

Tesis Doctoral
María Martínez Solís
Enero 2018

**Interacción insecto-baculovirus. Aplicaciones en la
mejora de baculovirus como vector para la expresión
heteróloga de proteínas.**



Director Dr. Salvador Herrero Sendra
Profesor titular
Departamento de Genética
ERI de Biotecnología y Biomedicina
Universitat de València

Dr. D. Salvador Herrero Sendra, Profesor titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València,

Informa:

Que Dña. María Martínez Solís, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación recogido en esta memoria que lleva por título "Interacción insecto-baculovirus. Aplicaciones en la mejora de baculovirus como vector para la expresión heteróloga de proteínas", para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València.

Y para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firma la presente en Burjassot, a 18/12/2017

Director: Dr. D. Salvador Herrero Sendra

Tutor: Dr. D. Rafael Sanjuán Verdeguer

AGRADECIMIENTOS

Aunque a veces parezca que no, todo llega a su fin en algún momento. Y sí, las tesis doctorales también se acaban por muy interminables que puedan llegar a parecer. Y aquí me encuentro ahora, con la escritura de la tesis prácticamente acabada y dispuesta a escribir unas palabras de agradecimiento a todos los que de alguna manera han formado parte de este trabajo y también de mi vida durante todos estos años. Desde que entré a este maravilloso laboratorio (GBQ, recientemente actualizado a CBP) en mi tercer año de carrera como alumna colaboradora, allá por el 2007, no he dejado de sentirme como en casa. Y no solo por las interminables horas y fines de semana que he llegado a pasar aquí, sino por todas las personas que están o han pasado por aquí. Cada uno de ellos con sus particularidades, por supuesto, pero que hacen que puedas acabar el día con una sonrisa, aunque los astros se hayan alineado para que los experimentos no salgan. Ahora, 10 años después de mi aterrizaje en el laboratorio, después de épocas difíciles, de estrés y agobios, solo puedo sacar cosas positivas de esta increíble experiencia que ha sido la realización de esta tesis.

*Salva, gracias por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral a tu lado. Pero, sobre todo gracias por haberme enseñado a mejorar día a día. Sé que he ido muchas veces al despacho y las reuniones con malas noticias sobre los experimentos. Y aunque para ti también suponía una desilusión que no tuviéramos resultados, y eso te pudiera llegar a cabrear, al final siempre tenías unas palabras de ánimo que me hacían replantearme la situación y volver a ver las cosas con algo de luz. Gracias por tus consejos y por tu experiencia transmitida. Y cómo no, gracias por esos momentos *off lab* de risas, que también son necesarios.*

Juan, tú también empezaste formando parte de esta tesis, aunque el destino decidió que no fuera así hasta el final. Gracias por tu sabiduría

científica y por seguir transmitiendo ese entusiasmo por la ciencia a cada persona que llega al laboratorio.

Balta, contigo realicé la tesis de máster y pude ir a mi primer congreso internacional (con charla en inglés incluida). Gracias también por tus consejos y sugerencias.

Joel, contigo no he tenido el placer de trabajar y no te conozco tanto, pero tus puntos de vista y aportaciones en las reuniones de línea siempre son de agradecer.

Patri, qué decirte. Para mí has sido como una mami en el laboratorio además de una compañera infalible. Empecé a trabajar a tu lado cuando acabé la carrera y pude aprender muchas cosas de ti. En este tiempo, hemos sufrido juntas con los experimentos, pero también nos hemos alegrado cuando hemos conseguido que funcionaran. Siempre estas dispuesta a echar un cable. Te elegiría una y mil veces, porque es realmente un placer trabajar contigo.

Rosí, qué haríamos sin ti en el laboratorio Rosí. Gracias por enseñarme tanto sobre los bichos, por estar dispuesta siempre a aprender y ayudar en lo que se te pide. Y gracias por alegrar los días con tus batallitas e historietas, eres una crack.

Cris, podría decir que fuiste mi primera mami científica. Contigo realicé los primeros experimentos en el laboratorio, ayudándote en tu tesis doctoral, no sin miedo a cometer errores. Pero tú siempre me transmitiste confianza y seguridad en lo que hacía, así que muchas gracias. Siempre sonriente y feliz, no cambies nunca.

Leila, creo que la compi del “lab sur” con la que más horas de laboratorio he compartido. Tímida y quizá algo desordenada, pero muy risueña y gran trabajadora. Gracias por estar ahí siempre dispuesta a echar una mano y por enseñarme otras muchas cosas sobre una cultura muy distinta a la nuestra.

Gloria, ay Glóri, Glóri... Junto a ti empecé mi andadura de esta tesis. Gracias por ayudarme en esos primeros meses y enseñarme tanto. Hace mucho

que decidiste emprender otro camino y ya no compartes los días en el laboratorio con nosotros, pero me alegro porque sé que te va muy bien. He de decirte que hecho mucho de menos esas “pequeñas broncas” nuestras que solo nosotras entendíamos, y aquellas conversaciones casi interminables. Podría describirte como pequeña pero matona, con mucho carácter, pero con un grandísimo corazón. Sin duda una persona a la que vale la pena encontrarse por el camino de la vida.

Agata, creo que sin ti esta tesis no existiría. Tú me enseñaste prácticamente todo lo que sé sobre los baculovirus y cultivo celular. Sé que en algún momento pude marearte con mi multitud de dudas y preguntas, pero siempre estabas dispuesta a perder un ratito de tu tiempo para ayudarme con lo que fuera. Por todo ello, solo puedo darte las gracias una y otra vez. Para mí eres una tía todoterreno, digna de admiración.

Gracias también a todas esas personas con las que quizá he compartido menos momentos en el laboratorio, pero que aportáis vuestro granito de arena de una u otra manera. Yolanda y Sara, gracias por vuestras buenas prácticas de laboratorio y entusiasmo por el trabajo. Nürria, Maïssa y Ximo, los eternos luchadores frente a sus amigas, las proteínas Vips. Natalia y Manoli, con las que compartí menos años, pero ambas grandes compañeras. Ángel y Adá, mis actuales compis del “lab sur” con los que comparto mis penas y alegrías, gracias por aguantarme cada día. Gracias Oscar por tu disponibilidad y buen hacer. Dani y Luis, el dúo “travieso” del grupo, gracias por vuestra alegría. Anabel, compartimos un tiempo en el laboratorio, emigraste y volviste con fuerza, gracias por tu buen humor salpicado de ironía. Ascen, una andaluza “mu salá” llegada hace relativamente poco, suerte en esta nueva aventura. Tampoco quiero olvidarme de otras personas que visitaron el laboratorio, provenientes de distintas partes del mundo: Juli, Silvia, Najara, Camila, Ana Paula, Hannane y Ayda. Ayda, a ti quiero dedicarte unas palabras en particular, ya que me pareces una maravillosa persona, gracias por ser tan caritativa y

atenta, te deseo lo mejor. Y finalmente me gustaría dar las gracias a Olwi, una estudiante que durante su trabajo fin de grado me ayudó mucho en una parte de esta tesis.

Gracias también al resto de compañeros del departamento de genética, que, si en algún momento he necesitado algo de ellos, han estado ahí. Así como a los técnicos y personal de secretaría, a los que también agradezco su labor y amabilidad.

Gracias a mis amigos, quienes sin comprender gran cosa de lo que les pudiera contar, siempre se han interesado por mi trabajo.

A mi familia, muchas gracias por estar ahí siempre. A mis padres, gracias por permitirme ser quien soy, apoyarme siempre en mis decisiones y guiarme, pero dejándome la libertad suficiente para aprender a volar por mí misma y explorar el mundo. Gracias por escucharme cuando os cuento algo del laboratorio y prestáis atención (o lo intentáis) aún sin entender una palabra. Y mi hermana pequeña Cris, a la que últimamente ya no veo tan pequeña. Que, aunque ambas somos bastante reservadas, sabemos que siempre nos tendremos la una a la otra, en cualquier lugar, en cualquier momento. Y ahora que volaste del nido, sigue así porque llegarás muy lejos. Gracias de nuevo, porque sin vosotros esto tampoco habría sido posible. Os quiero.

Y por supuesto, a mis dos soles, gracias. Miguel, mi compañero de vida, mi amigo, mi amante, mi marido, mi familia, mi todo. Juntos hicimos a nuestro pequeño príncipe, Marc, mi razón de ser y por el que actualmente daría literalmente mi vida. Gracias por apoyarme en todos los momentos y decisiones tomadas durante todos estos años, porque ha sido muy importante para mí. A los dos, gracias por iluminar mi vida cada día, gracias por hacerme sonreír cada mañana y gracias por aguantarme hasta en los momentos más complicados (que sé que no es fácil...). Os quiero con locura y no hay suficiente espacio en este papel para deciros cuánto.

Para acabar, aunque a veces puedo ser muy negativa, me quedo con esta idea que tú, Miguel, me has repetido tantas veces y que la realización de esta tesis me ha enseñado,

“Sí crees que puedes hacerlo, lo conseguirás”

ÍNDICE

	Página
RESUMEN/SUMMARY	15
INTRODUCCIÓN	23
1. Los baculovirus: aspectos generales	25
1.1. Taxonomía y clasificación	25
1.2. Estructura y composición	27
1.3. Ciclo de infección.....	30
1.4. Expresión génica	33
1.5. Aplicaciones de los baculovirus.....	34
2. Uso de los baculovirus como bioinsecticidas	36
2.1. Factores que limitan el uso de los baculovirus como insecticidas	38
2.2. Baculovirus recombinantes como bioinsecticidas	40
3. Los baculovirus como vectores de expresión para la producción de proteínas recombinantes	41
3.1. Ventajas y desventajas de los baculovirus frente a otros sistemas de expresión	42
3.2. El sistema de expresión basado en baculovirus (BEVS)	47
3.3. Principales debilidades del sistema BEVS.....	50
3.4. Mejoras en la producción de proteínas con el sistema BEVS	51
OBJETIVOS	57
CHAPTER 1: A novel baculovirus-derived promoter with high activity in the baculovirus expression system	61
1.1. Introduction	63
1.2. Materials and methods	64
1.2.1. Culture cells and insects.....	64
1.2.2. Sequence identification	65
1.2.3 Construction of recombinant baculoviruses	65
1.2.4 Infection assays in culture cells and insects.....	67
1.2.5 Analysis of GFP expression	68
1.3. Results.....	68
1.3.1. Expression of viral genes and promoter selection.....	68

1.3.2. <i>Orf46</i> promoter activity in insect cells.....	69
1.3.3. Activity of the <i>pSeL120</i> in combination with standard promoter in insect cells.....	72
1.3.4. Activity of the new promoters in baculovirus-infected insect larvae	74
1.4. Discussion	76
CHAPTER 2: Expression of the <i>lef5</i> gene from <i>Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus</i> contributes to the baculovirus stability in cell culture	81
2.1. Introduction	83
2.2. Materials and Methods	84
2.2.1. Cells, insects and viruses	84
2.2.2. Microarray design, hybridization, and analysis.....	85
2.2.3. Preparation of recombinant baculoviruses	86
2.2.4. Cell infection and serial passages	87
2.2.5. Virus titer determination and gene copy number determination.....	88
2.2.6. Gene expression of <i>Se-lef5</i>	89
2.3. Results.....	89
2.3.1. Different viral gene expression patterns in cell lines and <i>S. exigua</i> larvae	89
2.3.2. Virus replication was stable along the passages.....	92
2.3.3. Loss of the <i>gfp</i> gene was reduced when <i>Se-lef5</i> was overexpressed ...	92
2.3.4. Genomic deletions were mainly occurring at the GFP locus.....	94
2.4. Discussion	95
CHAPTER 3: Screening for host genetic factors increasing the expression of recombinant proteins using BEVS	101
3.1. Introduction	103
3.2. Material and Methods	104
3.2.1. Baculovirus library construction.....	104
3.2.2. Baculovirus selections	106
3.2.3. Isolation of individual baculoviruses	107
3.2.4. GFP quantification and viral growth measurement	107
3.2.5. Characterization of the individual baculoviruses	108
3.2.6. Generation of individual recombinant baculoviruses.....	108

3.3. Results	109
3.3.1. Characterization of the baculovirus library	109
3.3.2. Viral selection for GFP production.....	109
3.3.3. GFP expression levels of isolated baculoviruses	110
3.3.4. Sequence identification in the selected baculoviruses	112
3.3.5. Characterization of recombinant baculoviruses containing the identified sequences	113
3.4. Discussion	115
DISCUSIÓN GENERAL	119
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	129
BIBLIOGRAFÍA.....	135
ANEXOS.....	155

RESUMEN

SUMMARY

RESUMEN

Los baculovirus forman un amplio grupo de virus patógenos de insectos que se caracterizan por su elevada especificidad. Su principal aplicación es su uso como agente bioinsecticida frente a diferentes plagas agrícolas, aunque algunas de sus características han permitido el desarrollo de tecnologías que permiten usar los baculovirus como vectores para la expresión heteróloga de proteínas, así como vectores para su uso en terapia génica. El sistema de expresión basado en baculovirus, conocido como BEVS (Baculovirus Expression Vector System), fue desarrollado en los años 80 y desde entonces ha permitido la expresión de gran diversidad de proteínas recombinantes en cultivos celulares de insectos, de una manera más rápida y económica que empleando otros sistemas de expresión. Sin embargo, este sistema de producción presenta una serie de limitaciones que afectan sobre todo cuando se quiere una producción a gran escala. Estas limitaciones suelen estar relacionadas con bajos rendimientos de expresión, disminuyendo así la eficiencia de producción. Además, la multiplicación continuada de los baculovirus en cultivos celulares da lugar a la aparición de virus defectivos que se caracterizan por la pérdida de partes de su genoma, pudiendo afectar a la producción de proteínas recombinantes por pérdida del gen recombinante correspondiente. Por ello, para que el sistema BEVS siga siendo un sistema de producción competitivo, es necesaria la introducción de mejoras que permitan aumentar los niveles de producción con respecto al sistema convencional. Aprovechando los conocimientos de estudios previos sobre la interacción de los baculovirus con su huésped, en esta tesis se ha abordado la introducción de mejoras en el sistema de expresión BEVS desde distintas perspectivas y desarrollando diferentes estrategias, que aparecen reflejadas en cada uno de los capítulos.

En el primer capítulo se describe una secuencia derivada del genoma del baculovirus de *S. exigua* (SeMNPV) con actividad promotora, a partir de un gen viral altamente expresado en insectos infectados con dicho virus, a la que se ha denominado *pSeL*. Este nuevo promotor muestra unos niveles de expresión de la proteína GFP alrededor de 2 veces mayores con respecto a los obtenidos empleando

el promotor del gen de la *poliedrina* (*polh*) en diferentes líneas celulares de insectos. Además, la combinación de los promotores *pSeL* y *polh* muestra un efecto aditivo frente a la expresión de ambos promotores empleados individualmente.

En el segundo capítulo, el estudio transcripcional del proceso infectivo de los baculovirus AcMNPV y SeMNPV tanto en cultivos celulares como en larvas de *S. exigua* ha revelado un gen, el gen *lef5*, altamente sobreexpresado en larvas (respecto a su expresión en cultivo celular). Esto, nos dio pie a hipotetizar sobre su posible papel en la estabilidad genómica de los baculovirus durante su replicación en cultivo celular. El estudio de la sobreexpresión del gen *lef5* de SeMNPV (*Se-lef5*) en baculovirus recombinantes, que además expresan GFP, confirma la influencia de este gen en la estabilidad viral. A lo largo de varios pases de infección sucesivos se observa que la estabilidad del transgén *gfp* y la capacidad para expresar la proteína GFP, es mayor en los virus que expresan *Se-lef5* en comparación a los virus control.

El tercer capítulo se centra en la búsqueda de secuencias reguladoras o intensificadoras no virales (procedentes del huésped), que puedan influir en la expresión de los genes virales y así aumentar la producción de proteínas recombinantes de interés. Para ello se construyó una genoteca viral que contiene genes expresados en el intestino de larvas de *S. exigua*, y se seleccionó para aquellos virus que presentaban altos niveles de expresión de GFP, mediante citometría de flujo empleando un separador celular. La posterior selección y caracterización de aquellos baculovirus individuales que mostraron los mejores niveles de expresión de GFP, nos permitió identificar algunos de los transgenes presentes en dichos baculovirus. Entre las secuencias identificadas encontramos, en más de una ocasión, genes con similitud al citocromo P450, proteínas de choque térmico y proteínas REPAT. Los virus aislados que portan estas secuencias muestran niveles de expresión de GFP entre 3 y 4 veces superiores a los niveles de expresión previos a la selección de la genoteca. Sin embargo, la generación de nuevos baculovirus recombinantes que expresan estas secuencias, muestran unos niveles similares de GFP al baculovirus control. Esto nos hace pensar que el aumento de expresión de GFP observado puede deberse a otros factores, como la aparición de

mutaciones puntuales, y no únicamente a la presencia del transgén en los baculovirus seleccionados.

Los resultados presentados en esta tesis suponen nuevas mejoras en la producción de proteínas recombinantes en cultivos celulares, a través del uso de promotores distintos a los convencionales y del aumento de la estabilidad genómica de los baculovirus recombinantes. También se ha explorado la introducción de secuencias reguladoras o intensificadoras de la expresión para mejorar los niveles de producción. Aunque en este caso no se pudo validar que el aumento de expresión observado estuviera asociado a la presencia de dichas secuencias (existe la posibilidad que se esa mejora fuera debida a mutaciones en el genoma de los virus), nuestros resultados validan la metodología empleada para la selección de virus con mayores niveles de expresión de proteína recombinante. Así, las estrategias empleadas en este trabajo son capaces de aumentar los niveles de expresión de una proteína recombinante. Por tanto, presentan un gran potencial para ser incorporadas en los vectores que se emplean de manera habitual en el sistema de expresión de baculovirus, aumentando su rentabilidad en la producción a gran escala de proteínas recombinantes.

SUMMARY

Baculoviruses are a large group of pathogenic insect viruses that are characterized by their high specificity. The main application is their use as a bioinsecticidal against different crop pests, although some of their characteristics have allowed the development of technologies to use the baculoviruses as vectors for the heterologous protein expression, as well as in gene therapy. The expression system based on baculoviruses, known as BEVS (Baculovirus Expression Vector System), was developed in the 80's and since then it has allowed the expression of a great diversity of recombinant proteins in insect cell cultures, in a faster and more economical way than using other expression systems. However, this production system has some limitations affecting mostly to the large-scale productions. These limitations are usually related with low yields of expression, decreasing the production efficiency. Moreover, the continuous multiplication of the baculoviruses in cell cultures results in the emergence of defective viruses which are characterized by the loss of parts of the genome, affecting to the recombinant proteins production due to the loss of the corresponding recombinant gene. Therefore, for the BEVS to remain competitive as a production system, it is necessary the introduction of improvements to increase the production levels with respect to the conventional system. Taking advantage of the knowledge of previous studies about the interaction of the baculoviruses with their host, in this thesis has been addressed the introduction of improvements in the BEVS from different perspectives and developing different strategies, which are reflected in each of the following chapters.

In the first chapter, a sequence derived from the baculovirus genome of *S. exigua* (SeMNPV) with promoter activity is described. This sequence is derived from a viral gene highly expressed in insects infected with SeMNPV, and has been named as *pSeL*. This new promoter shows an expression levels of the GFP protein about twice higher compared to those obtained using the promoter of the *polyhedrin* gene (*polh*) in different insect cell lines. Moreover, the combination of both promoters *pSeL* and *polh* shows an additive effect in comparison with the expression obtained with both promoters used separately.

In the second chapter, the transcriptional study of the infective process of the baculoviruses AcMNPV and SeMNPV both in cell culture and *S. exigua* larvae has revealed a gene, *lef5*, highly overexpressed in larvae (with respect to its expression in cell culture). This, gives us the opportunity to hypothesize about the possible role of this protein in the genomic stability of the baculoviruses during their replication in cell culture. The study of the overexpression of the *lef5* gene from SeMNPV (*Se-lef5*) in recombinant baculoviruses, that also express GFP, confirms the influence of this gene in the viral stability. Through several successive infective passages, it is observed that the stability of the *gfp* transgene and the ability to express GFP, is higher in those viruses expressing *Se-lef5* compared with the control viruses.

The third chapter focuses on the search of non-viral regulatory or enhancer sequences (coming from the host), which can influence in the expression of viral genes and increase the production of recombinant proteins of interest. For that, it was generated a viral library containing genes expressed in the gut of *S. exigua* larvae, and it was selected by flow cytometry, using a cell sorter, for those viruses showing high expression levels of GFP. The subsequent selection and characterization of those individual baculoviruses showing the best expression levels of GFP, allowed us to identify some of the transgenes present in those baculoviruses. Among the identified sequences we found, multiple times, genes similarly to P450 cytochrome, heat-shock proteins and REPAT proteins. The isolated viruses that carry these sequences show expression levels of GFP between 3-4 times higher to the expression levels before the library selection. However, the generation of equivalent recombinant baculoviruses expressing these sequences, show expression levels of GFP similar to the control baculovirus. This suggests that the increased GFP expression observed can be due to other factors, as the emergence of point mutations, and not only to the presence of the transgene in the selected baculoviruses.

The results presented in this thesis represent new improvements in the production of recombinant proteins in cell culture, through the use of promoters other than conventional and the increase of the genomic stability of the recombinant baculoviruses. The introduction of regulatory or enhancer sequences of the

expression has also been explored to improve the production levels. Although in this case it could not be validated that the observed increase of expression was associated to the presence of these sequences (it exists the possibility that this improvement was due to mutations on the viral genome), our results validate the methodology employed for the selection of viruses with higher expression levels of recombinant protein. Thus, the strategies developed in this work are able to increase the expression levels of a recombinant protein. Therefore, they show a great potential to be used in the vectors usually employed in the baculovirus expression system, increasing its profitability in the large-scale production of recombinant proteins.

INTRODUCCIÓN

1. Los baculovirus: aspectos generales

Los baculovirus pertenecen a una amplia familia de virus de DNA de doble cadena, con un genoma circular cuyo tamaño oscila entre 80 y 180 kb. Estos virus infectan a invertebrados y se caracterizan por su elevada especificidad a nivel de especie. El descubrimiento de los baculovirus está relacionado con la industria de la seda, que se desarrolló en China hace 5000 años. La cría del gusano de seda (*Bombyx mori*, Lepidoptera) se extendió por Asia y posteriormente llegó a Europa en el año 550 DC. En el siglo XII la producción estaba establecida en España e Italia, pero las pérdidas producidas por patologías asociadas a los gusanos de seda fueron económicamente devastadoras para la industria de la seda. En el siglo XIX se observaron cuerpos poliédricos en larvas infectadas y se estableció una conexión entre la presencia de poliedros y los síntomas de la enfermedad de los gusanos de seda (Carstens 2009). Pero no fue hasta finales de 1940 cuando, gracias a la microscopía electrónica, Bergold demostró la presencia de partículas víricas con forma de bastón en los cuerpos poliédricos (Bergold 1952). El término baculovirus fue propuesto por Mauro Martignoni por la forma de bastón de los viriones, que deriva del latín *baculum* (bastón). Posteriormente, en 1976, se creó la familia *Baculoviridae* (Fenner 1976).

1.1. Taxonomía y clasificación

Los baculovirus se caracterizan por presentarse en forma de cuerpos de inclusión (OB, *occlusion bodies*), una estructura formada por una matriz proteica cristalina en la que se embeben los viriones. Tradicionalmente la familia *Baculoviridae* se ha clasificado, en función de la morfología de los cuerpos de inclusión, en dos géneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) y *Granulovirus* (GV). Los nucleopolyhedrovirus producen OBs con forma poliédrica compuestos principalmente por la proteína poliedrina, su tamaño oscila entre 0.5-15 μm y suelen contener varios viriones. Los nucleopolyhedrovirus se dividen a su vez en nucleopolyhedrovirus múltiples (MNPV) si los viriones presentan varias nucleocápsidas juntas, y nucleopolyhedrovirus simples

(SNPV) si solo presentan una. En cambio, los granulovirus producen OBs con forma ovalada formados principalmente por una proteína llamada granulina, son de menor tamaño (0.3-0.5 μm) y suelen contener un único virión. En 2006 se realizó una revisión taxonómica de la familia *Baculoviridae* teniendo en cuenta al análisis de secuencias del genoma y sus relaciones filogenéticas, y se propuso una nueva clasificación en cuatro géneros (Figura 1): *Alphabaculovirus* (NPV específicos de lepidópteros), *Betabaculovirus* (GV específicos de lepidópteros), *Gammabaculovirus* (NPV específico de himenópteros) y *Deltabaculovirus* (NPV específicos de dípteros) (Jehle et al. 2006).

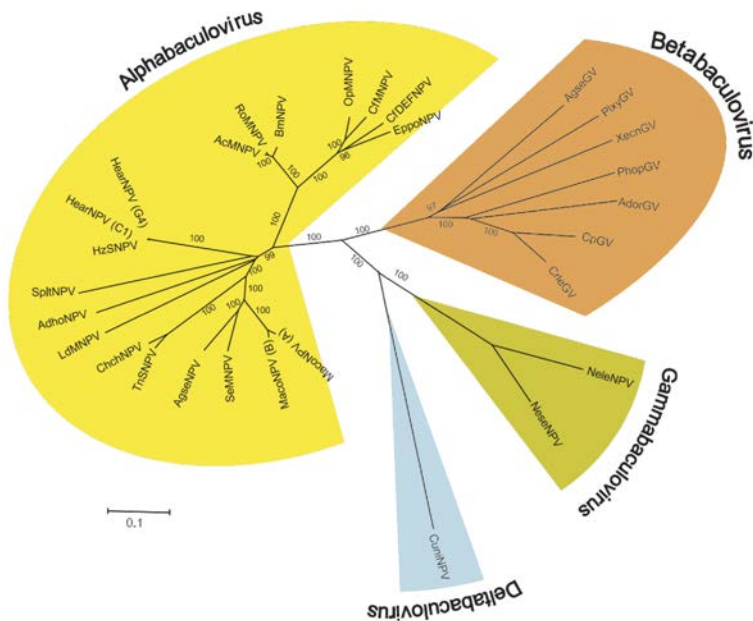


Figura 1. Árbol filogenético de la familia *Baculoviridae*. Clasificación obtenida a partir del análisis de secuencias de 29 baculovirus distintos, donde cada una de las ramas principales se corresponde con los 4 géneros propuestos (Jehle et al. 2006).

El primer baculovirus en ser secuenciado completamente fue el nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) (Ayres et al. 1994), convirtiéndose en el baculovirus más estudiado. Hasta la fecha, según la base de datos del ICTV, se han descrito 66 especies distintas pertenecientes a la familia *Baculoviridae* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).

1.2. Estructura y composición

Los baculovirus presentan unas nucleocápsides en forma de bastón que contienen y protegen el material genético. Estas nucleocápsides están formadas por una matriz proteica cuyo componente principal es la proteína VP39. Dentro de las nucleocápsides, el DNA viral se encuentra compactado y asociado a la proteína de unión al DNA P6.9. Cuando estas nucleocápsides adquieren una membrana o envuelta dan lugar a 2 tipos de viriones o fenotipos distintos: los viriones brotantes (BV, *budded virions*) y los viriones derivados de los cuerpos de oclusión (ODV, *occlusion derived virus*) (Figura 2). Ambos fenotipos son genéticamente idénticos, pero difieren a nivel de estructura y composición, y tienen diferentes roles dentro del ciclo infectivo del virus. Los BVs poseen una única nucleocápside rodeada por una envuelta que procede de la membrana plasmática, ya que se forman como consecuencia de la egresión de las nucleocápsides a través de la membrana de las células infectadas donde se han sintetizado. Estos viriones son los responsables de diseminar la infección célula a célula dentro del organismo, ya que son capaces de infectar diferentes tipos celulares de la larva. Uno de los principales componentes de la envuelta de los BVs es la glicoproteína GP64, esencial para la propagación célula a célula de los BVs (Monsma et al. 1996; Wang et al. 2010).

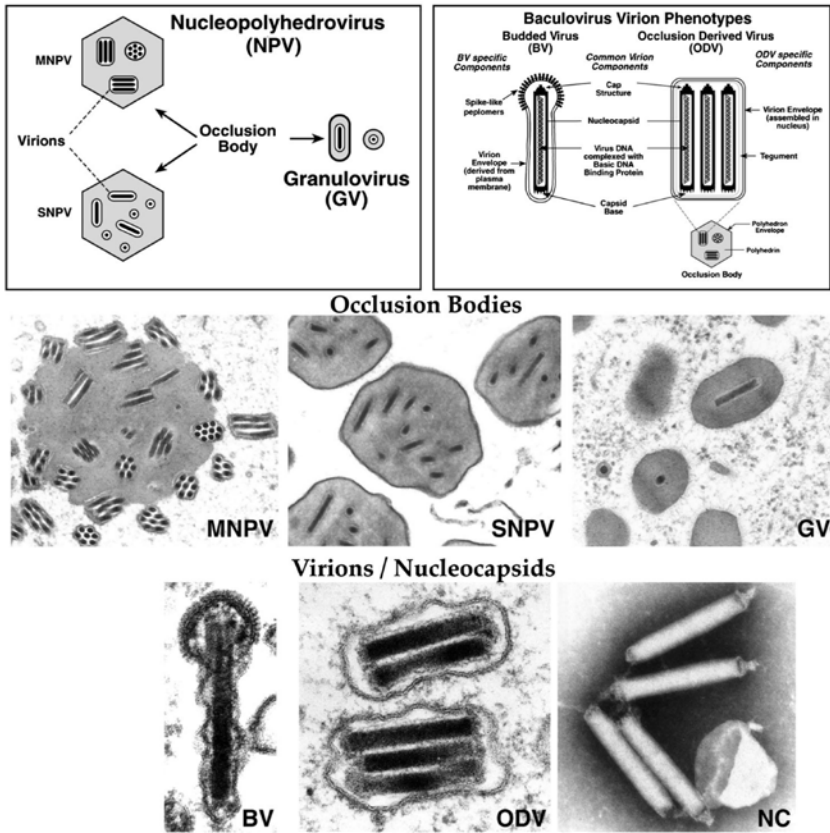


Figura 2. Fenotipos y estructura de los baculovirus. (A) Representación esquemática de los distintos cuerpos de oclusión (izquierda), y de los fenotipos de los viriones de los baculovirus donde se muestran los componentes compartidos y específicos de cada uno de ellos (derecha). (B) Microfotografías de microscopía electrónica de transmisión donde se observan los diferentes tipos de cuerpos de oclusión. (C) Microfotografías de microscopía electrónica de transmisión de los diferentes fenotipos de viriones (BV y ODV) y de las nucleocápsides (NC). Figura tomada de: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/>.

El otro tipo de virión, los ODVs, son los responsables de la infección primaria del insecto, que se forman dentro del núcleo de las células infectadas cuando una o más nucleocápsides adquieren una membrana sintetizada *de novo*. Son altamente infectivos para las células epiteliales del intestino de las larvas, pero son incapaces de infectar otros tejidos (Volkman and Summers 1977). La envuelta de los ODVs está formada por varias proteínas conocidas como ODV-E, y otro grupo de proteínas

denominadas PIFs (*per os infectivity factors*) que son necesarias para la infección *in vivo* (Peng et al. 2012). Además, los ODVs pueden ocluirse dentro de una matriz proteica constituida mayoritariamente por poliedrina (NPV) o granulina (GV), lo que se conoce como cuerpos de oclusión (OBs) (Figura 2B). Estos OBs también cuentan con una envoltura formada por una proteína estructural llamada PEP (*polyhedron envelope protein*), que sirve para sellar la superficie de los OBs y aumentar su estabilidad (Rohrmann 2013). La PEP se encuentra asociada a la proteína P10, y ambas parecen ser necesarias para la correcta formación de la envoltura de los OBs (Russell et al. 1991; Gross et al. 1994). Los OBs son estructuras de resistencia capaces de proteger el DNA viral de la radiación UV y así aumentar su estabilidad en el medio donde son liberados.

El baculovirus AcMNPV, perteneciente al género *Alphabaculovirus*, se considera el prototipo de la familia *Baculoviridae*, es perfectamente conocido y sirve como modelo para la mayoría de los ensayos de laboratorio. Su genoma se organiza en una única molécula circular que consta de 133.894 pares de bases (pb), en las que se predicen 154 pautas abiertas de lectura (ORFs, *open reading frames*) con potencial para expresar proteínas de más de 50 aminoácidos. La Figura 3 muestra un mapa con la localización de los genes, los cuales se distribuyen aleatoriamente sin seguir un patrón relacionado con el orden de expresión. Una característica del genoma de AcMNPV (y de otros muchos baculovirus) es la presencia de varias regiones homólogas (*hrs*) repartidas por el genoma. Son secuencias no codificantes que actúan como potenciadores de la transcripción y como orígenes de replicación (Cochran and Faulkner 1983; Guarino et al. 1986).

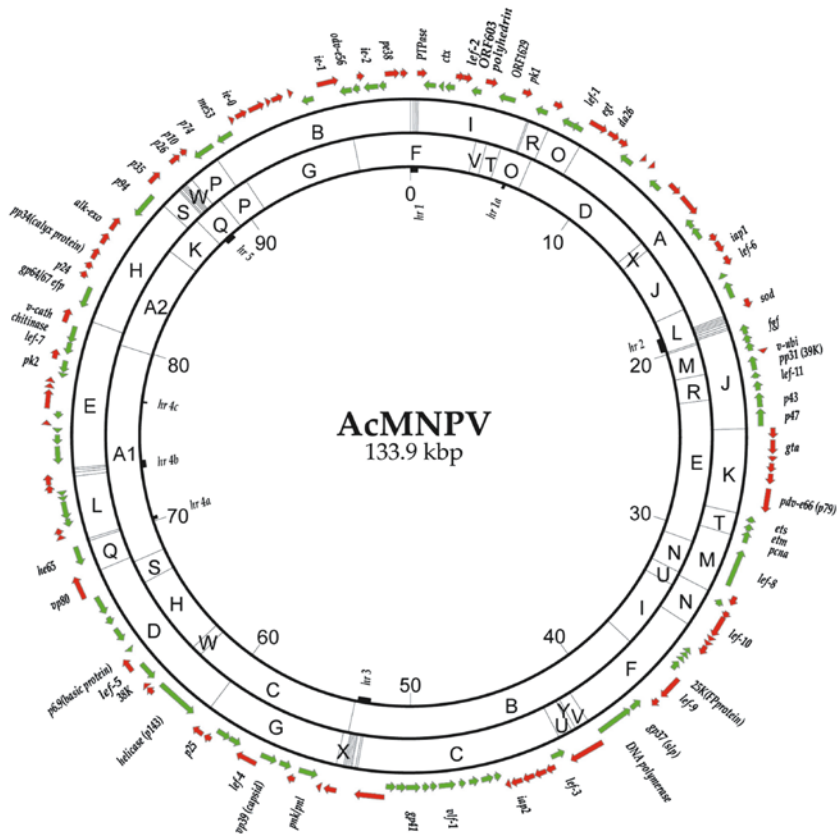


Figura 3. Esquema del genoma completo del baculovirus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*. Se indica la localización y orientación de cada una de las ORFs conocidas. Los mapas de restricción de las enzimas *EcoRI* y *HindIII* se muestran en los anillos exterior e interior, respectivamente. Las ubicaciones de las regiones homólogas (*hr*) aparecen representadas como pequeñas cajas negras. Imagen original de Ayres et al. (1994) y posteriormente modificada en <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/>.

1.3. Ciclo de infección

El ciclo de infección por baculovirus en lepidópteros es el más conocido y se caracteriza por la distinción de dos fases: la infección primaria y la infección secundaria (Figura 4). La infección primaria comienza cuando una larva susceptible ingiere OBs que se encuentran en la planta de la que se alimenta. Una vez llegan al intestino, los OBs se disuelven por la acción de las proteasas intestinales y el

ambiente alcalino (pH 9-11) (Pritchett et al. 1982), liberándose los ODVs en el lumen intestinal. Estos ODVs se unen a las microvellosidades del epitelio intestinal y mediante fusión de membranas liberan las nucleocápsides al interior de la célula (Horton and Burand 1993). Las nucleocápsides liberadas son transportadas al núcleo y, tras la decapsulación del genoma viral, comienza la expresión de los genes virales y la replicación del DNA vírico junto con el ensamblaje de nuevas nucleocápsides. Estas nuevas nucleocápsides atraviesan el núcleo y el citoplasma hasta alcanzar la membrana plasmática, desde donde emergen de la célula en forma de BVs (portando parte de la membrana plasmática como envoltura) al medio extracelular. A partir de ahí se dispersan a través de la hemolinfa por todo el insecto, comenzando la fase de infección secundaria. Cuando los BVs contactan con las células vecinas e incluso con las células de otros tejidos, se internalizan por vía endocítica dependiente de clatrina (Long et al. 2006) y liberan las nucleocápsides en el interior. Las nucleocápsides son transportadas al núcleo donde se replica el DNA y, como ocurre en la infección primaria, se ensamblan nuevas nucleocápsides. En este punto de la infección, las nucleocápsides pueden quedar retenidas en el núcleo y formar los ODVs que se ocluyen en una matriz proteica para formar los OBs. Este paso tiene lugar gracias a la hiperexpresión de dos genes muy tardíos, *poliedrina* y *p10*, indispensables para la infección *in vivo* pero no necesarios para la infección de cultivos celulares *in vitro* (Rohrman 2013). Finalmente se produce la muerte del insecto debido a una lisis celular masiva, que provoca literalmente la licuefacción de la larva y la liberación de grandes cantidades de OBs al medio ambiente donde permanecerán hasta ser ingeridos por otras larvas, comenzando así un nuevo ciclo de infección (Federici 1997).

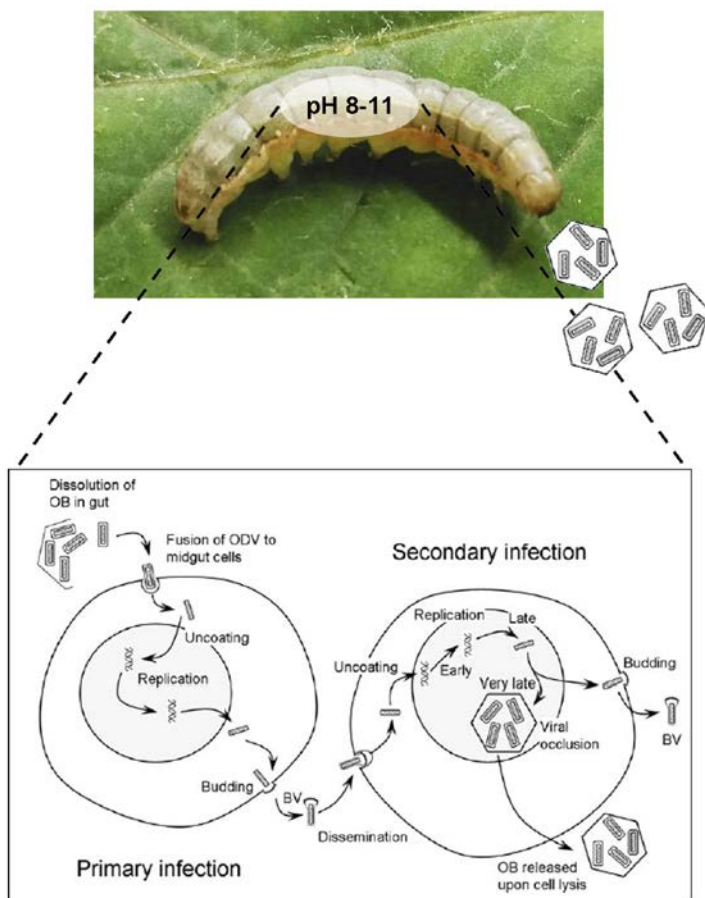


Figura 4. Ciclo de infección de los baculovirus. Los cuerpos de occlusión (OB) ingeridos por la larva son disueltos en el intestino, liberando los viriones (ODV) que inician la infección primaria. La infección primaria da lugar a viriones del tipo BV que son liberados al exterior de la célula e infectan a otros tejidos comenzando así la infección secundaria. La infección secundaria finaliza con la generación de nuevos OBs que son liberados al medio tras la lisis de las células, provocando a su vez la muerte del insecto. Figura extraída de Contreras-Gómez et al. (2014) y modificada para este trabajo.

