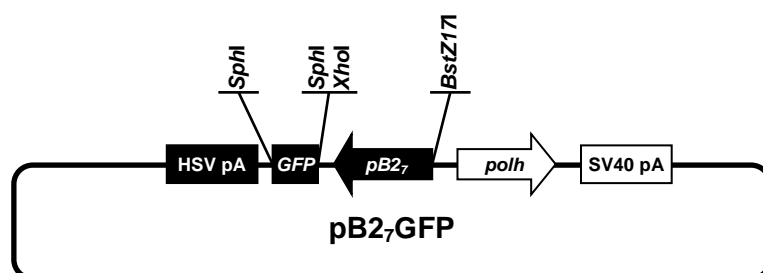
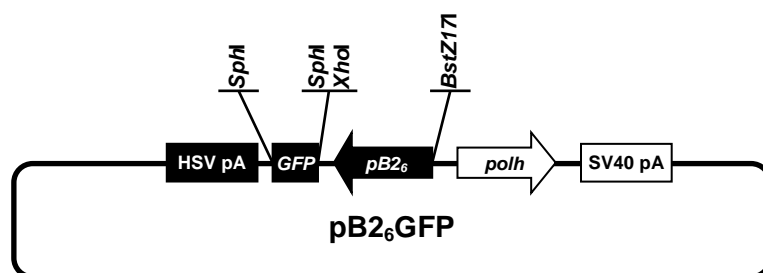
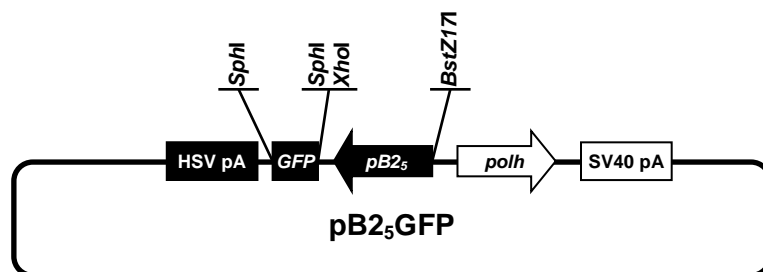
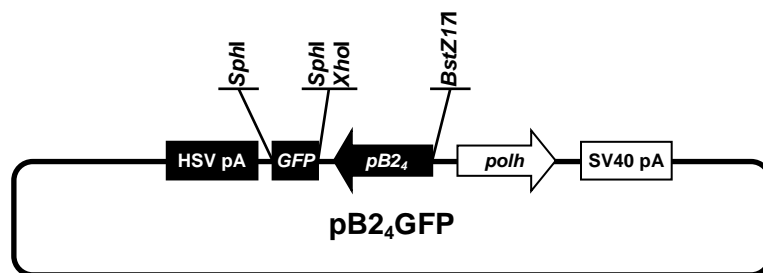
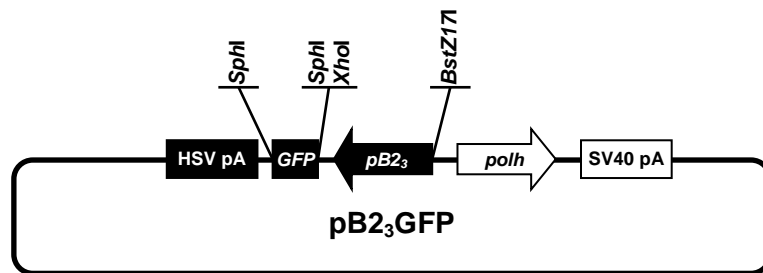


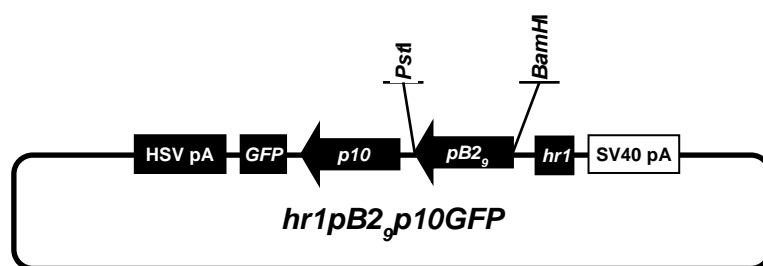
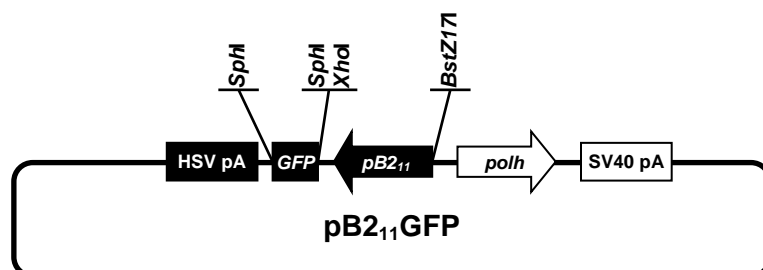
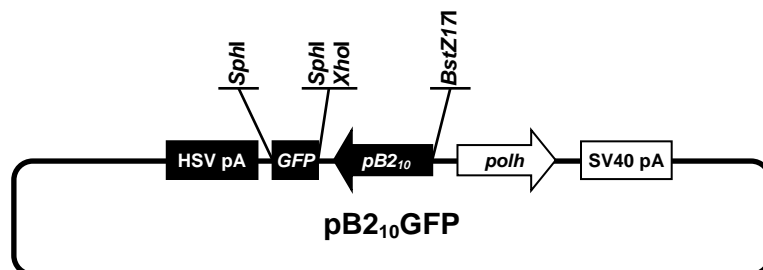
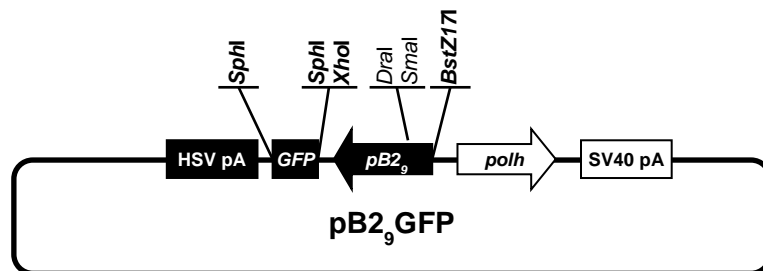
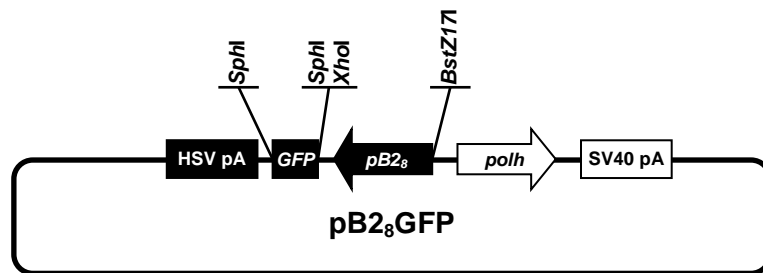