1.4. Expresión génica

Durante la fase de infección del baculovirus AcMNPV, la expresión de los genes virales tiene lugar siguiendo una secuencia temporal que se divide en 3 fases (Berretta et al. 2013): temprana, tardía y muy tardía. La fase temprana comprende las 6 primeras horas desde el inicio de la infección, antes del comienzo de la replicación del DNA viral. En esta fase se expresan genes cuyos productos van a ser necesarios para regular la expresión de otros genes en las fases sucesivas de la infección, y se caracteriza porque es llevada a cabo por una RNA polimerasa de la célula infectada (Huh and Weaver 1990). Los promotores de los genes tempranos suelen contener una caja TATA y una secuencia consenso del inicio de la transcripción (CAGT), de manera similar a los genes del hospedador (Friesen 1997; Berretta et al. 2013). Otro elemento importante son las secuencias *hrs*, que actúan como intensificadores de la transcripción de algunos genes tempranos. Los genes tempranos pueden dividirse en 2 categorías: los genes tempranos inmediatos y los tempranos retrasados. La diferencia entre ellos es que la expresión de los genes tempranos inmediatos no depende de factores virales, mientras que los genes tempranos retrasados necesitan ser activados por los productos de los genes tempranos inmediatos. El transactivador más importante de los genes tempranos en baculovirus es el producto del gen *ie1* (Guarino and Summers 1986). Otros genes cuya expresión regula la transcripción de los genes tempranos son *ie0*, *ie2* y *pe38* (Friesen 1997).

La fase tardía tiene lugar entre las 6 y las 24 horas tras la infección. En esta fase, además de la transcripción de los genes tardíos, tiene lugar la replicación del DNA viral y la producción de nuevos viriones. Esta fase se caracteriza por la expresión de genes que codifican para proteínas estructurales necesarias para el ensamblaje y liberación de los viriones. La fase muy tardía no se inicia hasta 16 horas después de la infección y se prolonga hasta pasadas 72 horas. Esta fase se caracteriza por la producción de grandes cantidades de poliedrina y P10 que van a permitir la oclusión de los viriones en OBs. Tanto la transcripción de los genes tardíos como los muy tardíos es llevada a cabo por una RNA polimerasa sintetizada por el

propio virus (Fuchs et al. 1983). En este caso, la mayoría de los promotores constan de una secuencia conservada (TAAG) en el sitio de inicio de la transcripción (Lu and Miller 1997). Se ha descrito un conjunto de 19 genes necesarios para la expresión de los genes tardíos y muy tardíos, conocidos como genes *lef* (*late expression factors*) (Rapp et al. 1998). Algunos están relacionados directamente con la transcripción de genes tardíos, otros con la replicación del DNA viral y otros actúan indirectamente manteniendo la integridad de la célula para que pueda tener lugar la replicación del DNA y la transcripción de los genes tardíos (Hefferon 2004). Aunque el papel de algunos de ellos no se conoce con exactitud.

1.5. Aplicaciones de los baculovirus

Las características propias de los baculovirus hacen de estos virus unos organismos muy versátiles, lo que ha permitido el desarrollo de diferentes usos gracias, en parte, al avance de la tecnología. Desde su descubrimiento hace 5000 años en China con la industria de la seda, quedó patente su potencial como agente patógeno frente a las larvas de estos insectos. Pero no fue hasta los años 1960-1970 cuando se empezó a extender el uso de estos virus como agentes bioinsecticidas, apareciendo el primer producto comercial para ser aplicado en campo en 1975 (Elcar™, de Sandoz Inc.). Unos años después, en la década de 1980, el poder de la biotecnología permitió el desarrollo de vectores de expresión basados en estos baculovirus para la expresión de proteínas recombinantes. A continuación, se explican más detalladamente cada una de estas aplicaciones.

Control de plagas

Una de las principales aplicaciones de los baculovirus es su uso como agente bioinsecticida, ya que son patógenos naturales de diferentes insectos. Los baculovirus se emplean a nivel mundial para el control de insectos plaga (sobre todo lepidópteros) en diferentes hábitats, incluyendo bosques e invernaderos. Los baculovirus presentan una serie de ventajas frente al uso de insecticidas químicos: son altamente específicos y seguros, ya que resultan inocuos para los seres humanos y/o la fauna auxiliar donde se aplica, presentan una elevada capacidad de

autorreplicación y dispersión, pueden usarse en programas de manejo integrado de plagas y además pueden manipularse genéticamente de manera sencilla.

Expresión de proteínas recombinantes

Los baculovirus también son ampliamente utilizados como vectores de expresión de proteínas recombinantes de interés, tanto a nivel industrial como académico. El desarrollo de la tecnología del DNA recombinante y las características de los baculovirus, como su posibilidad de replicación *in vitro*, permitieron desarrollar un sistema eficiente para la expresión de proteínas recombinantes en células de insecto que se conoce como BEVS (*Baculovirus Expression Vector System*) (Smith et al. 1983). Este sistema permite la producción de proteínas recombinantes de una manera rápida y económica. Además, ofrece ciertas ventajas frente a otros sistemas de expresión, ya que los baculovirus son capaces de introducir modificaciones post-traduccionales típicas de eucariotas, permite la expresión simultánea de varias proteínas y tienen elevados niveles de expresión.

Terapia génica

Una aplicación más reciente de los baculovirus, pero no menos interesante, es su uso como vectores en terapia génica. A pesar de la especificidad de los baculovirus, a mediados de la década de los 90 se consiguió que los baculovirus expresaran genes en células de mamífero (Hofmann et al. 1995; Boyce and Bucher 1996). Para ello se emplea un baculovirus modificado, conocido como BacMam, en el que un promotor viral es reemplazado por un promotor de mamífero para expresar la proteína de interés. Este baculovirus modificado no es capaz de replicar en células humanas, asegurando un riesgo de bioseguridad bajo (Kost and Condrey 2002). Se trata de una herramienta con mucho potencial para ser empleado en tratamientos terapéuticos. La regeneración de tejidos mediante la expresión de factores de crecimiento (Lin et al. 2010), o la inmunoterapia contra el cáncer mediante la expresión de antígenos asociados a tumores (Wang and Balasundaram 2010), son solo un par de ejemplos de investigaciones que ya han mostrado resultados exitosos (Airenne et al. 2013).

2. Uso de los baculovirus como bioinsecticidas

El concepto de plaga hace referencia a cualquier ente biótico que el ser humano considera perjudicial para sus intereses, ya sea hacia su propia persona, su propiedad o el medio ambiente. Una de las plagas que siempre ha preocupado al ser humano son las plagas agrícolas, ya que reducen la producción y encarecen los costes. Los insectos son los organismos que más daños producen en los sectores agrícola y forestal, estimándose pérdidas de hasta el 30% de la producción de los cultivos (Erlandson 2008). Durante muchos años, la estrategia más utilizada para combatir a los insectos plaga ha sido el uso de insecticidas químicos. Pero uno de los principales problemas de estos insecticidas son los efectos tóxicos y nocivos que tienen tanto para los seres humanos como para la fauna auxiliar y el medio ambiente. Además, su uso masivo y continuado acaba dando lugar a la aparición de resistencias en las poblaciones de insectos plaga. Por todo ello, surge la necesidad de emplear métodos de control de plagas alternativos, entre los que destacan los métodos culturales y los insecticidas de origen biológico.

Como insecticidas biológicos o bioinsecticidas encontramos hongos, nematodos, bacterias y virus, todos ellos patógenos naturales de diferentes insectos. Entre los insecticidas microbianos más populares se encuentran la bacteria *Bacillus thuringiensis* y algunos virus. Aunque se conocen 15 familias de virus capaces de infectar a insectos (Erlandson 2008), los baculovirus son prácticamente los únicos que se emplean como agente de control de plagas. Los baculovirus cuentan con una serie de características que los hace ventajosos como bioinsecticidas frente a los insecticidas químicos. Los insecticidas basados en baculovirus no dejan residuos en el medio ambiente, son altamente específicos y no afectan a humanos ni a la fauna auxiliar, lo que ha hecho que en los últimos años su uso haya ganado importancia en el control biológico de plagas.

Como se ha mencionado previamente, en 1975 se registró en Estados Unidos el primer insecticida basado en baculovirus (Elcar™, de Sandoz Inc.) contra el lepidóptero *Helicoverpa zea*. Desde entonces otros productos han sido registrados y comercializados para su uso como bioinsecticidas frente a diferentes especies plaga

(Tabla 1), aplicándose con éxito en muchos casos. Quizá el ejemplo más importante de un baculovirus natural aplicado en campo es del baculovirus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV), aplicado en campos de soja de Brasil (Moscardi 1999). Otros ejemplos son el uso del granulovirus de *Cydia pomonella* (CpGV) aplicado en manzanos y perales de América del Norte y Europa (Vincent et al. 2007), o el virus de *Helicoverpa armigera* (HaSNPV) en plantaciones de algodón, soja o maíz en China (Erlandson 2008), India y Australia (Moscardi 1999).

Tabla 1. Ejemplos de baculovirus formulados como insecticidas biológicos para el control de lepidópteros plaga. Adaptado de Moscardi (1999) y Moscardi et al. (2011).

Baculovirus	Producto	Cultivo	Referencia
<i>Adoxyphyes orana granulovirus</i>	Capex	Manzano	Cunningham (1995)
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Coopervirus, Baculovirus Nitral	Soja	(Moscardi and Sosa-Gomez 1992)
<i>Cydia pomonella granulovirus</i>	Cyd-X, Madex	Manzano, Peral	Vincent et al. (2007)
<i>Helicoverpa zea nucleopoliedrovirus</i>	Gemstar, Elcar	Algodón	Moscardi (1999), Erlandson (2008)
<i>Orgyia pseudotsugata multiple nucleopoliedrovirus</i>	TM Biocontrol	Bosques	Cunningham (1995), Erlandson (2008)
<i>Lymantria dispar multiple nucleopoliedrovirus</i>	Gypcheck	Bosques	Reardon et al. (1996)
<i>Mamestra brassicae multiple nucleopoliedrovirus</i>	Mamestrin	Col	Cunningham (1995)
<i>Spodoptera exigua multiple nucleopoliedrovirus</i>	Spod-X, Vir-ex, Spexit	Ornamentales, hortalizas	Erlandson (2008), (Elvira et al. 2013)

2.1. Factores que limitan el uso de los baculovirus como insecticidas

A pesar de que los baculovirus presentan unas características beneficiosas para poder emplearse como bioinsecticidas en campo, su uso no está tan extendido como se esperaría. Algunas características de los baculovirus, como su lenta velocidad de acción respecto a los insecticidas químicos, su elevada especificidad o las dificultades para su producción a gran escala, hacen que la industria tenga un interés restringido hacia la comercialización de bioinsecticidas basados en baculovirus.

La elevada especificidad de huésped de los baculovirus resulta ser una de las principales ventajas para su uso como bioinsecticida, pero al mismo tiempo puede convertirse en un inconveniente. Por un lado, esta especificidad hace que los baculovirus sean bioinsecticidas seguros para la fauna auxiliar y los humanos (Figura 5). Pero, por otro lado, los agricultores pueden considerar que este factor es uno de sus principales defectos. El reducido rango de huésped de los baculovirus en comparación a los insecticidas químicos convierte a los baculovirus en un producto menos atractivo cuando hay más de una plaga a tratar en un mismo cultivo. No obstante, la cada vez mayor demanda de productos más seguros, que dejen menos residuos en el medio ambiente y los cultivos, así como la aparición de resistencias a los insecticidas químicos, han hecho que en los últimos años aumente el interés por el uso de los baculovirus como bioinsecticidas.



Figura 5. Larva de *S. exigua* muerta por infección de SeMNPV (derecha) y ejemplo de un producto comercial formulado con baculovirus para tratar plagas de *S. exigua*. Imágenes extraídas de: <http://www.biocolor.es/>.

Aunque el éxito o el fracaso del uso de los baculovirus como bioinsecticidas depende de la combinación de varios factores relacionados con el cuándo y cómo aplicarlo (Moscardi 1999), la radiación solar es un factor importante que afecta a su estabilidad en el medio ambiente. La radiación ultravioleta puede inactivar a los baculovirus en tan solo 2-5 días, antes de que puedan ejercer ninguna acción sobre los insectos plaga. Precisamente, el tiempo necesario para producir la muerte de los insectos plaga es otra de las desventajas del uso de los baculovirus como bioinsecticidas. El modo de acción de los baculovirus es relativamente lento (varios días o semanas) si lo comparamos con la mayoría de los insecticidas químicos (un día o menos). Esto hace que muchos agricultores muestren reticencias a la utilización de un producto con el que los resultados no son rápidamente visibles.

Pero además existen problemas asociados a la producción a gran escala de los baculovirus, lo que dificulta el desarrollo de nuevos productos bioinsecticidas basados en baculovirus para su uso comercial, así como la posibilidad de abaratar los costes de producción y hacerlos más accesibles a los agricultores. Actualmente, la producción comercial de los baculovirus suele hacerse *in vivo*, mediante la infección de los insectos huésped tanto en condiciones de laboratorio como en campo (Moscardi and Sosa-Gomez 1992; Moscardi et al. 1997). Pero este es un método de producción costoso que hace de los baculovirus un producto poco competitivo frente a los químicos. La industria busca cada vez más la producción de baculovirus *in vitro*, empleando cultivos celulares de insectos en grandes biorreactores. Este sistema de producción resulta ventajoso, ya que la multiplicación de los virus puede hacerse de manera más controlada, eficiente y obteniendo un producto más puro. Sin embargo, todavía no se ha conseguido que la multiplicación de los baculovirus en cultivo celular sea un sistema de producción lo suficientemente económico y eficiente. Esto es debido a que la realización de pases sucesivos de los baculovirus en cultivos celulares, acaba dando lugar a la aparición de virus defectivos que presentan alteraciones genéticas y pérdida de virulencia (Krell 1996), lo que se conoce como *passage-effect*. Existen principalmente dos tipos de virus defectivos: los mutantes FP (*Few Polyhedra*) y los DIPs (*Defective Interfering Particles*), los cuales se multiplican y se imponen rápidamente en la población viral. Los mutantes FP se caracterizan por

producir un número significativamente menor de poliedros por célula respecto al fenotipo normal (Fraser and Hink 1982; Pedrini et al. 2004; Rezende et al. 2009), debido a una reducción en la oclusión de viriones, dando lugar a una pérdida de virulencia. Se han encontrado diferentes mutaciones en el gen *fp25k* asociadas a mutantes FP, el cual codifica para una proteína esencial para la correcta oclusión de los viriones y la formación de los poliedros (Harrison and Summers 1995; Slavicek et al. 1996; Lua et al. 2002; Pedrini et al. 2004). El otro tipo de mutante generado por el *passage-effect*, los DIPs, son partículas virales incapaces de replicarse en las células del huésped por sí mismos. Los DIPs se caracterizan por tener un genoma de menor tamaño debido a la pérdida de grandes partes del mismo por delección, lo que les confiere una ventaja a la hora de replicarse en dichas condiciones (Kool et al. 1991; Pijlman et al. 2001).

Así como el modo de acción de los baculovirus es un proceso ampliamente estudiado y conocido, poco se sabe de los mecanismos relacionados con la generación de partículas defectivas durante su multiplicación en cultivos celulares de insectos. Sin embargo, un aspecto importante para poder abastecer la gran demanda de los baculovirus como bioinsecticidas, es el desarrollo de un sistema eficiente de producción de baculovirus en cultivos celulares, ya que abarataría costes con respecto a la producción *in vivo*. Por lo tanto, es necesario seguir investigando acerca de las causas que originan estas partículas defectivas, y así poder desarrollar estrategias que limiten su aparición. Una posible vía de actuación, aunque no muy explorada hasta la fecha por parte de la comunidad científica, puede ser el desarrollo de baculovirus recombinantes que mejoren la estabilidad genómica de los baculovirus en cultivo celular.

2.2. Baculovirus recombinantes como bioinsecticidas

La existencia de todos los factores limitantes expuestos en el apartado anterior ha hecho que la ingeniería genética de baculovirus se convierta en un importante campo de investigación para la generación de baculovirus modificados genéticamente con propiedades bioinsecticidas mejoradas. El objetivo principal de la

ingeniería de baculovirus es la reducción del tiempo de acción necesario para producir la muerte del insecto, así como de su capacidad para alimentarse. Y en los últimos años se han desarrollado diferentes baculovirus recombinantes que consiguen mejorar estos aspectos (Bonning and Hammock 1996; Inceoglu et al. 2001; Moscardi et al. 2011). Una de las estrategias se basa en la inserción de genes que codifican para alguna hormona, enzima o toxina. Como ejemplo, cabe nombrar el uso del gen que codifica para una neurotoxina del escorpión *Androctonus australis* (AaIT), cuya expresión en baculovirus recombinantes ha conseguido reducir los tiempos de acción hasta en un 40% (McCutchen et al. 1991). La hormona diurética se ha clonado en el genoma del baculovirus de *Bombyx mori* (BmNPV) y este baculovirus recombinante es capaz de producir la muerte de las larvas un 20% más rápido que el baculovirus original debido al aumento de la pérdida de agua (Maeda 1989). Otro ejemplo es la hormona juvenil esterasa, cuya sobreexpresión hace que la larva deje de alimentarse y pupa (Hammock et al. 1990). Una estrategia alternativa es la delección de genes del genoma de los baculovirus, como por ejemplo el gen *egt* (ecdysteroid UDP-glucosyltransferase) que impide la muda durante la infección por baculovirus. La delección de este gen en el virus AcMNPV ha mostrado un aumento del 30% de la velocidad para resultar mortales y una reducción significativa del consumo de alimento por parte de la larva (O'Reilly and Miller 1991).

A pesar de todas las mejoras conseguidas, hoy en día no existe en el mercado ningún producto insecticida basado en un baculovirus recombinantes. Aunque China ya ha comenzado el proceso de registro de un baculovirus recombinante para su uso comercial, el baculovirus HearNPV-AaIT que expresa la toxina AaIT en sustitución del gen *egt* (Sun 2015).

3. Los baculovirus como vectores de expresión para la producción de proteínas recombinantes

Se denominan proteínas recombinantes a todas aquellas proteínas que se producen a partir de DNA recombinante. También son conocidas como proteínas heterólogas o quiméricas, y se caracterizan porque se obtienen a partir de la

expresión de genes clonados en una especie o línea celular distinta a la del gen original. La idea original del DNA recombinante fue propuesta en 1969 por Peter Lobban. Entre 1972 y 1974 se publicaron algunos trabajos donde se describen los primeros experimentos con éxito para la tecnología del DNA recombinante *in vitro* (Jackson et al. 1972; Mertz and Davis 1972; Lobban and Kaiser 1973; Chang and Cohen 1974). Pero no fue hasta 1982 cuando se aprobó la comercialización del primer producto para la salud derivado de la tecnología del DNA recombinante, la insulina humana producida en *Escherichia coli* (Johnson 1983).

Desde entonces la industria biotecnológica del DNA recombinante no ha parado de crecer, convirtiéndose en una de las tecnologías más importantes desarrolladas en el siglo XX. Hoy en día existen cientos de proteínas producidas mediante esta tecnología, y muchas son proteínas humanas que han sido aprobadas para su uso clínico con fines terapéuticos, como por ejemplo las vacunas. Pero las proteínas recombinantes tienen otras muchas aplicaciones, ya que también son ampliamente usadas en investigación como reactivos en experimentos de laboratorio, para mapear y secuenciar genes, o para producir sondas y anticuerpos. Además, la tecnología del DNA recombinante también se emplea en la agricultura para generar cultivos con mejores características comerciales, más resistentes a determinadas condiciones ambientales e incluso para la generación de plantas que puedan producir sus propios insecticidas.

Como ya se ha mencionado, los baculovirus constituyen un sistema de producción de proteínas recombinantes muy eficiente y utilizado ampliamente en la actualidad. En los siguientes puntos se explica más detalladamente en qué consiste este sistema y sus ventajas frente a otros sistemas de producción.

3.1. Ventajas y desventajas de los baculovirus frente a otros sistemas de expresión

Las proteínas son moléculas complejas, a nivel de su estructura y función, que actualmente no pueden ser sintetizadas químicamente (tan solo algunos péptidos), y por lo tanto para su obtención se requiere la utilización de procesos biológicos.

Debido a la elevada demanda en el mercado de diferentes tipos de proteínas, la búsqueda de un sistema de producción de proteínas recombinantes eficiente y, por consiguiente, de menores costes de producción se ha convertido en un tema de interés. Hoy en día existen numerosos sistemas de producción de proteínas recombinantes, pero la elección del mejor método va a depender del tipo de proteína que se pretenda expresar. La calidad de las proteínas, la funcionalidad, la rapidez o el rendimiento de producción son factores críticos que hay que tener en cuenta a la hora de elegir el mejor sistema de producción en cada caso. No es fácil elegir el método más apropiado, pero la elección de un sistema de producción erróneo puede dar lugar a una producción escasa o a la obtención de una proteína no funcional, porque no se ha plegado correctamente o porque no contiene las modificaciones post-traduccionales necesarias (Brondyk 2009; Overton 2014; Fernández and Vega 2016).

Las células de insecto resultan una muy buena opción como sistema de expresión. Este sistema se basa en el uso de líneas celulares derivadas de lepidópteros y baculovirus como vectores de expresión para la producción de proteínas recombinantes (Figura 6). Desde 1983 que se expresó por primera vez una proteína recombinante utilizando baculovirus como vector de expresión (Smith et al. 1983), este sistema ha ido ganando popularidad, siendo hoy en día un sistema de expresión de proteínas recombinantes robusto y fiable, ampliamente utilizado tanto en laboratorios de investigación como en la industria biofarmacéutica. Este sistema presenta una serie de características ventajosas que lo hacen más idóneo para la expresión de proteínas que otros sistemas de expresión.



Figura 6. Cultivos celulares de insecto. Células Sf21 expresando la proteína verde fluorescente (GFP) (izquierda), frascos de cultivo (centro) y biorreactores para una producción a gran escala (derecha).

Las bacterias se han empleado tradicionalmente en la industria biotecnológica para la expresión de proteínas recombinantes, ya que son organismos sencillos, genéticamente bien caracterizados y de fácil mantenimiento, que tiene rendimientos de producción altos. Sin embargo, las bacterias presentan una gran desventaja como sistema de expresión, y es su capacidad limitada para introducir modificaciones post-traduccionales en comparación a los organismos eucariotas, ya que son incapaces de producir proteínas glicosiladas. Sin embargo, esto no ocurre con las células de insecto, ya que son capaces de introducir la mayoría de modificaciones post-traduccionales que encontramos en las células de mamífero. No obstante, aunque son capaces de glicosilar no lo hacen de manera idéntica a las células de mamífero (Altmann et al. 1999). Por tanto, dado que la mayoría de las proteínas de interés comercial son proteínas humanas, las células de mamífero se convierten en el sistema de expresión de elección. En este sentido, las células de mamífero se consideran el sistema más eficiente en cuanto a la capacidad de incorporar las modificaciones post-traduccionales que este tipo de proteínas requieren, así como un correcto plegamiento de las proteínas expresadas. Ambas características son muy importantes para conservar la actividad funcional de las proteínas, por lo que son ampliamente usadas para la producción de proteínas terapéuticas, sobre todo anticuerpos. Sin embargo, en términos económicos se considera un sistema poco

eficiente porque estas células requieren de medios de cultivo y equipamiento especializado para su mantenimiento, lo que encarece la producción. Las células de insecto también requieren de medios de cultivo especializados, lo que a veces puede encarecer y dificultar el escalado de la producción. Pero en términos generales el mantenimiento de las células de insecto resulta más barato que el de las células de mamífero.

Existen otros sistemas de expresión como las levaduras, organismos eucariotas unicelulares que también se han usado ampliamente de manera convencional para la expresión de proteínas recombinantes, ya que son un sistema sencillo y barato. Sin embargo, aunque son capaces de introducir modificaciones post-traduccionales, realizan una glicosilación con un patrón muy distinto al de células de insecto y/o mamíferos. Los hongos constituyen otro sistema de expresión que resulta adecuado para la producción de proteínas recombinantes que tienen que ser excretadas al medio exterior, y además son capaces de introducir modificaciones post-traduccionales, pero suelen presentar bajos rendimientos de expresión.

Las plantas como sistema de expresión de proteínas recombinantes presentan una serie de ventajas, ya que son capaces de introducir muchas de las modificaciones post-traduccionales de las proteínas eucariotas y además requieren de un mantenimiento y escalado de producción poco costoso en términos económicos. Sin embargo, el desarrollo de los sistemas de expresión basados en plantas se vio afectado por el cierre de la empresa PPL Therapeutics (empresa biofarmacéutica dedicada al desarrollo y producción de proteínas humanas) en 2004 (Thayer 2003; Demain and Vaishnav 2009), al parecer una de las pocas compañías que apostó por esta tecnología. Esta empresa también explotó la producción de proteínas recombinantes empleando animales transgénicos como sistemas de expresión, por lo que el desarrollo de este sistema de expresión también se vio afectado a pesar de ser el sistema de expresión que produce las proteínas recombinantes de mayor calidad. Sin embargo, la mayor desventaja es que el tiempo de producción puede oscilar desde unos pocos meses hasta más de 2 años, frente a tan solo las 3-4 semanas que requieren los sistemas basados en células de insectos

para obtener proteínas recombinantes. Esto hace que las células de insecto sean realmente un sistema de producción eficiente que proporciona buenos rendimientos.

Una posibilidad que surge de los sistemas de expresión basados en células de insecto, es el uso de los baculovirus para infectar larvas (Gomez-Casado et al. 2011) y/o pupas (Martínez Escribano et al. 2017) de lepidópteros, y ser empleados como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes. Desde la primera proteína recombinante humana (α -interferón) producida en la hemolinfa de larvas de gusano de seda en 1985 (Maeda et al. 1985), este tipo de sistema de expresión se ha convertido en una alternativa muy atractiva para la producción de proteínas recombinantes a bajo coste. Una ventaja frente al uso de cultivos celulares es que normalmente con estas larvas se obtienen mayores niveles de expresión, aunque algunas veces se ha observado la degradación de las proteínas producidas. Las pupas además tienen otra ventaja, y es que no necesitan ni hojas ni dieta artificial durante su fase de producción.

Como conclusión general podemos decir que todos los sistemas de expresión tienen sus ventajas y sus inconvenientes. Para elegir un método u otro, hay que tener en cuenta tanto las características de la proteína recombinante a expresar como su posterior aplicación. En la Figura 7 se muestra un resumen de la comparativa entre los diferentes sistemas para la producción de proteínas recombinantes.

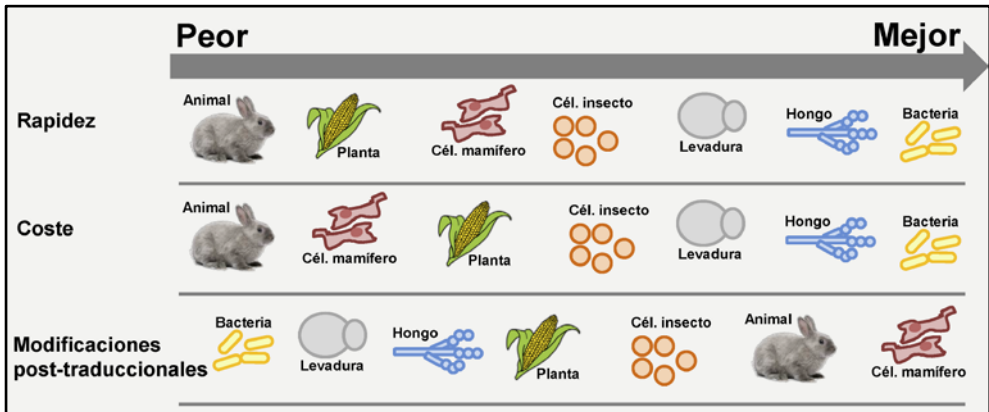


Figura 7. Comparativa general de los distintos sistemas de expresión de proteínas recombinantes. Cada sistema de expresión se clasifica en un continuo de peor a mejor atendiendo a diferentes características (rapidez, coste y capacidad para introducir modificaciones post-traduccionales).

3.2. El sistema de expresión basado en baculovirus (BEVS)

El sistema de expresión BEVS (*Baculovirus Expression Vector System*) consta de dos elementos principales: las células donde se replica el virus, y el baculovirus recombinante al que se le ha insertado el gen de la proteína a expresar. El baculovirus más utilizado como vector de expresión es AcMNPV, ya que es el más conocido y mejor caracterizado a nivel molecular. Además, tiene un amplio rango de huéspedes, se replica bien en diferentes cultivos celulares de insectos y en el mercado existen numerosos vectores de transferencia compatibles. No obstante, también se han desarrollado sistemas con vectores de los baculovirus de *Spodoptera exigua* (SeMNPV) (Choi et al. 1999) y *Bombyx mori* (BmNPV) (Motohashi et al. 2005). En cuanto a las líneas celulares, el sistema BEVS emplea células de insectos derivadas de lepidópteros para la expresión de proteínas recombinantes, siendo dos de ellas las más utilizadas junto con el baculovirus AcMNPV. Una de ellas es la línea celular Sf21 (IPLB-SF21-AE), aislada en 1977 del tejido ovárico de pupas de *Spodoptera frugiperda* (Vaughn et al. 1977) y de la que existe un aislado clonal conocido como Sf9 (IPLB-SF9). La otra línea celular es la llamada Hi5 (BTI Tn-5B1-4, High Five™), que fue aislada de tejido ovárico de adultos de *Trichoplusia ni* (Granados et al. 1994). Ambas líneas celulares presentan una característica interesante, y es que pueden crecer tanto en forma adherente como en suspensión y pueden escalarse en biorreactores para producir grandes cantidades de proteínas recombinantes. Aunque quizá menos empleadas que las líneas celulares ya nombradas, también se han desarrollado líneas celulares derivadas de los lepidópteros *Bombyx mori* (Bm5) (Grace 1967) y *S. exigua* (Se301) (Hara et al. 1995) para poder ser empleadas con sus respectivos baculovirus, BmNPV y SeMNPV.

Durante la fase tardía de la infección, los baculovirus expresan grandes cantidades de las proteínas poliedrina y P10, las cuales no son esenciales para la infección del virus *in vitro* (Rohrman 2013). Esta característica resultó de gran utilidad para poder establecer el sistema BEVS, ya que estos genes no esenciales pueden ser sustituidos por otros genes de interés y ser expresados bajo el control de

sus promotores. Al tratarse de promotores fuertes, se obtienen grandes cantidades de proteína recombinante.

Durante los primeros años del uso del sistema BEVS, los baculovirus recombinantes se obtenían por la técnica clásica de recombinación homóloga (Figura 8A) entre el genoma viral y un plásmido de transferencia que contenía el gen de interés clonado bajo el control del promotor del gen *poliedrina* (*polh*) al cotransfectar células de insecto (Summers and Smith 1987). Sin embargo, este procedimiento es bastante ineficiente y los baculovirus recombinantes obtenidos no superaban el 0.1% del total. Esto suponía tener que hacer varias rondas de purificación mediante *plaque assay*, una técnica que conlleva mucho tiempo para su realización y que además necesita de un ojo entrenado para poder identificar las placas negativas en poliedros. La primera mejora del sistema llegó de la mano de Kitts y colaboradores con la linearización del genoma del baculovirus en el sitio de inserción del gen a expresar (Kitts et al. 1990), lo que permitió aumentar el porcentaje de baculovirus recombinantes hasta el 30%. Poco después se construyó un vector que interrumpía el gen *orf1629* con la linearización. Éste es un gen esencial que solo es restaurado si se produce correctamente la recombinación entre el plásmido de transferencia y el genoma viral (Figura 8B). Esta nueva mejora permitió obtener frecuencias de recombinación cercanas al 100% (Kitts and Possee 1993). El vector original que incluía estas mejoras se denominó BacPAK6™, y actualmente se encuentran en el mercado otros vectores basados en el mismo principio como BaculoGold™ (BD Biosciences). No obstante, el salto más importante se consiguió en 1993 con el desarrollo de los bÁcmidos para el sistema BEVS, que permite la replicación de genomas de baculovirus recombinantes en cepas de *E. coli* gracias a la introducción de un origen de replicación y un marcador de selección bacterianos (Luckow et al. 1993). Este método se basa en la transposición mediada por la recombinasa Tn7 para introducir el gen de interés en un bÁcmido que porta la secuencia completa del genoma de AcMNPV, y así generar bÁcmidos recombinantes en *E. coli* (Figura 8C). El bÁcmido recombinante es posteriormente introducido en las células mediante transfección, las cuales transcriben el DNA viral y generan los baculovirus recombinantes. Con esta metodología se simplifica la generación y purificación de los

baculovirus recombinantes, que además se producen con una eficacia del 100%. Este sistema se comercializa bajo el nombre de Bac-to-Bac® (Invitrogen) y su uso está ampliamente instaurado en muchos laboratorios de investigación para la expresión transitoria de proteínas recombinantes, siendo el sistema que se ha empleado para generar los virus recombinantes de esta tesis. Más recientemente se ha desarrollado un sistema que combina la tecnología de los bÁcmidos con la recombinación homóloga en células de insecto. Este sistema se comercializa como *flashBAC*™ (Oxford Expression Technologies) (Figura 8D) y se caracteriza porque la selección de los virus recombinantes se basa en la reparación del gen esencial *orf1629* que se encuentra flanqueando el sitio de inserción.

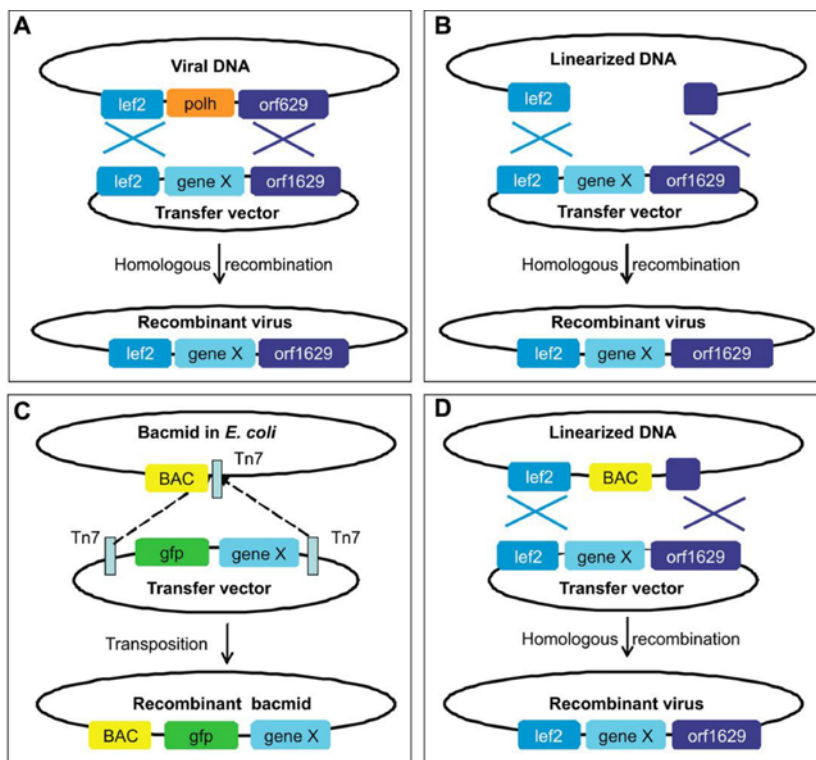


Figura 8. Evolución de los vectores de expresión y las técnicas para la generación de baculovirus recombinantes. (A) Recombinación homóloga. (B) Recombinación homóloga previa linearización del vector. (C) Tecnología del bÁcmido. (D) Combinación de la tecnología del bÁcmido y la linearización del vector. (van Oers 2011).

El sistema BEVS no ha dejado de evolucionar desde sus inicios, sobre todo mejorando las técnicas para facilitar y agilizar la generación de los baculovirus recombinantes. Sin embargo, este sistema de expresión sigue presentando ciertas debilidades. En los siguientes apartados se explica cómo afectan las limitaciones del sistema a la producción de proteínas recombinantes, así como los resultados de las últimas investigaciones que incluyen mejoras para aumentar la eficiencia del sistema BEVS.

3.3. Principales debilidades del sistema BEVS

Tanto la producción de baculovirus como su aplicabilidad pueden verse afectadas por una serie de limitaciones, que se comentan a continuación, y que pueden llegar a reducir el gran potencial de estos virus a nivel biotecnológico.

El uso del promotor del gen de la *poliedrina* para la expresión de proteínas recombinantes en el sistema BEVS supone una ventaja frente a otros sistemas de expresión, ya que se trata de un promotor fuerte con una alta tasa de transcripción que da lugar a grandes cantidades de proteína. Sin embargo, debido a la naturaleza de este promotor, la expresión de las proteínas recombinantes se restringe a la última fase de la infección. Esta expresión tardía afecta en diferentes aspectos a la expresión de proteínas recombinantes, dando lugar a rendimientos de expresión significativamente menores que los alcanzados con la mayoría de las células de mamífero. Durante la fase tardía de infección, la capacidad de expresión de las células infectadas se ve comprometida, dando lugar en muchos casos a proteínas recombinantes con un plegamiento inadecuado, formando agregados o con modificaciones post-traduccionales incorrectas (Ailor and Betenbaugh 1999). Otra limitación asociada al bajo rendimiento es el efecto citopatogénico de los virus sobre las células, que tiene como consecuencia una elevada proteólisis de las proteínas recombinantes producidas (Naggie and Bentley 1998). Por tanto, el propio proceso infectivo necesario para la producción de proteínas en el sistema BEVS disminuye la productividad, y aumenta los costes de producción.

Otro de los problemas del sistema BEVS es el denominado *passage effect*, del que ya se ha hablado en la sección 1.2.1 de este trabajo. En este caso, la sucesión de varios pases infectivos en las células dan lugar a una drástica disminución de la producción de proteína recombinante, asociada a la inestabilidad genómica de los baculovirus (Krell 1996). La aparición de DIPs (Wickham et al. 1991) y la delección de partes del genoma de los baculovirus, que pueden incluir los genes de interés (Pijlman et al. 2006), tienen lugar tras varios pases de infección sucesivos en cultivo celular. Esto da lugar a virus que dejan de ser infectivos y/o disminuyen significativamente el rendimiento de producción de proteínas recombinantes.

Por todo lo anteriormente expuesto, queda patente la necesidad del desarrollo de mejoras que permitan paliar estas limitaciones en la medida de lo posible. Para ello, la biotecnología está siendo una herramienta muy importante que está permitiendo la introducción de diferentes mejoras.

3.4. Mejoras en la producción de proteínas con el sistema BEVS

Con el fin de solventar las limitaciones y aumentar la productividad del sistema BEVS, se ha trabajado principalmente en dos aspectos fundamentales: por un lado para mejorar la calidad y la cantidad de las proteínas expresadas, y por otro para aumentar la estabilidad de los baculovirus recombinantes (van Oers 2011; Li et al. 2012; Kost and Kemp 2016). La Tabla 2 resume las diferentes modificaciones introducidas en el sistema BEVS de las que se hablan a continuación.

Tabla 2. Modificaciones del sistema de expresión de baculovirus (BEVS) para mejorar los niveles de producción.