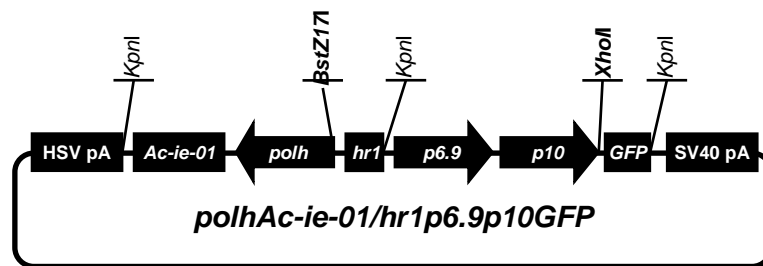
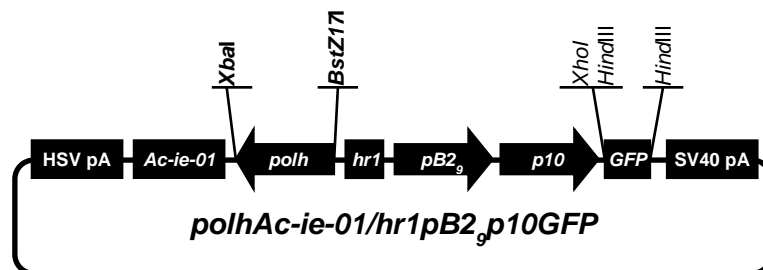
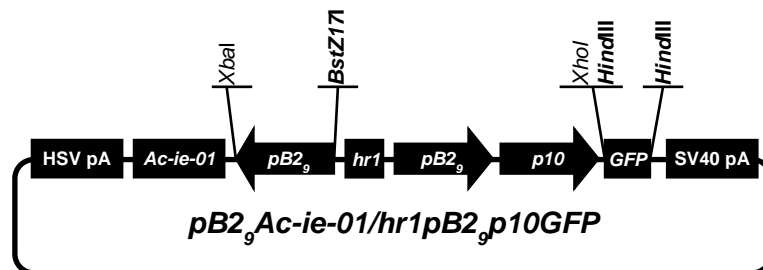
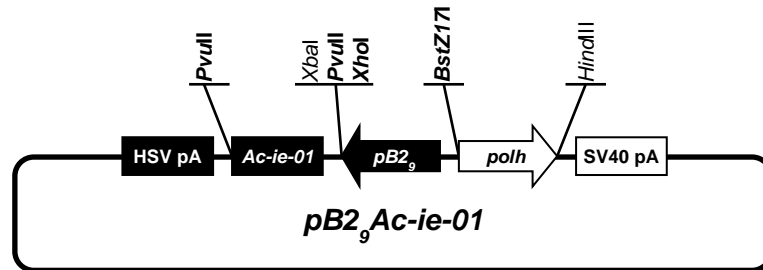
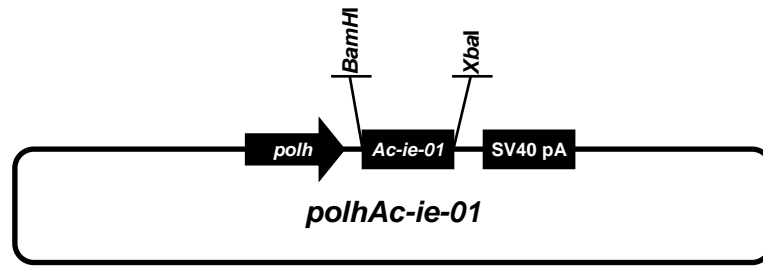


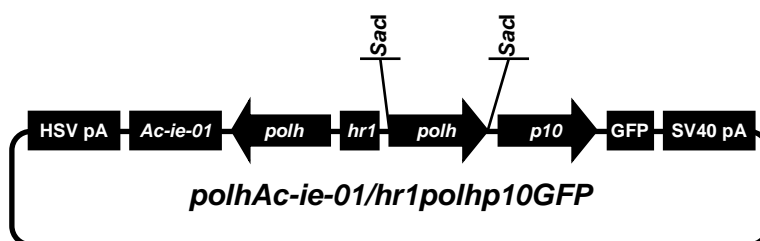
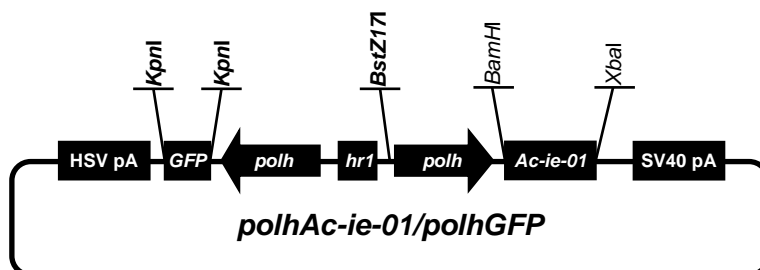
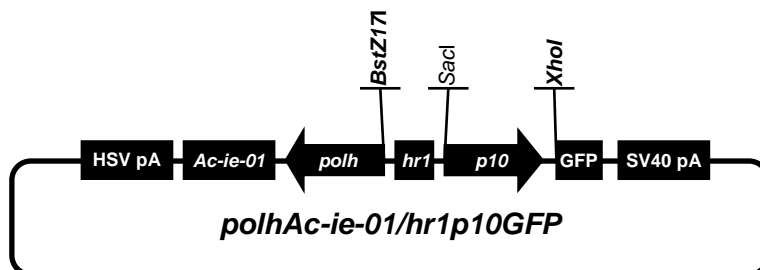
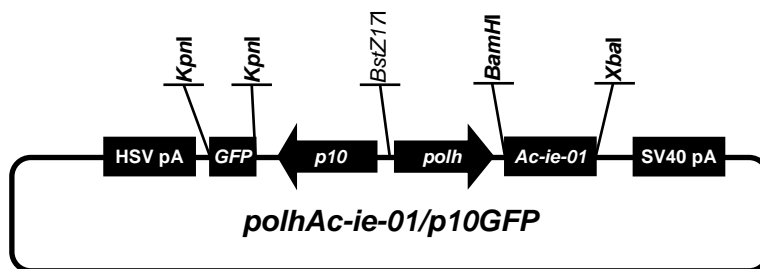


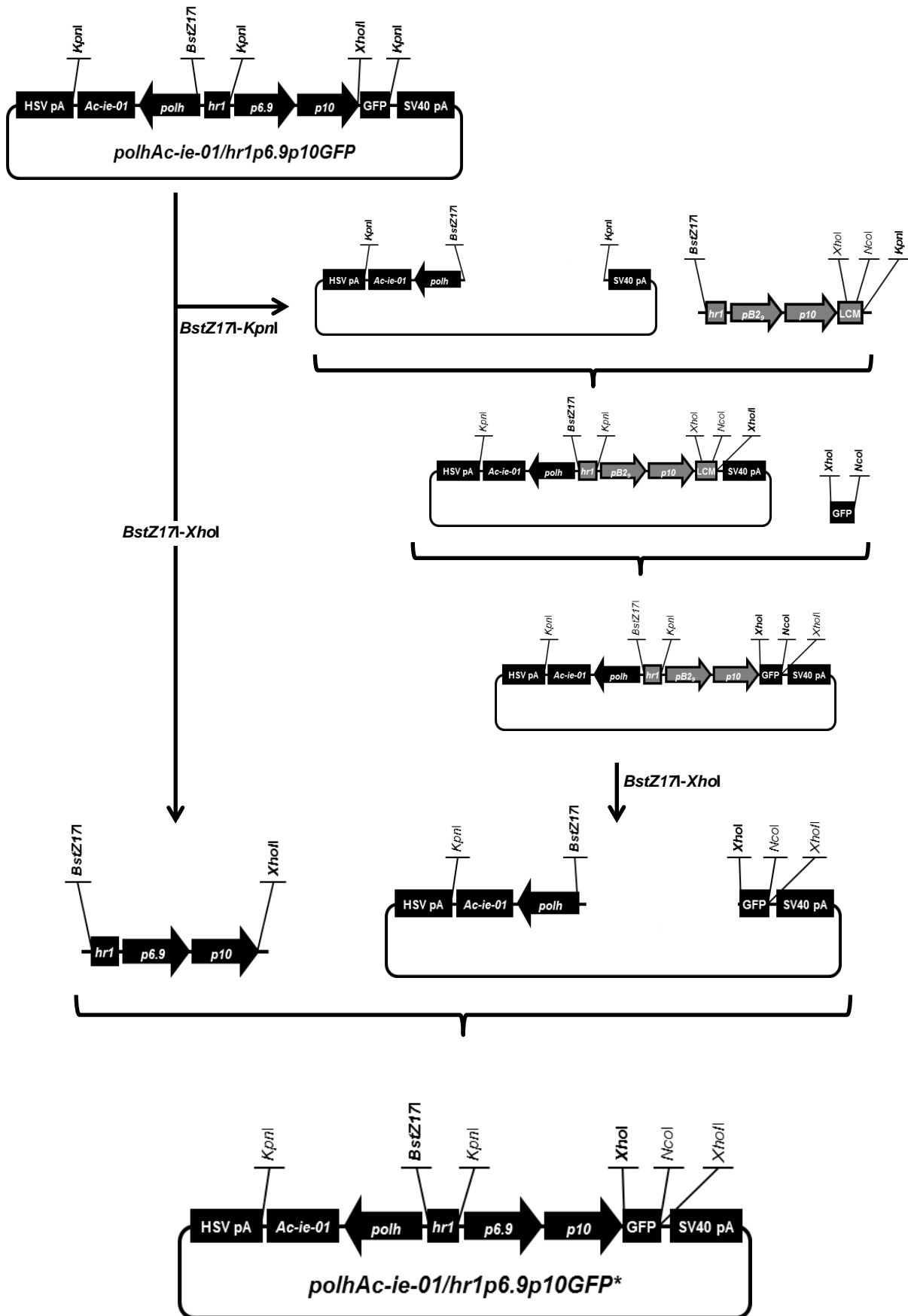


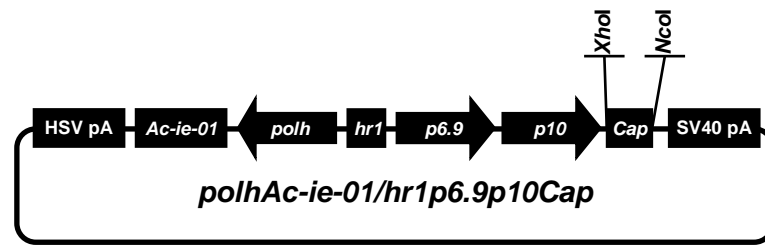














## **IX ANEXO II**



## IX.1 Secuencias nucleotídicas

### *Ac-ie-01*

ATGATCCGTACATCCAGCCACGTCCTGAACGTCCAAGAAAACATCATGACTTCCAACGTGTGCTTCCAGCCCCTACTCCTGTGA  
 GGCCACTTCAGCCTGCGCTGAGGCCAGCAACTGCAGGTGGACACAGGTGGCGATAAGATCGTGAACAACCAGGTACCATGA  
 CTCAAATCAACTTCAACGCTTCTTACACCTCTGCCAGCACTCCCTCTCGTGCTAGCTTCGACAACCTCATACTCGGAGTTCTGC  
 GACAAGCAACCTAACGATTACTTGTCTTACTACAACCACCAACCCCGACGGAGCTGATACTGTCATCTCCGACTCTGAAAC  
 CGCTGCCGCTAGCAACTTCTCGCCTCAGTTAACTCGCTCACTGACAACGATTTGGTGGAGTGTCTGCTCAAGACCCTGACA  
 ACCTGGAGGAAGCTGTGTCTCTGCCTACTACAGCGAGTCACTCGAACAGCCAGTGGTGAACAACCCCTCTCTAGCTCAGCT  
 TACCACGCCGAGTCTTTCGAACACTCTGCTGGTGTCAACCAGCCGTCGGCCACAGGCACCAAGAGGAAGTTGGACGAGTACCT  
 GGATAACTCCCAGGGAGTTGTGGTCAATTCAACAAGATCAAGTTGAGACCTAAGTACAAGAAGAGCACCATCCAGTCATGCG  
 CTACACTGGAACAAACCATCAACCACAACACTAACATCTGTACAGTGGCTTCCACCCAGGAGATCACTCACTACTTCACAAAC  
 GACTTCGCCCCCTACCTGATGAGGTTGACGATAACGACTACAACCTCGAACAGATTCTCCGATCACATGTCTGAAACCGGTTA  
 CTACATGTTGTCGTTAAGAAGTCCGAGGTGAAGCCTTTCGAAATCATCTTCGCCAAGTACGTCTCTAACGTGGTCTACGAGT  
 ACACAAACAACACTACTACATGGTTGACAACCGTGTGTTCGTTGTGACCTTCGATAAGATCCGCTTCATGATCAGCTACAACCTG  
 GTTAAGGAGACTGGCATCGAAATCCCACACTCACAGGAGTCTGCAACGATGAGACCGCCGCTCAAAACGCAAGAAGTGTCA  
 CTTTCGTGGACGTCCACCACACATTCAGGCCGCTCTGACCTCCTACTTCAACCTCGATATGTACTACGCTCAGACAACCTTCG  
 TGACCTTGTGCAATCACTCGGCGAGCGTAAGTGTGGATTCTCTTGTGCAAGTTGTACGAGATGTACCAGGACAAGAACCTC  
 TTCACCTTGGCCATCATGCTGAGCCGCAAGGAATCAAACGAGATCGAAACCGCCTCTAACAACTTCTTCGTCTCGCCATACGT  
 TTCCAGATCTCAAGTACTCGGAGTCCGTTCCAATTCGGGACAACCCCTCCAACAAGTACGTGCTTGATAACCTGAACCTCA  
 TCGTGAACAAGAAGAGCACTCTGACATACAAGTACTCGTCCGTCGCTAACCTGCTCTTCAACAACACTACAAGTACCACGACAAC  
 ATCGCTTCTAACAAACAACGCCGAGAACCTCAAGAAGGTCAAGAAGGAAGACGGAAGCATGCACATCGTTGAGCAGTACTTGAC  
 TCAAAACGTCGATAACGTTAAGGGTCACAACTTCATCGTGTGTCTTCAAGAACGAGGAAAGGCTGACCATCGCTAAGAAGA  
 ACAAGGAGTTCTACTGGATCTCTGGCGAAATCAAGGACGTTGATGTGAGCCAGGTATCCAAAAGTACAACAGATTCAAGCAC  
 CACATGTTTCGTGATCGGCAAGGTCAACCGTCGCGAGTCAACTACACTGCACAACAACCTTGCTGAAGCTCTTGGCCTTGATCCT  
 GCAGGACTGGTGCCACTCTCCGACGCCATCACATTCGCCGAGCAAAAGCTCAACTGCAAGTACAAGAAGTTTCGAGTTCAACT  
 AA

### *hr1*

ATCGATGTTGACCCCAACAAAAGATTTATAATTAATCATAATCACGAACAACAACAAGTCAATGAAACAAATAACAAGTTGT  
 CGATAAAAACATTCATAAATGACACAGCAACATACAATTCTTGATAATAAAAAATTTAAATGACATCATATTTGAGAATAACAA  
 ATGACATATCCCTCGATTGTGTTTTACAAGTAGAATTCTACCCGTAAAGCGAGTTTAGTTTTGAAAAACAAATGACATCAT  
 TGTATAATGACATCATCCCTGATTGTGTTTTACAAGTAGAATTCTATCCGTAAAGCGAGTTCAGTTTTGAAAAACAAATGAGT  
 CATACTAAACACGTTAATAATCTTCTGATATCAGCTTATGACTCAAGTTATGAGCCGTGTGCAAAACATGAGATAAGTTTTAT  
 GACATCATCCACTGATCGTGCGTTACAAGTAGAATTCTACTCGTAAAGCCAGTTTCGGTTATGAGCCGTGTGCAAAACATGACA  
 TCAGCTTATGACTCATACTTGATTGTGTTTTACGCGTAGAATTCTACTCGTAAAGCGAGTTCGGTTATGAGCCGTGTGCAAAA  
 CATGACATCAGCTTATGAGTCATAATTAATCGTGCGTTACAAGTAGAATTCTACTCGTAAAGCGAGTTGAAGGATCATATTTA  
 GTTGCGTTTATGAGATAAGATTGAAAGCACGTGTAAAATGTTTCCCGCGGTTGGCACAACCTATTTACAATGCGGCCAAGTTA  
 TAAAAGATTCTAATCTGATATGTTTTAAAACACCTTTGCGGCCGAGTTGTTTGCCTACGTGACTAGCGAAGAAGATGTGTGG  
 ACCGCAGAACAGATAGTAAAACAAAACCCCTAGTATTGGAGCAATAATCGAT

*polh*

ATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAA  
CCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGC

*p10*

ATACGGACCTTTAATTCAACCCAACACAATATATTATAGTTAAATAAGAATTATTATCAAATCATTGTATATTAATTA  
ACTATACTGTAAATTACATTTTATTTACAATCACTCGAC

*p6.9*

GGTACCAAATTCGGTTTTGCGACGATGCAGAGTTTTTGAACAGGCTGCTCAAACACATAGATCCGTACCCGCTCAGTCGGATG  
TATTACAATGCAGCCAATACCATGTTTTACACGACTATGAAAACATGCCGTGTCCAATTGCAAGTTCAACATTGAGGATTA  
CAATAACATATTTAAGGTGATGGAAAATATTAGAAAACACAGCAACAAAAATTCAAACGACCAAGACGAGTTAAACATATATT  
TGGGAGTTCAGTCGTGAATGCAAAGCGTAAAAAATATTAATAAGGTAAAAATTACAGCTACATAAATTACACAATTTAAC