Modificaciones	Efecto	Referencia
Delección del gen <i>quitinasa</i>	↑ proteínas secretadas ↓ degradación proteolítica	Suzuki et al. (1997), Kaba et al. (2004), Hitchman et al. (2010)
Delección del gen <i>cathepsina</i>	↓ degradación proteolítica	Kaba et al. (2004), Hiyoshi et al. (2007), Hitchman et al. (2010)
Introducción de genes <i>vankyrin</i>	↑ producción	Fath-Goodin et al. (2006)
Vectores no líticos	↓ degradación proteolítica	Ho et al. (2004)
Promotores		
<i>ie1</i> (AcMNPV)	↑ producción	Jarvis et al. (1996)
<i>39k</i> (AcMNPV)	↑ producción	Regev et al. (2006)
<i>p6.9</i> (AcMNPV)	↑ proteínas secretadas	Hill-Perkins & Possee (1990)
<i>vp39</i> (AcMNPV, BmNPV)	↑ producción	Thiem & Miller (1990), Ishiyama & Ikeda (2010)
<i>gp64</i> (AcMNPV)	↑ producción	Grabherr et al. (1997)
<i>pB2</i> (<i>T.ni</i>)	↑ producción	López-Vidal et al. (2013)
Introducción de secuencias <i>hr</i>		
<i>hr1</i> (AcMNPV)	↑ producción	Lo et al. (2002), Venkaiah et al. (2004), Tiwari et al. (2010)
<i>hr3</i> (BmNPV)	↑ producción ↓ agregación de proteínas	Chen et al. (2004), Ishiyama & Ikeda (2010)
Eliminación de secuencias non-<i>hr</i>		
<i>ori</i>	↑ estabilidad viral	Pijlman et al. (2002), Pijlman et al. (2004)
Elementos bicistrónicos	↑ estabilidad proteica	Pijlman et al. (2006)
Modificación vector pFastBac™	↑ producción	Shang et al. 2017

Una de las aproximaciones para aumentar la estabilidad de las proteínas expresadas ha sido la delección de genes no esenciales para la replicación del virus en cultivo celular. La quitinasa y la catepsina son dos enzimas responsables del proceso de licuefacción de las larvas en la fase final de la infección por baculovirus (Hawtin et al. 1997), pero su acción proteolítica resulta desventajosa para la expresión de proteínas recombinantes. Diferentes trabajos han mostrado que la delección de los genes virales que codifican para estas dos proteínas permite aumentar la estabilidad y la expresión de proteínas recombinantes secretadas, gracias a una menor degradación de las mismas (Suzuki et al. 1997; Kaba et al. 2004; Hiyoshi et al. 2007; Hitchman et al. 2010b). También se ha descrito que la incorporación de genes *vankyrin* del virus de insectos *Campoplex sonorensis ichnovirus* en los vectores de transferencia para la producción de baculovirus recombinantes, puede llegar a aumentar la producción de proteínas recombinantes hasta en 15 veces (Fath-Goodin et al. 2006). La función de los genes *vankyrin* consiste en la supresión del sistema inmune de las células del huésped (Kroemer and Webb 2004), por lo que al ser insertados en los vectores de expresión de baculovirus se consigue retrasar la lisis de las células infectadas por baculovirus y aumentar el tiempo de producción de las proteínas recombinantes. En la misma dirección, se ha trabajado también en la generación de vectores no líticos mediante mutagénesis aleatoria para conseguir un aumento del rendimiento de producción de las proteínas recombinantes (Ho et al. 2004). Otra de las estrategias para intentar solventar los problemas asociados al uso de promotores tardíos se basa en utilizar promotores virales distintos a los convencionales, los cuales puedan dirigir la síntesis de las proteínas recombinantes en fases más tempranas de la infección, cuando la maquinaria de producción de la célula todavía está intacta. Algunos de los promotores virales estudiados son *ie1* (Jarvis et al. 1996), *39k* (Regev et al. 2006), *p6.9* (Hill-Perkins and Possee 1990), *vp39* (Thiem and Miller 1990; Ishiyama and Ikeda 2010) o *gp64* (Grabherr et al. 1997). También se ha descrito el uso de promotores derivados de insectos, cuyos rendimientos de expresión mejoran con respecto al uso de los promotores convencionales, como es el caso del promotor derivado de hexamerinas de *T. ni pB2* (López-Vidal et al. 2013). Además se han introducido elementos de DNA

que han mostrado una capacidad para mejorar la producción de proteínas recombinantes, como pueden ser las secuencias reguladoras *hr1* de AcMNPV (Lo et al. 2002; Venkaiah et al. 2004; Tiwari et al. 2010) o *hr3* de BmNPV (Chen et al. 2004; Ishiyama and Ikeda 2010). Otro ejemplo es el que describen Gómez-Sebastián et al. (2014) mediante la introducción de diferentes elementos reguladores de baculovirus en *cis* y en *trans*, consiguiendo unos niveles de expresión de proteína recombinante 4 veces superiores con respecto a los baculovirus habituales, así como una mayor vida media de las células infectadas y una mayor estabilidad proteica. Recientemente se ha descrito la mejora de los niveles de expresión de proteínas recombinantes de los vectores pFastBac™. La introducción de un elemento en *cis* de 80 pb aguas arriba del promotor *polh* y la sustitución de la señal de poliadenilación (pA) SV40 por la señal *polh* pA, permite obtener niveles de expresión similares a los producidos por el virus salvaje AcMNPV (Shang et al. 2017). Otras estrategias se basan en aumentar la estabilidad de la expresión de las proteínas recombinantes, acoplando la expresión del gen de interés a un gen esencial por medio de una transcripción bicistrónica, en la que ambos genes se transcriben como un único mRNA separados por una secuencia IRES (*internal ribosome entry site*) (Pijlman et al. 2006). Sin embargo, aunque algunas de estas estrategias han conseguido aumentar los niveles de producción, la mayoría de las veces los rendimientos obtenidos están muy alejados del óptimo.

Para prevenir los efectos negativos derivados del *passage effect*, las investigaciones se centran en el desarrollo de genomas virales más estables. Se ha observado que las partículas víricas defectivas acumulan secuencias non-*hr ori* (orígenes de replicación no relacionados con las regiones homólogas (*hr*)) tanto en AcMNPV (Lee and Krell 1992) como en SeMNPV (Pijlman et al. 2002). Por ello, una de las estrategias ha sido la eliminación de estas secuencias non-*hr ori* del genoma de los baculovirus, dando lugar a baculovirus recombinantes con una mayor estabilidad genómica y con una mejor producción de proteína recombinante tras pases de infección sucesivos (Pijlman et al. 2002; Pijlman et al. 2004). Sin embargo, aunque se consiga estabilizar el genoma viral, a veces se sigue produciendo la

pérdida del gen de interés incorporado en el bácmido, con la consiguiente reducción en la producción de proteína recombinante (Pijlman et al. 2003).

En general, los mecanismos responsables de la aparición de los baculovirus defectivos son poco conocidos y, por tanto, es difícil diseñar estrategias para su control. No obstante, todavía existe un enorme campo de investigación y un potencial en el genoma de los baculovirus para su modificación con el fin de mejorar los rendimientos de producción de proteínas recombinantes empleando el sistema BEVS.

En esta tesis, hemos querido contribuir en la investigación para hacer frente a las distintas limitaciones que presentan los baculovirus como sistema de expresión. Para ello, se han realizado diferentes estudios de interacción insecto-baculovirus que nos han servido de base para la búsqueda y aplicación de modificaciones que permitan mejorar el sistema convencional de expresión en baculovirus tanto en los aspectos de estabilidad como de producción.

OBJETIVOS

Para la realización de la presente Tesis Doctoral se planteó la búsqueda y aplicación de mejoras en el sistema de expresión de baculovirus que permitan aumentar los niveles de producción de proteínas heterólogas con respecto a los sistemas de producción actuales. Para abordar este estudio nos planteamos la realización de los objetivos que se detallan a continuación:

1. Búsqueda de secuencias reguladoras que aumenten los niveles de expresión con respecto a los promotores virales convencionales empleados en el sistema de expresión en baculovirus.
2. Búsqueda de factores que aumenten la estabilidad del genoma de los baculovirus recombinantes para su replicación y expresión de proteínas recombinantes en cultivos celulares.
3. Selección y caracterización de baculovirus recombinantes con mejores propiedades en la producción de proteínas recombinantes, seleccionados a partir de una genoteca en baculovirus de *Spodoptera exigua*.

CHAPTER 1

A novel baculovirus-derived promoter with high activity in the baculovirus expression system

These results are included in:

María Martínez-Solís, Silvia Gómez-Sebastián, José M. Escribano, Agata K. Jakubowska and Salvador Herrero. A novel baculovirus-derived promoter with high activity in the baculovirus expression system. PeerJ. 2016 June 28; DOI 10.7717/peerj.2183.

National patent ES 2 554 561 B1. Nuevos promotores derivados de baculovirus con elevada actividad en sistemas de expresión basados en baculovirus.

1.1. Introduction

Baculoviruses are enveloped, double-stranded DNA viruses pathogenic to invertebrates, preferably Lepidoptera. Their specificity to kill a narrow spectrum of insects and their safety for humans, plants, and non-target insects, make them a good biological control agent. In addition, since 1983, baculoviruses have been extensively used as protein expression vectors in insect cells (Smith et al. 1983). The baculovirus expression vector system (BEVS) has been widely used to produce a large number of recombinant proteins, and several systems using different strategies for the generation of the recombinant viruses have been developed (Li et al. 2012; van Oers et al. 2015). The high popularity reached by this system is due to its ability to produce large amounts of active proteins, together with its ability to introduce post-translational modifications in the expressed protein, similar to mammalian cells, such as glycosylation or phosphorylation (O'Reilly et al. 1994).

Similar to most viruses, the baculovirus gene expression has a temporal regulation which can be divided into 3 main phases: the early, late, and very late phases (Friesen 1997; Lu and Miller 1997; Jarvis 2009). The expression of the early genes does not require prior viral protein synthesis and precedes viral DNA replication. The late phase is a period for viral DNA replication, and the very late phase is characterized by the production of viral particles. In this final phase of infection, the expression of the polyhedrin and P10 structural proteins predominate, and these comprise the major proportion of the cell protein mass. The high transcription yield of the promoters of these two proteins has been exploited in the BEVS to express foreign proteins (Rohrmann 1999). The baculovirus of *Autographa californica* (*A. californica nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV) is the main viral species used as an expression vector for recombinant protein expression using the BEVS. The *polyhedrin* and the *p10* promoters from AcMNPV have been extensively used for the expression of foreign proteins with this system. However, recombinant protein expression yields not only depend on the promoter used, but also on the host cell line, as well as the characteristics of the foreign gene (Morris and Miller 1992). Several strategies have been developed to improve the production of functional proteins in insect cells. For

instance, modification of the expression vectors by the addition of DNA elements involved in protein expression processes can enhance the production yields of recombinant proteins (Lo et al. 2002; Venkaiah et al. 2004; Manohar et al. 2010; Tiwari et al. 2010; Gómez-Sebastián et al. 2014). Nevertheless, one of the main cis-regulatory elements affecting the protein expression levels is the promoter. To date, different types of promoters have been tested in the BEVS to improve recombinant protein expression. Viral promoters such as *vp39* or *39K*, and promoters derived from insect larvae such as the hexamerin-derived promoter *pB2* from *Trichoplusia ni* (López-Vidal et al. 2013) showed high levels of expression of recombinant proteins. In other cases, the combination of some of these promoters with the conventional promoters exhibited higher expression levels of the recombinant proteins than the standard late promoters alone (Thiem and Miller 1990; Morris and Miller 1992; Ishiyama and Ikeda 2010; Lin and Jarvis 2012).

In a previous work, the transcriptional pattern of the *Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus* (SeMNPV) during the infective process in its natural host revealed very high levels of expression for the *orf46* viral gene (Pascual et al. 2012). Since the *orf46* gene codes for the structural protein polyhedron envelope protein (PEP), we hypothesized that its expression could be regulated by a strong promoter. In this study, we have determined the core regulatory sequence for the gene (*orf46*) derived from the SeMNPV and we have examined its ability to drive the expression of recombinant proteins in insect cells using the BEVS. Different sequences upstream of the ATG start codon of the *orf46* gene were cloned, and their promoter activities were tested by the expression of GFP as a reporter gene using the AcMNPV system in different insect cell lines. In addition, the promoter activity of this region was tested when combined with the standard *polyhedrin* promoter derived from the AcMNPV.

1.2. Materials and methods

1.2.1. Culture cells and insects

The *Spodoptera exigua* (Se301) and *Spodoptera frugiperda* (Sf21) cell lines were cultured at 25 °C in Gibco® Grace's Medium (1X) (Life technologies™)

supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). The *Trichoplusia ni* (High Five, Hi5) cell line was cultured at 27 °C in TNMFH medium supplemented with 10% FBS and gentamicin (50 µg/ml). *S. exigua* larvae were maintained in the laboratory, reared on an artificial diet at 25 ± 3 °C with 70 ± 5% relative humidity and a photoperiod of 16/8 hours (light/dark). *Trichoplusia ni* (cabbage looper) larvae were reared on an artificial insect diet and were kept in growth chambers at 22 ± 1 °C under controlled humidity (50%) and light period (8 h/day) conditions.

1.2.2. Sequence identification

The transcriptional regulatory region was determined by *in silico* analysis of the sequences derived from the Roche 454 FLX and Sanger methods obtained from the transcriptome of *S. exigua* larvae which included samples of SeMNPV-infected larvae (at the latest stage of the infection) (Pascual et al. 2012). First, the ten ORFs with the highest expression levels were obtained based on their maximum coverage. Then, the upstream region from the ATG start codon of *orf46* was analyzed *in silico* and manually for the prediction of the transcriptional regulatory region. Using promoter prediction software (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html), we identified a transcription start site and other motifs characteristic for baculovirus promoters. A sequence of 300 bp upstream of the predicted start site was selected as an initial candidate region to act as a promoter.

1.2.3 Construction of recombinant baculoviruses

Several baculovirus-transfer plasmids containing different fragments of the 5' region of the *orf46* gene driving the expression of GFP were generated using the AcMNPV vector system (Figure 1). The GFP gene was initially cloned under the control of the *polyhedrin* promoter (*polh*) to generate the pFB-PL-GFP vector (López-Vidal et al. 2013) (from now, polh-GFP). The initial *pSeL* and *pSeS* promoter sequences were obtained by PCR amplification using SeMNPV genomic DNA as template. PCR amplifications were performed using specific primers which added *Bstz171* and *SpeI* restriction sites. The *polh* promoter was then replaced by the *pSeL* or *pSeS* fragments into the *Bstz171* and *SpeI* sites, to generate the pSeL-GFP and pSeS-GFP vectors, respectively. The *pSeL140* and *pSeL120* sequences were

amplified by PCR from the pSeL-GFP vector using two specific primers. The first primer included the corresponding 5' region of *pSeL* and a *BstZ171* restriction site, and the second primer was designed to amplify from a 3' region of the GFP gene containing an *AvrII* restriction site. These sequences were cloned into the *BstZ171* and *AvrII* sites of the *polh*-GFP vector by replacement of the *polh* promoter, generating the pSeL140-GFP and pSeL120-GFP vectors.

The vector combining two promoters (*polh*-pSeL-GFP) was constructed by modification of the *polh*-GFP vector. The *pSeL120* promoter fragment was obtained by PCR using specific primers which added *XhoI* and *AvrII* restriction sites. The resulting fragment was inserted into the *XhoI* and *AvrII* sites of the *polh*-GFP vector, generating the *polh*-pSeL-GFP vector containing both the *polh* and *pSeL120* promoters in tandem. Additionally, the DNA sequence corresponding to the *p131* (homolog to *orf46* in AcMNPV) promoter was chemically synthesized (GenScript) and flanked by *BstZ171* and *SpeI* restriction sites. This was cloned into a pFB vector to control the expression of the GFP gene, generating the *p131*-GFP vector. Figure 1 shows a schematic representation of all of the different recombinant baculoviruses generated in the present work. The sequences of the primers employed for the cloning of the different constructs are summarized at Anexo 1.

The recombinant baculoviruses were obtained using the Bac-To-Bac® baculovirus expression system (Invitrogen, USA) following the manufacturer's instructions. Plasmids generated in the previous step were used to transform *E. coli* DH10Bac™ heat-shock competent cells and generate the corresponding recombinant bacmids. Bacmids were purified and used to transfect Sf21 cells using Cellfectin® II Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The resulting baculoviruses were collected after 4-5 days of incubation at 27 °C. These baculoviruses were amplified once to obtain high-titer stocks for further experiments, and the viral titers were determined by quantitative PCR (qPCR) using specific primers (Anexo 1). For that purpose, viral DNAs were treated using Prepman reagent (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions and were quantified by comparing the obtained Ct values against a standard curve of known viral concentration. Viral titers used in the standard curve were obtained by end point

dilution, a method that does not consider non-infective viruses. The viral titers were expressed as baculoviruses per milliliter (BVs/ml).

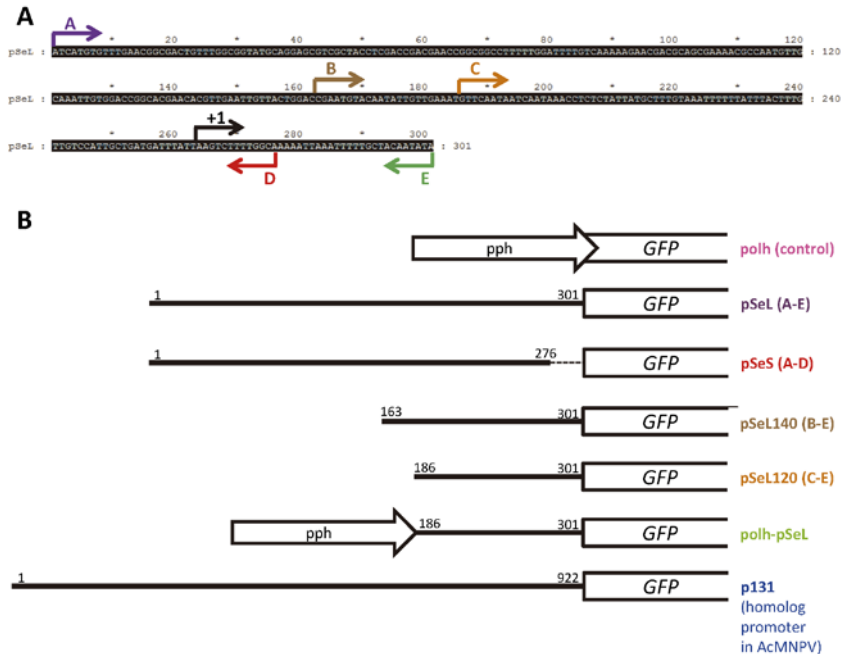


Figure 1. Schematic summary of the recombinant baculoviruses carrying different promoter regions employed in this study. (A) Nucleotide sequence upstream of the *orf46* gene from SeMNPV selected as a regulatory region (nucleotides 45417-47500 from AF169823). The arrows indicate the range of the fragments from the 5' to 3' sequence that were tested for promoter activity and the transcription initiation site (+1). (B) Schematic representation of the recombinant baculoviruses generated which carry different fragments of the sequence upstream of the *orf46* gene to test their promoter activity using GFP as a reporter. The white open arrows (*polh*) represent the *polyhedrin* promoter. The white boxes represent the GFP gene. The numbers indicate the first and the last nucleotides (from 5' to 3') of the sequence that was cloned as a promoter. The dotted line in the *pSeS* construct represents the 5' fragment that is absent.

1.2.4 Infection assays in culture cells and insects

Cells (Se301, Sf21, and Hi5) were cultured in 24-well plates at a confluence of 70%, then the cells were infected with the different recombinant baculoviruses at a multiplicity of infection (MOI) of 5. The cells were collected at different times post-infection by low speed centrifugation (3000 rpm, 5 min) to avoid cell lysis, and kept at

-20 °C until the quantification of GFP expression. Last instar *S. exigua* and *T. ni* larvae were injected with 5 µl of recombinant baculoviruses containing 5x10⁴ BVs. Larvae were maintained at 25 °C and 28 °C, respectively, and after 72 hours post-infection (hpi) were frozen at -20 °C until they were processed for GFP quantification.

1.2.5 Analysis of GFP expression

Frozen cells from the infection assays were resuspended in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% glycerol), incubated for 5 min at room temperature, and centrifugated at 16,000xg for 1 min. The supernatant was collected to measure GFP expression by fluorescence in a microplate reader (Infinite® 200 PRO NanoQuant, TECAN) (excitation 485 nm, emission 535 nm). Each value was obtained by measuring each sample 4 times. Occasionally, the production of GFP was confirmed by direct observation of the GFP protein band in SDS-PAGE, suggesting a good correlation between GFP intensity and protein abundance. Frozen larvae were homogenized in 1 ml of extraction buffer (0.01% de Triton X-100, 1 mM de PMSF, and DTT 25 mM in PBS 1x). Homogenates were centrifuged at 1800 x g for 30 min at 4 °C, and the supernatant was collected to measure GFP as described above. The values correspond to at least two independent replicates for all of the experiments. Statistical analyses were performed by Dunnett's Multiple Comparison Test using the GraphPad Prism program (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA).

1.3. Results

1.3.1. Expression of viral genes and promoter selection

Expression levels of the SeMNPV genes were monitored by mapping of the viral reads on the transcriptome of *S. exigua* infected larvae (Pascual et al. 2012). As expected, the most abundant reads were mapping on the *orf1* which corresponded to the *polyhedrin* gene (Table 1). The second most abundant ORF mapped, corresponded to the *orf46* gene of SeMNPV. *Orf46* codes for the polyhedron envelope protein (PEP), a structural protein that surrounds the polyhedra of the viral particles.

In addition, other genes highly expressed during the infection were *orf127* and *orf122*. Given the high expression observed for the *orf46* gene under our experimental conditions, and its role as a structural protein, we decided to explore the possibility of using its regulatory sequence as a promoter for foreign gene expression using the BEVS.

Table 1. ORFs from the SeMNPV highly expressed during infection of *S. exigua* larvae. (Pascual et al., 2012).

ORF	Description	Coverage ^a
ORF1	Polyhedrin	674
ORF46	Calyx/polyhedron envelope protein	590
ORF127	lef6	516
ORF122	-	416
ORF94	-	347
ORF71	odv-e25	344
ORF65	p6.9 DNA binding protein	262
ORF136	odv-e18	255
ORF32	pkip	224
ORF124	-	204

^aCoverage reported as the maximum coverage (number of reads) for a given ORF after mapping of the SeMNPV genome with transcriptional data.

Detailed analysis of the 454-derived reads mapping to the SeMNPV genome predicted the transcription start site (site +1) of *orf46* at position 89150 (which referred to the reverse complementary SeMNPV genome, GenBank acc: AF169823.1). A region of 301 nt upstream of the start codon of *orf46* from SeMNPV was initially selected as the promoter sequence. The *in silico* analysis predicted a promoter between nucleotides 224-269 from the selected sequence that revealed the presence

of a TAAG motif. This TAAG motif was in an AT rich region, and it was described as a typical transcriptional initiation site of late and very late baculovirus promoters (Lu and Miller 1997).

1.3.2. *Orf46* promoter activity in insect cells

To determine the promoter activity of the region upstream of the *orf46* gene from SeMNPV and its homologous equivalent region in AcMNPV (*p131*), different constructs were obtained and tested for their ability to drive the expression of the GFP reporter gene (Figures. 2 and 3) using the BEVS. Se301, Sf21, and Hi5 cells were infected with recombinant AcMNPV baculoviruses expressing GFP under the different promoter regions, and their activities were compared to the activity obtained with the standard *polyhedrin* (*polh*) promoter from AcMNPV. The GFP expression yields obtained for the 300 bp fragment upstream of *orf46* (*pSeL*) was equivalent to that obtained with the *polh* promoter in the Se301 and Sf21 cells. Interestingly, for the Hi5 cells, the GFP expression mediated by the *pSeL* promoter was about two-fold higher than that obtained using the *polh* promoter. The deletion of the 25 nucleotides in the 3' region of the *pSeL* sequence (*pSeS*) strongly affected its promoter activity in the three cell types tested, revealing the importance of this region in the activity of the *orf46* promoter. The homolog promoter in AcMNPV (*p131*) showed a significantly lower expression level than *pSeL* and the control *polh* in all of the cell lines tested (Figure 2).

In order to further delimit the promoter region, two additional constructs containing 120 and 140 nucleotides upstream of the *orf46* gene were also tested (*pSeL120* and *pSeL140*, respectively). The reduction in the promoter size had a positive impact on the promoter activity in most cases, as the GFP expression was double that seen when compared to the *polh* promoter (Figures. 2 and 3). The highest expression levels were observed for the region consisting of the 120 nt upstream of the *orf46* gene. When compared to the *polh* promoter, *pSeL120* showed an increase in expression of more than two fold in all of the cell lines tested. These results strongly suggest that *pSeL120* could be considered a useful promoter with the capacity to

significantly increase the expression yields obtained with the conventional *polyhedrin* promoter in the BEVS.

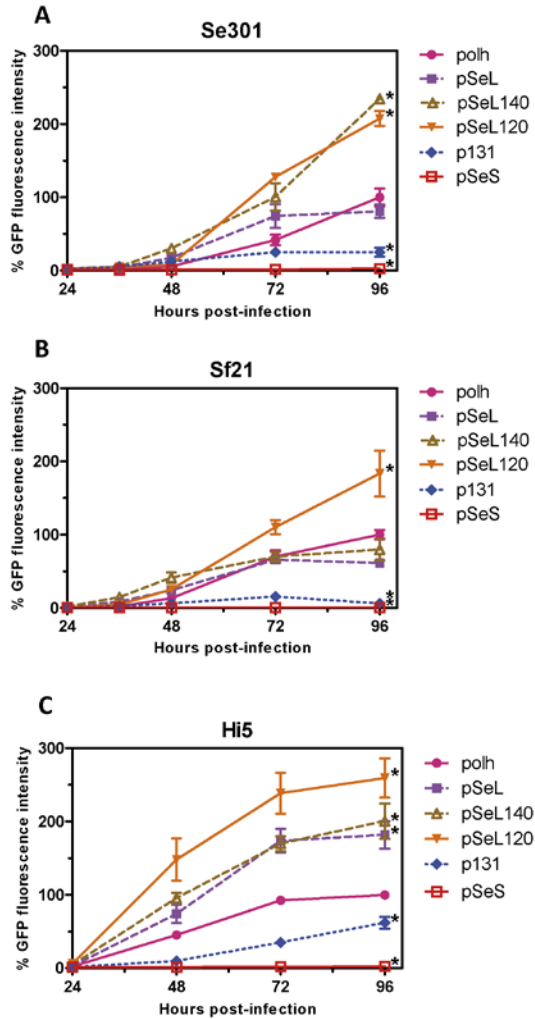


Figure 2. Promoter activity of the sequences upstream of the *orf46* gene. GFP expression, measured as relative fluorescence intensity, in different insect cell lines infected with the different baculoviruses at a multiplicity of infection (MOI) of 5. The fluorescence was measured at different time points after infection of Se301 (A), Sf21 (B), and Hi5 (C) cells. The results are expressed as the relative percentage of GFP fluorescence intensity, taken as 100% of the value corresponding to the maximum intensity obtained with the *polh* promoter. The values are the means of at least two independent assays. The error bars represent the standard error of the mean.

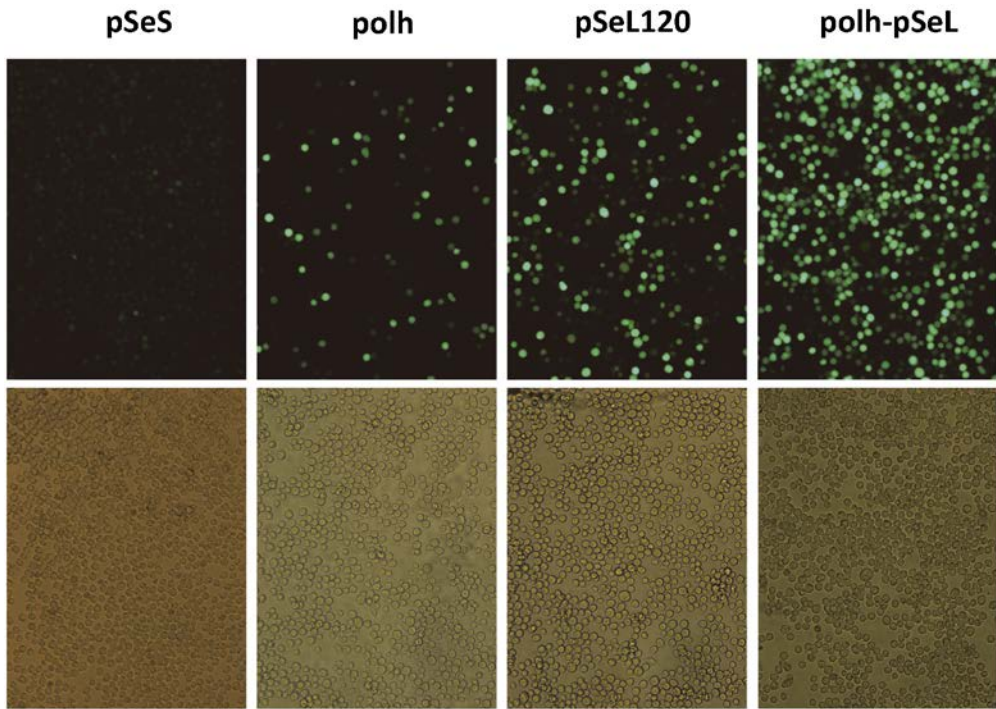


Figure 3. Fluorescence microscopy of Sf21 cells infected with the different baculoviruses. A representative image of Sf21 cells infected with a selected baculovirus at a MOI of 5. The images were taken at 48 hours post-infection.

1.3.3. Activity of the *pSeL120* in combination with standard promoter in insect cells

In a subsequent analysis, a recombinant baculovirus expressing GFP under the control of a promoter combining the *pSeL120* and *polh* in tandem (*polh-pSeL*) was generated and tested for its expression levels. After infecting insect cells with this recombinant baculovirus, we observed an additive effect over the two promoters used separately in different recombinant baculoviruses, increasing the *polh-pSeL* promoter GFP expression to around 3-fold of the levels obtained with the *polh* or *pSeL120* promoters alone (Figures. 3 and 4). This additive effect was observed with small variations in the three insect cell lines tested. These results revealed the potential of

pSeL120 to be combined with other promoters to produce increased amounts of recombinant proteins in the BEVS.

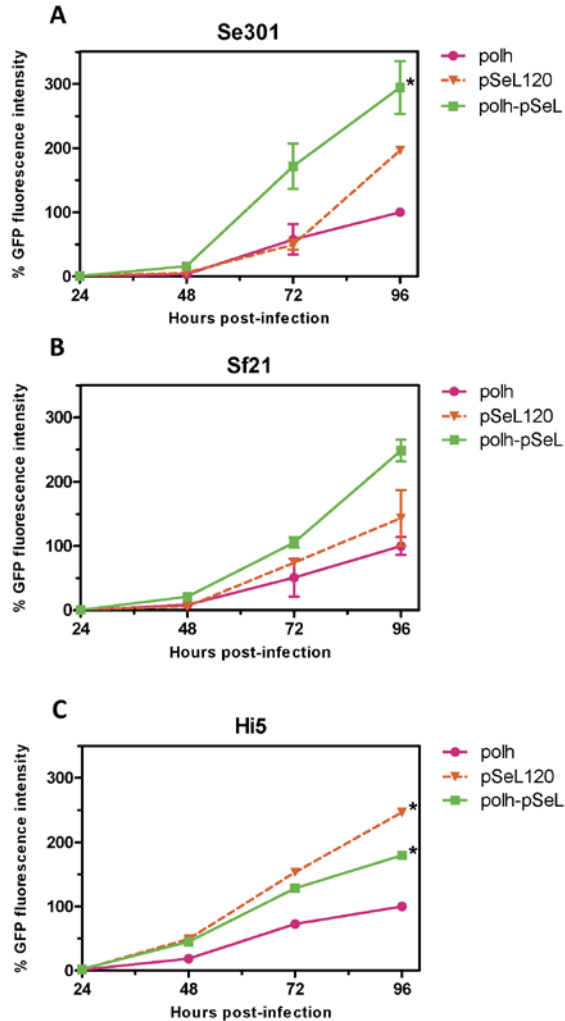


Figure 4. Promoter activity of *pSeL120* when combined with the *polh* promoter. GFP expression, measured as the relative fluorescence intensity, in different insect cell lines infected with the different baculoviruses at a MOI of 5. The fluorescence was measured at different time points after the infection of Se301 (A), Sf21 (B), and Hi5 (C) cells. The results are expressed as the relative percentage of GFP fluorescence intensity, taken as 100% of the value corresponding to the maximum intensity obtained with the *polh* promoter. The values are the means of at least two independent assays. The error bars represent the standard error of the mean.

1.3.4. Activity of the new promoters in baculovirus-infected insect larvae

Although BEVS is mainly used for protein production in insect cell cultures, they can also be used to efficiently produce recombinant proteins in a cost-effective manner by using Lepidoptera larvae. We tested the activity of several of the above described new promoters in larvae from two species of Lepidoptera, the specific host of the SeMNPV, *S. exigua* and *T. ni*, commonly used for protein production using AcMNPV-based vectors. Last instar of *S. exigua* and *T. ni* larvae were infected by intrahemocoelomic injection with the recombinant baculoviruses expressing GFP under the control of every promoter tested. After 48 hpi, the protein production was estimated by measuring the GFP fluorescence of the larval extracts (Figure 5). For all of the viruses tested in both insect species, the GFP production using *pSeL* or *pSeL120* was equivalent to that obtained with a baculovirus expressing this protein under the control of the *polyhedrin* promoter. For the baculovirus comprised of both the *polh* and *pSeL120* promoters, the expression was similar to the *polh* control promoter in *T. ni* larvae, and slightly lower in *S. exigua* larvae.

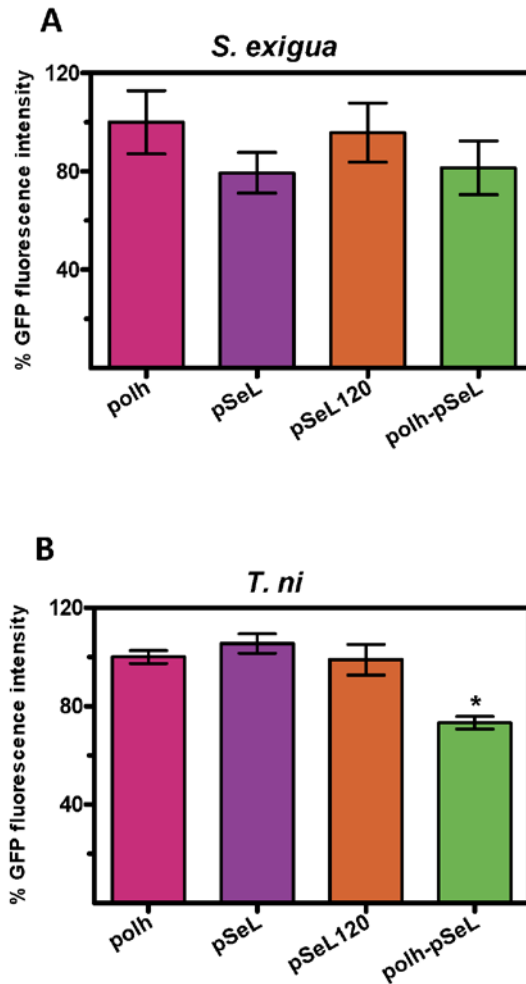


Figure 5. Promoter activity in insect larvae. GFP expression, measured as relative fluorescence intensity, was obtained in insect larvae infected with the different recombinant baculoviruses. The results are expressed as the relative percentage of GFP fluorescence intensity, taken as 100% of the value corresponding to values for the control sequence with the *polh* promoter. The values are the means of at least two independent assays. The error bars represent the standard error of the mean.

1.4. Discussion

Despite the wide use of the BEVS since the early 1980s (Smith et al. 1983), the system remains in terms of productivity very similar to the one originally developed. It is worth pointing out the need for research in the improvement of the productivity by different approaches, as was previously shown for other eukaryotic and prokaryotic production platforms. Several strategies have been attempted to increase the production yields by introducing modifications and improvements at different levels. Some of the improvements in the BEVS have been focused on the modification of viral promoters (Manohar et al. 2010), or the introduction of regulatory sequences (Sano et al. 2002; Tiwari et al. 2010; Ge et al. 2014; Gómez-Sebastián et al. 2014). Other strategies were based on the deletion of non-essential genes of the vector (Hitchman et al. 2010a; Hitchman et al. 2011). One standard strategy is the search for promoters which are stronger than those commonly used, such as the *p10* and *polyhedrin* (*polh*) promoters, or chimeras of them employed in laboratory and industrial production (Thiem and Miller 1990; Ishiyama and Ikeda 2010; Lin and Jarvis 2012; López-Vidal et al. 2013). However, often the efficiency of the promoter also depends on the regulatory sequences around them and the type of cellular lines in which they are acting (Matsuura et al. 1987; Morris and Miller 1992; Gross and Rohrmann 1993; Lo et al. 2002). Thus, the development of new promoters to implement the cost-efficient production of recombinant proteins and to provide alternatives to the traditional promoters, still remains of interest.

Viral genes coding for structural proteins are usually regulated by strong promoters, since they need to be highly translated to produce the viral particles. Thus, they are good candidates to explore in the improvement of the BEVS. The promoter studied in this work regulates the expression of the *orf46* gene from SeMNPV, which codes for the calyx/polyhedron envelope protein (PEP). The polyhedron envelope is an electron-dense structure that forms a smooth, seamless surface that surrounds polyhedra. The function of calyx/PE is to seal the surface of polyhedra and to enhance their stability (Rohrmann 2013). Homologs of the PEP are found in the genomes of all lepidopteran nucleopolyhedroviruses. The PEP is associated with p10 fibrillar

structures, and both proteins appear to be important for the proper formation of the polyhedron envelope (van Lent et al. 1990; Russell et al. 1991; Gross et al. 1994; Lee et al. 1996). PEP from AcMNPV was shown to be associated with BV but not with ODV. It is abundantly produced during the late phase of infection (Wang et al. 2010).

In the present study, we have described a new viral promoter sequence derived from the gene that codes for the structural PEP from SeMNPV, showing better performance than the *polh* promoter in the BEVS in different cell lines. By testing different sequences upstream of the ATG start codon from the *orf46* gene driving the expression of GFP, we have limited the essential promoter sequence. The sequence corresponding to the 120 nt just before the ATG start codon (*pSeL120*) showed the strongest promoter activity when it was functioning in cultured cell lines. On average, the expression under the *pSeL120* promoter was at least 2 times higher than the maximum expression levels reached using the standard *polh* promoter. Other groups have investigated the characterization of new promoters for increased expression yields. Lin & Jarvis (2012) showed that the delayed early *39K* promoter from AcMNPV produced 4-fold more SEAP protein than the *polyhedrin* promoter in Sf21 cells. López-Vidal et al. (2013) isolated the *pB2* promoter (promoter region of the Basic juvenile hormone-suppressible protein 2, BJHSP-2) from the Lepidoptera *T. ni* with activity in Sf21 cells. The *pB2* promoter can drive the expression of GFP earlier in time, but it is not as strong as the *polyhedrin* promoter. Ishiyama & Ikeda (2010) reported that the expression of GFP was increased using the *vp39* late promoter in comparison to the *polyhedrin* promoter in *Bombix mori* cultured cells.

Despite the high level of conservation and similarity between sequences from different virus species, the homolog *p131* sequence from AcMNPV showed the lowest promoter activity, even lower than the control *polh* promoter. Such discrepancy could be explained by the fact that the *p131* transcription start site (predicted *in silico*) is not located in the TAAG region, and this region seems to be very important in order to obtain high expression levels (as mentioned above). Alternatively, it could also be possible that the activity of *p131* in AcMNPV is not as crucial as the *orf46* activity in SeMNPV. This hypothesis is supported by some gene expression data in AcMNPV in the literature. It has been published that the gene expression levels of *pp34* (gene

whose expression is controlled by *p131* in AcMNPV) were considerably lower than the *polyhedrin* and *p10* expression in infected Sf9 cells (Iwanaga et al. 2004). The analysis of the transcriptome of AcMNPV-infected *T. ni* cells also showed lower expression levels of *pp34* in comparison to the *polyhedrin* and *p10* genes (Chen et al. 2013).

An additional improvement with regard to the protein expression was obtained when the *pSeL120* promoter was combined with the *polh* promoter (*polh-pSeL*), resulting in increases of about 3-fold over the *polh* promoter and 1.5-fold over the *pSeL120* promoter alone. Increases in protein production have also been reported by the combination of different promoters. Thiem & Miller (1990) showed that the combination of the *vp39* and the *polyhedrin* promoter enhanced the expression of foreign genes compared to using those promoters alone in Sf cells, because this hybrid promoter showed regulation patterns of late and very late promoters. López-Vidal et al. (2013) also demonstrated an increase in GFP production of more than 20% at early times post-infection, and similar expression levels at very late times post-infection in Sf21 cells using a *pB2-p10* promoter combination, with respect to conventional late promoters.