*pA*

ATGCCAGAGCAAAGGTCTGCCTTTGACAGGCTTACATAGGAATTACTCCTATTGACACAGCCAGCTCTATTACAATTTAAGGA  
AACCTGCTCTGTGCATTGATGACGTAATGGAACATTTCTATGATATCAAAGCTCGTTTTTTTTGGTAAAATATGAATTTCC  
GTGTTACAAAGTATAAAAAATGGGAACCTTACTAAGCCTCTGCTATCTGTCAGTCTGTTTATCACCTGGCCTTATCGCATGA  
ACCGTAACAAC TAGAAATTTGTTTTTTCTGTTACTTTTATAACCACAAATAATCAAATAAAAAATCGAGGTTAATGAATGAT  
CATTTCTTGCATTTTTTTAACCTCCTTAAGTTTTTCAGCGCACTTGGCTCTTTATTTTTATTTTTTCGGTAAAAATTTTTAAC  
ATGACGACATTATGATAGTAAATGTTAAATCCCAATACAATAGATGTTTCTTTTTTCGATATGTTTTTATGAAAATGAAAGTTA  
TTGTCCAATTGATAGCTTGAATCCACAATTGGATTAATATGCTACTTTATCAGGCAGCCTATACATGATTTTCATAGCGACTA  
TGAAAGTCTGCCTATACTACGTCATTCAACAATAGTATAATAATTACAATCTAACAAGCGACCACTGAATGTAACATACGTA  
TTACCGAATACGTATGAGCTGTAACGTTTTTCGCATCAACGTTAAAACCATCGTTGTGTCGAATCACCTATTGTTGGGCCCTT  
ATGGCTTAAGTTCGTGACTTCAACTCCATCAACCGGAATTGTTTGTACGTAAACGCTCAAGTACCGCGAACTTTTACTTAA  
ACAATACGTACTTAATAGACAGAAGGATGAAAAAGATATTGATCCGTTATCGGTTCTCAATATTGAATGAAAGTCGATTGTTTC  
GTCACCTTCGTACTTTTACTACAACTCTTCTTTGATAAGGACCAATTAATAGGTGACCTGCGATAAAAAATTACCTATAAATA  
TGTGATGTTGCTGGTGGATTGTCACCTGGCGAAC

*pB<sub>1</sub>*

CAAATGTACAAAGATTTCGCAGAATTATCAATTCAACATTA AAAAGATGCACATATATATTCATAATCCAACAATTTTATTACC  
TACTGCTGGTTATTGACACACCAGCTAAGGATTTATTGCTAACTGAATCTTTTGTATACTAAATAATTTACCATAAAAATCG  
GATTGAGGAAGGAAAACGTGCCAATCGTTATATTTATACATCGGACTATAGGTAAACAGTTATAAATAATGTATGAGGGTATT  
TTATGAGGAATCTAACCAGCTCAATATGTATGGGGTTCGCCCTCGGCATGTAGGCAGGAACTACAGCGGTCTTGTGGG  
CTACCATGGAACGAAAGACAGTATTAACATATGTGCGAAATACAACCTTTAGTTCGTAGACATAAAGACGGTAATGCAGTAA  
TGTGCCACTGATGAGCACTCGCCGGAACATGGCTACGTCGGTATCATTTGGAAGCTGTTTTTCATGTCCAAATATGAAGGCAA  
AGTAAAATATACTTCCGCGACCATAAAGAGGAAAAGAAAAGTGCGCCCTCGTATTGTAGATGGTAAAACACGCTTTTTTCATAAT  
ATGTACTGCACTGATTTGTTGGAGTATACGTTTGCAACCGTGACACCATTTACAACAAATACTAAAAAGAGCACTTTTATTGT  
GCTAACCAAAAAAAAAACACAAGAGTTCAGAAAACAGACAAGAAAAGCAAAGACGCTAAATAACATACAATCCAGATG  
TCAGACGCAAAATACAAATTACGGTGTACAGGTGATATCTCACGCTCGCAGATAAAGCAGTTGTTTTACTGCAACGAAGG  
TAATACCAGTGGCGTAGACTAGAGCCTCTAGCTTCGAGAGGGATCGCGAAGTATTGGGACTACCTCACGCCACCGGTAAGGGC  
ATCGGTGACGCGAGAGGTTATCGCCCAATACAACAACATGATAATGACGTGCAAGCAGATAATAGTGAAAAATAACAGATA  
CTAGAGTATAAAAAGGGGATGCTGGGAGTGGACAGGCACAGTCGTGGTGTGGCAGCAAACA

*pB<sub>2</sub>*

CTTGAATGTTAGTGAAACCCCTGCGACACAAGTATTACATTCCTTAGTGCTTGAATCCTTTAGGAAAGAAAAGCCAATTTTC  
 AAAATCTTAGCACTTGTTAACTCGCGAAAAAGACCAACAGATTTCCCATACTACAATTCGACATTAGAAATGTAAACCCATTA  
 TCATTATTTACGCCTCATTTCCATCCAATAATAAGTTTAAGTACGTTGAGATAAAACTGGCTTACCTAGAACTTGACATGGCG  
 ACCTCTTGCACTCTGTATCTCAAGTCAACTTTCTCTATCCAAATATTTGATAACATTTGACATGATATTGAAGTAAGATTGTT  
 ACTAAGGCTTACATTGTAATATTACTGACGCAAGTTCTTTATCAATAAAATAGCTGAAAACAAAAAACAACATCGATTAGG  
 GTGACTGAAGGTTACATTGGGGTAGGTTATGGTTAATACGTAATGGTTTAAACACCAAAACGATATCATGGATTGACTTTATAA  
 ATTTTATATAAGGTGTAATAATATTTTAAATGAGTGGACGCGTCCGGTCAATGTCTGCTTATTGACGTCATAACATATTAGG  
 TGATTATATTAATAACTCAAATATTACTTGAAGTTTAAAGTTTCATCATAATCTGATCATAAGTTTCCACCAACAGAAAC  
 CAAAAGCATAACTATCTGCTATTTGAATATCTTTAGCTTCCCATGAAGAAAGATTACCGTAACCATCACTAGGATTTTATACG  
 ATTTAGAAAAATAAGTATTTCTCAGTCTCTTTTTCAGTTTAAAAATCTGCTGGCATTTTTACAAGTCGCTGTATCAGTCAATGTT  
 TATACAATATGTCAATGTACTTTTCGTATTAATCAGAAAAAATATTTCTACTAGTTTTGATAAGCTATCACTTTTGTACATTG  
 TACTGCCCTTTACAGTTCATCAGGTATTTATGAATGACATATTGGAGAAACATCGTAATCAGTCCAGTATAAAAAGGGGTGCA  
 TTCTCGGTAAGAGTACAGTTGAACTCACATCGAGTTAACTCCACG

*pB<sub>2s</sub>*

GTATACTTGAATGTTAGTGAAACCCCTGCGACACAAGTATTACATTCCTTAGTGCTTGAATCCTTTAGGAAAGAAAAGCCAA  
 TTTTCAAATCTTAGCACTTGTTAACTCGCGAAAAAGACCAACAGATTTCCCATACTACAATTCGACATTAGAAATGTAAACC  
 CATTATCATTATTTACGCCTCATTTCCATGGCCAATAATAAGTTTAAGTACGTTGAGATAAAACTGGCTTACCTAGAACTTGA  
 CATGGCGACCTCTTGCACTCTGTATCTCAAGTCAACTTTCTCTATCCAAATATTTGATAACATTTGACATGATATTGAAGTAA  
 GATTGTTACTAAGGCTTACATTGTAATATTACTGACGCAAGTTCTTTATCAATAAAATAGCTGAAAACAAAAAGCCGGCAAA  
 AACATCGATTAGGGTGACTGAAGGTTACATTGGGGTAGGTTATGGTTAATACGTAATGGTTTAAACACCAAAACGATATCATGG  
 ATTGACTTTATAAATTTTATATAAGGTGTAATAATATTTTAAATGAGTGGACGCGTCCGGTCAATGTCTGCTTATTGACGTC  
 ATAACATATTAGGTGATTATATTAATAATACCCGGTCAAATATTACTTGAAGTTTAAAGTTTCATCATAATCTGATCATAAG  
 TTTCCACCAACAGAAACCAAAAGCATAACTATCTGCTATTTGAATATCTTTAGCTTCCCATGAAGAAAGATTACCGTAACCA  
 TCACTAGGATTTTATACGATTGTAGAAAATAAGTATTCTCAGTCTCTTTTCAGTTTAAAAATCTGCTGGCATTTTTACAAGTC  
 GCTGTATCAGTCAATGTTTATACAATATGTCAATGTACTTTTCGTATTAATCAGAAAAAATATTCTACTAGTTTTGATAAGCT  
 ATCACTTTTGTACATTGTACTGCCCTTTACAGTTCATCAGGTATTTATGAATGACATATTGGAGAAACATCGTAATCAGTCC  
 AGCGCTATAAAAAGGGGTGCATTCTCGGTAAGAGTACAGTTGAACTCACATCGAGTTAACTCCACGCTCGAG