Although our results have shown a clear improvement of the *pSeL* promoter activity in different cell types, we could not observe such improvement when it was used for protein production in *S. exigua* and *T. ni* larvae. The difference in the promoter activity between the cell lines and larvae could be due to additional factors affecting the replication dynamics and/or promoter activity of the virus, as well as the timing selected for the processing of the larvae. Nevertheless, the *pSeL120* promoter activity in larvae is equivalent to that obtained using the *polh* promoter, and no significant differences were observed, demonstrating that the promoter exhibits versatility and can be utilized in both cell lines (with high activity for a wide range of cell types) and insect larvae (with activity equal to the *polh* promoter).

When compared with homologous sequences in other viral species, we found a region of 50 nt upstream of the ATG start codon that was highly conserved between them. Interestingly, removal of 25 nt of this sequence downstream of the +1 start transcription site in mRNA abolishes the activity of the *pSeS* promoter. This

observation suggests that this region is essential for the strong promoter activity as already proposed in previous studies. Weyer and Possee (1988) showed that the 5'UTR regions are necessary for the maximum activity of the *polyhedrin* and *p10* promoters. In agreement with that, expression levels for foreign proteins are related to the integrity of the 5'UTR region of the *polyhedrin* gene (Matsuura et al. 1987; Luckow and Summers 1988). The sequence located between the TAAG motif and the translation initiation site is known in baculoviruses as the burst sequence (BS) (Weyer and Possee 1988). This is a sequence of about 50 nt required for the efficient expression of viral genes during the very late phase of infection. Studies of mutational analysis regarding the BS region have demonstrated that BS are essential for efficient protein expression (Weyer and Possee 1988; Ooi et al. 1989), which agrees with our results. If we take into consideration that most of those highly conserved 50 nucleotides are included in the 5'UTR of the ORF46 transcript, it seems that the increase in expression found with the *pSeL*-derived promoters is likely influenced by the effect of such sequences with respect to the access provided to the RNAPol, which affects the transcription and translation rates, and even increases mRNA stability. The reason in this case is not known, but it has already been described that an upstream sequence of the AcMNPV *polyhedrin* gene has an important function for mRNA transcription and translation efficiencies (Min and Bishop 1991).

In conclusion, the sequence derived from the SeMNPV genome described in this work represents a new promoter which is able to express, in most cases, higher yields of foreign proteins than the *polh* promoter in the BEVS. Moreover, the combination of *pSeL* with the conventional *polh* promoter showed higher activity for the expression of GFP than the *pSeL* or *polh* promoters alone. Although additional validations of this promoter for the expression of recombinant proteins other than GFP would be needed, these results represent a new improvement in the production of recombinant proteins using the BEVS, with potential application in the cost-efficient large-scale industrial production of biologics.

CHAPTER 2

Expression of the *lef5* gene from *Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus* contributes to the baculovirus stability in cell culture

These results are included in:

María Martínez-Solís, Agata K. Jakubowska and Salvador Herrero. Expression of the *lef5* gene from *Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus* contributes to the baculovirus stability in cell culture. *Appl Microbiol Biotechnol* (2017) 101:7579–7588. DOI 10.1007/s00253-017-8495-y

2.1. Introduction

Baculoviruses are a broad group of enveloped, double-stranded DNA insect viruses which are characterized by their generally high species-specificity, with more than 50 species described so far (International Committee on Taxonomy of Viruses 2016). Their pathological characteristics make them suitable for use as biopesticides in pest control (Bonning and Hammock 1996; Inceoglu et al. 2001). In addition, some baculoviruses have been engineered to be used as vectors to express recombinant proteins in insect cultured cells (Hitchman et al. 2009; Contreras-Gómez et al. 2014; Kost and Kemp 2016) and, more recently, as gene-delivery vectors for gene therapy in mammalian cells (Hu 2008; Airene et al. 2013; Kost and Kemp 2016).

The conventional way to produce baculoviruses for different commercial purposes relies on *in vivo* propagation in susceptible larvae. This method, although effective in viral production, has some disadvantages due to the difficulty of scaling-up the production, and it is also labor intensive, increasing the final cost of the product (Beas-Catena et al. 2014). Thus, to cope with the current increased demand, an efficient large-scale production of baculoviruses in a continuous cell culture system (bioreactor) is highly demanded. This system presents some advantages, such as the low cost of production and the easy handling of cells. However, one of the major limitations in cell culture production is the so-called passage effect. This phenomenon was first described by Tramper and Vlak (1986) and it is characterized by the occurrence and accumulation of defective viruses containing genomic mutations upon several successive infection passages. The result is a decrease in productivity and virulence, generating ineffective viruses for use as biopesticides or low yield of heterologous proteins when they are used as protein expression vectors.

Deletions of genomic fragments are one of the most common genomic alterations described for defective viruses (Krell 1996). The viruses start to lose fragments of their genome through the infective passages, generating smaller sized viruses. These defective viruses present a selective advantage in the replication process, so they are imposed rapidly in the population (Giri et al. 2012). Although the defective viruses can be present in natural virus isolates from infected larvae (Muñoz

et al. 1998; Pijlman et al. 2001), the passage effect and the accumulation of these non-infective forms have been described only in cultured cells. Pijlman and co-workers have reported in several studies the accumulation of defective viruses upon serial passages in Sf21 cells using recombinant AcMNPV carrying GFP (Pijlman et al. 2001, 2003) and also in wild-type SeMNPV infecting the Se301 cell line (Pijlman et al. 2002). In some cases the loss of DNA can reach 43% of the viral genome (Pijlman et al. 2001). In other cases the spontaneous deletion of the BAC vector from the recombinant viral genome was observed, as it was described in Pijlman et al. (2003).

In the present work, to gain information on the molecular factors that could influence the formation of defective viruses in cell culture, we performed a transcriptional analysis of viral expression genes in *Spodoptera exigua* larvae and cultured cells for two species of baculovirus, the generalist AcMNPV and the host-specific, SeMNPV. The results showed some differentially expressed genes when the viruses were replicated in larvae in comparison with insect cells. The most differentially expressed gene in both systems was identified as *lef5*. Taking into account this observation with the occurrence of the passage effect in cell cultures, we hypothesized that the function of the *lef5* gene could be related with the baculovirus stability. This hypothesis was tested by studying the effect of *Se-lef5* expression on the genomic stability after successive replicative passages in cell culture.

2.2. Materials and Methods

2.2.1. Cells, insects and viruses

S. exigua (Se301) (Hara et al. 1993) and *S. frugiperda* (Sf21) (Vaughn et al. 1977) cell lines were cultured at 25°C in Gibco® Grace's Medium (1X) (Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), according to standard cell maintenance procedures. *S. exigua* larvae were maintained in the laboratory, reared on an artificial diet at 25 ± 3°C with 70 ± 5% relative humidity and a photoperiod of 16/8 hours (light/dark). The viruses used in the experiments for the transcriptional comparison between larval and cellular infections

were the SeMNPV (Ox4 isolate) (Muñoz et al. 1999) and the AcMNPV (C6 isolate) (Ayres et al. 1994), which are available from our laboratory at the Universitat de València. The procedure for virus multiplication and infection of the Se301 cells has been previously described in (Jakubowska et al. 2013). For larval infection, *S. exigua* L5 larvae were injected with 10 µl of virus suspension at a dose of 5×10^3 Tissue Culture Infective Dose (TCID₅₀)/larvae. After injection, the larvae were given a piece of fresh diet and were reared individually until dissection (36 hours after injection).

2.2.2. Microarray design, hybridization, and analysis

A 44K Agilent (Santa Clara, CA, USA) oligonucleotide microarray was previously designed to study different aspects of the interaction of *S. exigua* larvae with viruses (iflavirus and baculovirus) and bacterial pathogens (Bel et al. 2013; Jakubowska et al. 2013, 2016). In that sense, the array comprised mainly of probes representing unigenes from the *S. exigua* transcriptome (Pascual et al. 2012; Jakubowska et al. 2013), but also included 60-mer probes for the predicted open reading frames (ORFs) from the SeMNPV (Ijkel et al. 1999) and AcMNPV (Ayres et al. 1994) genomes that were of relevance for this study. For each virus and ORF, two different 60-mer probes were included (Anexo II and III). The probes were designed using the eArray application from Agilent (Santa Clara, CA, USA).

Total RNA was extracted using RNeasy reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH), according to the manufacturer's protocol. To further purify RNA, an RNeasy Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) was used following the protocol provided by the manufacturer. The quality of RNA was assessed by an Agilent 2100 Bioanalyzer using the Eukaryote Total RNA Nano protocol. Agilent One-Color Spike-in Mix was added, and 600 ng of total RNA was used for cRNA (complementary RNA) synthesis. The obtained cRNA (1.65 µg) was fluorescently labeled with cyanine-3-CTP, fragmented, and hybridized to *S. exigua* microarray slides following the One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Quick-Amp labelling) protocol. Microarrays were scanned using a G2505B Agilent scanner and data were extracted using Agilent Feature Extraction 9.5.1 software. Spike-in transcripts are a mix of unique 55-mer probes that specifically anneal to complementary control probes on

Agilent's microarrays and were used for linear normalization performed by the Agilent Extraction 9.5.1 software. Before data analysis, hybridization quality control reports were verified as correct. RNA labelling and hybridization, as well as array scanning, and data extraction were performed by the Microarray Analysis Service of Principe Felipe Research Centre (CIPF, Valencia, Spain) following standard protocols.

Data analysis was performed using Babelomics 4.3 software (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>) (Medina et al. 2010). First, between-arrays normalization was performed using the quantile normalization method in Babelomics (Bolstad et al. 2003). For those probes having low signal levels for one of the samples (as indicative of the absence or very low expression in one of the samples), changes in gene expression were estimated by comparison with the overall background intensity. For each viral gene included in the arrays (two independent probes), the expression value was obtained as the average intensity obtained for both probes. For each type of virus, normalized arrays of the cell-infected samples were compared to larvae-infected samples and differences expressed as a fold-change between both conditions.

2.2.3. Preparation of recombinant baculoviruses

The recombinant baculoviruses were generated using the Bac-To-Bac® baculovirus expression system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) of AcMNPV following the manufacturer's instructions. For construction of the donor vectors, we used the pFastBacDUAL (pFBD) vector as a backbone. To generate the control recombinant virus (pFBD-*gfp*), the green fluorescent protein (GFP) gene was cloned under the control of the *polyhedrin* promoter using the *NotI* and *PstI* restriction sites. To generate the recombinant virus for the *Se-lef-5* gene expression (pFBD-*Se-lef5*), we amplified by PCR the corresponding sequence from SeMNPV genomic DNA using specific primers (Anexo IV). The amplified sequence was cloned under the control of the *p10* promoter into the pFBD-*gfp* vector using the *NheI* and *XhoI* restriction sites. Figure 1 shows a schematic representation of the recombinant baculoviruses generated in this study.

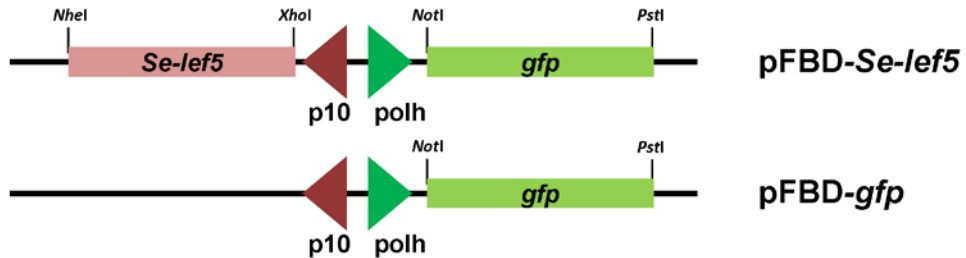


Figure 1. Schematic representation of recombinant baculoviruses. The *lef5* gene from SeMNPV (*Se-lef5*) and *gfp* genes were cloned under the control of the *p10* and *polyhedrin* (*polh*) viral promoters, respectively, using the pFastBacDual (pFBD) vector as a backbone. Both genes were cloned using the restriction sites shown in the scheme.

To generate the corresponding recombinant bacmids, the donor vectors were used to transform *E. coli* DH10Bac™ heat-shock competent cells, containing the AcMNPV bacmid and the pMON7124 helper plasmid following the procedure described for the Bac-to-Bac system. Bacmid DNAs were then used to transfect Sf21 cells using Cellfectin® II Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Two independent bacmid clones from each construction were used to generate the recombinant viruses to be used as replicates in the subsequent infection assays. The resulting baculoviruses were collected after 4-5 days of incubation at 27°C. These baculoviruses were amplified once to obtain the viral stocks that were defined as passage zero (P0). The stocks were titrated by quantitative PCR (qPCR) as previously described in the Chapter 1 (Martínez-Solís et al. 2016). The titers were expressed as baculoviruses per milliliter (BVs/ml). These recombinant baculoviruses are available from our laboratory at the Universitat de València.

2.2.4. Cell infection and serial passages

The P0 viral stocks were used for the first passage of infection in cultured cells. Sf21 cells were cultured in 6-well plates at a 50-60% of confluence. In the first experimental setting, cells were infected with the recombinant viruses at a multiplicity

of infection (MOI) of 0.05. The cells were incubated at 27°C, and 5 days post-infection the samples were collected. The medium containing the multiplied virus was centrifuged at 3000 rpm for 5 min to spin down the cells. The cell pellets were kept at – 20 °C until RNA extraction for checking the *Se-lef5* expression, and the budded viruses (BVs) in the supernatant were kept at 4°C for viral quantification and to perform the subsequent infection passage as described above. In total, fifteen infection passages were completed for each recombinant baculovirus. Two independent viral clones were used for each virus and condition tested. Then, we performed an additional experiment infecting the cells at a MOI of 5 following the same methodology described.

2.2.5. Virus titer determination and gene copy number determination

The copy number for the different genes (*DNApol*, *gfp*, *p74*, *pif1* and *lef3*) were quantified by qPCR using specific primers (Anexo IV). For that, total viral DNA from the BVs in the supernatant collected after each passage was prepared using PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions, and qPCRs were carried out in StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reactions were performed using 5x HOT FIREPOL EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) in a total volume of 20 µl. Cycle threshold (Ct) values obtained from the *DNApol* gene were used to calculate the viral titers by comparison against a standard curve of known viral concentration as previously described in the Chapter 1 (Martínez-Solís et al. 2016). The viral titer was obtained after each infection passage and served as an indirect way to follow the replication. Ct values obtained from the *gfp* gene were used to calculate the relative abundance of this gene after each infection passage, while Ct values from *p74*, *pif* and *lef3* genes were used to calculate the relative abundance of these genes only after the first and last infection passages. The relative abundances were calculated as fold-change ($2^{-\Delta Ct}$), where ΔCt is $\Delta Ct_{\text{passage 1}} - Ct_{\text{passage X}}$, and serves as a measure of the viral stability of different parts of the genome. The represented values correspond to two replicates using two different recombinant baculoviruses from each construct. Statistical analyses were

performed by paired t-test using the GraphPad Prism program (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA).

2.2.6. Gene expression of *Se-lef5*

Expression levels of *Se-lef5* were analyzed after the first and last passages. For that, total RNA extraction was carried out using TriPure isolation reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA was used for cDNA synthesis using PrimeScript RT Reagent kit (Takara Bio Inc, Otsu Shiga, Japan). RT-qPCR was performed with 5x HOT FIREPOL EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) following standard protocols and measured in StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). To evaluate the gene expression, the *ATP synthase* gene from the Sf21 cells was used as reference. Data were statistically analyzed with an ANOVA using the GraphPad Prism program (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA).

2.3. Results

2.3.1. Different viral gene expression patterns in cell lines and *S. exigua* larvae

To explore possible differences in baculoviral gene expression between the cellular and larval conditions, transcription profiles of all the predicted ORFs from the SeMNPV and the AcMNPV viruses at 36 hpi were investigated in infections of Se301 cells and *S. exigua* larvae using custom DNA-microarray. As expected for an active infective process, the expression was generally high for most of the genes in both viruses and for both types of systems. After normalization of the intensity of the viral probes between samples, the relative expression for each of the ORFs in each system was compared (Figure 2). In general, the overall expression pattern in each of the viruses was similar between the cellular and larval conditions. This fact is reflected in an overall similar shape of the graphical representations of the expression values for each viral gene in cell culture and larvae (Figure 2). Quantitative comparison between conditions of the expression values revealed that about two thirds of the ORFs

showed a statistically different level of expression (t -test $P < 0.05$) (<https://figshare.com/s/17398dc48abf0b48a900>). Nevertheless, due to the difficulties in exactly synchronizing the infection timing in cell culture and larvae, small differences in gene expression could be attributed to mainly differences in the infection timing without any connection to the actual differences in viral replication in both systems. Based on that, we focused our attention on those genes having considerable differences (>20-fold differences) in gene expression between both systems (Table 1).

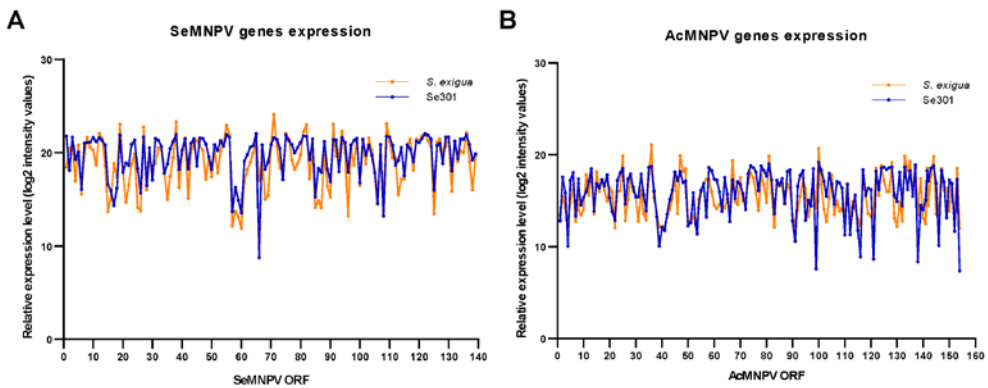


Figure 2. Gene expression patterns of different baculoviruses replicating in insect cells and larvae. SeMNPV (A) and AcMNPV (B) gene expression pattern after 36 hours of infection of *S. exigua* larvae and Se301 cells. Viral genes are represented in the x-axis according to the ORF number in their genomes. The expression levels (y-axis) are represented as log₂ of the normalized expression values (microarray data) for the viral genes when infecting Se301 cells or *S. exigua* larvae.

In the case of SeMNPV infections, *lef5* (ORF66) was strongly overexpressed in larval infections (315-fold) when compared to the infection in Se301 cells. Although to a lower degree, *lef7* from SeMNPV (ORF17) was also overexpressed in larval conditions (23-fold). Similarly, in the case of AcMNPV infections, the *lef5* (ORF99) gene was also strongly overexpressed in larval conditions (96-fold). In addition, the ORF138 (*p74* gene), ORF121, and ORF154 from AcMNPV were also overexpressed in larval conditions (about 30-fold). For the genes overexpressed in cell conditions,

only one gene, *ORF66* from SeMNPV, showed remarkable differences between both systems.

Table 1 Overexpressed viral genes after 36 hours of infection in *S. exigua* larvae and Se301 cells (>20-fold differences) .

	ORF number	Description	Fold Change
<i>Overexpressed in larvae</i>			
SeMNPV	66	<i>lef5</i>	315
	17	<i>lef7</i>	23
AcMNPV	99	<i>lef5</i>	96
	138	<i>p74</i>	35
	121	unknown	32
	154	unknown	25
<i>Overexpressed in cells</i>			
SeMNPV	96	unknown	25

The results found here for the two types of baculoviruses revealed a clear difference between virus replication in cell culture and larvae for the expression of *lef5*. Accordingly, the lower expression of this gene in cell culture could be playing a role on the formation of defective viruses, a characteristic of the baculovirus replication in cell culture. To test such a hypothesis, we further investigated if overexpression of *Se-lef5* could contribute to increasing the stability of AcMNPV during serial passages of this virus. For that, recombinant viruses expressing the GFP protein as a reporter of the viral integrity and *Se-LEF5* were constructed and their

genomic stability during serial passages at low and high multiplicities of infection (MOI) were evaluated.

2.3.2. Virus replication was stable along the passages

Virus replication during the different passages was measured for both MOI and for both recombinant baculoviruses. The viral titer after each replication passage was estimated by quantification of the *DNA polymerase (DNApol)* gene copy number by qPCR. This gene is considered essential and it is expected to be stable along the different passages. Regardless of the initial concentration of virus (MOI 0.05 and 5) used in each passage, we observed that the virus multiplication capacity was stable along the different passages, and always reached a final viral titer of about 10^8 BVs/ml (Figures 3A and C), similar to the P0 stock viral titer. No differences were observed between the viruses expressing *Se-lef5* and its control lacking *Se-lef5* (Figures 3A and C). Thus, the overexpression of the *Se-lef5* gene seems not to have a negative effect on the ability of the virus to multiply. In addition, expression levels of *Se-lef5* gene was also tested by qPCR at the first and the latest passage. For all the experimental conditions and replicates, the expression of the *Se-lef5* gene was maintained high until the latest passages (data not shown).

2.3.3. Loss of the *gfp* gene was reduced when *Se-lef5* was overexpressed

To monitor the viral genome stability during successive infection passages, we evaluated the stability of the GFP reporter, a non-essential gene that is not expected to be under selection in insect cells. The presence of the *gfp* gene in the viral genome after each passage was quantified by qPCR. By measuring the decrease in the relative *gfp* gene copy number during passages we could detect non-stable viruses due to the loss of the transgene. The accumulative production of deleted viruses with passage was observed for both recombinant viruses, and this accumulation was greater at the low MOI (Figures 3B and D). However, in the recombinant viruses expressing the *Se-lef5* gene, the level of deleted viruses with passage is not as high as in the absence of *Se-lef5*. Thus, an effect of *Se-lef5* was observed in the reduction of the formation of deleted viruses in the two MOIs used in the experiments. An additional confirmation of the effect of the *Se-lef5* gene in reducing viral instability was

directly obtained by observing the number of infected cells expressing GFP. Along the infection passages, the control viruses showed a quicker loss of GFP expression than those viruses expressing the *Se-lef5* gene, since fewer GFP-expressing cells were observed (Figure 4). As observed in Figure 3, at passage number 10 no GFP-expressing cells were observed in those cells infected with the control virus, whereas many of the cells infected with viruses expressing the *Se-lef5* gene were still able to express GFP. These results support the role of the *lef5* gene in increasing the stability of baculoviruses in cell culture.

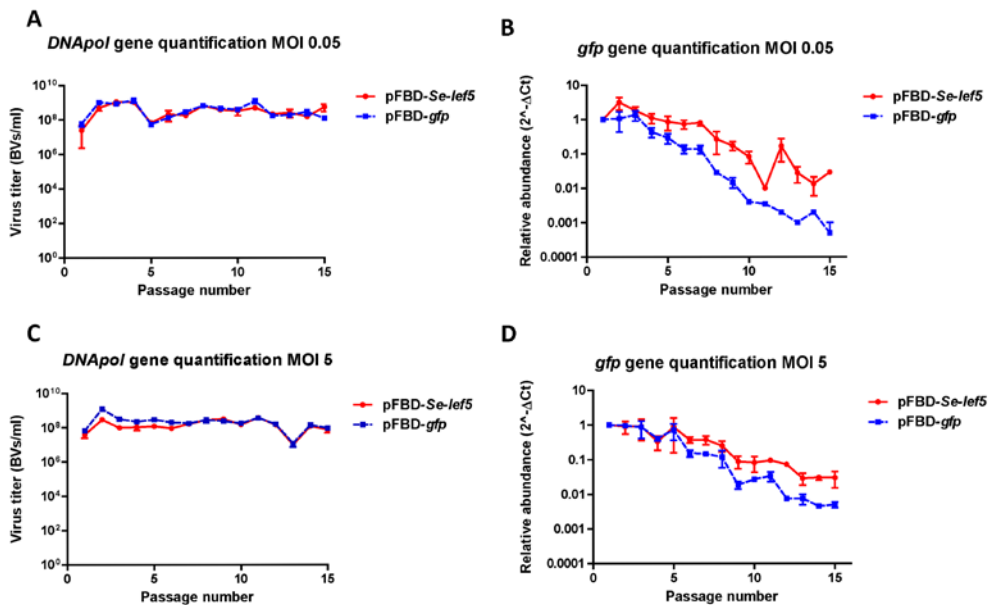


Figure 3. Baculovirus genome stability after serial passages. Virus titers expressed as BV/ml after each infection passage in Sf21 cells at a MOI of 0.05 (A) and 5 (C). Relative abundance of the *gfp* gene copy number after each infection passage in Sf21 cells at a MOI of 0.05 (B) and 5 (D). Paired *t*-test revealed significant differences for B (P -value = 0.0153) and D (P -value = 0.0123).

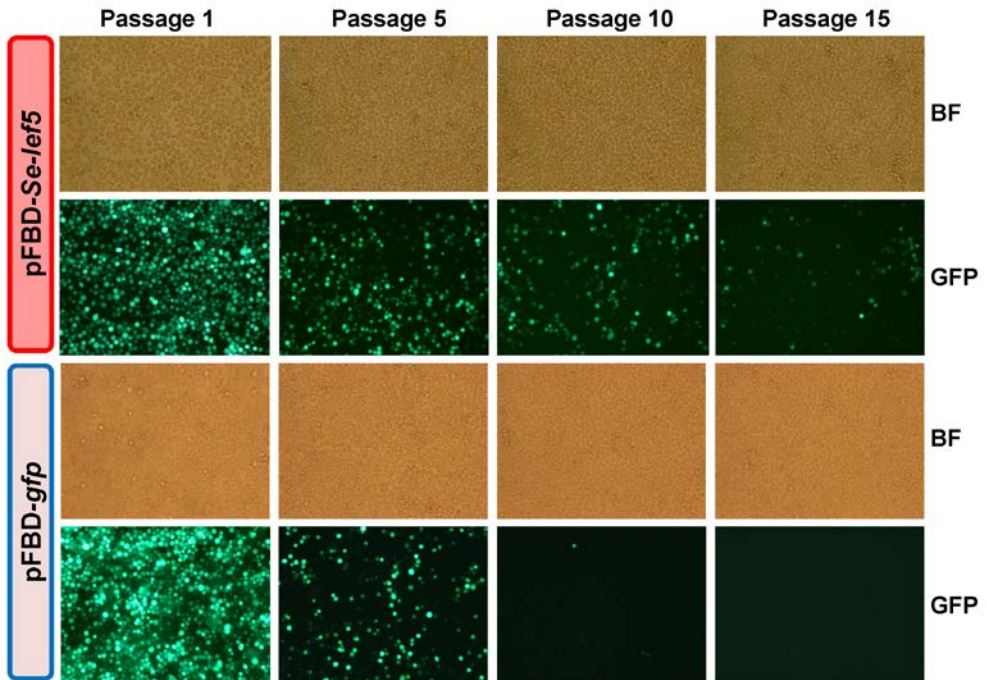


Figure 4. Effect of serial passage on the GFP expression of infected Sf21 cells. Sf21 cells expressing GFP at different passages after infection with both recombinant baculoviruses. The pictures were taken 5 days after infection at MOI 0.05. BF = bright field, GFP = green fluorescent protein.

2.3.4. Genomic deletions were mainly occurring at the GFP locus

In order to determine if viral instability was affecting other regions of the AcMNPV genome, we also monitored the stability of additional genes during serial passages in insect cells. For that, we measured the copy number of some essential (*lef3*) and non-essential (*p74* and *pif1*) viral genes at the end of the passages. Unlike the *gfp*, the other analyzed genes were more stable and did not show a significant decrease in the copy number after the serial passages, independently of the viral construct or the MOI tested (Figure 5). Nevertheless, there was a slight tendency to a lower copy number for non-essential genes (*p74* and *pif1*) in control viruses when compared with the viruses expressing the *Se-lef5* gene. However, the copy number for the *lef3* gene, described in literature as an essential gene, remained more similar between both viral constructs after the passages (Figure 5). These results suggest

that the deletions associated with the passage effect in recombinant baculovirus strongly affect to transgenes than to the baculoviral genes.

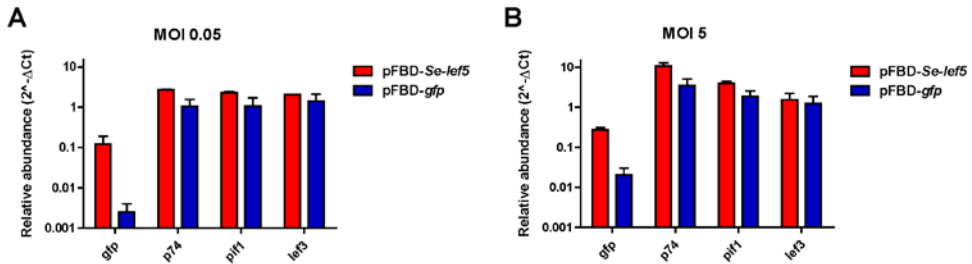


Figure 5. Gene copy number determination after the last passages. Relative abundance of different genes after fifteen serial passages in Sf21 cells at a MOI of 0.05 (A) and 5 (B). Values are normalized to the copy number at passage 1.

2.4. Discussion

The increased commercial use of baculoviruses as biopesticides as well as a protein expression system requires an efficient scalable method for viral replication (Tramper and Vlaskovska 1986; Ikonomou et al. 2003). The baculovirus production *in vitro* using insect cell cultures is an easy and efficient method to achieve large quantities of baculovirus. However the major limitation for baculovirus production in cell culture is the occurrence and accumulation of defective viruses containing genomic deletions upon several successive infective passages (Krell 1996). The emergence of these defective baculoviruses by serial passages in insect cell culture systems (Lee and Krell 1992) and also in bioreactors (Kool et al. 1991) generates a decrease in productivity and virulence, via the production of non-infective baculoviruses. As a consequence, they are no longer effective as insecticides and this also has effects in other areas of the biotechnology industry, such as the production of heterologous proteins due to a production decrease, as described by Pijlman et al. (2003).

By comparing the expression patterns of the SeMNPV and AcMNPV viruses infecting *S. exigua* larvae and Se301 cells, we have detected a set of genes differentially expressed between both systems which were considered as candidates

to play a role in baculovirus replication and stability. The most interesting candidate was identified as *lef5* (*ORF66* in SeMNPV and *ORF99* in AcMNPV). The *lef5* gene appeared as the most overexpressed gene in larval conditions with a 315- and 96-fold increase in the SeMNPV and AcMNPV infections, respectively. The *lef5* gene was first identified in AcMNPV as a gene involved in the late and very late expression (Passarelli and Miller 1993), and later its function as a late transcription initiation factor was demonstrated (Guarino et al. 2002). More recently, it has been shown that LEF5 is localized in the cell nucleus during viral infection and plays a role in the production or stability of late transcripts and viral replication (Su et al. 2011). Based on our experimental evidence and previous information, we hypothesized that the *lef5* gene expression could be playing a role in baculovirus stability. Since it was previously demonstrated that *lef5* from SeMNPV is able to functionally replace the AcMNPV *lef5* (Berretta and Passarelli 2006), we evaluated if Se-*lef5* gene overexpression affects the AcMNPV stability when replicates in cell culture.

In agreement with our hypothesis, successive passages in Sf21 cells with recombinant AcMNPV expressing GFP as marker of the genome stability revealed that those viruses carrying the Se-*lef5* gene under a strong promoter (*p10*) were more stable than their counterpart controls. While the virus titers along the passages were equally stable for both viral constructs, we observed a reduction in the presence of the *gfp* transgene for both recombinant baculoviruses. However, the reduction of the *gfp* gene copies was significantly lower for the Se-*lef5* viruses than for the control viruses for the two MOI analyzed. Therefore, Se-*lef5* gene overexpression increases the baculovirus stability in our cell culture conditions. In order to check if deletions were affecting other regions in the AcMNPV genome, we check the copy number of some essential and non-essential genes. The *p74* and *pif1* genes are involved in processes related with baculovirus oral infectivity and are considered as not necessary for infection in cultured cells (Rohrmann 2013), so we would not expect to be under selection during the passages. In contrast, the *lef3* gene, is an essential gene for DNA replication (Lu and Miller 1995), and we would not expect its deletions during the different passages. Surprisingly, we hardly detected instability for those genes in any of the recombinant viruses limiting the observation of the possible effects of LEF5

overexpression on the genome stability. Nevertheless, a slightly trend to an attenuated loss of the non-essential genes in the LEF5-overexpressing viruses was observed. These results suggest that, in our system, deletions due to passage effect are mainly affecting the transgenes introduced in the recombinant baculovirus and *Se-lef5* gene overexpression could prevent the loss of recombinant protein production in insect cell cultures. It is possible that our experimental system using the Bac-to-Bac system, where the transgene is flanked by the the terminal arms of transposon tn7, could also influence on the greater instability of the transgenes when compared to the other non-essential genes.

LEF5 activity was previously associated with an increase in the transcription from both the late and very late viral promoters (Guarino et al. 2002). Accordingly, the *lef-5* knockout in AcMNPV caused a drastic reduction in the expression of the late genes (Su et al. 2011). Interestingly, the lower expression of the *lef-5* gene found in cells infected with AcMNPV and SeMNPV was not associated with the reduction of the transcripts for other late and very late genes. These results suggest that low levels of *lef-5* transcription found in cell culture are enough to promote the expression of the late and very late genes. In addition, it also suggests that the *lef-5* gene could also be involved in regulating the expression of host genes during the infective process, and the product of those genes could play a role in viral genome stability. Further experiments to analyse the effects of the *lef-5* gene on host gene expression could provide interesting information on the host factors that may be involved in the generation of defective baculoviruses.

Although the overexpression of the *Se-lef5* gene in our experimental setting increases the transgene stability in recombinant baculoviruses in insect cell cultures, it was not enough to completely prevent the occurrence of deleted viruses. We used the *p10* viral promoter to drive the expression of *Se-lef5*, which is a very strong but late promoter. We cannot discount the possibility that an earlier expression of the *lef5* gene (before the start of DNA replication) could have a stronger effect on preventing the accumulation of deleted viruses. It would be interesting to test the viral genome stability when the *lef-5* gene is overexpressed using an earlier promoter such as the *IE1* promoter, or the *39K* promoter. Both promoters have been tested in recombinant

baculovirus infection obtaining high expression levels (Lin and Jarvis 2012). Alternatively, the use of stable cell lines constitutively expressing the *lef5* gene could be tested, ensuring the expression throughout the whole replication cycle.

From the successive infection passages we also could observe that deleted viruses accumulated slightly faster when infected with a lower MOI. In contrast, it has been described that higher MOI inoculums result in the increased accumulation of defective viruses and the reduced production of recombinant proteins (Wickham et al. 1991). Wickham et al. (1991) suggest that high MOI facilitates replication of defective viruses due to the co-infection of cells with an intact virus. According to our data, deleted viruses observed in this study seem to be self-replicative and does not required from the complementation with other viruses. Under those circumstances, it is likely that infections at lower MOI, would allow additional rounds of replications within the same passage that could explain the higher instability at lower MOI. Nevertheless, the increasing stability after the overexpression of *Se-lef5* was observed for both MOI tested, and suggests that the effect of the *lef5* gene on viral replication stability is independent of the MOI used.

Although *lef5* was the only gene found highly differentially expressed (100-300 fold) when the viral replication was compared between larvae and cell culture for both viral types, other differentially expressed genes were also identified for each of the viruses. Some of the strongly overexpressed genes were of unknown function (*ORF121* and *ORF154* from AcMNPV). The *ORF17* from SeMNPV was identify as the *lef7* gene (Thézé et al. 2014). Expression of this gene could also be influencing in viral stability since its homologous in AcMNPV has been reported to enhance baculovirus DNA replication and gene expression (Mitchell et al. 2013). The *ORF138* from AcMNPV (*p74*) was the first *pif* (per os infectivity factor) described in baculoviruses (Kuzio et al. 1989; Faulkner et al. 1997). It has been extensively studied, suggesting that its expression plays an essential role in the baculovirus binding to the larval midgut and in vivo primary infection (Haas-Stapleton et al. 2004). Although its role has never been linked to viral replication, *p74* could also be a good candidate to study its possible function in baculovirus stability in cell cultures.

In summary, the gene expression analysis of two different species of baculovirus have shown a very strong underexpression of the *lef-5* gene when the viruses replicate in cell culture conditions. Additional experiments revealed that overexpression of *Se-lef5* in recombinant AcMNPV contributes to increasing the transgene stability of recombinant baculoviruses, one of the limiting factors for the production of baculoviruses in cell culture. This work shed light on the viral factors that could be involved in the accumulation of defective viruses when baculoviruses replicate in cell culture, and opens new ways to facilitate the *in vitro* production of recombinant proteins using the baculoviruses expression vector system.

CHAPTER 3

Screening for host genetic factors
increasing the expression of
recombinant proteins using BEVS

3.1. Introduction

The baculovirus expression vector system (BEVS) (Smith et al. 1983) is one of the most robust technology for the efficient production of recombinant proteins using cultured insect cells. It is widely used in industry and research laboratories due to its versatility and advantages against other expression systems, since it offers the possibility to express several proteins at the same time and it can introduce post-translational modifications similarly to eukaryotes (O'Reilly et al. 1994; Altmann et al. 1999). However, the BEVS has some drawbacks, as has been already explained in the introduction and other chapters of this thesis, which finally result in lower yields than those obtained with other expression systems.

In order to solve the expression level limitation of BEVS, different approaches have been developed to improve the productivity of BEVS (Hitchman et al. 2011). Most strategies have consisted in the deletion of non-essential viral genes (Kaba et al. 2004; Hiyoshi et al. 2007), the use of promoters different to the conventional ones (Hill-Perkins & Possee 1990; Thiem & Miller 1990; Jarvis 2009; Regev et al. 2006; see also Chapter 1) or the introduction of regulatory sequences (Chen et al. 2004; Pijlman et al. 2006; Tiwari et al. 2010; Gómez-Sebastián et al. 2014). Although these changes have managed to increase expression levels, the improvements achieved are still far from optimal.

The knowledge on the interactions of the baculoviruses with the host cells could help on the genetic manipulation of the viruses to enhance the recombinant protein production in cultured cells. After the starting of the infective process, baculoviruses interact with host cells and induce changes to control the cell machinery. Infected cells respond to the infection by up- and down-regulation of its genes. Many viral proteins interact with host cells, but little is known about the deep interactions between proteins and the host response. Last years, the use of next generation sequencing (NGS) techniques have revealed thousands of genes involved in the interactions between baculoviruses and their hosts (Xue et al. 2012; Chen et al. 2013; Jakubowska et al. 2013). This regulation results in host changes related with cellular morphology and cytoskeleton, apoptosis, cell cycle, replication, metabolism, immunity, cell host stress

and host gene expression regulation (Choi et al. 2012; Monteiro et al. 2012; Jakubowska et al. 2013; Nguyen et al. 2013). In fact, host factors can recognize and bind to viral promoters modulating its activity (Kogan and Blissard 1994). It is also been reported the up-regulation of host genes for protein folding or translation processes (Salem et al. 2011; Choi et al. 2012; Xue et al. 2012). Accordingly, the expression or overexpression of host genes could have an effect in the production of recombinant proteins using baculoviruses by regulating the replication and/or the genes expression of the viruses.

Since the viral gene expression can be modulated by host genes and favor the production of recombinant proteins production, in this chapter we have explored the effect of host gene expression on protein production. For that, we have generated a baculovirus library expressing cDNAs from the midgut of *S. exigua* to explore the ability of non-viral sequences to enhance the expression of recombinant proteins. Then, we used the flow cytometry technology to select recombinant baculoviruses from the library with enhanced expression characteristics, and we analyzed the ability of these sequences from *S. exigua* to improve the expression yields of BEVS.