*pB<sub>2</sub><sub>1</sub>*

GGGTCAAATATTACTTGCAAGTTTAAAGTTTCATCATAATCTGATCATAAGTTTCACCCAAACAGAAACCAAAAGCATAACTAT  
 CTGCTATTTGAATATCTTTAGCTTCCCATGAAGAAAGATTACCGTAACCATCACTAGGATTTTATACGATTGTAGAAAATAAA  
 GTATTCTCAGTCTCTTTTCAGTTTAAAAATCTGCTGGCATTTTTACAAGTCGCTGTATCAGTCAATGTTTATACAATATGTCAA  
 TGTACTTTTCGTATTAATCAGAAAAAATATTCTACTAGTTTTGATAAGCTATCACTTTTGTACATTGTACTGCCCTTTACAG  
 TTCATCAGGTATTTATGAATGACATATTGGAGAAACATCGTAATCAGTCCAGCGCTATAAAAAGGGGTGCATTCTCGGTAAGA  
 GTACAGTTGAACTCACATCGAGTTAACTCCACGCTCGAG

*pB<sub>2</sub><sub>2</sub>*

AAAATCTGCTGGCATTTTTACAAGTCGCTGTATCAGTCAATGTTTATACAATATGTCAATGTACTTTTCGTATTAATCAGAAAA  
 AAATATCTACTAGTTTTGATAAGCTATCACTTTTGTACATTGTACTGCCCTTTACAGTTCATCAGGTATTTATGAATGACA  
 TATTGGAGAAACATCGTAATCAGTCCAGCGCTATAAAAAGGGGTGCATTCTCGGTAAGAGTACAGTTGAACTCACATCGAGTT  
 AACTCCACGCTCGAG

*pB2<sub>3</sub>*

CCAATAATAAGTTTAAGTACGTTGAGATAAAAACCTGGCTTACCTAGAACTTGACATGGCGACCTCTTGCACTCTGTATCTCAAG  
TCAACTTTCTCTATCCAAATATTTGATAACATTTGACATGATATTGAAGTAAGATTGTTACTAAGGCTTACATTGTAATATTA  
CTGACGCAAGTTCTTTTATCAATAAAAATAGCTGAAAACAAAAAGCCGGCAAAAACATCGATTAGGGTGACTGAAGGTTACATT  
GGGGTAGGTTATGGTTAATACGTAATGGTTTAAACACCAAAACGATATCATGGATTGACTTTATAAATTTTATATAAGGTGTA  
TAATATTTTTAATGAGTGGACGCGTCGGGTCAATGTCTGCCTATTGACGTCATAACATATTAGGTGATTATATTAATAAATAC  
CCGGGTCAAATATTACTTGAAGTTTAAAGTTTCATCATAATCTGATCATAAGTTTACCCAAACAGAAACCAAAAGCATAACT  
ATCTGCTATTTGAATATCTTTAGCTTCCCATGAAGAAAGATTACCGTAACCATCACTAGGATTTTATACGATTGTAGAAAATA  
AAGTATTCTCAGTCTCTTTTTCAGTTTAAAATCTGCTGGCATTTTTACAAGTCGCTGTATCAGTCAATGTTTATAACAATATGTC  
AATGTACTTTTCGTATTAATCAGAAAAAATATTCTACTAGTTTTGATAAGCTATCACTTTTGTACATTGTACTGCCCTTTAC  
AGTTCATCAGGATTTTATGAATGACATATTGGAGAAACATCGTAATCAGTCCAGCGCTATAAAAAGGGGTGCATTCTCGGTAA  
GAGTACAGTTGAACCTCACATCGAGTTAACTCCACGCTCGAG

*pB2<sub>4</sub>*

GGCAAAAACATCGATTAGGGTGACTGAAGGTTACATTGGGGTAGGTTATGGTTAATACGTAATGGTTTAAACCAAAAACGATA  
TCATGGATTGACTTTATAAATTTTATATAAGGTGTAATAATATTTTTAATGAGTGGACGCGTCGGGTCAATGTCTGCCTATT  
GACGTCATAACATATTAGGTGATTATATTAATAAATACCCGGGTCAAATATTACTTGAAGTTTAAAGTTTCATCATAATCTGAT  
CATAAGTTTACCCAAACAGAAACCAAAAGCATAACTATCTGCTATTTGAATATCTTTAGCTTCCCATGAAGAAAGATTACCG  
TAACCATCACTAGGATTTTATACGATTGTAGAAAATAAAGTATTCTCAGTCTCTTTTTCAGTTTAAAATCTGCTGGCATTTTTA  
CAAGTCGCTGTATCAGTCAATGTTTATAACAATATGTCAATGTACTTTTCGTATTAATCAGAAAAAATATTCTACTAGTTTTGA  
TAAGCTATCACTTTTGTACATTGTACTGCCCTTTACAGTTCATCAGGATTTTATGAATGACATATTGGAGAAACATCGTAAT  
CAGTCCAGCGCTATAAAAAGGGGTGCATTCTCGGTAAGAGTACAGTTGAACCTCACATCGAGTTAACTCCACGCTCGAG

*pB2<sub>5</sub>*

GTATACCTTGAATGTTAGTGAAACCCCTGCGACACAAGTATTACATTCCTTAGTGCTTGAATCCTTTAGGAAAGAAAAGCCA  
ATTTTCAAATCTTAGCACTTGTTAACTCGCGAAAAAGACCAACAGATTTCCATACTACAATTCGACATTAGAAATGTAAC  
CCATTATCATTATTTACGCCCTCATTTCATGGCCAATAATAAGTTTAAAGTACGTTGAGATAAAAACCTGGCTTACCTAGAACTTG  
ACATGGCGACCTCTTGCACTCTGTATCTCAAGTCAACTTTCTCTATCCAAATATTTGATAACATTTGACATGATATTGAAGTA  
AGATTGTTACTAAGGCTTACATTGTAATATTACTGACGCAAGTTCTTTTATCAATAAAAATAGCTGAAAACAAAAAATCAAATAT  
TACTTGCAAGTTTAAAGTTTCATCATAATCTGATCATAAGTTTACCCAAACAGAAACCAAAAGCATAACTATCTGCTATTTGA  
ATATCTTTAGCTTCCCATGAAGAAAGATTACCGTAACCATCACTAGGATTTTATACGATTGTAGAAAATAAAGTATTCTCAGT  
CTCTTTTCAGTTTAAAATCTGCTGGCATTTTTACAAGTCGCTGTATCAGTCAATGTTTATAACAATATGTCAATGTACTTTTCGT  
ATTAATCAGAAAAAATATTCTACTAGTTTTGATAAGCTATCACTTTTGTACATTGTACTGCCCTTTACAGTTCATCAGGTA  
TTTATGAATGACATATTGGAGAAACATCGTAATCAGTCCAGCGCTATAAAAAGGGGTGCATTCTCGGTAAGAGTACAGTTGAA  
CTCACATCGAGTTAACTCCACGCTCGAG

*pB2<sub>6</sub>*

GTATACCTTGAATGTTAGTGAAACCCCTGCGACACAAGTATTACATTCCTTAGTGCTTGAATCCTTTAGGAAAGAAAAGCCA  
ATTTTCAAATCTTAGCACTTGTTAACTCGCGAAAAAGACCAACAGATTTCCATACTACAATTCGACATTAGAAATGTAAC  
CCATTATCATTATTTACGCCCTCATTTCATGGCCAATAATAAGTTTAAAGTACGTTGAGATAAAAACCTGGCTTACCTAGAACTTG  
ACATGGCGACCTCTTGCACTCTGTATCTCAAGTCAACTTTCTCTATCCAAATATTTGATAACATTTGACATGATATTGAAGTA  
AGATTGTTACTAAGGCTTACATTGTAATATTACTGACGCAAGTTCTTTTATCAATAAAAATAGCTGAAAACAAAAAATCTGCTG  
GCATTTTTACAAGTCGCTGTATCAGTCAATGTTTATAACAATATGTCAATGTACTTTTCGTATTAATCAGAAAAAATATTCTAC

TAGTTTTGATAAGCTATCACTTTTGTACATTGTACTGCCCTTACAGTTCATCAGGTATTTATGAATGACATATTGGAGAAA  
CATCGTAATCAGTCCAGCGCTATAAAAAGGGGTGCATTCTCGGTAAGAGTACAGTTGAACTCACATCGAGTTAACTCCACGCT  
CGAG