3.2. Material and Methods

3.2.1. Baculovirus library construction

A cDNA library containing *S. exigua* midgut genes cloned in the pDONRTM222 plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Navarro-Cerrillo et al. 2012) was used for the construction of the baculovirus library. A glycerinate of *E. coli* containing the cDNA library was seeded into LB agar plates, and the grown colonies were collected with LB medium for plasmid isolation using NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany). Then, the purified plasmids were subcloned by Gateway LR recombination (Invitrogen) into pDest-670 vector. This vector is characterized by the presence of the Green Fluorescent Protein (GFP) reporter gene downstream of the *p10* promoter and a Gateway cassette downstream of the *polyhedrin* promoter. Recombinant vectors were transformed by heat-shock in *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) competent cells and plated on LB agar containing 100 µg/ml of

ampicillin. The resulting colonies were collected from plates with LB medium for plasmid extraction. The next step was the transposition into the *Autografa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) bacmid using the Bac-To-Bac® system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For that, the purified pDest-670 plasmids were transformed into *E. coli* DH10Bac™ heat-shock competent cells and plated on LB agar containing 50 µg/ml of kanamycin, 7 µg/ml of gentamycin, X-gal and IPTG. Resulting colonies were harvested with PBS for bacmid DNA purification. All incubation plates were performed at 37 °C and all extraction plasmids or bacmids were done using NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany). After each transformation step, several individual colonies were collected to confirm the presence of the inserts and check their variability by digestion with restriction enzymes or by PCR amplification. Last step was the transfection of purified bacmid DNA into *Spodoptera frugiperda* (Sf21) cells to obtain the recombinant baculoviruses carrying the cDNA library. The Sf21 cells were maintained at 25 °C in Gibco® Grace's Medium (1X) (Life Technologies™) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Transfections were carried out in 25 cm² culture flasks using Cellfectin® II Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at a 3:1 volume ratio to bacmid (2 µg/µl). At 48 hours post-transfection, cells were detached in Grace's medium supplemented with 2% of FBS, filtered using 0.50 µm filters and those cells expressing GFP, that represent cells infected with the bacmids of interest, were selected by cell sorter (MoFlo Legacy BEKMAN COULTER). The recovered GFP-positive cells were seeded in a culture plate and incubated at 27 °C for 24 h to let baculoviruses to bud off from the cells. Baculoviruses were harvested from the medium by centrifugation at 3000 rpm for 5 min to spin down the cells and filtered by 0.45 µm filters. Then, the viral titer was determined by end-point dilution assay (EPDA) and viruses were aliquoted and kept at – 80 °C. Those viruses were considered as the stock (P0) of the baculovirus library to be use in following experiments. Figure 1 shows a schematic summary of the different steps performed for the baculovirus library construction.

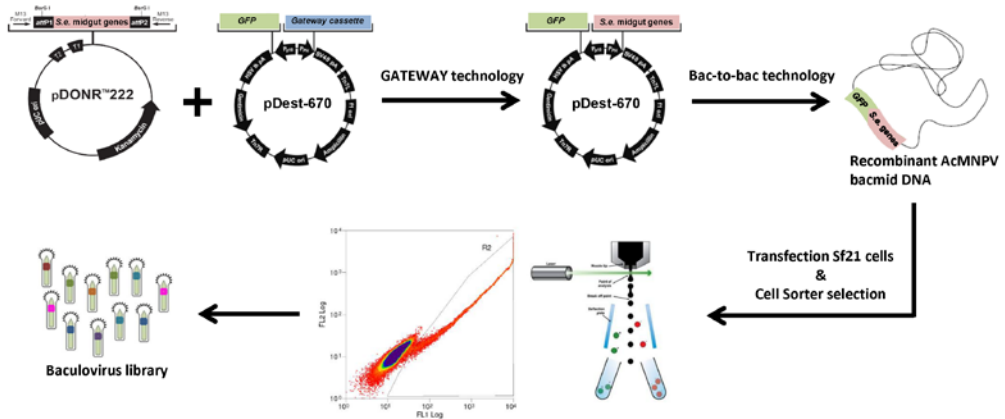


Figure 1. Schematic representation of the procedure for the construction of baculovirus library. Cells were discriminated on the basis of their green fluorescence signal and were selected only those cells expressing GFP levels corresponding to the R2 region of the cytometry plot picture.

3.2.2. Baculovirus selections

The baculovirus stock library was employed to carry out two different types of viral selections, designated as HIGH and FAST selection. The aim of HIGH selection was to select those viruses able to express higher quantities of recombinant GFP, while for the FAST selection, the aim was the selection of viruses able to start earlier the production of the GFP. For that, Sf21 cells were infected with the baculovirus library at a multiplicity of infection (MOI) of 5, and then the cells were harvested and separated by flow cytometry using a cell sorter (MoFlo Legacy BEKMAN COULTER) to recover the cells which showed the highest levels of GFP signal. For the HIGH selection, at 48 hours post-infection (hpi) the 10% of the cells showing the highest levels of GFP fluorescence were selected. For the FAST selection, the 100% of the GFP-fluorescent cells were selected at 24 hpi. The sorted cells were seeded in a culture plate, incubated at 27 °C, and the budded baculoviruses were collected after 3-4 days from the supernatant. Viruses were titrated by quantitative PCR (qPCR) as previously described in the Chapter 1 (Martínez-Solís et al. 2016) to set the next selection passage. In total, two rounds of selection were performed for each type of selection (HIGH and FAST). The selected libraries were named as P1 or P2, for the first (P1) or the second (P2) round of selection, respectively.

3.2.3. Isolation of individual baculoviruses

Individual viral clones from the selected libraries were isolated by the plaque assay method. For that, Sf21 cells were seeded in a confluent monolayer in 6-well plates and were left to attach for 30 min at room temperature (RT). The medium was then removed, and 200 μ l of serial dilutions of the viruses were added carefully drop by drop in each well. The cells were incubated for 2 h at RT. Then, the viral inocula were removed and 2 ml of overlay medium was added. Overlay medium consisted of sterile medium and 3% SeaPlaque agarose at a 2:1 volume ratio tempered to 37 °C. After the overlay solidified, 1 ml of medium was added to each well. Plates were incubated in a moisten-box at 27 °C for 6 days. After removal of the liquid overlay, cells were stained at 27 °C for 3 h with Neutral Red Solution (0.33%) previously diluted 1/5 in phosphate-buffered saline (PBS). A plug of agarose from each isolated GFP-positive plaque was picked with a micropipette tip and individually collected into a 1.5 ml tube with 500 μ l of medium, vortexed and left for 30 min at RT. Then, the viruses diffused from the agarose plug were amplified by infection of Sf21 cells in 24-well culture plates. After 4-5 days from the infection, the medium from each well was collected and centrifuged, and the supernatants containing the viruses were kept at 4 °C. Finally, each individual virus was titrated by qPCR.

3.2.4. GFP quantification and viral growth measurement

All the baculovirus infection assays for GFP quantification and growth measurement were carried out in Sf21 cells seeded in 24-well culture plates at 80% confluency. Cells were infected using a MOI of 5 for the GFP quantification and a MOI of 0.05 for growth measurement assays, and incubated in a moisten-box at 27 °C. For GFP measurement, cell densities were first measured using Trypan blue stain (0.4%) in the Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instruction. Then, cells were pelleted by low speed centrifugation (3000 rpm, 5 min) to avoid cell lysis, and kept at -20 °C until the quantification of GFP expression. The amount of GFP was measured by fluorescence as described in the Chapter 1 (Martínez-Solís et al. 2016). For viral growth measurement, 50 μ l of supernatants containing budded viruses (BVs) were collected and kept at 4 °C until

they were quantified by qPCR as described above. The represented values correspond to at least two replicates unless otherwise specified.

3.2.5. Characterization of the individual baculoviruses

The isolated baculovirus clones showing better properties were selected to identify the inserted transgene. For each clone, viral DNA was extracted from BVs using Prepman reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions and used as template for standard PCR amplification. Specific primers were designed base on the pDest vector sequence flanking the library transgene (Anexo V) and were used for all the clones. The amplified fragments were subcloned into the pCR™2.1-TOPO® vector using the TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for sequencing. The identity of each transgene was determined by sequence comparison against protein databases (NCBI) using blastx.

3.2.6. Generation of individual recombinant baculoviruses

Based on the sequence information from the individual clones, recombinant baculoviruses expressing equivalent genes were constructed using the AcMNPV vector system. For that, the complete sequenced fragments were amplified by PCR from the corresponding TOPO® plasmid, except for the 3' region containing the polyA tail, using specific primers which added *NotI* and *XbaI* restriction sites (Anexo V). The amplified transgenes were cloned under the *polyhedrin* promoter (*polh*) into the *NotI* and *XbaI* restriction sites of the pFBD-GFP vector, derived from the pFastBac™ Dual vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) that carries the *gfp* gene under the viral *p10* promoter. The empty pFBD-GFP vector was used as a control. The recombinant baculoviruses were obtained by transposition of the generated vectors using the Bac-To-Bac® baculovirus expression system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as described above. The ability of these recombinant baculoviruses to growth and to express GFP in comparison with the control was tested as explained above.

3.3. Results

3.3.1. Characterization of the baculovirus library

The diversity of the genes represented in the baculovirus library was evaluated by digestion or PCR amplification and sequencing of individual clones at different points during the preparation process. For that, 23 and 11 randomly selected individual bacterial clones from the original *S. exigua* cDNA library in the pDONR™222 (donor vector) and the pDest-670 (destination vector), respectively, were analyzed by plasmid isolation and digestion. All the colonies analyzed showed an insert between 500 and 3000 bp (data not shown). Then, 14 individual recombinant bacmids were randomly selected and analyzed by PCR amplification, PCR fragments showing fragments between 500 and 3000 bp (data not shown). Those inserts with similar size of two different plasmids or bacmids were sequenced and identified as different sequences. Those results were indicative of a good representativeness and variability of the prepared baculovirus library.

3.3.2. Viral selection for GFP production

The baculovirus library was further selected based on the GFP production characteristics of the recombinant baculoviruses. After two rounds of selection for the FAST and HIGH libraries (see Material and Methods), Sf21 cells were infected with the selected libraries to measure the improvement in GFP production. For the HIGH selection, the GFP expression was increased about 3 times after the first selection (P1-HIGH) in comparison with the non-selected baculovirus stock library (P0). The levels of GFP expression were maintained after the second round of selection (P2-HIGH) (Figure 2A). In the FAST selection, the GFP expression was increased 2-fold in P1-FAST and an additional increase of about 40% in P2-FAST respect to the P1-FAST (Figure 2A). In addition, differences in the visual GFP fluorescence expressed by both P2 baculovirus libraries respect to P0 were evident in infected Sf21 cells after 72 hpi (Figure 2B). The P2 libraries for both selection types were used for further experiments.

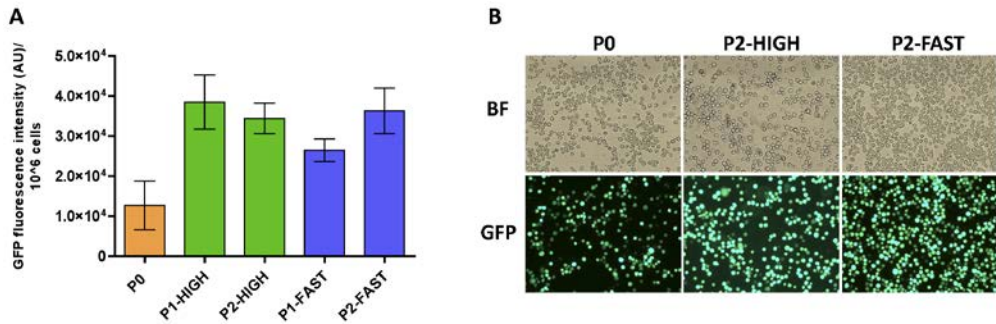


Figure 2. GFP expression of the baculovirus library after the selection passages. (A) Measured GFP expression in Sf21 cells at 72 hpi with the stock library (P0) and two serial passages (P1 and P2) for both HIGH and FAST selections. (B) Representative image of the GFP fluorescence in Sf21 cells at 72 hpi with the stock library and the second selection passage (P2) for HIGH and FAST selections.

3.3.3. GFP expression levels of isolated baculoviruses

A total of 18 and 23 individual viral clones were isolated by plaque assay from the P2-HIGH and FAST selected libraries, respectively. Then, the GFP expression for each isolated baculovirus was evaluated by a single-point infection assay. For that, Sf21 cells were infected with each isolated baculovirus and GFP was measured after 36 or 72 hpi for P2-FAST and P2-HIGH isolated baculoviruses, respectively. Around 72% and 78% of isolated viruses analyzed from the HIGH (Figure 3A) and the FAST (Figure 3B) selections, respectively, were expressing similar or higher quantities of GFP protein when compared to the non-selected baculovirus library (P0). Those viruses showing at least 4-fold increase in GFP expression in comparison to P0 were chosen for a more detailed characterization. Five (P2H-14, P2H-21, P2H-30, P2H-31 and P2H-34) and four (P2F-9, P2F-10, P2F-16, P2F-18) isolated baculoviruses were selected from P2-HIGH and P2-FAST groups, respectively.

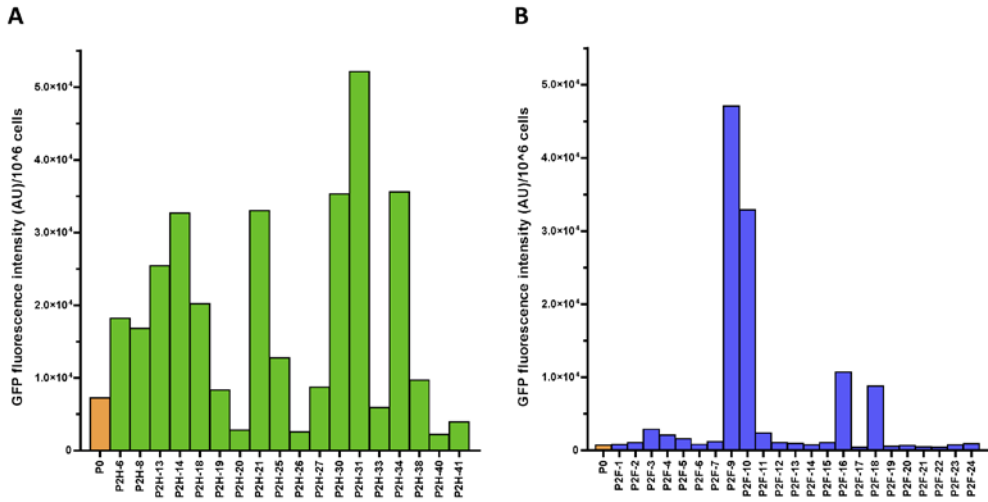


Figure 3. Screening of GFP expression in clones isolated from the second selection passage. (A) GFP expression levels in Sf21 cells of individual recombinant baculoviruses isolated from the second passage of HIGH selection at 72 hpi and (B) FAST selection at 36 hpi. The values correspond to a single-point infection assay.

To better characterization of these individual baculoviruses, Sf21 cells were infected and their ability to replicate and GFP production was compared to the P0 library over time. Most of the baculoviruses tested, showed higher GFP-expression levels (3-4 fold) in comparison to the P0 library (Figures 4A and 4C). However, similar patterns of growth were observed among the baculoviruses from the same selection type (Figures 4B and 4D), suggesting that the differences in expression levels were not due to differences in viral replication.

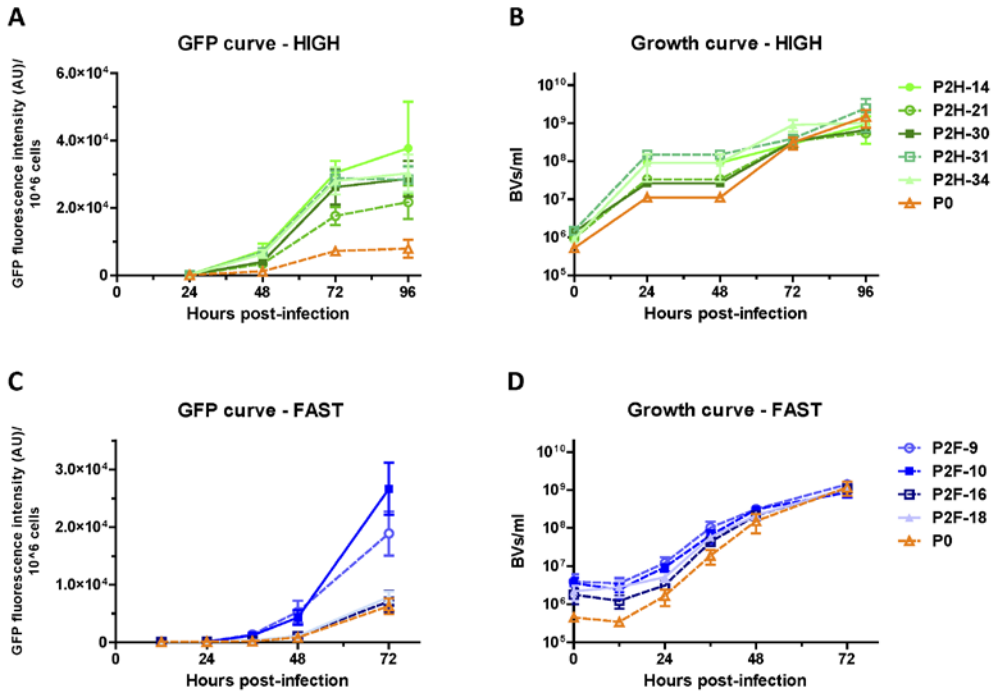


Figure 4. GFP expression and viral replication of the selected clones. GFP expression levels were measured at different times post-infection in Sf21 cells infected with the individual baculoviruses selected from the HIGH (A) and FAST (C) selections at a multiplicity of infection (MOI) of 5. Growth rates were monitored at different times post-infection after infection of Sf21 cells with the individual baculoviruses selected from the HIGH (B) and FAST (D) selections at MOI of 0.05. The values are the means of at least two independent assays. The error bars represent the standard error of the mean.

3.3.4. Sequence identification in the selected baculoviruses

To identify the transgene carried by each baculovirus, we obtained the sequence of the cDNA from *S. exigua* inserted in each of the recombinant viruses. Sequence were obtained and identified based on their blastx first hit against the NCBI database (Table 1). In general, the transgenes were identified as sequences containing complete or almost complete CDSs (coding DNA sequences) with homology to genes from different lepidopteran species. In some cases (P2H-21, P2H-30 and P2F-10), two different sequences were found in the same isolated baculovirus, likely because two different baculoviruses were co-purified from the plaque assay.

Interestingly, in both selection types, baculoviruses carrying similar transgenes were identified. Those redundant clones contained cytochrome P450, heat-shock and REPAT proteins. Moreover, the P2H-14 and P2F-16 baculoviruses carried the same sequence containing a partial cytochrome CYP6AB14, suggesting that the same baculovirus was selected in both selections. For that reason, we decided to test this sequence in further experiments to check the improved ability for GFP expression using recombinant baculoviruses. In addition, we additionally selected the sequences from P2F-10 (identified as REPAT5) and P2H-31 (identified as a small heat shock protein G8), for further confirmations.

3.3.5. Characterization of recombinant baculoviruses containing the identified sequences

The sequences obtained from P2H-14, P2H-31 and P2F-10.2 were used to generate new recombinant baculoviruses to validate the previous results that showed an improvement of the GFP expression. So, the growth rate and the ability to express the GFP protein were tested for each recombinant baculovirus at different times post-infection in comparison to a control baculovirus lacking any transgene. As expected, the same growth patterns were observed for all of them (Figure 5B). Surprisingly, all the recombinant baculoviruses tested showed similar GFP-expression levels when compared to the corresponding control (Figure 5A). This result suggests that the improvement on GFP expression found in the selected viruses was not directly associated to the expression of the identified transgene.

Table 1. Identification of the sequences carried by the isolated baculoviruses.

Viral clone ^a	Fold improvement ^b		Hit ^c	E-value
P2H-14	6.2	4.2	cytochrome CYP6AB14 [<i>Spodoptera littoralis</i>]	6e-28
P2H-21^d	2.9	2.4	V-type proton ATPase subunit G [<i>Helicoverpa armigera</i>]	1e-45
			KH domain-containing protein 3-like [<i>Helicoverpa armigera</i>]	6e-29
P2H-30^d	3.4	3.6	ER membrane protein complex subunit 3 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	4e-176
			REPAT46 [<i>Spodoptera exigua</i>]	1e-15
P2H-31	5.7	4.0	heat shock protein Hsp-12.2-like [<i>Helicoverpa armigera</i>]	3e-102
P2H-34	5.4	3.9	carboxypeptidase B-like [<i>Helicoverpa armigera</i>]	2e-111
P2F-9	6.4	3	Hsp70 [<i>Mythimna separata</i>]	0.0
P2F-10^d	5.2	4.2	Pancreatic triacylglycerol lipase-like [<i>Helicoverpa armigera</i>]	0.0
			REPAT5 [<i>Spodoptera exigua</i>]	2e-99
P2F-16	1.4	1.1	cytochrome CYP6AB14 [<i>Spodoptera littoralis</i>]	2e-27
P2F-18	1.3	1.3	Calmodulin, partial [<i>Trichinella pseudospiralis</i>]	1e-98

^aIsolated viruses from the P2-HIGH (P2H) or P2-FAST (P2F) selections

^bFold improvement respect to P0 viral library stock at 48 (first column) or 72hpi (second column)

^cFirst hit from blastx analysis

^dTwo fragments were amplified from the viral clone DNA

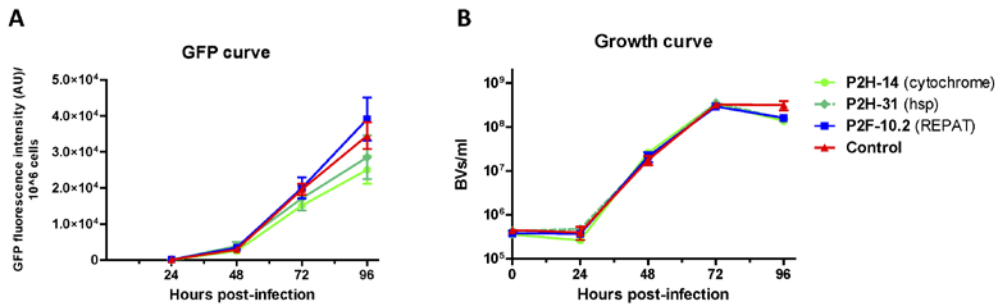


Figure 5. GFP expression and viral replication of recombinant baculoviruses expressing the identified sequences from the library. (A) GFP expression levels were measured at different times post-infection in Sf21 cells infected at a MOI of 5. (B) Growth rates were monitored at different times post-infection in Sf21 cells infected at MOI of 0.05. The values are the means of at least two independent assays. The error bars represent the standard error of the mean.

3.4. Discussion

The BEVS, thanks to its versatility and robustness, is currently one of the most used systems to produce recombinant proteins. However, yields obtained in cell cultures can be a limiting factor for an efficient large-scale production. Some of the strategies developed to increase the production levels, have been based on the insertion of enhancers and/or DNA regulatory elements both viral and from heterologous systems (Sano et al. 2002; Gómez-Sebastián et al. 2014). In this context, we hypothesized that the host genomes (*S. exigua* in our case) could contain sequences, that when expressed in baculovirus, could increase the expression of recombinant proteins in BEVS.

Two different selections were performed to select viruses expressing higher amounts of GFP protein (HIGH) and viruses expressing the GFP protein earlier in time (FAST). Both selections generated new libraries that showed an increased GFP expression levels when compared to the non-selected library (P0) after two rounds of selection (Figure 2). Although we could not observe drastic increases in the GFP expression, some isolated baculoviruses from both selections showed an enhanced GFP expression of at least 4 times respect to the GFP expression levels obtained with the P0 library (Figure 3). However, no differences were found in time of production

neither in final production, between the isolated baculoviruses from the HIGH and the FAST selections (Figures 4A and 4C). It is likely that both selection types have selected for the same trait and those viruses showing high GFP expression levels after 72 hpi, are already producing a higher amount of the protein at 48 hpi. In agreement with that, we have found equivalent sequences in the baculoviruses derived from both types of selections.

The GFP expression and growth rate analysis over time for the different viral isolates, revealed higher GFP expression levels but similar multiplication patterns in comparison to P0 (Figure 4). Based on that, we hypothesized that increase of GFP could be related with the expression of the transgenes carried by each virus. In agreement with that, in some cases, we found related sequences in independent clones. We focus our interest in three of them, which were isolated from both HIGH and FAST selection, identified as cytochrome *CYP6AB14*, *hsp-12.2-like* and *repat5*. Cytochromes P450 are hemoproteins that catalyze enzymatic reactions, being the monooxygenase reaction the most common. They can transform different types of compounds, being involved in detoxification processes both in humans and insects. In addition P450s play an important role in the adaptation of insects to host plant chemical defenses (Schuler 2012; Wang et al. 2015). The transgene P2H-14 only contains the 3' end of the *CYP6AB14* gene that most probably it is not enough to maintain the functionality of the protein, however the remaining gene contains a substrate recognition site (SRS6) which could bind somehow to certain cellular elements and increase the recombinant protein stability. Schoch et al. (Schoch et al. 2003) correlated a mutation in SRS6 with a decreased activity of a plant cytochrome P450, and they suggest that SRS6 plays a role in the interaction with the substrate. By other hand, the heat-shock proteins (HSP) have a chaperon activity that stabilize the proteins and assure their correct folding (Hartl 1996; Fink 1999). This suggest that they could increase the production of recombinant proteins using BEVS by avoiding their degradation. In fact, there are some examples in the literature showing an increased protein production in insect cells transfected with baculoviruses expressing HSP type chaperons (Ailor and Betenbaugh 1999; Yokoyama et al. 2000). The third group of isolates, included the *repat5* gene. REPAT are small proteins which were

first identified in the midgut of *S. exigua* (Herrero et al. 2007) and they are overexpressed in response to *Bacillus thuringiensis* and baculovirus infections (Herrero et al. 2007; Navarro-Cerrillo et al. 2012; Bel et al. 2013). Moreover, some members of this family proteins can interact with each other and be translocated to the nucleus (Navarro-Cerrillo et al. 2012) where they could influence in the expression of other genes, as the expression of recombinant proteins in BEVS.

The isolated viruses showed GFP levels 3-4 times higher than those expressed by the P0 library (Figures 4A and 4C). However, the recombinant baculoviruses generated carrying the identified sequences did not reproduce the improvement in GFP expression, and the expression levels obtained were similar to the obtained with the control baculovirus only expressing the *gfp* gene (Figure 5). Both the selected baculoviruses from the library and the recombinant baculoviruses generated can be considered equivalent because all of them express GFP under the control of *p10* promoter and the corresponding transgenes under the control of the *polh* promoter. Therefore, maybe the increased expression levels observed was not linked to the presence of the *S. exigua* transgenes in the baculoviruses as we initially thought, but to other changes in the baculoviruses genome which were not identify in this study. Continuous infection passages in cell cultures can led to the accumulation of genetic alterations such as deletions, insertions or point mutations (Krell 1996). These mutations can affect to different regions of the genome. If they affect to promoters or regulatory regions, the expression levels of the proteins expressed by the genes they regulate could be modified. These mutations can also affect directly to viral genes also involved in the expression of recombinant proteins. An example it was reported by Kaba et al. (2004) who observed an increase in protein expression when *chitinase* and *v-cathepsin* viral genes were deleted. It would be interesting to obtain the full genomic sequence of the selected baculovirus to analyze the presence of genetic mutations that could be responsible of the improvement observed in GFP productions.

Nevertheless, we have shown that the flow cytometry is a valid technique to select baculoviruses in a quick and efficient way, and we have identified isolated viruses with higher levels of protein expression. This work is as a first approach to

screen for regulatory sequences as well as baculovirus mutants with ability to increase the expression levels of recombinant proteins in BEVS.

DISCUSIÓN GENERAL

El sistema de expresión basado en baculovirus (BEVS) se desarrolló en los años 80 (Smith et al. 1983) y desde entonces se ha convertido en un sistema de expresión de proteínas recombinantes muy empleado tanto a nivel industrial como en laboratorios de investigación. Su gran éxito radica en las múltiples ventajas que ofrece frente a otros sistemas de expresión, ya que es un sistema muy versátil que presenta altos rendimientos de expresión, permite expresar más de una proteína simultáneamente y es capaz de introducir modificaciones post-traduccionales típicas de eucariotas.

Para abastecer una gran demanda de proteínas recombinantes, es necesario disponer de un sistema que permita una producción eficiente a gran escala. Sin embargo, el sistema BEVS es quizá en este punto donde menos ha evolucionado desde sus inicios y su gran potencial puede verse comprometido en este aspecto. Por tanto, para poder competir con otros sistemas de expresión surge la necesidad de introducir mejoras que consigan aumentar los niveles de producción. Hasta la fecha se han llevado a cabo diferentes estrategias a distintos niveles, desde el cambio de promotores a la introducción de secuencias de diversas procedencias.

En esta tesis se ha abordado la mejora de la producción de proteínas recombinantes del sistema de expresión BEVS desde diferentes perspectivas. En concreto, se han evaluado tres estrategias para mejorar el uso de baculovirus como sistema de expresión. Por un lado, el uso de un nuevo promotor que nos ha permitido mejorar los niveles de expresión. Por otro lado, el aumento de la estabilidad de los baculovirus recombinantes que permite su replicación en cultivo celular sin perder la expresión de la proteína recombinante. Y por último, el uso de secuencias reguladoras que, aunque el trabajo realizado hasta el momento no ha permitido validar las mejoras del sistema de expresión encontradas inicialmente, sí nos abre la puerta a buscar y encontrar cambios en el genoma de los virus con un efecto sobre la expresión de proteínas recombinantes.

***pSeL120* como promotor alternativo en el sistema BEVS**

El análisis del transcriptoma de larvas de *S. exigua* infectadas con el virus SeMNPV (Pascual et al. 2012) nos permitió identificar un gen viral altamente expresado (*orf46*). A partir del estudio de varias secuencias reguladoras aguas arriba de este gen, se ha delimitado una región de 120 nt con elevada actividad promotora en diferentes líneas celulares de insecto (Sf21, Se301 y Hi5) a la que hemos llamado *pSeL120*. Esta secuencia presenta una actividad promotora mejorada, siendo capaz de llegar a triplicar los niveles de expresión de GFP en comparación con los niveles de expresión obtenidos con un promotor convencional, como es el caso del promotor del gen de la *poliedrina* (*polh*). Existen ejemplos en la literatura que también describen el aumento de los niveles de expresión de proteínas recombinantes mediante el uso de promotores virales alternativos, como el promotor 39K de AcMNPV (Lin and Jarvis 2012) o el promotor *vp39* de BmNPV (Ishiyama and Ikeda 2010). Pero también hay casos en los que el aumento de producción se consigue gracias a la combinación de dos promotores, normalmente siendo uno de ellos un promotor de los que se emplean de manera habitual en el sistema BEVS (*polh* y *p10*) (Thiem and Miller 1990; López-Vidal et al. 2013). De modo similar a estos estudios, la combinación de nuestro promotor *pSeL120* con el promotor *polh* resulta en un aumento de la producción de GFP de hasta 3 veces con respecto a los niveles obtenidos con cada uno de los promotores individualmente.

Este nuevo promotor *pSeL120* se caracteriza por la presencia de una región de 50 nt altamente conservada en secuencias homólogas de virus de otras especies. Además, hemos podido comprobar que los últimos 25 nt de nuestra secuencia, pertenecientes a la región 5'UTR, son esenciales para la actividad promotora de *pSeL120*. La región 5'UTR de otros promotores como *polh* y *p10*, también se considera necesaria para que éstos tengan una elevada actividad (Weyer and Possee 1988). Aunque serían necesarios experimentos adicionales para saber qué papel está desempeñando concretamente esa secuencia esencial de 25 nt en nuestro promotor *pSeL120*, nos atrevemos a hipotetizar que su interacción con la RNAPol podría estar influyendo en los niveles de transcripción y traducción, como ya mostraron Min y Bishop (1991) con el gen de *poliedrina* de AcMNPV.

Sobreexpresión del gen *lef-5* para aumentar la estabilidad genómica de los baculovirus recombinantes

Los baculovirus resultan una herramienta muy útil para la expresión de proteínas recombinantes *in vitro*. Sin embargo, la producción continua a gran escala empleando cultivos celulares de insecto presenta una importante limitación que hace que este modo de producción no sea lo suficientemente eficiente. Cuando los baculovirus se multiplican en cultivos celulares de forma seriada, se acumulan rápidamente formas defectivas que se caracterizan por la pérdida de partes de su genoma, lo que se conoce como *passage effect* (Krell 1996). La consecuencia de la aparición y acumulación de estas formas defectivas es que, además de generar virus no infectivos, se puede producir un fuerte descenso de la producción de proteínas recombinantes si las zonas delecionadas afectan a los transgenes incorporados en los baculovirus recombinantes para la producción de una proteína de interés.

En esta tesis también se ha abordado la mejora de la producción del sistema BEVS desde el punto de vista de la mejora de la estabilidad de los baculovirus durante su replicación en cultivo celular. El análisis transcripcional de los virus SeMNPV y AcMNPV durante su replicación en larvas de *S. exigua* y células Se301 nos ha permitido detectar varios genes que muestran una menor expresión en células, convirtiéndose en candidatos de tener una función relacionada con la estabilidad genómica de los baculovirus. El gen *lef5* de SeMNPV (*Se-lef5*), caracterizado como un factor de inicio de la transcripción (Guarino et al. 2002) y relacionado con la estabilidad de los transcritos tardíos y la replicación viral (Su et al. 2011), ha sido relacionado por primera vez con la estabilidad genómica de los baculovirus recombinantes. La sobreexpresión del gen *Se-lef5* en virus AcMNPV recombinantes que expresan GFP retrasa la aparición y acumulación de genes defectivos para la producción de GFP, respecto a los virus recombinantes que no sobreexpresan este gen, e independientemente del MOI empleado. Además, se ha comprobado que la disminución en la producción de GFP a lo largo de los pases de infección es debido a la pérdida del transgén *gfp* y no a la generación de virus no infectivos.

Además, se ha observado que cambios en los niveles de expresión de LEF5 no afectan a la expresión de otros genes virales tardíos y muy tardíos, ya que no hemos encontrado una reducción en la expresión de este tipo de genes cuando los virus SeMNPV y AcMNPV replicaban en cultivo celular. Y aunque se desconoce el mecanismo molecular por el cual *Se-lef5* es capaz de aumentar la estabilidad del transgén, podría estar regulando la expresión de genes del hospedador cuyos productos podrían estar relacionados con la estabilidad viral, ya que es bien conocido que la infección por baculovirus es capaz de modificar la expresión de genes del hospedador (Schultz and Friesen 2009; Sagisaka et al. 2010; Choi et al. 2012). Por ello, un estudio de la expresión génica del hospedador tras la sobreexpresión de *lef5* arrojaría nueva información al respecto.

Aunque *Se-lef5* aumenta la estabilidad del transgén, no es suficiente para prevenir completamente la acumulación de virus delecionados. Como ya se ha mostrado en el Capítulo 1 de esta misma tesis, los niveles de expresión de una misma proteína pueden variar en función del promotor empleado para su expresión. Quizá la sobreexpresión de *Se-lef5* bajo un promotor de expresión más temprana o de expresión constitutiva (creación de una línea celular de expresión estable) puede tener un efecto mayor sobre la estabilidad genómica de los virus.

Selección de baculovirus recombinantes con mejores niveles de expresión

Además de mejorar la estabilidad de los baculovirus recombinantes durante su replicación en cultivo celular y de aumentar los niveles de expresión mediante el uso de promotores distintos a los convencionales, existen otras estrategias para mejorar la producción de proteínas recombinantes. Una de ellas es la incorporación de elementos reguladores y/o elementos potenciadores (*enhancer*), ya sean de origen viral o de otros organismos, en los vectores para generar baculovirus recombinantes con una mayor capacidad de expresión frente a los vectores convencionales del sistema BEVS.

En esta parte del trabajo hemos podido validar la citometría de flujo como una nueva técnica apta para la selección de baculovirus recombinantes con características mejoradas a partir de una genoteca viral. En este caso se ha

construido una genoteca viral que contenía genes expresados en el intestino de larvas de *S. exigua* y se han seleccionado los baculovirus recombinantes que expresaban mayores niveles de GFP, suponiendo que ese aumento de expresión podría estar influenciado por la presencia de secuencias de *S. exigua*, las cuales podrían actuar como elemento regulador o tener una función intensificadora de la expresión en nuestro sistema BEVS. Finalmente se han aislado varios virus recombinantes portadores de diferentes secuencias, los cuales muestran un claro aumento de los niveles de expresión de GFP con respecto a los niveles obtenidos con la genoteca antes de ser sometida al proceso de selección (hasta 3-4 veces), mientras que las tasas de multiplicación a lo largo del tiempo para los diferentes virus seguían un patrón similar.

Entre las secuencias identificadas se han encontrado genes que codifican para citocromos del tipo CYP6AB14, una proteína de choque térmico (hsp-12.2-like) y proteínas de respuesta a patógenos tipo REPAT. Según nuestra hipótesis inicial, estas secuencias podrían jugar un papel en la regulación de la expresión de proteínas recombinantes. La actividad chaperona y estabilizadora de proteínas que presentan las proteínas de choque térmico (Hartl 1996; Fink 1999), el posible papel como activador de la transcripción de las proteínas REPAT (Liu et al. 2000; Navarro-Cerrillo et al. 2013) o la posible interacción del citocromo con las proteínas recombinantes a través del sitio de unión SRS6, podrían contribuir al aumento de la expresión de proteínas recombinantes empleando el sistema BEVS. Sin embargo, la generación de baculovirus recombinantes *de novo* mediante la clonación de las secuencias estudiadas en un vector BEVS no nos ha permitido validar que la mejora de los niveles de expresión de GFP obtenidos con los baculovirus aislados, se debiera a la presencia de estas secuencias. Una posible explicación es que el aumento de expresión de GFP observado en los baculovirus aislados tras la selección de la genoteca no se deba a las secuencias de *S. exigua* que portan, sino a otras alteraciones genéticas que hayan podido sufrir los virus durante los procesos de replicación en las células. Como se vio en el capítulo 2 de esta misma tesis, los pases sucesivos en líneas celulares pueden dar lugar a la aparición de deleciones, pero también se pueden dar mutaciones puntuales e incluso inserciones. Si alguno de

estos cambios afecta a zonas reguladoras, podría modificar los patrones de expresión típicos del sistema BEVS. Así, sería interesante realizar un estudio más exhaustivo del genoma de los baculovirus recombinantes aislados en busca de posibles alteraciones que podrían explicar el aumento de expresión de proteína GFP observado.

Tanto el estudio de las interacciones de los baculovirus con su huésped presentados en esta tesis, como estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Pascual et al. 2012; Jakubowska et al. 2013), han permitido explorar nuevas estrategias para mejorar la expresión de proteínas recombinantes en el sistema de baculovirus. Además, en la literatura encontramos trabajos en los que se pone de manifiesto la importancia de la interacción insecto-patógeno, ya que son capaces de influenciar cambios en los patrones de expresión de una gran variedad de genes (Cheng and Lynn 2009; Popham et al. 2010; Salem et al. 2011; Choi et al. 2012; Nguyen et al. 2013). Entre los genes que alteran su expresión tras una infección por baculovirus, encontramos genes relacionados con procesos de transcripción, así como de expresión y procesado de proteínas (Popham et al. 2010; Salem et al. 2011). La manipulación de los niveles de expresión de estos genes podrían tener un efecto sobre el proceso infectivo, y en consecuencia sobre la producción de proteínas recombinantes al emplear los baculovirus como sistema de expresión. Por ello, los conocimientos aportados por estudios acerca de las interacciones insecto-patógeno, pueden ser de gran utilidad para aplicarse al estudio de las mejoras en los sistemas de expresión basados en baculovirus. De este modo, a lo largo de este trabajo de tesis se han empleado diferentes técnicas que han permitido la identificación de secuencias de distinta naturaleza y procedencia, capaces de mejorar los rendimientos de expresión obtenidos con el sistema de expresión BEVS basados en los vectores comerciales utilizados de manera convencional durante años. Entre ellos se ha identificado una secuencia del virus SeMNPV con actividad promotora en el sistema BEVS para la expresión de la proteína GFP mayor que el promotor *polh*. También se ha demostrado la capacidad del gen *lef5* de SeMNPV para reducir la aparición y acumulación de la delección de los transgenes en baculovirus recombinantes, consiguiendo así que la producción de las proteínas recombinantes

no se vea disminuida a lo largo de los pases en cultivos celulares de insecto. Por último, se han aislado una serie de baculovirus recombinantes portadores de distintas secuencias originarias de larvas de *S. exigua* mediante la técnica de citometría de flujo, de manera rápida y sencilla, por su mayor capacidad para expresar GFP. Aunque no hemos podido confirmar que esta mayor expresión de GFP se debe a la secuencia de la genoteca que portan, sería interesante realizar un estudio más detallado de estos baculovirus recombinantes que pudiera ofrecer nueva información acerca de la regulación de la expresión de las proteínas recombinantes en el sistema BEVS.

Como conclusión podemos decir que los resultados de esta tesis aportan nuevas mejoras al sistema BEVS para la producción de proteínas recombinantes, aumentando sus rendimientos de expresión y ofreciendo así la oportunidad de explorar su uso a gran escala para obtener una producción industrial eficiente y más económica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

1. La secuencia de 120 nt aguas arriba del gen *orf46* de SeMNPV, denominada *pSeL120*, presenta una actividad promotora mayor que el promotor *polh* en distintos cultivos celulares de insectos (Se301, Sf21 y Hi5).
2. La combinación del promotor *pSeL120* con el promotor *polh* (*polh-pSeL*) tiene un efecto aditivo para la expresión de GFP en cultivos celulares de insecto, en comparación a los niveles de expresión obtenidos con cada uno de los promotores de manera individual.
3. El estudio transcripcional durante el proceso infectivo de los virus SeMNPV y AcMNPV, tanto en cultivos celulares Se301 y larvas de *S. exigua*, ha revelado la presencia de varios genes con una expresión reducida cuando los baculovirus replican en cultivo celular, siendo el gen *lef5* el que mayores diferencias de expresión ha mostrado para ambos virus.
4. La sobreexpresión del gen *lef5* de SeMNPV (*Se-lef5*) en células Sf21, reduce la acumulación de baculovirus recombinantes que han perdido el transgén *gfp* a lo largo de pases de infección sucesivos y que, por lo tanto, son incapaces de expresar la proteína correspondiente. Por tanto, la sobreexpresión de *Se-lef5* puede prevenir el descenso de la producción de proteínas recombinantes en cultivo celular.
5. La selección de una genoteca viral que expresa genes intestinales expresados en *S. exigua* ha permitido aislar baculovirus recombinantes, que muestran unos niveles de expresión de GFP entre 3 y 4 veces superiores a los niveles obtenidos con la genoteca original no seleccionada, mientras que sus patrones de replicación a lo largo del tiempo son similares.
6. Entre los baculovirus aislados de la genoteca viral, se identificaron secuencias con homología al citocromo *CYP6AB14*, la proteína de choque térmico *hsp-12.2-like* y la proteína de respuesta a patógenos *repat5* en

múltiples clones. Sin embargo, la clonación de estos transgenes para generar baculovirus recombinantes equivalentes, no validó los resultados de aumento de expresión obtenidos tras la selección. No obstante, esto abre la puerta a la búsqueda de otras posibles mutaciones en el genoma de los baculovirus seleccionados, que pudieran tener un efecto potenciador sobre la expresión de proteínas recombinantes.

1. The 120 nt sequence upstream the *orf46* gene of SeMNPV, named as *pSeL120*, shows a higher promoter activity than the *polh* promoter in different insect cell cultures (Se301, Sf21 y Hi5).
2. The combination of the *pSeL120* promoter with the *polh* promoter (*polh-pSeL*) has an additive effect for the expression of GFP in insect cell cultures, when compared to the expression levels obtained with each of the promoters individually.
3. The transcriptional study during the infective process of the SeMNPV and AcMNPV viruses both in Se301 cell cultures and *S. exigua* larvae, has revealed the presence of several genes showing a reduced expression when baculovirus replicates in cell culture, being the *lef5* gene the one that greater differences of expression has shown for both viruses.
4. The overexpression of the *lef5* gene from SeMNPV (*Se-lef5*) in Sf121 cells, reduces the accumulation of recombinant baculoviruses that have lost the *gfp* transgene along successive infection passages and, therefore, are unable to express the corresponding protein. Therefore, the *Se-lef5* overexpression can prevent the decrease of the recombinant proteins production in cell culture.
5. The selection of a viral library expressing genes expressed in the *S. exigua* midgut has allowed the isolation of recombinant baculoviruses, which show expression levels of GFP of about 3 to 4 times higher than the levels obtained with the non-selected original library, while the patterns of replication over time are similar.
6. From the isolated baculoviruses derived from the viral library, sequences with homology to the *CYP6AB14* cytochrome, the *hsp-12.2-like* heat-shock protein and the *repat5* protein were identified in multiple clones. Nevertheless, the increased levels of expression obtained after the selection, were not

reproduced by cloning these transgenes in equivalent recombinant baculoviruses. On the other hand, this could promote the search of other possible mutations in the genome of the isolated baculoviruses that could enhance the expression of recombinant proteins.

BIBLIOGRAFÍA

- Ailor E., Betenbaugh M.J. (1999) Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Curr Opin Biotechnol* 10:142–145. doi: 10.1016/S0958-1669(99)80024-X
- Airenne K.J., Hu Y-C., Kost T.A., Smith R.H., Kotin R.M., Ono C., Matsuura Y., Wang S., Ylä-Herttua S. (2013) Baculovirus: an insect-derived vector for diverse gene transfer applications. *Mol Ther* 21:739–749.
- Altmann F., Staudacher E., Wilson I.B.H., März L. (1999) Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj J* 16:109–123.
- Ayres M.D., Howard S.C., Kucio J., Lopez-Ferber M., Possee R.D. (1994) The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 202:586–605.
- Beas-Catena A., Sánchez-Mirón A., García-Camacho F., Contreras-Gómez A., Molina-Grima E. (2014) Baculovirus biopesticides: An overview. *J Anim Plant Sci* 24:362–373.
- Bel Y., Jakubowska A.K., Costa J., Herrero S., Escrache B. (2013) Comprehensive analysis of gene expression profiles of the beet armyworm *Spodoptera exigua* larvae challenged with *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa toxin. *PLoS One* 8:1–23. doi: 10.1371/journal.pone.0081927
- Bergold G.H. (1952) Demonstration of the polyhedral virus in blood cells of silkworms. *Biochim Biophys Acta* 8:397–400.
- Berretta M.F., Ferrelli M.L., Salvador R., Sciocco A., Romanowski V. (2013) Baculovirus gene expression. In: *Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications*. pp 57–78
- Berretta M.F., Passarelli A.L. (2006) Function of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus late gene expression factors in the insect cell line SF-21. *Virology* 355:82–93. doi: 10.1016/j.virol.2006.07.006
- Bolstad B.M., Irizarry R.A., Astrand M., Speed T.P. (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19:185–193.
- Bonning B.C., Hammock B.D. (1996) Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annu Rev Entomol* 41:191–210. doi: 10.1146/annurev.ento.41.1.191
- Boyce F.M., Bucher N.L.R. (1996) Baculovirus-mediated gene transfer into

mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A 93:2348–2352. doi: 10.1073/pnas.93.6.2348

Brondyk W.H. (2009) Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. In: Methods in Enzymology, 1st edn. Elsevier Inc., pp 131–147

Carstens E.B. (2009) AcMNPV as a model for baculovirus DNA replication. Virol Sin 24:243–267.

Chang A.C.Y., Cohen S.N. (1974) Genome construction between bacterial species *in vitro*: replication and expression of *Staphylococcus* plasmid genes in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 71:1030–4. doi: 10.1073/pnas.71.4.1030

Chen Y-R., Zhong S., Fei Z., Hashimoto Y., Xiang J.Z., Zhang S., Blissard G.W. (2013) The transcriptome of the baculovirus *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* cells. J Virol 87:6391–405. doi: 10.1128/JVI.00194-13

Chen Y., Yao B., Zhu Z., Yi Y., Lin X., Zhang Z., Shen G. (2004) A constitutive super-enhancer: Homologous region 3 of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. Biochem Biophys Res Commun 318:1039–1044. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.136

Cheng X-W., Lynn D.E. (2009) Baculovirus interactions: *in vitro* and *in vivo*. In: Advances in applied microbiology, 1st edn. Elsevier Inc., pp 217–239

Choi J.Y., Roh J.Y., Wang Y., Zhen Z., Tao X.Y., Lee J.H., Liu Q., Kim J.S., Shin S.W., Je Y.H. (2012) Analysis of genes expression of *Spodoptera exigua* larvae upon AcMNPV infection. PLoS One 7:e42462. doi: 10.1371/journal.pone.0042462

Choi J.Y., Woo S.D., Je Y.H., Kang S.K. (1999) Development of a novel expression vector system using *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus. Mol Cells 9:504–509.

Cochran M.A., Faulkner P. (1983) Location of homologous DNA sequences interspersed at five regions in the baculovirus AcMNPV genome. J Virol 45:961–970.

Contreras-Gómez A., Sánchez-Mirón A., García-Camacho F., Molina-Grima E., Chisti Y. (2014) Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. Biotechnol Prog 30:1–18. doi: 10.1002/btpr.1842

Cunningham J.C. (1995) Baculoviruses as microbial insecticides. In: Reuveni R (ed) Novel Approaches to Integrated Pest Management. Boca Raton: Lewis, pp 261–292

Demain A.L., Vaishnav P. (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv 27:297–306. doi:

10.1016/j.biotechadv.2009.01.008

Elvira S., Ibargutxi M.A., Gorria N., Muñoz D., Caballero P., Williams T. (2013) Insecticidal characteristics of two commercial *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus strains produced on different host colonies. *J Econ Entomol* 106:50–56.

Erlandson M. (2008) Insect pest control by viruses. In: *Encyclopedia of Virology*. pp 125–133

Fath-Goodin A., Kroemer J., Martin S., Reeves K., Webb B.A. (2006) Polydnavirus genes that enhance the baculovirus expression vector system. *Adv Virus Res* 68:75–90. doi: 10.1016/S0065-3527(06)68002-0

Faulkner P., Kuzio J., Williams G.V., Wilson J.A. (1997) Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity *in vivo*. *J Gen Virol* 78:3091–100.

Federici B.A. (1997) Baculovirus pathogenesis. In: Miller LK (ed) *The Baculoviruses*. Springer US, pp 33–59

Fenner F. (1976) The classification and nomenclature of viruses. *J Gen Virol* 31:463–470. doi: 10.1159/000149025

Fernández F.J., Vega M.C. (2016) Choose a suitable expression host: a survey of available protein production platforms. In: *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization*. pp 15–24

Fink A.L. (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 79:425–449.

Fraser M.J., Hink W.F. (1982) The isolation and characterization of the MP and FP plaque variants of *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 117:366–378. doi: 10.1016/0042-6822(82)90476-7

Friesen P.D. (1997) Regulation of baculovirus early gene expression. In: *The Baculoviruses*. pp 141–170

Fuchs L.Y., Woods M.S., Weaver R.F. (1983) Viral transcription during *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection: a novel RNA polymerase induced in infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J Virol* 48:641–646.

Ge J., Jin L., Tang X., Gao D., An Q., Ping W. (2014) Optimization of eGFP expression using a modified baculovirus expression system. *J Biotechnol* 173:41–46. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.01.003

Giri L., Feiss M.G., Bonning B.C., Murhammer D.W. (2012) Production of baculovirus defective interfering particles during serial passage is delayed by removing transposon target sites in *fp25k*. *J Gen Virol* 93:389–99. doi: 10.1099/vir.0.036566-0

Gomez-Casado E., Gomez-Sebastian S., Núñez M.C., Lasa-Covarrubias R., Martínez-Pulgarín S., Escribano J.M. (2011) Insect larvae biofactories as a platform for influenza vaccine production. *Protein Expr Purif* 79:35–43. doi: 10.1016/j.pep.2011.03.007

Gómez-Sebastián S., López-Vidal J., Escribano J.M. (2014) Significant productivity improvement of the baculovirus expression vector system by engineering a novel expression cassette. *PLoS One* 9:e96562. doi: 10.1371/journal.pone.0096562

Grabherr R., Ernst W., Doblhoff-Dier O., Sara M., Katinger H. (1997) Expression of foreign proteins on the surface of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Biotechniques* 22:730–735.

Grace T.D.C. (1967) Establishment of a line of cells from the silkworm *Bombyx mori*. *Nature* 216:613. doi: 10.1038/216613a0

Granados R.R., Guoxun L., Derksen A.C.G., McKenna K.A. (1994) A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *J Invertebr Pathol* 64:260–266. doi: 10.1016/S0022-2011(94)90400-6

Gross C.H., Rohrmann G.F. (1993) Analysis of the role of 5' promoter elements and 3' flanking sequences on the expression of a baculovirus polyhedron envelope protein gene. *Virology* 192:273–281.

Gross C.H., Russell R.L.Q., Rohrmann G.F. (1994) *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: Analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure. *J Gen Virol* 75:1115–1123. doi: 10.1099/0022-1317-75-5-1115

Guarino L.A., Dong W., Jin J. (2002) In vitro activity of the baculovirus late expression factor LEF-5. *J Virol* 76:12663–12675. doi: 10.1128/JVI.76.24.12663

Guarino L.A., Gonzalez M.A., Summers M.D. (1986) Complete sequence and enhancer function of the homologous DNA regions of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 60:224–229.

Guarino L.A., Summers M.D. (1986) Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *J Virol* 57:563–571.

Haas-Stapleton E.J., Washburn J.O., Volkman L.E. (2004) P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae. *J Virol* 78:6786–6791. doi: 10.1128/JVI.78.13.6786

Hammock B.D., Bonning B.C., Possee R.D., Hanzlik T.N., Maeda S. (1990) Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. *Nature* 344:458–461.

Hara K., Funakoshi M., Kawarabata T. (1995) A cloned cell line of *Spodoptera exigua* has a highly increased susceptibility to the *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Can J Microbiol* 41:1111–1116.

Hara K., Funakoshi M., Tsuda K., Kawarabata T. (1993) New *Spodoptera exigua* cell lines susceptible to *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* 29:904–907. doi: 10.1007/BF02634225

Harrison R.L., Summers M.D. (1995) Mutations in the *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus 25 kDa protein gene result in reduced virion occlusion, altered intranuclear envelopment and enhanced virus production. *J Gen Virol* 76:1451–1459.

Hartl F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571–580. doi: 10.1038/381571a0

Hawtin R.E., Zarkowska T., Arnold K., Thomas C.J., Gooday G.W., King L.A., Kuzio J.A., Possee R.D. (1997) Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* 238:243–253. doi: 10.1006/viro.1997.8816

Hefferon K.L. (2004) Baculovirus late expression factors. *J Mol Microbiol Biotechnol* 7:89–101. doi: 10.1159/000078652

Herrero S., Ansems M., Van Oers M.M., Vlak J.M., Bakker P.L., de Maagd R.A. (2007) REPAT, a new family of proteins induced by bacterial toxins and baculovirus infection in *Spodoptera exigua*. *Insect Biochem Mol Biol* 37:1109–1118. doi: 10.1016/j.ibmb.2007.06.007

Hill-Perkins M.S., Possee R.D. (1990) A baculovirus expression vector derived from the basic protein promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol* 71:971–976.

Hitchman R.B., Locanto E., Possee R.D., King L.A. (2011) Optimizing the baculovirus expression vector system. *Methods* 55:52–57. doi: 10.1016/j.ymeth.2011.06.011

Hitchman R.B., Possee R.D., Crombie A.T., Chambers A., Ho K., Siaterli E., Lissina O., Sternard H., Novy R., Loomis K., Bird L.E., Owens R.J., King L.A. (2010a) Genetic modification of a baculovirus vector for increased expression in insect cells. *Cell Biol Toxicol* 26:57–68. doi: 10.1007/s10565-009-9133-y

Hitchman R.B., Possee R.D., King L.A. (2009) Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. *Recent Patents Biotechnol* 3:46–54.

Hitchman R.B., Possee R.D., Siaterli E., Richards K.S., Clayton A.J., Bird L.E., Owens R.J., Carpentier D.C.J., King F.L., Danquah J.O., Spink K.G., King L.A. (2010b) Improved expression of secreted and membrane-targeted proteins in insect cells. *Biotechnol Appl Biochem* 56:85–93. doi: 10.1042/BA20090130

Hiyoshi M., Kageshima A., Kato T., Park E.Y. (2007) Construction of a cysteine protease deficient *Bombyx mori* multiple nucleopolyhedrovirus bacmid and its application to improve expression of a fusion protein. *J Virol Methods* 144:91–97. doi: 10.1016/j.jviromet.2007.04.005

Ho Y., Lo H-R., Lee T-C., Wu C.P.Y., Chao Y-C. (2004) Enhancement of correct protein folding in vivo by a non-lytic baculovirus. *Biochem J* 382:695–702. doi: 10.1042/BJ20040007

Hofmann C., Sandig V., Jennings G., Rudolph M., Schlag P., Strauss M. (1995) Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10099–10103. doi: 10.1073/pnas.92.22.10099

Horton H.M., Burand J.P. (1993) Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *J Virol* 67:1860–1868.

Hu Y-C. (2008) Baculoviral vectors for gene delivery: a review. *Curr Gene Ther* 8:54–65. doi: 10.2174/156652308783688509

Huh N.E., Weaver R.F. (1990) Identifying the RNA-polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis-virus. *J Gen Virol* 71:195–201. doi: 10.1099/0022-1317-71-1-195

Ijkel W.F.J., van Strien E.A., Heldens J.G.M., Broer R., Zuidema D., Goldbach R.W., Vlak J.M. (1999) Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol* 80:3289–3304.

Ikonomou L., Schneider Y.J., Agathos S.N. (2003) Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:1–20. doi: 10.1007/s00253-003-1223-9

Inceoglu A.B., Kamita S.G., Hinton A.C., Huang Q., Severson T.F., Kang K., Hammock B.D. (2001) Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest Manag Sci* 57:981–987. doi: 10.1002/ps.393

International Committee on Taxonomy of Viruses (2016) *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses The Online (10th) Report of the ICTV*. London, UK

Ishiyama S., Ikeda M. (2010) High-level expression and improved folding of proteins by using the vp39 late promoter enhanced with homologous DNA regions. *Biotechnol Lett* 32:1637–1647. doi: 10.1007/s10529-010-0340-7

Iwanaga M., Takaya K., Katsuma S., Ote M., Tanaka S., Kamita S.G., Kang W., Shimada T., Kobayashi M. (2004) Expression profiling of baculovirus genes in permissive and nonpermissive cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 323:599–614. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.114

Jackson D.A., Symons R.H., Berg P. (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:2904–2909. doi: 10.1073/pnas.69.10.2904

Jakubowska A.K., Murillo R., Carballo A., Williams T., van Lent J.W.M., Caballero P., Herrero S. (2016) Iflavirus increases its infectivity and physical stability in association with baculovirus. *PeerJ* 4:e1687. doi: 10.7717/peerj.1687

Jakubowska A.K., Vogel H., Herrero S. (2013) Increase in gut microbiota after immune suppression in baculovirus-infected larvae. *PLoS Pathog* 9:e1003379. doi: 10.1371/journal.ppat.1003379

Jarvis D.L. (2009) Baculovirus-insect cell expression systems. In: *Methods in enzymology*. pp 191–222

Jarvis D.L., Weinkauff C., Guarino L.A. (1996) Immediate-early baculovirus vectors for foreign gene expression in transformed or infected insect cells. *Protein Expr Purif* 8:191–203. doi: 10.1006/prev.1996.0092

Jehle J.A., Blissard G.W., Bonning B.C., Cory J.S., Herniou E.A., Rohrmann G.F., Theilmann D.A., Thiem S.M., Vlak J.M. (2006) On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Arch Virol* 151:1257–1266. doi: 10.1007/s00705-006-0763-6

Johnson I.S. (1983) Human insulin from recombinant DNA technology. *Science* (80-) 219:632–637. doi: 10.1126/science.6337396

Kaba S.A., Salcedo A.M., Wafula P.O., Vlak J.M., Van Oers M.M. (2004) Development of a chitinase and v-cathepsin negative bacmid for improved integrity of secreted recombinant proteins. *J Virol Methods* 122:113–118. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.07.006

Kitts P.A., Ayres M.D., Possee R.D. (1990) Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Res* 18:5667–5672. doi: 10.1093/nar/18.19.5667

Kitts P.A., Possee R.D. (1993) A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques* 14:810–817.

Kogan P.H., Blissard G.W. (1994) A baculovirus *gp64* early promoter is activated by host transcription factor binding to CACGTG and GATA elements. *J Virol* 68:813–822.

Kool M., Voncken J.W., Van Lier F.L.J., Tramper J., Vlak J.M. (1991) Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties. *Virology* 183:739–746.

Kost T.A., Condreay J.P. (2002) Innovations-Biotechnology: Baculovirus vectors as gene transfer vectors for mammalian cells: Biosafety considerations. *J Am Biol Saf Assoc* 7:167–169.

Kost T.A., Kemp C.W. (2016) Fundamentals of baculovirus expression and applications. In: *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization*. pp 187–197

Krell P.J. (1996) Passage effect of virus infection in insect cells. *Cytotechnology* 20:125–137. doi: 10.1007/BF00350393

Kroemer J.A., Webb B.A. (2004) Polydnavirus genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. *Ann Rev Entomol* 49:431–456. doi: 10.1146/annurev.ento.49.072103.120132

Kuzio J., Jaques R., Faulkner P. (1989) Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology* 173:759–763.

Lee H.Y., Krell P.J. (1992) Generation and analysis of defective genomes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 66:4339–4347.

Lee S-Y., Poloumienko A., Belfry S., Qu X., Chen W., MacAfee N., Morin B., Lucarotti C., Krause M. (1996) A common pathway for p10 and calyx proteins in progressive stages of polyhedron envelope assembly in AcMNPV-infected *Spodoptera frugiperda* larvae. *Arch Virol* 2057–2076.

Li S., Wang H., Hu Z., Deng F. (2012) Genetic modification of baculovirus expression vectors. *Virology* 27:71–82. doi: 10.1007/s12250-012-3236-y

Lin C-H., Jarvis D.L. (2012) Utility of temporally distinct baculovirus promoters for constitutive and baculovirus-inducible transgene expression in transformed insect cells. *J Biotechnol* 29:997–1003. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.021. Secreted

Lin C-Y., Lu C-H., Luo W-Y., Chang Y-H., Sung L-Y., Chiu H-Y., Hu Y-C. (2010) Baculovirus as a gene delivery vector for cartilage and bone tissue engineering. *Curr Gene Ther* 10:242–254.

Liu Q-X., Ueda H., Hirose S. (2000) MBF2 is a tissue- and stage-specific coactivator that is regulated at the step of nuclear transport in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev Biol* 225:437–446. doi: 10.1006/dbio.2000.9836

Lo H-R., Chou C-C., Wu T-Y., Yuen J.P-Y., Chao Y-C. (2002) Novel baculovirus DNA elements strongly stimulate activities of exogenous and endogenous promoters. *J Biol Chem* 277:5256–5264. doi: 10.1074/jbc.M108895200

Lobban P.E., Kaiser A.D. (1973) Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. *J Mol Biol* 78:453–471.

Long G., Pan X., Kormelink R., Vlak J.M. (2006) Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal Virol* 80:8830–8833. doi: 10.1128/JVI.00880-06

López-Vidal J., Gómez-Sebastián S., Sánchez-Ramos I., Escribano J.M. (2013) Characterization of a *Trichoplusia ni* hexamerin-derived promoter in the AcMNPV baculovirus vector. *J Biotechnol* 165:201–208. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.03.012

Lu A., Miller L.K. (1995) The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication. *J Virol* 69:975–982.

Lu A., Miller L.K. (1997) Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In: *The Baculoviruses*. pp 193–216

Lua L.H.L., Pedrini M.R.S., Reid S., Robertson A., Tribe D.E. (2002) Phenotypic and genotypic analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus serially passaged in cell culture. *J Gen Virol* 83:945–955.

Luckow V.A., Lee S.C., Barry G.F., Olins P.O. (1993) Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol* 67:4566–4579.

Luckow V.A., Summers M.D. (1988) Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology* 167:56–71. doi: 10.1016/0042-6822(88)90054-2

Maeda S. (1989) Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. *Biochem Biophys Res Commun* 165:1177–1183. doi: 10.1016/0006-291X(89)92726-5

Maeda S., Kawai T., Obinata M., Fujiwara H., Horiuchi T., Saeki Y., Sato Y., Furusawa M. (1985) Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* 315:592–594.

Manohar S.L., Kanamasa S., Nishina T., Kato T., Park E.Y. (2010) 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* 107:909–916. doi: 10.1002/bit.22896

Martínez-Solís M., Gómez-Sebastián S., Escribano J.M., Jakubowska A.K., Herrero S. (2016) A novel baculovirus-derived promoter with high activity in the baculovirus expression system. *PeerJ* 4:e2183. doi: 10.7717/peerj.2183

Martínez Escribano J.Á., Alvarado Fradua C., Reytor Saavedra E., Cid Fernandez M. (2017) Expression of recombinant proteins in *Trichoplusia ni* pupae. WO 2017046415 A3

Matsuura Y., Possee R.D., Overton H.A., Bishop D.H.L. (1987) Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J Gen Virol* 68:1233–1250. doi: 10.1099/0022-1317-68-5-1233

McCutchen B.F., Choudary P.V., Crenshaw R., Maddox D., Kamita S.G., Palekar N., Volrath S., Fowler E., Hammock B.D., Maeda S. (1991) Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin: potential for pest control. *Nat Biotechnol* 9:848–852. doi: 10.1038/nbt0991-848

Medina I., Carbonell J., Pulido L., Madeira S.C., Goetz S., Conesa A., Tárrega J., Pascual-Montano A., Nogales-Cadenas R., Santoyo J., García F., Marbà M., Montaner D., Dopazo J. (2010) Babelomics: An integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Res* 38:210–213. doi: 10.1093/nar/gkq388

Mertz J.E., Davis R.W. (1972) Cleavage of DNA by R1 restriction endonuclease generates cohesive ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:3370–3374. doi: 10.1073/pnas.69.11.3370

Min M-K., Bishop D.H.L. (1991) Transcriptional analyses of baculovirus polyhedrin and foreign gene expression relative to baculovirus p10 mRNA levels. *J Gen Virol* 72 (Pt 10:2551–6.

Mitchell J.K., Byers N.M., Friesen P.D. (2013) Baculovirus F-Box protein LEF-7 modifies the host DNA damage response to enhance virus multiplication. *J Virol* 87:12592–12599. doi: 10.1128/JVI.02501-13

Monsma S.A., Oomens A.G.P., Blissard G.W. (1996) The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J Virol* 70:4607–4616.

Monteiro F., Carinhas N., Carrondo M.J.T., Bernal V., Alves P.M., Coombs K., Wang H-W., Krell P. (2012) Toward system-level understanding of baculovirus–host cell interactions: from molecular fundamental studies to large-scale proteomics approaches. *Front Microbiol* 3:1–16. doi: 10.3389/fmicb.2012.00391

Morris T.D., Miller L.K. (1992) Promoter influence on baculovirus-mediated gene expression in permissive and nonpermissive insect cell lines. *J Virol* 66:7397–7405.

Moscardi F. (1999) Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* 44:257–289. doi: 10.1146/annurev.ento.44.1.257

Moscardi F., Leite L.G., Zamataro C.E. (1997) Production of nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera:Noctuidae): effect of virus dosage, host density and age. *An da Soc Entomológica do Bras* 26:121–132. doi: 10.1590/S0301-80591997000100017

Moscardi F., Lobo De Souza M., Batista de Castro M.E., Moscardi M.L., Szewczyk B. (2011) Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. In: *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*. Springer, New York, pp 415–445

Moscardi F., Sosa-Gomez D.R. (1992) Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. *Pest Manag Soybean* 98–109.

Motohashi T., Shimojima T., Fukagawa T., Maenaka K., Park E.Y. (2005) Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system. *Biochem Biophys Res Commun* 326:564–569. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.11.060

Muñoz D., Castillejo J.I., Caballero P. (1998) Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population of *Spodoptera exigua*. *Appl Environ Microbiol* 64:4372–4377.

Muñoz D., Murillo R., Krell P.J., Vlak J.M., Caballero P. (1999) Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region. *Virus Res* 59:61–74. doi: 10.1016/S0168-1702(98)00125-7

Naggie S., Bentley W.E. (1998) Appearance of protease activities coincides with p10 and polyhedrin-driven protein production in the baculovirus expression system: Effects on yield. *Biotechnol Prog* 14:227–232. doi: 10.1021/bp980002b

Navarro-Cerrillo G., Hernández-Martínez P., Vogel H., Ferré J., Herrero S. (2013) A new gene superfamily of pathogen-response (repat) genes in Lepidoptera: Classification and expression analysis. *Comp Biochem Physiol Part B* 164:10–17. doi: 10.1016/j.cbpb.2012.09.004

Navarro-Cerrillo G., Ferré J., de Maagd R.A., Herrero S. (2012) Functional interactions between members of the REPAT family of insect pathogen-induced proteins. *Insect Mol Biol* 21:335–342. doi: 10.1111/j.1365-2583.2012.01139.x

Nguyen Q., Nielsen L.K., Reid S. (2013) Genome scale transcriptomics of baculovirus-insect interactions. *Viruses* 5:2721–2747. doi: 10.3390/v5112721

O'Reilly D.R., Miller L.K. (1991) Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene. *Nat Biotechnol* 9:1086–1089. doi: 10.1038/nbt1191-1086

O'Reilly D.R., Miller L.K., Luckow V.A. (1994) *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. Oxford University Press

Ooi B.G., Rankin C., Miller L.K. (1989) Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene. *J Mol Biol* 210:721–36.

Overton T.W. (2014) Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov Today* 19:590–601. doi: 10.1016/j.drudis.2013.11.008

Pascual L., Jakubowska A.K., Blanca J.M., Cañizares J., Ferré J., Gloeckner G., Vogel H., Herrero S. (2012) The transcriptome of *Spodoptera exigua* larvae exposed to different types of microbes. *Insect Biochem Mol Biol* 42:557–70. doi: 10.1016/j.ibmb.2012.04.003

Passarelli A.L., Miller L.K. (1993) Identification of genes encoding late expression factors located between 56.0 and 65.4 map units of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* 197:704–714.

Pedrini M.R.S., Wolff J.L.C., Reid S. (2004) Fast accumulation of few polyhedra

mutants during passage of a *Spodoptera frugiperda* multicapsid nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) in Sf9 cell cultures. *Ann Appl Biol* 145:107–112. doi: 10.1111/j.1744-7348.2004.tb00365.x

Peng K., van Lent J.W.M., Boeren S., Fang M., Theilmann D.A., Erlandson M.A., Vlak J.M., van Oers M.M. (2012) Characterization of novel components of the baculovirus *per os* infectivity factor complex. *J Virol* 86:4981–4988. doi: 10.1128/JVI.06801-11

Pijlman G.P., de Vrij J., van den End F.J., Vlak J.M., Martens D.E. (2004) Evaluation of baculovirus expression vectors with enhanced stability in continuous cascaded insect-cell bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 87:743–53. doi: 10.1002/bit.20178

Pijlman G.P., Dortmans J.C.F.M., Vermeesch A.M.G., Yang K., Martens D.E., Goldbach R.W., Vlak J.M. (2002) Pivotal role of the non-*hr* origin of DNA replication in the genesis of defective interfering baculoviruses. *J Virol* 76:5605–5611. doi: 10.1128/JVI.76.11.5605

Pijlman G.P., Roode E.C., Fan X., Roberts L.O., Belsham G.J., Vlak J.M., van Oers M.M. (2006) Stabilized baculovirus vector expressing a heterologous gene and GP64 from a single bicistronic transcript. *J Biotechnol* 123:13–21. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.10.022

Pijlman G.P., van den Born E., Martens D.E., Vlak J.M. (2001) *Autographa californica* baculoviruses with large genomic deletions are rapidly generated in infected insect cells. *Virology* 283:132–138. doi: 10.1006/viro.2001.0854

Pijlman G.P., van Schijndel J.E., Vlak J.M. (2003) Spontaneous excision of BAC vector sequences from bacmid-derived baculovirus expression vectors upon passage in insect cells. *J Gen Virol* 84:2669–2678. doi: 10.1099/vir.0.19438-0

Popham H.J.R., Grasela J.J., Goodman C.L., McIntosh A.H. (2010) Baculovirus infection influences host protein expression in two established insect cell lines. *J Insect Physiol* 56:1237–1245. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.03.024

Pritchett D.W., Young S.Y., Yearian W. (1982) Dissolution of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra by the digestive fluid of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *J Insect Sci* 39:354–361.

Rapp J.C., Wilson J.A., Miller L.K. (1998) Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression. *J Virol* 72:10197–10206.

Reardon R.C., Podgwaite J., Zerillo R. (1996) Gypchek - The gypsy moth nucleopolyhedrosis virus product. United States. Forest Health Technology Enterprise Team

Regev A., Rivkin H., Gurevitz M., Chejanovsky N. (2006) New measures of insecticidal efficacy and safety obtained with the 39K promoter of a recombinant baculovirus. *FEBS Lett* 580:6777–6782. doi: 10.1016/j.febslet.2006.11.037

Rezende S.H.M.S., de Castro M.E.B., Souza M.L. (2009) Accumulation of few-polyhedra mutants upon serial passage of *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus in cell culture. *J Invertebr Pathol* 100:153–159. doi: 10.1016/j.jip.2008.12.002

Rohrmann G.F. (2013) *Baculovirus molecular biology*, 3rd edn. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda

Rohrmann G.F. (1999) Nuclear polyhedrosis viruses. In: *Encyclopedia of virology*, 2nd ed. Academic Press, London, United Kingdom, pp 146–152

Russell R.L.Q., Pearson M.N., Rohrmann G.F. (1991) Immunoelectron microscopic examination of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus-infected cells: time course and localization of major polyhedron-associated proteins. *J Gen Virol* 72 (Pt 2):275–83. doi: 10.1099/0022-1317-72-2-275

Sagisaka A., Fujita K., Nakamura Y., Ishibashi J., Noda H., Imanishi S., Mita K., Yamakawa M., Tanaka H. (2010) Genome-wide analysis of host gene expression in the silkworm cells infected with *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Res* 147:166–175. doi: 10.1016/j.virusres.2009.10.015

Salem T.Z., Zhang F., Xie Y., Thiem S.M. (2011) Comprehensive analysis of host gene expression in *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Virology* 412:167–178. doi: 10.1016/j.virol.2011.01.006

Sano K-I., Maeda K., Oki M., Maéda Y. (2002) Enhancement of protein expression in insect cells by a lobster tropomyosin cDNA leader sequence. *FEBS Lett* 532:143–146. doi: 10.1016/S0014-5793(02)03659-1

Schoch G.A., Attias R., Le Ret M., Werck-Reichhart D. (2003) Key substrate recognition residues in the active site of a plant cytochrome P450, CYP73A1: Homology model guided site-directed mutagenesis. *Eur J Biochem* 270:3684–3695. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03739.x

Schuler M.A. (2012) Insect P450s: mounted for battle in their war against toxins. *Mol Ecol* 21:4157–4159. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05657.x

Schultz K.L.W., Friesen P.D. (2009) Baculovirus DNA replication-specific expression factors trigger apoptosis and shutoff of host protein synthesis during infection. *J Virol* 83:11123–11132. doi: 10.1128/JVI.01199-09

Shang H., Garretson T.A., Senthil Kumar C.M., Dieter R.F., Cheng X-W. (2017) Improved pFastBac™ donor plasmid vectors for higher protein production using the Bac-to-Bac® baculovirus expression vector system. *J Biotechnol* 255:37–46. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.397

Slavicek J.M., Mercer M.J., Kelly M.E., Hayes-Plazolles N. (1996) Isolation of a baculovirus variant that exhibits enhanced polyhedra production stability during serial passage in cell culture. *J Invertebr Pathol* 67:153–160.

Smith G.E., Summers M.D., Fraser M.J. (1983) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol* 3:2156–2165. doi: 10.1128/MCB.3.12.2156.Updated

Su J., Lung O., Blissard G.W. (2011) The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *lef-5* gene is required for productive infection. *Virology* 416:54–64. doi: 10.1016/j.virol.2011.04.019

Summers M.D., Smith G.E. (1987) A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Bulletin / Texas Agricultural Experiment Station ; no. 1555.

Sun X. (2015) History and current status of development and use of viral insecticides in China. *Viruses* 7:306–319. doi: 10.3390/v7010306

Suzuki T., Kanaya T., Okazaki H., Ogawa K., Usami A., Watanabe H., Kadono-Okuda K., Yamakawa M., Sato H., Mori H., Takahashi S., Oda K. (1997) Efficient protein production using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus lacking the cysteine proteinase gene. *J Gen Virol* 78:3073–3080. doi: 10.1099/0022-1317-78-12-3073

Thayer A. (2003) Dolly's maker to close its doors. *Chem Eng News Arch* 81:9. doi: 10.1021/cen-v081n038.p009a

Thézé J., Cabodevilla O., Palma L., Williams T., Caballero P., Herniou E.A. (2014) Genomic diversity in European *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus isolates. *J Gen Virol* 95:2297–2309. doi: 10.1099/vir.0.064766-0

Thiem S.M., Miller L.K. (1990) Differential gene expression mediated by late, very late and hybrid baculovirus promoters. *Gene* 91:87–94. doi: 10.1016/0378-1119(90)90166-O

Tiwari P., Saini S., Upmanyu S., Benjamin B., Tandon R., Saini K.S., Sahdev S. (2010) Enhanced expression of recombinant proteins utilizing a modified baculovirus expression vector. *Mol Biotechnol* 46:80–89. doi: 10.1007/s12033-010-9284-3

Tramper J., Vlak J.M. (1986) Some engineering and economic aspects of continuous cultivation of insect cells for the production of baculoviruses. *Biochem Eng IV* 468:279–288.

van Lent J.W.M., Groenen J.T.M., Klinge-Roode E.C., Rohrmann G.F., Zuidema D., Vlak J.M. (1990) Localization of the 34 kDa polyhedron envelope protein in *Spodoptera frugiperda* cells infected with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Arch Virol* 111:103–114. doi: 10.1007/BF01310508

van Oers M.M. (2011) Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *J Invertebr Pathol* 107:S3–S15. doi: 10.1016/j.jip.2011.05.001

van Oers M.M., Pijlman G.P., Vlak J.M. (2015) Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *J Gen Virol* 96:6–23. doi: 10.1099/vir.0.067108-0

Vaughn J.L., Goodwin R.H., Tompkins G.J., McCawley P. (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13:213–217. doi: 10.1007/BF02615077

Venkaiah B., Viswanathan P., Habib S., Hasnain S.E. (2004) An additional copy of the homologous region (hr1) sequence in the *Autographa californica* multinucleocapsid polyhedrosis virus genome promotes hyperexpression of foreign genes. *Biochemistry* 43:8143–8151. doi: 10.1021/bi049953q

Vincent C., Andermatt M., Valéro J. (2007) Madex® and VirosoftCP4®, viral biopesticides for codling moth control. In: *Biological control: a global perspective*. pp 336–343

Volkman L.E., Summers M.D. (1977) *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: Comparative infectivity of the occluded, alkali-liberated, and nonoccluded forms. *J Invertebr Pathol* 30:102–103. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(77\)90045-3](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(77)90045-3)

Wang R-L., Xia Q-Q., Baerson S.R., Ren Y., Wang J., Su Y-J., Zheng S-C., Zeng R-S. (2015) A novel cytochrome P450 CYP6AB14 gene in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and its potential role in plant allelochemical detoxification. *J Insect Physiol* 75:54–62. doi: 10.1016/j.jinsphys.2015.02.013

Wang R., Deng F., Hou D., Zhao Y., Guo L., Wang H., Hu Z. (2010) Proteomics of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus budded virions. *J Virol* 84:7233–7242. doi: 10.1128/JVI.00040-10

Wang S., Balasundaram G. (2010) Potential cancer gene therapy by baculoviral transduction. *Curr Gene Ther* 10:214–225.