***pB2<sub>7</sub>***

GTATACCTTGAATGTTAGTGAAACCCCTGCGACACAAGTATTACATTCCTTAGTGCTTGAATCCTTTAGGAAAGAAAAGCCA  
ATTTTCAAAATCTTAGCACTTGTTAACTCGCGAAAAAGACCAACAGATTTCCCATACTACAATTCGACATTAGAAATGTAAAC  
CCATTATCATTATTTACGCCCTCATTTCATGGCCAATAATAAGTTTAAAGTACGTTGAGATAAAAAGTGGCTTACCTAGAACTTG  
ACATGGCGACCTCTTGCACTCTGTATCTCAAGTCAACTTTCTCTATCCAAATATTTGATAACATTTGACATGATATTGAAGTA  
AGATTGTTACTAAGGCTTACATTGTAATATTAAGTACGCAAGTTCTTTATCAATAAAAATAGCTGAAAACAAAAAGCCGGCAA  
AAACATCGATTAGGGTGACTGAAGGTTACATTGGGGTAGGTTATGGTTAATACGTAATGGTTTAAACACCAAACGATATCATG  
GATTGACTTTATAAATTTTATATAAGGTGTAATAATATTTTAAATGAGTGGACGCGTCGGGTCAATGTCTGCCTATTGACGT  
CATAACATATTAGGTGATTATATTAATAAATACCCAAAATCTGCTGGCATTTTTACAAGTCGCTGTATCAGTCAATGTTTATAC  
AATATGTCAATGTACTTTTCGTATTAATCAGAAAAAATATTTCTACTAGTTTTGATAAGCTATCACTTTTGTACATTGTACTG  
CCCTTTACAGTTCATCAGGTATTTATGAATGACATATTGGAGAAACATCGTAATCAGTCCAGCGCTATAAAAAGGGGTGCATT  
CTCGGTAAGAGTACAGTTGAACTCACATCGAGTTAACTCCACGCTCGAG

***pB2<sub>8</sub>***

GTATACAAAAACATCGATTAGGGTGACTGAAGGTTACATTGGGGTAGGTTATGGTTAATACGTAATGGTTTAAACACCAAACG  
ATATCATGGATTGACTTTATAAATTTTATATAAGGTGTAATAATATTTTAAATGAGTGGACGCGTCGGGTCAATGTCTGCCT  
ATTGACGTCATAACATATTAGGTGATTATATTAATAAATAGCGCTATAAAAAGGGGTGCATTCTCGGTAAGAGTACAGTTGAA  
CTCACATCGAGTTAACTCCACGCTCGAG

***pB2<sub>9</sub>***

GTATACAAAAACATCGATTAGGGTGACTGAAGGTTACATTGGGGTAGGTTATGGTTAATACGTAATGGTTTAAACACCAAACG  
ATATCATGGATTTTATATAAGGTGTAATAATATTTTAAATGAGTGGACGCGTCGGGTCAATGTCTGCCTATTGACGTCATAA  
CATATTAGGTGATTATATTAATAAATAGTTTAAACTCAAATATTACTTGCAAGTTTAAAGTTTCATCATAATCTGATCATAAGTT  
TCACCCAAAACAGAAACCAAAGCATAACTATCGAATATCTTTAGCTTCCCATGAAGAAAGATTACCGTAACCATCACTAGGAT  
TTTATACGATTGTAGAAAATAAAGTATTTCTCAGTCTCTTTTCAGAGCGCTATAAAAAGGGGTGCATTCTCGGTAAGAGTACAG  
TTGAACTCACATCGAGTTAACTCCACGCTCGAG

***pB2<sub>10</sub>***

GTATACAAAAACATCGATTAGGGTGACTGAAGGTTACATTGGGGTAGGTTATGGTTAATACGTAATGGTTTAAACACCAAACG  
ATATCATGGATTTTATATAAGGTGTAATAATATTTTAAATGAGTGGACGCGTCGGGTCAATGTCTGCCTATTGACGTCATAA  
CATATTAGGTGATTATATTAATAAATAGTTTGCTATAAAAAGGGGTGCATTCTCGGTAAGAGTACAGTTGAACTCACATCGAGT  
TAACTCCACGCTCGAG

***pB2<sub>11</sub>***

GGCAAAAAACATCGATTAGGGTGACTGAAGGTTACATTGGGGTAGGTTATGGTTAATACGTAATGGTTTAAACACCAAACGATA  
TCATGGATTGACTTTATAAATTTTATATAAGGTGTAATAATATTTTAAATGAGTGGACGCGTCGGGTCAATGTCTGCCTATT  
GACGTCATAACATATTAGGTGATTATATTAATAAATACCCGGGTCAAATATTACTTGCAAGTTTAAAGTTTCATCATAATCTGAT  
CATAAGTTTCACCCAAAACAGAAACCAAAGCATAACTATCTGCTATTTGAATATCTTTAGCTTCCCATGAAGAAAGATTACCG  
TAACCATCACTAGGATTTTATACGATTGTAGAAAATAAAGTATTCTCAGTCTCTTTTCAGTTTGCTATAAAAAGGGGTGCATT  
CTCGGTAAGAGTACAGTTGAACTCACATCGAGTTAACTCCACGCTCGAG

**GFP**

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTT  
 CAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCG  
 TGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCAGC  
 TTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGC  
 CGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGG  
 GGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCATGGTGAAC TTC  
 AAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGCT  
 GCTGTGCCCGACAACACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCTGC  
 TGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

**Cap (PCV-2)**

ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTTTCCGCGAGACGAAGACACCGCCCCGAGCCATCTTGCCAGATCCTCCGCCGCGCCCCCTG  
 GCTCGTCCACCCCGCCACCCTTACCGCTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAACACCCGCTCTCCCGCACCTTCGGATATA  
 CTGTCAAGGCTACCACAGTCACAACGCCCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTTAATATTAACGACTTTGTTCCCCGGGA  
 GGGGGGACCAACAAAATCTCTATACCCCTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCAAT  
 CACCCAGGGTGACAGGGAGTGGGCTCCACTGCTGTATCTAGATGATAACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTAACCTATG  
 ACCCTATGTAAACTACTCTCCCGCCATACAATCCCCAACCCCTTCTCCTACCCTCCCGTTACTTACACCCAAACCTGTA  
 CTGGATAGAACTATTGATTACTTCCAGCCAAACAACAAAAAATCAGCTTTGGCTGAGGCTACAAACCTCTGCAATGTAGA  
 CCACGTAGGCCTCGGCCTGCGTTCGAAAAACAGTAAATACGACCAGGACTACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAATTC  
 GAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCACTTAAACCCTAA

**IX.2 Secuencias aminoacídicas****IE0**

MIRTSSHVLNVQENIMTSNCASSPYSCEATSACAEAQQIQVDTGGDKIVNNQVTMTQINFNASYTSASTPSRASFDNSYSEFC  
 DKQPNDYLSYHNHPTPDGADTVISDSETAAASNFLASVNSLTDNDLVECLLKTDDNLEEAVSSAYYSESLEQPVVEQPSPSA  
 YHAESFEHSAGVNPQSATGTRKRLDEYLDNSQGVVGFNFKIKLRPKYKSTIQSCATLEQTINHNTNICTVASTQEITHYFTN  
 DFAPYLMRFDNDYNSNRFSDHMSETGYMFVVKSEVKPFEIIFAKYVSNVVEYTNNYMVDNRVVFVTFDKIRFMISYNL  
 VKETGIEI PHSQDVCNDETAQNCKKCHFVDVHHTFKAALTSYFNLDMYAQTTFVTLQSLGERKCGFLLSKLYEMYQDKNL  
 FTLPIMLSRKESNEIETASNNFFVSPYVSQILKYSESQVFPDNPKNYVVDNLNLIVNKKSTLTYSYSSVANLLFNKYHDN  
 IASNNNAENLKKVKEDGSMHIVEQYLTQNVNDVKGHNFI VLSFKNEERLTI AKKNKEFYWISGEIKDVDVSVQVIQKYNRFKH  
 HMFVIGKVNRESTTLHNNLLKLLALILQGLVPLSDAITFAEQKLNCKYKFEFN\*

**IE1**

MTQINFNASYTSASTPSRASFDNSYSEFCDKQPNDYLSYHNHPTPDGADTVISDSETAAASNFLASVNSLTDNDLVECLLKT  
 DNLEEAVSSAYYSESLEQPVVEQPSPSAYHAESFEHSAGVNPQSATGTRKRLDEYLDNSQGVVGFNFKIKLRPKYKSTIQS  
 CATLEQTINHNTNICTVASTQEITHYFTNDFAPYLMRFDNDYNSNRFSDHMSETGYMFVVKSEVKPFEIIFAKYVSNVVE  
 EYTNNYMVDNRVVFVTFDKIRFMISYNL VKETGIEI PHSQDVCNDETAQNCKKCHFVDVHHTFKAALTSYFNLDMYAQT  
 FVTLQSLGERKCGFLLSKLYEMYQDKNLFTLPIMLSRKESNEIETASNNFFVSPYVSQILKYSESQVFPDNPKNYVVDNLN  
 LIVNKKSTLTYSYSSVANLLFNKYHDNIASNNNAENLKKVKEDGSMHIVEQYLTQNVNDVKGHNFI VLSFKNEERLTI AK