Weyer U., Possee R.D. (1988) Functional analysis of the p10 gene 5' leader sequence of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Nucleic Acids Res* 16:3635–3653. doi: 10.1093/nar/16.9.3635

Wickham T.J., Davis T., Granados R.R., Hammer D.A., Shuler M.L., Wood H.A. (1991) Baculovirus defective interfering particles are responsible for variations in recombinant protein production as a function of multiplicity of infection. *Biotechnol Lett* 13:483–488.

Xue J., Qiao N., Zhang W., Cheng R-L., Zhang X-Q., Bao Y-Y., Xu Y-P., Gu L-Z., Han J-D.J., Zhang C-X. (2012) Dynamic interactions between *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus and its host cells revealed by transcriptome analysis. *J Virol* 86:7345–7359. doi: 10.1128/JVI.07217-12

Yokoyama N., Hirata M., Ohtsuka K., Nishiyama Y., Fujii K., Fujita M., Kuzushima K., Kiyono T., Tsurumi T. (2000) Co-expression of human chaperone Hsp70 and Hsdj or Hsp40 co-factor increases solubility of overexpressed target proteins in insect cells. *Biochim Biophys Acta* 1493:119–124.

ANEXOS

ANEXO I: Sequence of the primers employed in Chapter 1

Primer name	Sequence (5'-3')
Cloning	
pSeL ^F	GGATCCGTATACATCATGTGTTTGAACGGCGACTG
pSeL ^R	GACTAGTATATTGTAGCAAAAATTTAATTTTTGCCAAAAG
pSeS ^F	GGATCCGTATACATCATGTGTTTGAACGGCGACTG
pSeS ^R	GACTAGTGCCAAAAGACTTAATAAATCATCAGC
pSeL-140 ^F	TAGTATACCGAATGTACAATATTGTTG
pSeL-140 ^R	CTGGGTGTAGCGTCGTAAGC
pSeL-120 ^F	TAGTATACGTTCAATAATCAATAAACCTCTC
pSeL-120 ^R	CTGGGTGTAGCGTCGTAAGC
polh-pSeL ^F	ATCTCGAGGTTCAATAATCAATAAACCTCTCTATTATCCTTTGTAAA TTTTTATTTACTTTGTTGTCCATTGCTGATCAT
polh-pSeL ^R	CTGGGTGTAGCGTCGTAAGC
qPCR	
qF-AcMNPV-pol	GGGTCAGGCTCCTCTTTGC
qR-AcMNPV-pol	TTACGCAGCCATCACAAACAC

Anexo II: List of probes for AcMNPV genes employed in Chapter 2

TargetID	BPStart	Sequence
AcMNPV_major_occlusion_body_pro...	66	AAATTTAGGTGCCGTTATCAAGAACGCTAAGCGCAAGAAGCACTTCGCCGAACATGAGAT
AcMNPV_major_occlusion_body_pro...	63	CAAAAATTTAGGTGCCGTTATCAAGAACGCTAAGCGCAAGAAGCACTTCGCCGAACATGA
AcMNPV_AcOrf-11_peptide	915	CAAAAACCTCATTGATGGACCTGTTGTGTATTGGATTGTGAAGAAATAGATGTGATTG
AcMNPV_AcOrf-11_peptide	778	GGCAAAACCACGCAAGAAGAAAAGTCTTTTCCTTGTATTAGGGTATTAAAGATTTTGGT
AcMNPV_AcOrf-12_peptide	488	AAGATTGCAACGGATTTTACCCATTTGAGCCAACGCGCGATTGTTAATATGCAAAACAAA
AcMNPV_AcOrf-12_peptide	390	GAGTATTTGCGGTCCACCAGAGAGCGACAATTTTTAGTGTAAACAAATAACAAGTAGAAAT
AcMNPV_AcOrf-13_peptide	925	GTAATTGACGTGGATTGTAAGTCTAATGTAGTTAGAGAGGTTATACAGGAAGATTGTAA
AcMNPV_AcOrf-13_peptide	841	CACCCAAATCCCTTGTGGCTATTCAATGTATTAACGAAAACCTACGATAAACATTAC
AcMNPV_lef_1	614	GCGCACCGTACAGCTATAAATATAAGGGAACGAAATTTTCGTTGTATAACAAAGGAAT
AcMNPV_lef_1	574	GTGGACAGGGATATTTTTGTAACGTTAAACAAACAAACACGCGCACCGTACAGCTATAAT
AcMNPV_ecdyseroid_UDP-glucosyl...	1405	GACATCAGTCGTCAATTGTATTCAAAAAACAACAGCTGCCAATGTACCGTATTCAAAT
AcMNPV_ecdyseroid_UDP-glucosyl...	1345	ACGTTTCCGCTCTAGATAAAGCCATCAAATTCACAGAACGCGTAATTCGATATAGACAT
AcMNPV_AcOrf-16_peptide	580	CGGTTTCGAGTTATAAATCCGGACGAGATTGCTAGTGGTAAACGTTAATAATAAACAT
AcMNPV_AcOrf-16_peptide	540	GGCGTTTGGTTCGCGAGTCATAGTTTATGAAAATAGTCGCGGTTCCGAGTTTATAAATCC
AcMNPV_AcOrf-17_peptide	349	CGTAAAGTGAAGGACGTGGTGGATTCAATTCAAACCAACAGACAATGTTAAAGATTTT
AcMNPV_AcOrf-17_peptide	282	CGATGAAGGTACAACAATGCCTTATGTCATTGGACCATTATATTCTGTGACGCTGCTGT
AcMNPV_AcOrf-18_peptide	1000	CACAAGAGTTTGTGTGACCAAAATGGAAGCGGTTTATGTCATGATTTTTTCGTTATAC
AcMNPV_AcOrf-18_peptide	937	TTGACCACCGACACGTTTAGCGGACAACCTGCCCGCTATTTAACTCATTACGTAACCTAT
AcMNPV_AcOrf-19_peptide	258	CGACGGGTTACGATTCAACATAAAATGTTAACCAACGTGTTAAGTTTTTTGTTGGAAAA
AcMNPV_AcOrf-19_peptide	257	GCGACGGGTTACGATTCAACATAAAATGTTAACCAACGTGTTAAGTTTTTTGTTGGAAAA
AcMNPV_actin_rearrangement_induct...	151	AGCGAAGAGTTGCAGCGTAAATTTCAAGAGAAAAAATATTACCCGTTTATGATGATTAG
AcMNPV_actin_rearrangement_induct...	146	GTTTTAGCGAAGAGTTGCAGCGTAAATTTCAAGAGAAAAAATATTACCCGTTTATGATG
AcMNPV_actin_rearrangement_induct...	852	TTCGGTTTCAGAAACACTTTCATCTTTTATCGCGCCTTCGGACTTGTCTTACAGCCATC
AcMNPV_actin_rearrangement_induct...	720	TTATTGCGACATTGACTATCGCCGCGAAGAACGAGAGAGTAACCTCTAGATTGCTGGAAGT
AcMNPV_AcOrf-22_peptide	1090	TTTTATCTTGATACCAGATCTCGAGTTAATTACAATGACGTCAGAGGGCAGTTATCTTAA
AcMNPV_AcOrf-22_peptide	980	TGTTATGTCCAGTGACACTTTTATAGTAGTAACACGGACGCGACTTTTGCCTTTGAAGTGC
AcMNPV_copialike_envelope_protein	1936	GCATACATTAATTTACCTAATGAATACGATAGCGATGATATGCCAAAACCATGTACCCT
AcMNPV_copialike_envelope_protein	1782	CGCTATTGTCGCTGCAATGATCTATTCTGTGGATTATTGTTATTTTTGTTTGTCTGTAT
AcMNPV_protein_kinase_interacti...	341	CGGTTTACGATTCTTCATAAAAACACAGCGAATTATTTATAAACGCCATATGTCAAATGG
AcMNPV_protein_kinase_interacti...	340	GCGGTTTACGATTCTTCATAAAAACACAGCGAATTATTTATAAACGCCATATGTCAAATG
AcMNPV_ssDNA_binding_protein	870	GGACATGAATAATAAGAAAATACCAGAAAAGCCCTATTGTTAGCTTTTAAAGCCTGGAAT
AcMNPV_ssDNA_binding_protein	809	TTAAAATGTACATGATGGGCACCATGACGGCGTCAAGTACGGCAAGAGATGCAGATGA

AcMNPV_AcOrf-26_peptide	328	AACGTGTCGCTAAACCAAAACGACGCAAACGTGCTCATTTTGACCGTAACTTAAACGAGC
AcMNPV_AcOrf-26_peptide	298	GCCGAAACAAAAACCAAACCTGGGCCATATAAACGTGTCGCTAAACCAAAACGACGCAAAAC
AcMNPV_apoptosis_inhibitor_1	802	CAAAAGTGTCCGACGTGTCGTCAGGACGTCACCGATTTTATAAAAAATTTTGTGGTGTA
AcMNPV_apoptosis_inhibitor_1	742	GCCGTGCTTATGCCGTGTCGGCATTTCGCGTTTGCCTTCAGTGTATTTTGGATTAGAT
AcMNPV_lef_6	446	GCGAAATCGACGAACGTGACTCTTTAAAAAGTTTAAATATCATCTAGACGACTTGAATG
AcMNPV_lef_6	445	GGCGAAATCGACGAACGTGACTCTTTAAAAAGTTTAAATATCATCTAGACGACTTGAAT
AcMNPV_AcOrf-29_peptide	148	CAGAATATGGAGAAGAGAGTTATGAAGTCAAGACAAAACCTTCTCAACTACGGAATAGAC
AcMNPV_AcOrf-29_peptide	147	GCAGAATATGGAGAAGAGAGTTATGAAGTCAAGACAAAACCTTCTCAACTACGGAATAGA
AcMNPV_AcOrf-30_peptide	1322	GCAATAAAAAATAACCATTTTATGGAAGATGTGTACGAGCAAATGGTCGCGATACAAATGA
AcMNPV_AcOrf-30_peptide	1250	TTTTATCGGCCACGACGCCCATTTGCCCTTTAACCTACGACATTTGCAAAATGTCAATG
AcMNPV_superoxid_e_dismutase	322	CATAATATTATCGGAAGAAGTTTGGTCGTGCACACGGACAAGACGATTTGGGCCTTACC
AcMNPV_superoxid_e_dismutase	302	TTATGTCTCTATATGGCCCCATAATATTATCGGAAGAAGTTTGGTCGTGCACACGGACA
AcMNPV_fibroblast_growth_factor	487	ACGTGCTGCTCAATATAAAAAAGTAAATTTATTGTTCCGCAATCGTAAATGTCACGTGTA
AcMNPV_fibroblast_growth_factor	467	GCTTAAGCTTTCATATACACGTCGTGCTCAATATAAAAAAGTAAATTTATTGTTCCGCC
AcMNPV_putative_histidinol-phos...	484	GCAAAAAAATAAGTCTGCAGTTTTACACGCCAGAGCAGTTTATACAACCTCGACCTTGAT
AcMNPV_putative_histidinol-phos...	454	AAAGATTTTAGCGATTACAGACCGAGTGTTCGCAAAAAAATAAGTCTGCAGTTTACACG
AcMNPV_AcOrf-34_peptide	576	TCTAATGGCAAGCTACAATTTTTCAACGCCGACCTGGACACAAAACGCGTACGAATTGAT
AcMNPV_AcOrf-34_peptide	536	GTGCGCTACAAACGCTTACAAAAATTTGAATCGCTATCCGATTAATGGCAAGCTACAATT
AcMNPV_viral_ubiquitin	175	TACAATATTCAGAAGGAATCTACTCTTACATGGTGTACGATTACGAGGAGGGTATTAA
AcMNPV_viral_ubiquitin	174	TTACAATATTCAGAAGGAATCTACTCTTACATGGTGTACGATTACGAGGAGGGTATTAA
AcMNPV_nuclear_matrix_associate...	769	GTGGCTCCAGCACTTTTAAATGGTTAGCGATAATACACAAGATACAAATATGTCAGATTAA
AcMNPV_nuclear_matrix_associate...	708	GAAAAGGAAAAAGCTCAGTTCAGCCAAACACGATCTTCTATAAAGACTCGCCGCAACAC
AcMNPV_lef_11	220	TCGAAGCGTAAGGTGTGTCTTCATCACAACGAATGCCAGGTTGTTGGGCATTAATAAAA
AcMNPV_lef_11	219	TTCGAAGCGTAAGGTGTGTCTTCATCACAACGAATGCCAGGTTGTTGGGCATTAATAAAA
AcMNPV_AcOrf-38_peptide	577	GACTTTTTCTACGCCACTCTGAAAAAGATAGACAACGATGCCCCCCAAAAATTCACGCGCA
AcMNPV_AcOrf-38_peptide	547	AAGGCGCGTTTTGATAATAGGCAATTCAGGACTTTTTCTACGCCACTCTGAAAAAGATA
AcMNPV_p43	1026	GCAACTGAACAAGGACGGATCTAAAAATTAACCGGGTTCAACGTAACGTAATAAATG
AcMNPV_p43	966	CGGGTGGAACAGACAAGGCGGTTTTGCAGAACCAGAAAAATTTGTCAATTAGTCAACTT
AcMNPV_transcripton_regulator	1147	ACCGGTGCACATTACGGCAAACGTGTTGTCAATTTTGATTGAATCAATCGTTACTACTGA
AcMNPV_transcripton_regulator	1087	CGTGTAATCAATTGCGACAGCGAAATAACATGGATTACATACGCGGCAAACGTGTGCGA
AcMNPV_AcOrf-41_peptide	442	GTGTATGTTAGAAAACCTTGGTGCATACAAGTAGCGACATTATCAGTTTACGAACAAAT
AcMNPV_AcOrf-41_peptide	441	TGTGTATGTTAGAAAACCTTGGTGCATACAAGTAGCGACATTATCAGTTTACGAACAAAT
AcMNPV_global_transactivator-li...	1456	GTCACACGGTCTTTGAAGAGACTCTGCTCAATTACGAAGACATTAATAAATTTTCAAC
AcMNPV_global_transactivator-li...	1396	GTGAAGACAACAGCATCGAAAAATACATTAACAACGCCAAGACAAAAAGATTGCGTTT
AcMNPV_AcOrf-43_peptide	116	TTGTTAAAAACGGTATCGTGTCTGCCACGTTGTCGTCGGAACATAAAAAATGGCAACG

Anexo II

AcMNPV_AcOrf-43_peptide	115	ATTGTTAAAAACGGTATCGTGCTGTGCCACGTTGTCGTCGGAACATAAAAAATTGGCAAC
AcMNPV_AcOrf-44_peptide	323	CGGTAACCGTGGACAACACGTGTCTAAATGTAAAAGCGGCATTAGATATAAAATAAAAAT
AcMNPV_AcOrf-44_peptide	322	ACGGTAAACGTGGACAACACGTGTCTAAATGTAAAAGCGGCATTAGATATAAAATAAAA
AcMNPV_AcOrf-45_peptide	470	ACTCGTTCGGCAAATGCGAGTGGTTGGACAAAAATATAAAAACTGTGTGTTTACAATTTAA
AcMNPV_AcOrf-45_peptide	450	GGCGTCTATTTGTTTAAAACTCGTTCCGGCAAATGCGAGTGGTTGGACAAAAATATAAAA
AcMNPV_ODV_envel ope_protein_1	2033	CATCAAATGCTTTGTGTATGGAACCGGTTTCAAATTGAACAACAGCACGTTTGATTAC
AcMNPV_ODV_envel ope_protein_1	1973	CATTTAGCGTTATAATGAATTCCTCACCTCTATCGGCGAACCAGCTTTGCAATACTCTC
AcMNPV_AcOrf-47_peptide	203	CCACGTCGGAACAGCGTGATTTGTACGCGTTAGCATTAAAAATTAACAGTTTAATAAATA
AcMNPV_AcOrf-47_peptide	202	TCCACGTCGGAACAGCGTGATTTGTACGCGTTAGCATTAAAAATTAACAGTTTAATAAAT
AcMNPV_AcOrf-48_peptide	245	CTGTGCAAGACACCTTTGATTTTGGTCTGTTACTTTAAAAATAAAATTACCGACGCTG
AcMNPV_AcOrf-48_peptide	244	CCTGTGCAAGACACCTTTGATTTTGGTCTGTTACTTTAAAAATAAAATTACCGACGCT
AcMNPV_proliferatin g_cell_nucle...	608	ATTACTGTGTCAATTTGCTAAAGCCGCTCCTTTGGCGCCACCCTGACAATATACATGT
AcMNPV_proliferatin g_cell_nucle...	570	CAAAGCAAAGCAAACCGTAACGCACACTTTTGCGGGCGATTACTTGTGTCAATTTTGTAA
AcMNPV_lef_8;_puta tive_DNA-depe...	2572	GGCGAGTTCAACGTGGTGTCCAGCCTGTTGATGTGCAACAATACGATAATGAAAAATTGA
AcMNPV_lef_8;_puta tive_DNA-depe...	2485	TGGACAAAGAATCAATCGTTCGTAGGCAACAGAATGTCGAAAAGTTGCATTGGATGCGC
AcMNPV_AcOrf-51_peptide	888	GAACCAGCGAATTGACATAATAAGCAAGGACATTGAGGATTTAAGAAACGCTTTAAAAATC
AcMNPV_AcOrf-51_peptide	828	ATTTACAGTTACAGAGTTTTCCGTGGTTCAGTACTACAACGTGGCCAAAAACAGAATGGT
AcMNPV_AcOrf-52_peptide	310	TTTCTGAGTATTTGTTATTGGAAGGAGCGACGGAGCGAGCTTTGGCGACAATGAAAAAT
AcMNPV_AcOrf-52_peptide	280	ACGCCGCGACAGCAATTGTACATGTTTGTGTTCTGAGTATTTGTTATTGGAAGGAGGCA
AcMNPV_AcOrf-53_peptide	342	CGTTTATCAACGCGTTACACAGGAAGACGCCCTGGACATTGAACTCGATTTTAGGCATTT
AcMNPV_AcOrf-53_peptide	306	TATAGGCGATCACGAAATTGATCGCGTTTACAACCGCGTTTATCAACGCGTTACACAGGA
AcMNPV_lef_10	93	AAATGTGTTGACCAAGAAACCGATCAAGTTAGACCTCTGTGCCTCGGTGAAATTAACGC
AcMNPV_lef_10	92	TAAATGTGTTGACCAAGAAACCGATCAAGTTAGACCTCTGTGCCTCGGTGAAATTAACG
AcMNPV_capsid_as sociated_protein_2	1039	TGGGAAAACCTTTATGGTGGAATTCAGCAGTTATTTGGTCTGCACGCACACAACGTGTAG
AcMNPV_capsid_as sociated_protein_2	979	CGCGAAAACGTAACAACAGCTACACGCTCGAGATGTGTCTCAATTACATTTATTGGAT
AcMNPV_AcOrf-55_peptide	163	TACGACGTGGTCGCAAGCGAGATTACACGAAATTTGACAAATTTGGTAAAAAATATTGA
AcMNPV_AcOrf-55_peptide	162	GTACGACGTGGTCGCAAGCGAGATTACACGAAATTTGACAAATTTGGTAAAAAATATTG
AcMNPV_AcOrf-56_peptide	191	TGACCAACTCTAAAAGTTGGAATAATCATGAAAAATGTTCTGCCTATTTTACCCTCTGT
AcMNPV_AcOrf-56_peptide	165	CGATCGGTGCCCTAACGATTTTATTGTGACCAACTCTAAAAGTTGGAATAATCATGAAAA
AcMNPV_AcOrf-57_peptide	424	GAGTCGGACCCAAAAGTGCAGACGCCCTTGATCGTGAAGTGAATAAAAACTATACAAG
AcMNPV_AcOrf-57_peptide	379	TTTTTGGATTTTCAAAAACGTAACCTGCATACCTCGGCCCAATCGAGTCGGACCCAAAA
AcMNPV_AcOrf-58_peptide	115	ACACCACCGCATTATGACACCAGCGAAGATGAGGACGAAGATAATTATTACAACATTTAA
AcMNPV_AcOrf-58_peptide	39	ATTTAATGCGAAATCCAAAAATTTCTATCGGCGAAGTGGTGTGACGCGCAAACGATT
AcMNPV_AcOrf-59_peptide	151	TACGTTAAAAATAGATACATTGCAAAATCTTGGATTCCGCGCAAAGCCGCCTACGAGATAG
AcMNPV_AcOrf-59_peptide	150	GTACGTTAAAAATAGATACATTGCAAAATCTTGGATTCCGCGCAAAGCCGCCTACGAGATA

AcMNPV_AcOrf-60_peptide	205	GAGGATTCCACTACAGATACAGAAACCGAATACAGTACAACCGAAGACGAACCTTGCTTAA
AcMNPV_AcOrf-60_peptide	204	AGAGGATTCCACTACAGATACAGAAACCGAATACAGTACAACCGAAGACGAACCTTGCTTAA
AcMNPV_FP_protein	574	TTTCATAGCGATAGCGTCGATAATTTTGTAGTCTGAAAACGATAGCGAAAAAATGCTTCAA
AcMNPV_FP_protein	534	GCAAAATATAGAATATCTCAAAGCCAACAATATTACGCTTTTCATAGCGATAGCGTCGA
AcMNPV_lef_9;_putative_DNA-depe...	1492	TGCGCTTGGCCCTCTGAGTTTCTGTTTCCAGAACATTTGCTCGACATGTTCAATTGAATGA
AcMNPV_lef_9;_putative_DNA-depe...	1395	CGCCGACATATATCATAAACCGGTTGTGTTACAGAGCGTGTATTAAAAATAACTATGT
AcMNPV_AcOrf-63_peptide	377	GCATAGCAGACTACGAATTTGAAGACATGTTTGAATTTGTCGATTGATTGTAGAGATC
AcMNPV_AcOrf-63_peptide	248	TTGCTTTGCAATATCTTTTTGACGATGACGAAATATCCAAACGAGATCAAGATGGCTTTA
AcMNPV_fusolin;_spindle_body_pr...	847	GAAGAATCTTGTGGCGTGCACGCAAAATCAAATTTTCGTCATTTTTTAAATCCAGGATTT
AcMNPV_fusolin;_spindle_body_pr...	787	AAAGTGGTCAGAAGCCAATTACAAAAGCATAAACTTGTATGCACGCATTGATCATAATGAC
AcMNPV_DNA-dependant_DNA-polyme...	2742	CATGCAAAAGTACATGCAGAATCAATTGTACGATCGAAAAGAACCAGTGTAGTAAAAAT
AcMNPV_DNA-dependant_DNA-polyme...	2682	GTTGCTGGAAATATTTGGCGACGACAAAAGGATAAAAATTGCAAAAGTGTTTTACCGCGAT
AcMNPV_AcOrf-66_peptide	2342	TATTTGAGTGGAAAACAGCATGCTTAAAAGGTACGAAACGTTGGCGCGAACACAGCGG
AcMNPV_AcOrf-66_peptide	2238	GTCTATTGCAGATCAGGCTGTCAAATCTGAAATGAGTAAATTAACACACAACAGATGA
AcMNPV_lef_3	1087	GAGAATCACAACATGAACGTGTTGGGACTGTTGAAGTATGACGAAGATGAAAATGAATAT
AcMNPV_lef_3	1027	TCAATGCTGCTGGAAGATAATTTAATCAAAGTAACTATTACGTAACGTGCGAGAACGGC
AcMNPV_AcOrf-68_peptide	517	TTTTTCGACACAACATTGCGACCGACACGAAGAGTAAAAATGTTGCAGCAAAAATTTAAA
AcMNPV_AcOrf-68_peptide	482	TTATTTGTATAGTTTTGCTGAGCGTGTGGCCGCTTTTTTCGACACAACAACTTGCAGCCG
AcMNPV_putative_methyl_transferase	632	CTCGGCCTGCCAATCCGAACGCTATTTAATTTGTTTCAATAAATTAGTTAGACCGTATT
AcMNPV_putative_methyl_transferase	590	TTAACCAATTCGAAAAATGGGTTTTATACAAACCCCTTCTTCTCGGCCTGCCAATCCG
AcMNPV_AcOrf-70_peptide	683	AATGTTTTTGCTCGACAGGGTTATAAGTGTGAATGTATATGCCGACGATCTAAATATT
AcMNPV_AcOrf-70_peptide	653	TTGCACGCTGTTTTGTACCAATACCATGCAATGTTTTTGCTCGACAGGGTTATAAGT
AcMNPV_apoptosis_inhibitor_2	688	TGCAAGCGTTGTTGTGTGTGCAACGCAAAAATATGCAGCGCATCGAAACATTACCTCAG
AcMNPV_apoptosis_inhibitor_2	604	TGCAAAAGTTGTTTTGATAGAAAAATCGGTGTGTTTCATGCCGTGCCGTCACCTGGCT
AcMNPV_AcOrf-72_peptide	106	GAAGACGACAGCGACGGTGATCGCTATTATCAGTATAATAACAATTGTAATTTTCATATAC
AcMNPV_AcOrf-72_peptide	105	CGAAGACGACAGCGACGGTGATCGCTATTATCAGTATAATAACAATTGTAATTTTCATATA
AcMNPV_AcOrf-73_peptide	133	GGCAAACAGTTTGATTTTTAGATGAAATGCTAACGAAAAAATACTCGAAAGCAACGCC
AcMNPV_AcOrf-73_peptide	132	GGGCAAAACAGTTTGATTTTTAGATGAAATGCTAACGAAAAAATACTCGAAAGCAACGCC
AcMNPV_AcOrf-74_peptide	721	GCCGACGAGTATATTAAGCCGAATTGTATAGTGGACACGTACAATTGTTGCAATTTAGTT
AcMNPV_AcOrf-74_peptide	681	CAATTTGTTGAACACGAAATGGATTGCAAAATACGATTGCGCCGACGAGTATATTAAGCC
AcMNPV_AcOrf-75_peptide	341	GTTTTTTAGCAAATTTCTAGTCACAAAAATGGATGAAGCATACCAACTGCCAGCGTATT
AcMNPV_AcOrf-75_peptide	340	AGTTTTTTAGCAAATTTCTAGTCACAAAAATGGATGAAGCATACCAACTGCCAGCGTATT
AcMNPV_AcOrf-76_peptide	196	TTGGAGATCGAGCAAGCGCTTGATGCGATTCTAAACAAAAATACCAGCTCAATAGATTGA
AcMNPV_AcOrf-76_peptide	195	ATTGGAGATCGAGCAAGCGCTTGATGCGATTCTAAACAAAAATACCAGCTCAATAGATTG

Anexo II

AcMNPV_very_lef_1	1012	AAATACAATATAGGTTTAGACGAAACGAGCAGCGAAGAGGAGAACAACAACGACGACGA
AcMNPV_very_lef_1	952	CAAAAAGTGGCCAAATTAATGAACCACGAATCCTCCGCAAGCACCAACACTACTTGAAC
AcMNPV_AcOrf-78_peptide	167	GCAACGTGTCGGCGGGAATTATAATTTAATTAGTGTAGTCGCTTTATAGCTTTATTCT
AcMNPV_AcOrf-78_peptide	166	AGCAACGTGTCGGCGGGAATTATAATTTAATTAGTGTAGTCGCTTTATAGCTTTATTCT
AcMNPV_AcOrf-79_peptide	256	CGTCTCATCAAAGCCAAACCACTTTTGTTGCATAAATTCCTGTTAGCAAATAAGTTGTAA
AcMNPV_AcOrf-79_peptide	255	GCGTCTCATCAAAGCCAAACCACTTTTGTTGCATAAATTCCTGTTAGCAAATAAGTTGTAA
AcMNPV_ODV_glyc oprotein	1131	TATTTTTCAACAAATAAATTACAACAAGGACGCCAACGCGATTATTGCCGCGCTGCGCC
AcMNPV_ODV_glyc oprotein	1085	AGAGCTTGACCGAATTGGCGTTCAAAACGAAACTCTAAGACGTTTTATTTTTCAACAAA
AcMNPV_AcOrf-81_peptide	523	GTGCTGTTGACCTGCGCCATTTTGTTGTTGTTATTCAACGTTGAAAAATTTCCATGATT
AcMNPV_AcOrf-81_peptide	473	CTTTTAGAAATTGCGAAAGCATTTTGTGTCGGCGCGTCAGTTTTCAAACGGTGCTGTTGA
AcMNPV_telokin-like protein-20	302	TATTTCAAACAAAAATTTGGCGGTCCGATAATAGTAAGACGGACGCTGCTGTACACACGT
AcMNPV_telokin-like protein-20	282	GTTGAACAAGGGCCAAATGTTATTTCAAACAAAAATTTGGCGGTCCGATAATAGTAAGAC
AcMNPV_capsid_as sociated protein_3	2443	GCGTGTCCCGAAGAATTGTACGATAACAACGAATTTAAATGTAACATAGAATCGGATAAAA
AcMNPV_capsid_as sociated protein_3	2212	AACAACGTTAAAGTGGACGCTGATTGCGAATTGGCCAAAGACCTATCGCACGTTTTGAAC
AcMNPV_AcOrf-84_peptide	461	ATTGTGATCGGGGTCATGTCGTTGAAGAGAAACAATTGCAGAGTAATTTGTATATAGATT
AcMNPV_AcOrf-84_peptide	421	GTGGGATATTTTCATGAATTCAAAATTTGAAAGGTTTTGCCAATTGTGATCGGGGTCATGTC
AcMNPV_AcOrf-85_peptide	103	CGCATTGGATGGAACGATGACAATAGCCAAGATCCCAACGTATATTGGAATGGTGTTAA
AcMNPV_AcOrf-85_peptide	102	TCGCATTGGATGGAACGATGACAATAGCCAAGATCCCAACGTATATTGGAATGGTGTTAA
AcMNPV_polynucleo tide_kinase/li...	2021	GCATGTGGCAAGATTTAAAAATACCTACAGTGTTTAAATGTTTGCAGGGATTACTTGAAT
AcMNPV_polynucleo tide_kinase/li...	1961	ACTATATCAGAGGAAAAATAATGTAATAGCGGTGTTGACGACAGGCCGTGCGTTGTTTC
AcMNPV_p15	238	CGCGACACAAATAATTGGCATCAGATATTGAAGAAGGTGTGAAAAATAACAAGAGACAT
AcMNPV_p15	237	GCGCGACACAAATAATTGGCATCAGATATTGAAGAAGGTGTGAAAAATAACAAGAGACA
AcMNPV_cg30	610	GACGATTACGCAAACCTTGGCTCTAAAAACGCCAAATGAGTAGCGAAAAATAAGGTTTTA
AcMNPV_cg30	570	GAAACGAATTACAACCTGAAAAGGCGCTAAAATCGCTCAATGACGATTACGCAAAACCTGCG
AcMNPV_major_cap sid_protein;_vp39	921	AAACAACTTTTTTCGCAACGACTTTATACCAAGAGCAAATCCTAACGCTACTCTGGGCGG
AcMNPV_major_cap sid_protein;_vp39	861	ATACGAAGAATACCCGACGTACGTTCCGCTGTTTTGGGATACCAATAATCAATTGAGA
AcMNPV_lef_4	1336	ATCACGGACACGACAATAAACGTTGAAACATCGTCGCGACCGAATCGTCCCAAAATTA
AcMNPV_lef_4	1276	GGTCTCATGATTTTAACCGACTTGCCGGAGTTACTGCACGAAAACATTTACGAATGTGTA
AcMNPV_AcOrf-91_peptide	616	GATGGTTGATTGACTTTAACAGCTCGGACTGCCGTTGATCCGCTTAACGTGCTTTAA
AcMNPV_AcOrf-91_peptide	609	TGTTAACGATGGTTGATTGACTTTAACAGCTCGGACTGCCGTTGATCCGCTTAACGT
AcMNPV_AcOrf-92_peptide	721	CCCGCTCATTACGAACGCATGACATGGGGAGAATACAAAAAATTTGTTAAATTTGCAATAA
AcMNPV_AcOrf-92_peptide	653	CCTACGTCAGTATGACTTTTACAACCACATTAACGATTACAAGTGATACAAAAGAAATA
AcMNPV_AcOrf-93_peptide	396	CGTGCCCGTCAATTTGGGAAAACGATAATTTAAGTGTACTTTTGAACATTTGCACAACCT
AcMNPV_AcOrf-93_peptide	365	TTTTTACGCTCAGCAGTAAATCGTCGTGGCCGTGCCGTCATTTGGGAAAACGATAAAT
AcMNPV_ODV_envel ope_protein;_p25	617	ACTTTACCGTCATTAATGCTGAACAACCGCCTATCTCAAAAATATAAATCATACAGAG

AcMNPV_ODV_envel ope_protein;_p25	577	ACAAGAAACGCGGCAGCTCAGCAAGTTTTATTGGAAAATAACTTTACCGTCATTAATGCT
AcMNPV_helicase	3606	CATGACAATGGCGTTGAACGAGAACGATTTGAACACTAGTGTACCAAAATTTGTATGTTA
AcMNPV_helicase	3459	GCACCCCTCGTTTGTTCAGTACAATTATAAAAAGAATATAAACGCAAGTAGTTCAAAAGTC
AcMNPV_AcOrf- 96_peptide	458	TTTCAATACTCGACATTATCAATTATTTGATTTACAAATGGCTACGTGGATTTGTTGGCCG
AcMNPV_AcOrf- 96_peptide	427	GTTCTCGATGTGGTCGACCAACAGATTCAAGTTTCAACTCGACATTATCAATTATTTG
AcMNPV_AcOrf- 97_peptide	108	GGTGAAGAGTCACTAAATTTGCAATGGAAAACGCGGATAAAGAAGACAGCGACAATGA
AcMNPV_AcOrf- 97_peptide	107	GGGTGAAGAGTCACTAAATTTGCAATGGAAAACGCGGATAAAGAAGACAGCGACAATG
AcMNPV_38K	885	CCCCGTGCAAGATTGGGAACATTATCACAATGAAATAATACAAAACATTATGGATTACGA
AcMNPV_38K	824	ACGATCTGCCAACTAATAACTACGCGTACGATTTCTACGTCAAAGTCAAACGATGCCCA
AcMNPV_lef_5	687	TTTAAATCTTGACACATGATTTTGTAAACAGTCGAAAGCCAAACGAGGGCAGGCGACGA
AcMNPV_lef_5	570	TACCAGCACTGGGTGTACACGCAAAAAGAAAATCAAACACAGGCAAAATATTGAATGATAA
AcMNPV_major_DN A_binding_protei...	109	AGAAGATCCAGGAGCCGTTTCATCGACAGGTCGCCGAAGTTACAGAACACGCTACTATTAA
AcMNPV_major_DN A_binding_protei...	108	CAGAAGATCCAGGAGCCGTTTCATCGACAGGTCGCCGAAGTTACAGAACACGCTACTATTA
AcMNPV_p40	1024	CAAGACGAGTTAAACATATATTTGGGAGTTCACTCGTCAATGCAAAGCGTAAAAAATAT
AcMNPV_p40	929	CCGTGTCCAATTGCAAGTTCAACATTGAGGATTACAATAACATATTTAAGGTGATGGAAA
AcMNPV_AcOrf-102	310	GTGTTAGACTTTTTGGGAAGCGTTTACGACAACACGATCCAAGTGATAGTTACAGAGTAA
AcMNPV_AcOrf-102	309	CGTGTAGACTTTTTGGGAAGCGTTTACGACAACACGATCCAAGTGATAGTTACAGAGTA
AcMNPV_p48	1105	CAATTGGACAACGAAATATCTCTGCTTATCGAACTCAACCATGATTGCTTCAATAATGA
AcMNPV_p48	1045	GTGCTAATGACAGAAATGATTGTGCCCGAAACATTTATAAGGCACATCATTACCAAGTAC
AcMNPV_capsid_as sociated_protein_4	2012	CGCGCAACACAAAACATTTGCAAAGACTAATAATGTTGATGAACGCAAACTACAATGTTA
AcMNPV_capsid_as sociated_protein_4	1922	GAATTCACAGCGTGTGGTCATGCGGGATAAAATTTGTTAACTAGCTTTTAGTAATTTAC
AcMNPV_HE65	1429	GAGTGGTTAACTTGCGATTACATTAAGCAACTGTGACGCCATAGACAATCAGACATG
AcMNPV_HE65	1329	CCCCTGGAAGGATTTATTATTCGATGTGGAAATCTAATTTACAAACTGAAGTCTGATTA
AcMNPV_AcOrf- 106_peptide	127	TTAAACAAAATTAACCCCGATTTAAAGAGTTCTCCGCGCAATGCTTACGATTACAATGA
AcMNPV_AcOrf- 106_peptide	126	TTTAAACAAAATTAACCCCGATTTAAAGAGTTCTCCGCGCAATGCTTACGATTACAATG
AcMNPV_AcOrf- 107_peptide	242	ACTCAACGGCAAAATGTTGCTACCAGCACCACCGCCACAATTCGCTAAACTTGAAAAAA
AcMNPV_AcOrf- 107_peptide	216	ACGTAAAAAGAAAATTACAAAACCAACTCAACGGCAAAATGTTTGTACCAGCACCACC
AcMNPV_AcOrf- 108_peptide	113	GCCAAATTTGTAATAGAAACCGATCGCTAATTAAGAAATTTGTTCTAGTAGTATGCGGCT
AcMNPV_AcOrf- 108_peptide	112	GGCCAATTTGTAATAGAAACCGATCGCTAATTAAGAAATTTGTTCTAGTAGTATGCGGC
AcMNPV_AcOrf- 109_peptide	1080	AAACATTAATTTGTAACGCAACGCGTCTTAACGACGGAGGTTTTAGCAGCGGCATCAC
AcMNPV_AcOrf- 109_peptide	901	TTGAACAACATTTGACCAGATGGTGTGCTGTGCGCCGAATAAAGCAGAGCCCTACAAAAA
AcMNPV_AcOrf- 110_peptide	112	CATTACAATTACGTGCCCGACACCCATTGAATACGGTACGAGTTCACAAATTTAAATAA
AcMNPV_AcOrf- 110_peptide	111	CCATTACAATTACGTGCCCGACACCCATTGAATACGGTACGAGTTCACAAATTTAAATAA
AcMNPV_AcOrf- 111_peptide	141	GCCTGGCAGCAGCATCACAAGTTTTACAATTACGGTTATAACAAAGAAAACAAATATAA
AcMNPV_AcOrf- 111_peptide	140	TGCCTGGCAGCAGCATCACAAGTTTTACAATTACGGTTATAACAAAGAAAACAAATATAA