KNKEFYWISGEIKDVDVSQVIQKYNRFKHHMFVIGKVNRRRESTLHNNLLKLLALILQGLVPLSDAITFAEQKLNCKYKKFEF  
N\*

**GFP**

MTYPRRRFRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTFGYTVKATTVTTPSWAVDMMRFNINDFVPPG  
GGTNKISIPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPFYSYHSRYFTPKPV  
LDRTIDYFQPNKKQLWLRLQTSANVDHVGLGTAFENSKYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLKP\*

**Cap (PCV-2)**

MTYPRRRFRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTFGYTVKATTVTTPSWAVDMMRFNINDFVPPG  
GGTNKISIPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPFYSYHSRYFTPKPV  
LDRTIDYFQPNKKQLWLRLQTSANVDHVGLGTAFENSKYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLKP\*

**X PUBLICACIONES Y PATENTES**

Journal of Biotechnology 165 (2013) 201–208



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Biotechnology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jbiotec](http://www.elsevier.com/locate/jbiotec)

## Characterization of a *Trichoplusia ni* hexamerin-derived promoter in the AcMNPV baculovirus vector



Javier López-Vidal<sup>a,1</sup>, Silvia Gómez-Sebastián<sup>a,\*,1</sup>, Ismael Sánchez-Ramos<sup>a</sup>, José M. Escribano<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Alternative Gene Expression S.L. (ALGENEX), Centro Empresarial, Parque Científico y Tecnológico de la Universidad Politécnica de Madrid, Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Autovía A6, Km 7.5, 28040 Madrid, Spain

**ARTICLE INFO****Article history:**

Received 14 January 2013

Received in revised form 18 March 2013

Accepted 21 March 2013

Available online xxx

**Keywords:**

Baculovirus expression vector system

AcMNPV

Recombinant protein expression

Promoter

*Trichoplusia ni*

Basic juvenile hormone-suppressible protein 2

**ABSTRACT**

The promoter sequences of the encoding genes for the three most abundant hexamerins of the Lepidoptera *Trichoplusia ni* were isolated and cloned into the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)-derived baculovirus expression vector. From the sequences analyzed, the DNA region driving the expression of the Basic juvenile hormone-suppressible protein 2 (BJHSP-2), denominated pB2, presented the highest promoter strength in the context of the baculovirus vector in Sf21 insect cells. This promoter activity occurred earlier in baculovirus-infected cells than that achieved by a conventional polyhedrin promoter (p*polh*), but surprisingly stopped at 48 h post-infection. A mapping of pB2 essential promoter elements determined that a region of about 400 bp, denominated pB2<sub>9</sub>, retained and even increased the transcriptional activity with respect to the parental full-length sequence. Finally, several chimeric combinations of the insect-derived pB2 with the virus-derived conventional p*polh* or p10 promoters were constructed and incorporated into an AcMNPV baculovirus vector. The pB2-p10 combination showed increased recombinant protein expression at early times post-infection and similar expression levels at very late times post-infection in Sf21 cells with respect to conventional late promoters. To the best of our knowledge, pB2 is the first promoter isolated from the Lepidoptera *T. ni*, the natural host of AcMNPV, to be assayed in a baculovirus expression vector.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau

(10) International Publication Number

WO 2012/169939 A2

(43) International Publication Date  
13 December 2012 (13.12.2012) WIPO | PCT

- (51) International Patent Classification: Not classified
- (21) International Application Number: PCT/RU2012/000455
- (22) International Filing Date: 13 June 2012 (13.06.2012)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
- |                   |                               |    |
|-------------------|-------------------------------|----|
| 61/495,467        | 10 June 2011 (10.06.2011)     | US |
| 11169634.0        | 10 June 2011 (10.06.2011)     | EP |
| PCT/EP2011/068381 |                               |    |
|                   | 20 October 2011 (20.10.2011)  | EP |
| PCT/EP2011/072406 |                               |    |
|                   | 12 December 2011 (12.12.2011) | EP |
- (71) Applicants (for all designated States except US): **ALTERNATIVE GENE EXPRESSION S.L.** [ES/ES]; INIA, Autovia A6 Km. 7, E-28040 Madrid (ES). **OBSCHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVENNOSTYU "LAISENTEK"** [RU/RU]; ul. Myasnitskaya, 13/5, Moscow, 101000 (RU).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **GOMEZ SEBASTIAN, Silvia** [ES/ES]; INIA, Autovia A6 Km.7, E-28040 Madrid (ES). **LOPEZ VIDAL, Javier** [ES/ES]; INIA, Autovia A6 Km. 7, E-28040 Madrid (ES). **MARTINEZ ESCRIBANO, Jose Angel** [ES/ES]; INIA, Autovia A6 Km.7, E-28040 Madrid (ES).
- (74) Agent: **OBSCHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVENNOSTYU "SOJUZPATENT"**; ul.Iliinka, 5/2, Moscow, 109012 (RU).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
- without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
  - with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



WO 2012/169939 A2

(54) Title: RECOMBINANT DNA ELEMENTS FOR THE EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEINS IN A HOST CELL

(57) Abstract: Reagents and methods are provided that allow for art Improved expression of a recombinant protein. More specifically, the Introduction of recombinant DNA elements into a host cell allows for the increased expression of a recombinant protein, an improvement of the correct folding of said protein and an increase in cell viability and proliferation of the host cell. These recombinant DNA elements can be introduced into host cells, for example, via a recombinant baculovirus, which has incorporated said elements. The recombinant DNA elements include nucleic acids encoding transcriptional regulators, such as IE-0 and IE-1, transcriptional enhancer elements, such as the homologous region (hr) and promoters.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau

WIPO | PCT



(10) International Publication Number

WO 2012/169940 A2

(43) International Publication Date  
13 December 2012 (13.12.2012)(51) International Patent Classification: Not classified  
(21) International Application Number:  
PCT/RU2012/000456(22) International Filing Date:  
13 June 2012 (13.06.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
61/495,467 10 June 2011 (10.06.2011) US  
11169634.0 10 June 2011 (10.06.2011) EP  
PCT/EP2011/068381  
20 October 2011 (20.10.2011) EP  
PCT/EP2011/072406  
12 December 2011 (12.12.2011) EP(71) Applicants (for all designated States except US): AL-  
TERNATIVE GENE EXPRESSION S.L. [ES/ES];  
INIA, Autovía A6 Km. 7, E-28040 Madrid (ES). OB-  
SCHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVEN-  
NOSTYU "LAISENTEK" [RU/RU]; ul. Myasnitskaya,  
13-5, Moscow, 101000 (RU).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GÓMEZ SE-  
BASTIÁN, Silvia [ES/ES]; INIA, Autovía A6 Km. 7, E-  
28040 Madrid (ES). LÓPEZ VIDAL, Javier [ES/ES];  
INIA, Autovía A6 Km. 7, E-28040 Madrid (ES).  
MARTÍNEZ ESCRIBANO, José Angel [ES/ES]; INIA,  
Autovía A6 Km. 7, E-28040 Madrid (ES).(74) Agent: OBSCHESTVO S OGRANICHENNOI  
OTVETSTVENNOSTJU "SOJUZPATENT"; ul.Iliinka,  
5/2, Moscow, 109012 (RU).(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,  
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,  
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,  
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,  
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,  
OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD,  
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,  
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,  
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,  
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,  
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished  
upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: RECOMBINANT DNA ELEMENTS FOR THE EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEINS IN INSECTS

(57) Abstract: Reagents and methods are provided that allow for an improved expression of a recombinant protein in an insect. More specifically, the introduction of recombinant DNA elements into an insect larva allows for the increased expression of a recombinant protein, an improvement of the correct folding of said protein and an increase in the survival rate after infection of the insect. These recombinant DNA elements can be introduced, for example, into insect larvae via a recombinant baculovirus, which has incorporated said elements. The recombinant DNA elements include nucleic acids encoding transcriptional regulators, such as IE-0 and IE-1, transcriptional enhancer elements, such as the homologous region (hr) and promoters.

WO 2012/169940 A2



(11) EP 2 350 292 B1

(12) EUROPEAN PATENT SPECIFICATION

- (45) Date of publication and mention of the grant of the patent:  
23.10.2013 Bulletin 2013/43
- (46) Application number: 08803551.4
- (47) Date of filing: 02.09.2008
- (51) Int. Cl.:  
C12N 15/85 (2006.01) C12N 15/866 (2006.01)  
A01K 67/033 (2006.01)
- (86) International application number:  
PCT/EP2008/061580
- (87) International publication number:  
WO 2010/025764 (11.03.2010 Gazette 2010/10)

(54) INSECT-DERIVED PROMOTERS FOR FOREIGN PROTEINS EXPRESSION IN INSECT CELLS  
AUS INSEKTEN STAMMENDE PROMOTOREN ZUR EXPRESSION VON FREMDPROTEINEN IN  
INSEKTENZELLEN  
PROMOTEURS DÉRIVÉS D'INSECTES POUR L'EXPRESSION DE PROTÉINES ÉTRANGÈRES  
DANS DES CELLULES D'INSECTES

(84) Designated Contracting States:  
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR  
HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT  
RO SE SI SK TR

(43) Date of publication of application:  
03.08.2011 Bulletin 2011/31

(73) Proprietor: **Alternative Gene Expression, S.L.**  
(Algenex)  
28223 Pozuelo de Alarcón - Madrid (ES)

(72) Inventors:  
• GÓMEZ SEBASTIÁN, Silvia  
28223 Pozuelo de Alarcón - Madrid (ES)  
• LÓPEZ VIDAL, Javier  
28223 Pozuelo de Alarcón - Madrid (ES)  
• SÁNCHEZ RAMOS, Ismael  
28223 Pozuelo de Alarcón - Madrid (ES)  
• ALONSO MARTÍ, Covadonga  
28223 Pozuelo de Alarcón - Madrid (ES)  
• MARTÍNEZ ESCRIBANO, José, Angel  
28223 Pozuelo de Alarcón - Madrid (ES)

(74) Representative: **HOFFMANN EITLÉ**  
Patent- und Rechtsanwälte  
Arabellastrasse 4  
81925 München (DE)

(56) References cited:  
US-A1- 2005 054 569

- DATABASE EMBL [Online] 29 December 1995 (1995-12-29), "Trichoplusia ni basic juvenile hormone sensitive hemolymph protein (BJHSP2) gene, promoter region." XP002517034 retrieved from EBI accession no. EMBL:U41640 Database accession no. U41640 -& DATABASE EMBL [Online] 29 December 1995 (1995-12-29), "Trichoplusia ni basic juvenile hormone sensitive hemolymph protein (BJHSP1) gene, promoter region." XP002517035 retrieved from EBI accession no. EMBL:U41639 Database accession no. U41639 -& JONES G ET AL: "Identification of regulatory sequences of juvenile hormone-sensitive and -insensitive serum protein-encoding genes" GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 173, no. 2, 16 September 1996 (1996-09-16), pages 209-214, XP004043217 ISSN: 0378-1119
- DATABASE EMBL [Online] 9 June 1994 (1994-06-09), "Trichoplusia ni clone BJHSP1 hexamerin gene, 5' flanking sequence." XP002517036 retrieved from EBI accession no. EMBL:U09672 Database accession no. U09672
- DATABASE EMBL [Online] 9 June 1994 (1994-06-09), "Trichoplusia ni clone BJHSP2 hexamerin gene, 5' flanking sequence." XP002517037 retrieved from EBI accession no. EMBL:U09673 Database accession no. U09673
- JINWAL U K ET AL: "Sex-, stage- and tissue-specific regulation by a mosquito hexamerin promoter" INSECT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 15, no. 3, June 2006 (2006-06), pages 301-311, XP002515941 ISSN: 0962-1075

Note: Within nine months of the publication of the mention of the grant of the European patent in the European Patent Bulletin, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to that patent, in accordance with the Implementing Regulations. Notice of opposition shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid. (Art. 99(1) European Patent Convention).

## X.1 Patentes no publicadas

**Enhanced production of the porcine circovirus capsid protein by a baculovirus vector expression system.**

PCT/EP2013/075799 (Diciembre 2013)

**Baculovirus vector expression system for the expression of recombinant proteins (in particular, those forming virus-like particles).**

PCT/EP2013/075812 (Diciembre 2013)

## X.2 Publicaciones sometidas

**Significant productivity improvement of the baculovirus expression vector system by engineering a novel expression cassette**

Silvia Gómez-Sebastián\*, Javier López-Vidal\*, José M. Escribano

\* Igual contribución

### **Summary**

Here we describe the development of a baculovirus vector expression cassette containing rearranged baculovirus-derived genetic regulatory elements. This newly designed expression cassette conferred significant production improvements to the BEVS, including prolonged cell integrity after infection, improved protein integrity, and around 4-fold increase in recombinant protein production yields in insect cells with respect to a standard baculovirus vector. The expression cassette consisted of a cDNA encoding for the baculovirus transactivation factors IE1 and IE0 expressed under the control of the *polyhedrin* promoter and a homologous repeated transcription enhancer sequence operatively *cis*-linked to the *p10* promoter or to chimeric promoters containing *p10*. The prolonged cell integrity observed in cells infected by baculoviruses harbouring the novel expression cassette reduced the characteristic proteolysis and aberrant forms frequently found in baculovirus-derived recombinant proteins. The new expression cassette developed here has the potentiality to significantly improve the productivity of the BEVS.

### X.3 Publicaciones en preparación

#### **Highly efficient insect cell-based platform for virus-like particle vaccines production using an improved baculovirus vector**

Javier López-Vidal\*, Silvia Gómez-Sebastián\*, Juan Bárcena, Maria C. Nuñez, Diego Martínez-Alonso, Eva Guijarro Pardo, Benoit Dudognon and José M. Escribano.

\* Igual contribución

##### **Summary**

Vaccines based on virus-like particles (VLP) have proved their success in human and animal health. Insect cells platform, based on the use of recombinant baculoviruses is between the most used to generate this kind of highly immunogenic vaccines. Because production cost is a very relevant constraint to extend the use of these vaccines to human and animal populations, any productivity improvement in this platform may be a relevant factor to reduce the vaccine costs. Here we describe the use of a novel baculovirus expression cassette, denominated TB, to model the production in insect cells of three well defined VLP, two of them already marketed today. Capsid proteins from human papillomavirus (L1 from HPV 16), from porcine circovirus type 2 (Cap) and from the calicivirus producing the rabbit hemorrhagic disease (VP60), were expressed in insect cells by baculoviruses genetically engineered with the TB expression cassette in which the different genes were inserted. Productivities were compared with that obtained by the conventional counterpart vectors expressing the proteins under the control of *polyhedrin* promoter. Results demonstrated that the expression of vaccine proteins under the control of TB cassette increased productivities in more than 300% in all cases and recombinant proteins were fully functional forming VLP as determined by electron microscopy analysis. The use of the TB expression cassette represent a simply modification of the baculovirus vectors that significantly improves the cost efficiency of VLP-based vaccines production, facilitating the broad application of these vaccines in human and animal health.

#### **Improved recombinant protein production in a *Trichoplusia ni* insect larvae by using a baculovirus vector harboring a novel expression cassette**

Silvia Gómez-Sebastián\*, Javier López-Vidal\*, Edel Reytor, Miguel Cid, Carmen Alvarado, Lorena Romero Santacreu, Maria C. Nuñez and José M. Escribano

\* Igual contribución

##### **Summary**

Insects, in combination with baculovirus vectors, are extremely efficient biofactories for the production of recombinant proteins. Recently, a novel expression cassette has been designed to improve the productivity of the baculovirus vector expression system (BEVS) in cultured insect cells. This expression cassette, denominated TB, has been shown to increase not only productivity but also cell viability at late times post-infection. In the present work we have studied the correlation between the TB-induced effects observed in insect cells with that observed in insect larvae (*Trichoplusia ni*). For this purpose, two baculoviruses were compared, one consisting in a conventional control baculovirus expressing the reporter green fluorescent protein (GFP) under the control of *polyhedrin* (*polh*) promoter and the other expressing the same protein under the TB expression cassette. Results demonstrated that TB cassette increased in larvae the productivity with respect to the control baculovirus between 17% to 35%, depending of the virus dose used. Production yields obtained in

insect larvae are virus dose- and infection time-dependent. However, the use of high infection doses or long infection periods induce high larvae mortality rates. Interestingly, larvae infected with the TB-modified baculovirus, showed about a 70% increase in survival ratios with respect to control virus at optimal production conditions. The synergistic effects of increased productivity and insect biomass recovered by using the TB-modified baculoviruses made the insect larvae platform about 200% more productive.