AcMNPV_AcOrf-112_peptide	205	TATCCTCATTATTATGAAACTGTGTTGACAGTATAGTGAAACGTGCTGGCAAAAATTGA
AcMNPV_AcOrf-112_peptide	204	GTATCCTCATTATTATGAAACTGTGTTGACAGTATAGTGAAACGTGCTGGCAAAAATTG
AcMNPV_AcOrf-113_peptide	432	CGGCAGTTGAAAACTCAACTGCAACCCGTATGCAATTATGTTTACAAAAGTAAAAATAT
AcMNPV_AcOrf-113_peptide	402	ACCTTGTGTAATTTAACTTTTAGACGTGGCGGCAGTTGAAAACTCAACTGCAACCCGT
AcMNPV_AcOrf-114_peptide	1215	CAATTACGACATTAACAAGAGCCATTGAACAATTTTCGATACAACACGAAAGTGCTGTA
AcMNPV_AcOrf-114_peptide	1155	TCAAGAACTAAAAACGTCGTGTGCAAAACACAACGCCCAAAATTGTACGACATATTAAT
AcMNPV_AcOrf-115_peptide	435	TTATCTATGCAACGACGCCGGTTGAATATGAATTTGAACACGGTGAATTTTCGCCGGA
AcMNPV_AcOrf-115_peptide	430	AGGCCTTATCTATGCAACGACGCCGGTTGAATATGAATTTGAACACGGTGAATTTTCG
AcMNPV_AcOrf-116_peptide	112	TTTATTTTTGCGCAACCAGTCATTCGTGCGTCACACCACGCTTTTCACACTCAGTTAA
AcMNPV_AcOrf-116_peptide	111	GTTTATTTTTGCGCAACCAGTCATTCGTGCGTCACACCACGCTTTTCACACTCAGTTA
AcMNPV_AcOrf-117_peptide	177	GGAAGTGTGGAGAGTTTAGAATACACTAGTGACAACATTGAACTGTTATGCGAAAAAT
AcMNPV_AcOrf-117_peptide	176	TGGAAGTGTGGAGAGTTTAGAATACACTAGTGACAACATTGAACTGTTATGCGAAAAA
AcMNPV_AcOrf-118_peptide	147	CGTCATGTACGTGGTTTTGTTGCAATTTTTCAATGTTTAAAAAGGCTTTGATATCGC
AcMNPV_AcOrf-118_peptide	72	GTGCGCGCTCATGCCGTGTTTAGCAATTTTTCTTCATTATAGAATTTGTTATGAAAACTT
AcMNPV_AcOrf-119_peptide	1531	CAAGGGCAACAAATAGACGCATTAACCCAAATACTTGAAACTTACCCCAACTACTCTGTA
AcMNPV_AcOrf-119_peptide	1511	TCACTACAGCGCATGACCCAAAGGGCAACAAATAGACGCATTAACCCAAATACTTGAAA
AcMNPV_AcOrf-120_peptide	132	CATAAAGAAGTGGCAGTCATGTTAAACAAGAAAACACAGAGTGTGCAATTGAAACG
AcMNPV_AcOrf-120_peptide	118	CGTCGAAAGACTAACATAAAGAAGTGGCAGTCATGTTAAACAAGAAAACACAGAGTGT
AcMNPV_AcOrf-121_peptide	118	TCTTCGAATCTTGTTTTAGCCCTCGGGATGGTCAAAATGCGCCGTAGTAATTGTTAA
AcMNPV_AcOrf-121_peptide	100	TTCGTGTTGTTGTAAGGCTTCGAATCTTGTTTTAGCCCTCGGGATGGTCAAAATG
AcMNPV_AcOrf-122_peptide	118	CTGAAACACAAGATTGGAAGACCTTACAACAACACGAAGACAGATTGATTCATGTAAA
AcMNPV_AcOrf-122_peptide	117	GCTGAAACACAAGATTGGAAGACCTTACAACAACACGAAGACAGATTGATTCATGTAA
AcMNPV_protein_ki nase_3	587	GGCTGTTGAAAGAGATGGAACAATTACTGTTGGAATACACAACGTGTTCTAAAAACTAT
AcMNPV_protein_ki nase_3	527	TGACCGAAATGTTTTGTAATTAATTCAGCATGATTACAGTCAACGACCCGGATGCTGAAT
AcMNPV_AcOrf-124_peptide	682	TACAACGATCCGCCACCCTTCTCAACATTGTAATGGATGACATAAAAAATAAAAA
AcMNPV_AcOrf-124_peptide	642	CGTTTCAAATTTACAAAGTATTCAAGTTGTTCCGTTTTTCATACAACGATCCGCCACC
AcMNPV_lef_7	434	ATCGCTGTGTAACCCGTCTACAGTGCAAAATAAATTATACGACGACAATGAAGATTAT
AcMNPV_lef_7	383	TTTTATGGTACAAGTTGGCGAGAAAGTTGATCGAACACGAACGTCGAATGGATCGCTGTG
AcMNPV_chitinase	1597	GATAACGGCGACTTGCTCAACGCAGTAAACGCACAGTTTAAACCTAAAGATGAACGTAA
AcMNPV_chitinase	1537	AAAGTTAAATATGTCGACCGAAATAAATTGGCGGCCTGTTGCTTGGGAGATTGATGCC
AcMNPV_viral_cathe psin-like_pro...	913	CAAAACATAAACGCCTGTGGTATGAGAAACGAACTTGCCTCTACTGCAGTCATTTATTA
AcMNPV_viral_cathe psin-like_pro...	845	TTCCATATTGGACCTTAAAAACACTTGGGGCACGATTGGGGAGAGGACGATTTTTC
AcMNPV_major_bud ded_virus_envel...	1419	AGGCGAATTGGCCGCTAAATGACTTCGTTTCATGTTGGTCATGTGTTAACTTTGTAAT
AcMNPV_major_bud ded_virus_envel...	1318	TCGTTTATTGCCCAACAAAAAGCAACCTCATAACCACCATGGAGAACCAAGTTTGGC
AcMNPV_capsid_pr otein	464	CGCCAGACATTAACAAGTTGCAAGAACTGATACAAGATTGCGACTGTAATACAATAAAA

AcMNPV_capsid_protein	463	GCGCCAGACATTAACAAGTTGCAAGAACTGATACAAGATTTGCAGTCTGAATACAATAAA
AcMNPV_gp16	255	CGACGAAAAAATTAACGTGTTATTAACAAAAAACGGGGTAGTTAACAACTGCTAAACGT
AcMNPV_gp16	254	TCGACGAAAAAATTAACGTGTTATTAACAAAAAACGGGGTAGTTAACAACTGCTAAACG
AcMNPV_major_pohedral_calyx_p...	688	ATGTTAGATAAATTAGCTGAACAATTGTTGGACGCCATCAACACGGTGCAGCAAACCTGC
AcMNPV_major_pohedral_calyx_p...	648	GCTTGGCAGATTACAGACTCGTACCCTGACTGACGTCCATGTTAGATAAATTAGCTGA
AcMNPV_AcOrf-132_peptide	582	GGAAGTACCAAAGTATATGAAAAAATTGTTTGTGAAATGCAATTGGAACCTCCCGTCAT
AcMNPV_AcOrf-132_peptide	581	GGGAAGTACCAAAGTATATGAAAAAATTGTTTGTGAAATGCAATTGGAACCTCCCGTCA
AcMNPV_alkaline_exonuclease	1200	CTCGTCGCCCAACACACGATCATTTAAACGACTGTGTATATTATTGGAAATAAAATA
AcMNPV_alkaline_exonuclease	1140	TTTTGGTTACTATTTAACTCATACAGGAACCTGAAGACCTTTTCTGCGGATCGCAAAA
AcMNPV_94K	2347	CAAGCCGAAGAATTGACAAGCTTTATAAAGCTTCTGAACAACGAGTCAATTTTGTCTG
AcMNPV_94K	2209	CTACAAAACCTGGCCGAGTGCACAATGAGTACGCAAAACAAAATTGTTAATTTGCCAGTT
AcMNPV_apoptosis_inhibitor;_ann...	749	CAGAATCGAGCTGGGGCAAATCCGAAAAAGTATAATTGGAAAAATTTTTGTAAACGGTTTTA
AcMNPV_apoptosis_inhibitor;_ann...	684	GGTTTTATATTACAACGAAGCGTCGAAAAACAAAAGCATGATCTACAAGGCTTTAGAGTT
AcMNPV_p26	496	AAATGGCGACCCAACATGTCCGTCTACGGGACTGTGCAATTGCCGTACGATAAAATTA
AcMNPV_p26	315	TAATGAAACGAAGCAAAACTGCGCATTGGAGCTCCAATTTTTGCCGGCAAAAAGCTGGT
AcMNPV_fibrous_boddy_protein	212	TAAAGCCTAAGCTGAAAACCCAAGCTTTTGAACCTCGATTACAGCCTCGTCTGGTAAAC
AcMNPV_fibrous_boddy_protein	211	CTAAAGCCTAAGCTGAAAACCCAAGCTTTTGAACCTCGATTACAGCCTCGTCTGGTAA
AcMNPV_ODV_envelope_protein_2	1781	GTTTTATTGCAACAAACACAATTGTGGCGTTTACAGCATTTGTTATACACACAGAACTCA
AcMNPV_ODV_envelope_protein_2	1699	GAGTTTATGCAAGTACACGTTTAGGCAAAACACACTATTGTCTATGAACAAAGAAAACAAC
AcMNPV_DNA_synthesis_regulator	1176	CGTGTATATTGTACCAAAATGCGGGTTTACCAACGTTTATCATTTTCTGAACTACTCTAA
AcMNPV_DNA_synthesis_regulator	1093	GGCGCAATCACGTTTCTTTGAAACCTACAACATAACAATTGCAAAATTGTGTA
AcMNPV_AcOrf-140_peptide	84	TGTGGAGGGGACAGGCTATATAAAGCCCGTTTGCCCAACTCGTAAATCAGTATCAATTGT
AcMNPV_AcOrf-140_peptide	12	ATCTATAGAGATAAGATTGTATATGCGTAGGAGAGCTGGTACGTTAGGCACCTTTGCGCA
AcMNPV_putative_early_gene_transcript...	1836	GGTCCGTTGTCGACGCTATAACGTTTGCAGCAAAAAACTAAATTTGTAATATA
AcMNPV_putative_early_gene_transcript...	1759	GGTAAAGTGAACCGAAGAGAGAGCACTACATTGCACAATAATTTGTTAAATTTGTTAGCT
AcMNPV_IE-0	674	TAAAGCCAAAAGAATGTTGCGAATACGCTATATGCAACGCGTCTGCGTTAACATGTGGA
AcMNPV_IE-0	516	GCAAAATGACGTGAACGAGTTAATATCAAATGACCTGTTGTTTATTGAAAAGCTGGAAC
AcMNPV_early_49_Daa_protein;_si...	1375	TTGAATCCGTGGGTTGAGAACACGCTTCTCAAATTAATCCCCGACTCGGTACAATAA
AcMNPV_early_49_Daa_protein;_si...	1315	GCATATCTTTTAATAAGAGGTGATTACGAAAGTTCGTCTGACTTGAATCCCTTCGCGAT
AcMNPV_ODV_envelope_protein_3	130	TAAACGCTACCATGCGAGCTAATCCCTTTATGAACACGCCTCAAAGGCAAATGTTGTAG
AcMNPV_ODV_envelope_protein_3	129	TTTAAACGCTACCATGCGAGCTAATCCCTTTATGAACACGCCTCAAAGGCAAATGTTGTA
AcMNPV_ODV_envelope/capsid_protein	726	GCTTTTTACCAACAAATGCGATCGACAATGAGCACAACAACTCTAATTTACTGTAAAG
AcMNPV_ODV_envelope/capsid_protein	602	TAACTGAGGTTGAAGCCACTCAATTTTAACTCTGTTGCTGACCGTCAACATGCCTATT
AcMNPV_AcOrf-145_peptide	128	AATTAATCACGAATTTGACTTGGACTCGCCAGCTGCAAGCCTATCGTGTACGATCACA
AcMNPV_AcOrf-145_peptide	121	TTTTGCGAATTAATCACGAATTTGACTTGGACTCGCCAGCTGCAAGCCTATCGTGTAC

Anexo II

AcMNPV_AcOrf-146_peptide	544	CATTTATGTCCCGAACTGCAAATCGATAATAGTGTGTGCAACTGGAACCCGCTCTTCA
AcMNPV_AcOrf-146_peptide	502	CAAAAATGTCGCGCGCATCACAAAGACATCGATATATTTAAACATTTATGTCCCGAACTG
AcMNPV_early_gene_transactivator_2	1674	GGTTCCGTTGTCCGACGCTATAACGTTTGCGGAACAAAACTAAATTGTAATATAAAAA
AcMNPV_early_gene_transactivator_2	1597	GGTAAAGTGAACCGAAGAGAGAGCCTACTATTGCACAATAATTTGTTAAATTTGTTAGCT
AcMNPV_ODV_envelope_protein_4	1011	TTATTTTATCTACAGATACATGATGAAAGGAGGAGGAGGAGGTGGTGTGGCGCAGCAAC
AcMNPV_ODV_envelope_protein_4	951	CGGCAAGTTAATGCCTATCATTTTGTGTATAGGCGCGGTCTTGTTTTAGGTTTAATATT
AcMNPV_AcOrf-149_peptide	253	TTAGATTTTACCAACATGACGCCGCTGCCGTGTTGTATTGACGACGGCAGTTTTGCAAAA
AcMNPV_AcOrf-149_peptide	252	ATTAGATTTTACCAACATGACGCCGCTGCCGTGTTGTATTGACGACGGCAGTTTTGCAAAA
AcMNPV_AcOrf-150_peptide	238	GATCCAGATGTTAAAAATTGTGTTCTATATCAGATTATGGATGTACCGCTAACCAAAAAC
AcMNPV_AcOrf-150_peptide	185	GTGTCGGTTTAAATCAAAAATTAGAGTTAATCTGCCCTGAAGGATTTGAATTTGATCCAG
AcMNPV_early_gene_transactivator_1	1167	GTTTGAGCGCAGTAACTCTGATTTAGTTTCTAAGTTACAACTGTTATGTCTAGACGTTA
AcMNPV_early_gene_transactivator_1	1107	GAATAATCTGCAAGAACAATTGCGTAAGCAGGTGGCCGAGTCTCAAGCCAAATTTTCAGA
AcMNPV_AcOrf-152_peptide	220	AAACAGTATAAATACAGCTGCCGTTCTACTCGTAAGCACAGTTCAAGCCTCACAGCCTAG
AcMNPV_AcOrf-152_peptide	219	TAAACAGTATAAATACAGCTGCCGTTCTACTCGTAAGCACAGTTCAAGCCTCACAGCCTA
AcMNPV_PE38	903	CGGAACCTCTGCTGCTAGTTCATGTGATGTAATGTTACTGTTAATTTGGGTTTGAAAA
AcMNPV_PE38	828	CTCACTTGTCTATTTCGACTATTTTCAGAGCTGTTTATTGAAAAATGGCGTTCATAGTATTCA
AcMNPV_AcOrf-154_peptide	76	GATAAAGACGTTGTAATGCGTATGACACTATCGATGTTGACCCCAACAAAAGATTTATA
AcMNPV_AcOrf-154_peptide	75	AGATAAAGACGTTGTAATGCGTATGACACTATCGATGTTGACCCCAACAAAAGATTTAT

Anexo III: List of probes for SeMNPV genes employed in Chapter 2

TargetID	BPStart	Sequence
SeMNPV_ORF1_poly hedrin	357	TTTCCTCGTAATCAACATGAGACCAACGAGACCTAACCGTTGCTCCGATTTTTGGCTCA
SeMNPV_ORF1_poly hedrin	356	TTTCCTCGTAATCAACATGAGACCAACGAGACCTAACCGTTGCTCCGATTTTTGGCTC
SeMNPV_ORF2_orf1 629	1298	ATTCCATTACCACGCTGACGGCGCCATTTTCGTCGATATTCGAGAAAAACAAAATATGG
SeMNPV_ORF2_orf1 629	1017	ATAAAAACGTAAAACCTCCGCTCTGCCCCGACAAGTTGAGCACTTTACAACATCAAGCTAA
SeMNPV_ORF3_prot ein_kinase_1	691	AACGATCACGACGAAGACATGACCATTGAAAAACTAGAGGAAAGGCAGTTTCAACAATTA
SeMNPV_ORF3_prot ein_kinase_1	578	TCGACTATTACTGCCCCGAAAAATAGCGGGACGACGATACGACTACCATTTTGATTGGT
SeMNPV_ORF4_ho a	2046	ACCTAAACGATTTCCCATTAAGTTACTCGATATGCTCACATCGTCAGCGAAGAGTATAT
SeMNPV_ORF4_ho a	1892	ATCAATGTCAGGACGGTGTAGTTATCAAGCTCGAGAAAGATGACCCCGTTTACGTCGAAA
SeMNPV_ORF5	1430	AATATATTGCTCGTCAAATTAGATCATCTATGCGTCGTAACGCAATCGCGACGGAGAAA
SeMNPV_ORF5	1390	GCTGCAATGGCTGTCGCTGCTGATGCCACTGTTAGCATGAAATATATTGCTCGTCAAATT
SeMNPV_ORF6_odv- e56	1019	TCAAGAATCTAAATAGTAATAGACAAACGGTTCAATTTTCAGCCGATGCCCGTCCCAACCG
SeMNPV_ORF6_odv- e56	959	TGCCCCGAATATTAATGATCGGCGCCATCATTCTTATCGTGCTAGTGGGATATTTTATTT
SeMNPV_ORF7_me5 3	1109	CTACGGCGTCTAAAAATAAGTTATTGATTTCAAGCCAAAGGCCTAAAGTTTGGAAAAA
SeMNPV_ORF7_me5 3	1049	ACTATTATGACATGAACCTATACAAATCGTACATGAACAAAGCATCTTTGTCATCGTCAC
SeMNPV_ORF8	1939	TATAAACGCGGCAAGAAACACGTCGACTCCATCTTTGACATGAAATGGAACCCATGTAA
SeMNPV_ORF8	1854	TAATTTTAAAAATTTGTAGAGGCAGCGAACACACGGTCGTGAGACGCGAAGACAGGGACAT
SeMNPV_ORF9_gp1 6	217	GATTCATACTCATCAATAGCAAAAAGATTGACGTGATCAACAACAAAATCGATACCTTG
SeMNPV_ORF9_gp1 6	216	CGATCTCATACTCATCAATAGCAAAAAGATTGACGTGATCAACAACAAAATCGATACCTT
SeMNPV_ORF10_p2 4capsid	685	AGCAACGACACCATGCTCGACGGTTTCAAATCCATCAAAGACATTGTGGTCTGAAAAAG
SeMNPV_ORF10_p2 4capsid	635	TCGACAACATCAAGAGTATGCAAGCCGACCTGACCAATAAGATTGCATTCAGCAACGACA
SeMNPV_ORF11	177	ATCTTCGATCGATACCAACGTCTATTACTCCACACCTCGATACAACATTGGCAGTACTGT
SeMNPV_ORF11	176	GATCTTCGATCGATACCAACGTCTATTACTCCACACCTCGATACAACATTGGCAGTACTG
SeMNPV_ORF12_l ef2	568	AAAGACAAGTTATGTTTTAAATCGGGCACATGCAAGGCACCAATCCAATTTGTAACTTT
SeMNPV_ORF12_l ef2	528	CACTCTTTACAAGCCGCCAACTGCGAGAACATCAAGAACAAAGACAAGTTATGTTTTAA
SeMNPV_ORF13_38. 7kD	1022	GATCGAGAAGAGTGATACATGTAACAGTCCCATAGAAACCGTAAAGTCTTTTATAAATG
SeMNPV_ORF13_38. 7kD	958	CCTCAACTAGCCATGCATTGCATCAACGAAGAATTGGACATTAACAGTTTAATTATACA
SeMNPV_ORF14_l ef1	570	CGTATTCTGCAACAACAGTCAAATTCGCGTCCCCTACAGTTATAATTATAAAGGAAAAA
SeMNPV_ORF14_l ef1	569	ACGTATTCTGCAACAACAGTCAAATTCGCGTCCCCTACAGTTATAATTATAAAGGAAAAA
SeMNPV_ORF15	403	AAACATCATCATCATCAACGCCCAACAACGATCACGGCAGTGTGCTCGAAATAATA
SeMNPV_ORF15	367	TATAATGTAATCACCGACAACAACCAACAATAACAACATCATCATCATCAACGC
SeMNPV_ORF16_cat hepsin	594	ACAAATCATGAAATGGGCGGCGTGAACAAGAGTTTGACTATTTCGTACAAAGCGGAACG
SeMNPV_ORF16_cat hepsin	574	TTAATTCACACCCGCTACGAACAATCATGAAATGGGCGGCGTGAACAAGAGTTTGAC
SeMNPV_ORF17	222	CTCAATGGCGAGGAAAGTATTTAAAGTCTGCTGATAATGATTGGGAAGATTTGTATGT

Anexo III

SeMNPV_ORF17	202	TGTGTCAAATGTCAGGAACCCCTCAATTGGCGAGGAAAGTATTTTAAAGCTGCTGGATAAT
SeMNPV_ORF18	457	TTGTTGCAATATCTGGGATCGGAGCAAATGAGGACAATATTGTGGAATGTTTTGATCGTT
SeMNPV_ORF18	388	TTTTGCAAATACCAAAGAGCTATGCACGAAAAAGGAAACGGAACATACGACCCCGCCAAT
SeMNPV_ORF19_chi tinase	1639	TTGGTGGTAAACAAGCCGATTATTTATACACGCTCAACATTATCATCGACACTAACAAA
SeMNPV_ORF19_chi tinase	1592	AAATTGACGCCGATAACGGTGATTTACTCAACGCCATCAACAAGGTTTGGTGGTAAAC
SeMNPV_ORF20	376	AATGCGCCGATTAATGCGTATCGTCTTCACCTACCAGGATGATATTTCAATCTAAAAATG
SeMNPV_ORF20	350	AATATTGTGTTGTACATCACAGAGACAATGCGCCGATTAATGCGTATCGTCTTCACCTA
SeMNPV_ORF21	230	CCGACAAATACATTACAAAAATGAAAAAGACTCTCATCAAATGGAACCATCCCGTAAAGT
SeMNPV_ORF21	229	TCCGACAAATACATTACAAAAATGAAAAAGACTCTCATCAAATGGAACCATCCCGTAAAG
SeMNPV_ORF22	253	ATGTTGCCGATGTGGGAGCATAGGTTGACAAATTACGCTGAGCATTCTCATAGACTTTAA
SeMNPV_ORF22	252	AATGTTGCCGATGTGGGAGCATAGGTTGACAAATTACGCTGAGCATTCTCATAGACTTTA
SeMNPV_ORF23	465	TATAATACGACACACGAATCATTGCGACGTAACGCTGATCGCGTTCATAGTGTGATGTT
SeMNPV_ORF23	432	TCTCTCACCGTGTCCGTGTACCTGATGGGATTTATAATACGACACACGAATCATTGCGA
SeMNPV_ORF24	160	CTGCTCACCCGTCGTTGGATTGTCGACAAAAACTATGCGAACTTGTTGAATTCTTAA
SeMNPV_ORF24	91	ATACAGCTGTATCAGATTGCGCACCAGCAATTGCAAATATCGCCGTTCTACGTGACTCTA
SeMNPV_ORF25_gp 37	745	AATTGCGCCGACGTAGAGTTTGATGATTATAGTTTACGTCGCCGACGAAACAATCATTGA
SeMNPV_ORF25_gp 37	744	CAATTGCGCCGACGTAGAGTTTGATGATTATAGTTTACGTCGCCGACGAAACAATCATTG
SeMNPV_ORF26_ptp 2	436	ATTAGACCGAACAATTCGTTTTTGCGGCAACTGCAAATGGCCGAATCACAAATGGAATTT
SeMNPV_ORF26_ptp 2	368	ATTTTTGATGAAACACTACAACATCGGTTTAGCCGAAGCGTATCAGATCGTCGTCGACA
SeMNPV_ORF27_egt	1513	TTGGCCTCGTTCACTGTAATGAACCATCTGCGTCAATTAAGAGAAATTAATTTAGTGTGA
SeMNPV_ORF27_egt	1452	GAAAAACCAAAGCCTCGAACGTCATTTATAGCGATTACATCATGTCGTATATATTCGTGCC
SeMNPV_ORF28	511	TTTTCAAACGCAGACGATTTGGATAAGTTTAAAAATGAACTTCGAATAATGTACTCGGAG
SeMNPV_ORF28	481	CGCATCCGCGTCAACGGCGACGAGATAATATTTCAAACGCAGACGATTTGGATAAGTTT
SeMNPV_ORF29	580	ACGGGTAAACTCTTGCTCATGGCGACTATAAECTTTAACTGTTATGGTGTAGGTAATAATG
SeMNPV_ORF29	539	CCAAATTGAATAATACTCTTTGGCGCCCGTGGTATGCAAACCGGTAACCTCTTGCTCA
SeMNPV_ORF30	2472	GGCTTTTAAACGACAACAGTTACCGTAGTTGTATTAACAATAGTAGGAATATCGTGCAA
SeMNPV_ORF30	2374	CGAGTCAATGTCGTAGCTAGAGGCAATCAAACAAGATTGAGCAAGAAGAAAAGGATGAT
SeMNPV_ORF31	598	AAGTGGACAATTTCAAATTGGTTACGGAACTGTTTCTCTGGGCTCGATGCTGGTTCTGG
SeMNPV_ORF31	571	CGACGAAACGCAACTTTTTCATATCAAAGTGACAAATTTCAAATTGGTTACGGAACTG
SeMNPV_ORF32_pki p	390	CAACGTGTTTCGCAAATGTGAAAACGATAGTCTTTTAGAGGAACTCGTATTGTTAAAGTG
SeMNPV_ORF32_pki p	366	CCTCAAACAGTTTATAGATAAACGCAACGTGTTTCGCAAATGTGAAAACGATAGTCTTTT
SeMNPV_ORF33	273	CGAGAAGATCATCACTGTATTCAACGAAAACGAAATGGTCCCATTGTATTGTCTGATTA
SeMNPV_ORF33	253	ACTCAAAAATTGGCCATGATCGAGAAGATCATCACTGTATTCAACGAAAACGAAATGGT
SeMNPV_ORF34_arif 1	783	GCACAACAACGAAGAAAATCTACTTTTACCTCCTCCACCAAAGAGTTGGATATTTGATCA
SeMNPV_ORF34_arif 1	743	CAACGACGACAACAACAACATTTACCTCATCGTATTGGCACAACAACGAAGAAAATC

SeMNPV_ORF35	1061	GCAACATGTTATGGTGTCCCTCGAACATTTTCAACCAAACACCGACAACGCTTTCCTAT
SeMNPV_ORF35	1041	GCCCGTCGAAAAATACGATCGCAACATGTTATGGTGTCCCTCGAACATTTTCAACAAAA
SeMNPV_ORF36	1515	GTATGCCGACATTTGGAATTTACTACATACCCTTGCTCCGCACCTACCATCATATTAGCAT
SeMNPV_ORF36	1228	TATACACTTTGTTTCTATCCCGGGCTCGAAGGTAGGTGTATAGTCAACGGCTACATGAAT
SeMNPV_ORF37	149	GCGATCGAAAAATTCTACACTGCGTCCGCGAAAGGAATAGAATAATCAAATTAACAAAC
SeMNPV_ORF37	148	TGCGATCGAAAAATTCTACACTGCGTCCGCGAAAGGAATAGAATAATCAAATTAACAAAC
SeMNPV_ORF38_fgf	1156	AACGCCGTGCCCATGATGTTCCGTCCATCACAGTACTTCGTTGAAGATTTGTTTTGCATGA
SeMNPV_ORF38_fgf	1079	ATGATCATGATGAGGTGAAGGAGTCGGTGAAAAAGGTGATTTCAAATTTGATCGCTGCCG
SeMNPV_ORF39	124	GTTTCGATTTATAATTAATATACAGTCACCTTCGCCACAGCAATTTGCTGGCGAAATAA
SeMNPV_ORF39	123	TGTTTCGATTTATAATTAATATACAGTCACCTTCGCCACAGCAATTTGCTGGCGAAATA
SeMNPV_ORF40	634	TCTAAACTATGCATAAGCGCCATGATACTAATGTTCCGCAATTTACATGATTTTGTATGTC
SeMNPV_ORF40	594	CATCTATAAATATTTGCAATGGGAGGACCAACGAGAAATATCTAAACTATGCATAAGCGC
SeMNPV_ORF41_alk aline_exonuclease	1163	GCGGCATCGAAATGGATAGGGATAACGGTAAAGTAAAACATAGTGTGACTTGTAAATATA
SeMNPV_ORF41_alk aline_exonuclease	1103	TAGCCGACGAAGGTATATACTGCGACGATGACGACGACGAAACACTAAAGACATTTTGT
SeMNPV_ORF42	187	AGCATACAATGCACCATCAACACGCAACTATTGGACCATTTGATGATAAAATACGTTTAA
SeMNPV_ORF42	186	TAGCATACAATGCACCATCAACACGCAACTATTGGACCATTTGATGATAAAATACGTTTAA
SeMNPV_ORF43	1066	CATCGATGGGAGTGTGACTATTTTTCGAAATGTTGAAACAATTTTTGTACATCATCAAC
SeMNPV_ORF43	1002	ATACTTTATGAATCGCTTCGACAACCACGTCAAGTACGTGACCCATCAAATCAACTTTCC
SeMNPV_ORF44	364	TCAAGATGGCATTACGCGACGAAACTTGAAAAAGCCAATATTAATCGTGACGTAGTATAA
SeMNPV_ORF44	344	TTGACCCTTCCCGACAACATCAAGATGGCATTACGCGACGAAACTTGAAAAAGCCAATA
SeMNPV_ORF45_rib onucleotide_red...	883	GGCGAATACAAGCGTTTCGGCGCCGGCGGAAGACAAATTTCAAATTTGGAAGACTTTTAA
SeMNPV_ORF45_rib onucleotide_red...	807	CTATACTGAGAACCATTTCGAGTTTATGAACAATATTTTCGTTGGAGGGCAAAACTAATTT
SeMNPV_ORF46_cal yx_/polyhedron...	929	AGACCATCAATACCATTCTCGATTTGTTACAACCACTTCTGGCATACTTCAACCAACA
SeMNPV_ORF46_cal yx_/polyhedron...	909	CGTCGTCGGCGAACTACAACAGACCATCAATACCATTCTCGATTTGTTACAACCACTTCT
SeMNPV_ORF47	246	GCACGAACACGTTGAATTTACTGGACCGAATGTACAATATTGTTGAAATGTTCAATAA
SeMNPV_ORF47	245	GGCACGAACACGTTGAATTTACTGGACCGAATGTACAATATTGTTGAAATGTTCAATA
SeMNPV_ORF48_su per_oxide_dismut...	274	TTGACCgAAATCGATAAGATCGACAACGTGATGAGTCTTTTCGGCGAATACAGCGTCACT
SeMNPV_ORF48_su per_oxide_dismut...	273	TTTGACCgAAATCGATAAGATCGACAACGTGATGAGTCTTTTCGGCGAATACAGCGTCACT
SeMNPV_ORF49	296	AAATTCAAAGCCCAATGAATTCGCGATCCGTGTATCAGAAACTTGCTGCTCATCTACGACC
SeMNPV_ORF49	273	CAAATGTAACAAGGATCTAATTAATAATCAAAGCCCAATGAATTCGCGATCCGTGTATCAG
SeMNPV_ORF50	586	GTCTGTATTCCGAACCGATCGAAAAACGATCTTTAGCAAATATACAAGCAATTGGAATGA
SeMNPV_ORF50	585	AGTCTGTATTCCGAACCGATCGAAAAACGATCTTTAGCAAATATACAAGCAATTGGAATG
SeMNPV_ORF51	352	AGGGAGGATTGTGTCTTTTCGATTATGTCGTCGATGATTGAAATTTTTCGATTCCCTTT
SeMNPV_ORF51	321	TCTCTATAAACGCCACTGCGTGTACGAGATGAGGGAGGATTGTGTCTTTTCGATTATGT
SeMNPV_ORF52	1531	CTCGCAAACACTACAATTTAACCTTACGGGTCCGATGAATTTTCAAAAAGTCAATAATGA

Anexo III

SeMNPV_ORF52	1471	GATCTCAACGATACGCTCGAATGCATATCTCGATACAACATCTCGCAACTATACAACAAA
SeMNPV_ORF53	583	ATGAAAGAAAAATCGCAAACGTAAATACCCAAGTCGTCGCGCCGTCGTCTCGTACAAA
SeMNPV_ORF53	464	TTATCGAGACTATAGACCTATAACAACCACAGCAGCAAGAGCCCCTTTGAATTCAACGAAA
SeMNPV_ORF54	1035	CAAGGCGTGCGGAATGAAGTTTTACTACGACTTTAATTTATTTTACCATGAAGGAATTTTG
SeMNPV_ORF54	931	ACGATGGAGTATCTGATGTCTAGATATCCCCATATCGACATGAAGCGCTCGTTCTTTTGC
SeMNPV_ORF55	338	TCGTTCTGATACACTACAAGCTGCCCTGGAGGAGGTGGATGAGTTGACGGTCAACCGAA
SeMNPV_ORF55	318	CGACAGGATCGCTCAGTTTATCGTTCTGATACACTACAAGCTGCCCTGGAGGAGGTGG
SeMNPV_ORF56_p1 3_homolog_in_Leu...	742	TGGCACTTTGACGCAAAAACCAATCAGACAATCAACTATATGGACGTGTATATTTGGAAG
SeMNPV_ORF56_p1 3_homolog_in_Leu...	712	GTGATCAACTATTACGGCGACGTCAAACCATGGCACTTTGACGACAAAACCAATCAGACA
SeMNPV_ORF57_od v-e66	2113	CAACAAGATCGTTTCGTGCTTACGACGTTTACGCGGACGAGTTCAAATTTCAACTTTTAG
SeMNPV_ORF57_od v-e66	2053	CCTCTGCTGTTGATGTCAATGTCCTGATAGATAATTTGAAATTTTACAACGAATCAAACGT
SeMNPV_ORF58	142	ATCATACTCTTGTTCATCGTATTGATCGTGAGCATCAACAAGAGCCCTCGAACTGTCCACC
SeMNPV_ORF58	141	GATCATACTCTTGTTCATCGTATTGATCGTGAGCATCAACAAGAGCCCTCGAACTGTCCAC
SeMNPV_ORF59	1009	TACGAGTCGACGCGCATTGACAATTTGATTGTGGCGGCGGAGATACAATTACTTTTTT
SeMNPV_ORF59	827	TTATTATCAAGCTGAACGGTCTCGATCGCGAACAAGGTCGGTCTCTATTGCAAAAACG
SeMNPV_ORF60	121	CCCGAAACACTGTTGAACGTCGTCAAAGTGCACAGACTAAAAGATGACCTGTCCATATA
SeMNPV_ORF60	120	ACCCGAAACACTGTTGAACGTCGTCAAAGTGCACAGACTAAAAGATGACCTGTCCATATA
SeMNPV_ORF61_p8 7capsid	1576	ATACACTACGATTTTAAATCAATCGCGCGTCTACATCGGACCCGTCGACAACGTGATCAAA
SeMNPV_ORF61_p8 7capsid	1516	CAAAAAGTCATCAATGTCCTGCACGTGTACGCGAGCGTCGTACAAAAAGAATATTTCCAAG
SeMNPV_ORF62	1012	CTGTTC AAGGAGACGATGGAACAGTACATTTGATCCGAAAACATATATAAGACATTTAGTT
SeMNPV_ORF62	951	CAAATACAACGACCAACAGTTTGAGTATTTTACGACAAGCTAAAAAATATCAAAGCGGA
SeMNPV_ORF63	252	CGTCAACACTATAAACGTTAAAGTTGATGTCTGACATTTACGACAATAAAAATACCCGT
SeMNPV_ORF63	251	CCGTCAACACTATAAACGTTAAAGTTGATGTCTGACATTTACGACAATAAAAATACCCG
SeMNPV_ORF64	1108	AGAGCTTCGTCCTCGTCGTCGTCGTATAACGCTAAACGCAAAAAATATCAAACACTAG
SeMNPV_ORF64	1048	ATACTAGTCAATCCCAAAGACAAGACGGATTTCGTAACATATTTCTTAGGCAACGGAATT
SeMNPV_ORF65_p6 9_DNA_binding_p...	99	TAGATCATCAAGCAACCGCAGGACCTATAGACGATCGAGCGGCTATCACCGAAGACCGG
SeMNPV_ORF65_p6 9_DNA_binding_p...	98	GTAGATCATCAAGCAACCGCAGGACCTATAGACGATCGAGCGGCTATCACCGAAGACCGG
SeMNPV_ORF66_lef 5	778	GAGGCAGTTTCGTTTATTAGATATTGTCAAAAGTGAACCGGACCATGATGGGCTATGAT
SeMNPV_ORF66_lef 5	703	TCTTTGAACGGGCTCTCGTTGAAAGAGTGTGATCACAATTCGTGACGATCGAAAAGACAG
SeMNPV_ORF67	833	CCCAAGATTGGAAGCAATATCACGAAGAATTGTTAAATAACATCACAGATTACGAAAACG
SeMNPV_ORF67	773	TCAAAGACAACAATTTATCGTACGATTACTTTTTAAACGTACGTCGATGCATGGAACCCG
SeMNPV_ORF68	362	TAACGTCTGAAAAATAATGTACATGTTTGCCGCTTCGGTCTGTTCTGATTCTCTGCGAAT
SeMNPV_ORF68	361	TTAACGTCTGAAAAATAATGTACATGTTTGCCGCTTCGGTCTGTTCTGATTCTCTGCGAA
SeMNPV_ORF69	444	TGAGATCCAATACACCATTATCGACATTATAAACTACCTAATCCATCTTGACTGGTACA
SeMNPV_ORF69	424	CGCGTTCTGCTCACCGTCGATGAGATCCAATACACCATTATCGACATTATAAACTACCTA

SeMNPV_ORF70_helicase	3610	ATCGACATGGCGTGGAAGACGGCCGACTTTAATACTAATCAACCAGAGTTTATATGTTAA
SeMNPV_ORF70_helicase	3550	GACGCGTTCAAGAGGAAATTCAAAAAGTACTATTTCGGACGAAAGAAAAATGTTCTACAGC
SeMNPV_ORF71_odv-e25	588	CACACAAATCAACGACGCGGGCACACTCTTTATCAAAAATGAAAAATCATTAGACTACA
SeMNPV_ORF71_odv-e25	547	ACAACGCCAACGTTCAACTCAAACCTCAAGGAATGGGATTACACACAAATCAACGACGCG
SeMNPV_ORF72	375	AATCGTGTGGCGTCAACATCAATTGGAAGGAAGATAATTTAAGTGCGCCTTTTAAACA
SeMNPV_ORF72	345	CAAATTATCCGTCTACAGAGCCGTATAATAATCGTGTGGCGTCAACATCAATTGGAA
SeMNPV_ORF73	697	CCACCAATCAACTTTGAAAAGATGAAATGGTCCACATACAAGTCAATGTTGGAATTGAAA
SeMNPV_ORF73	637	ACGACGATGGTGTTCACAATCACATCAACGACTACCGTTGGATACAGAGAAAACATGAAG
SeMNPV_ORF74_ief4	1233	TGAGTTGAATATGTTTAAAAATTTGGACGGCCACTGTGAGGCGGACTACGATCGTTTC
SeMNPV_ORF74_ief4	1086	TCAGCAATTCTTTAATCCACCCTATTGTTGCAAAACGCCGTAGCGGGATACAGTACGAT
SeMNPV_ORF75_virion_protein_39k...	785	TGTTCAAATTTAGGGGCAACTCGAAAGCTTTGCAGACGGCGCTCAATCGATACGAACAAT
SeMNPV_ORF75_virion_protein_39k...	745	CGGTCCGGTTACAACGAAAACTATTTACTCATCGATAGCGTGTCAAATTTAGGGGCAAC
SeMNPV_ORF76_cg30	1327	TCGCCGTACCATCGAGCTCGTCTAACACTATTGCCATTTTTAAAAACCTAAATTTTAA
SeMNPV_ORF76_cg30	1267	AATGATCCATGGCGTGGTTGAACAAACGCAAGGCTAAACAGTCGGTTTCATCATCGTCA
SeMNPV_ORF77_virion_protein_91k...	2372	CGCTCGGACCAAACTTTACGTGCAATCTCGAGGATAATAGAATATATTTTAGAAGATT
SeMNPV_ORF77_virion_protein_91k...	2312	TCAAATACAATCCCTGGCTGCATACTTACGAAGGAAAAACAATGGCGTGTCCAGAACATG
SeMNPV_ORF78	341	TCAATGCTAATACTACTGATAAGATGTTAGCCGAGCCGGTCGCGCATCAAGAACAACATG
SeMNPV_ORF78	340	GTCAATGCTAATACTACTGATAAGATGTTAGCCGAGCCGGTCGCGCATCAAGAACAACAT
SeMNPV_ORF79	661	AGTAATCCACAAATGTATATTGCTCTCATAAAAAGAACCAACGCAATGGCCAACTACAC
SeMNPV_ORF79	557	CCGTGCTGATTCTGTTGCGTGAACATTGTTCAATTTTTCATGTTACTTTGTACTGTTCAAT
SeMNPV_ORF80_glycoprotein_41kD...	932	TCACCGAGCTAGCGTTTGAGAATGAAGCATTAAAGAAGATTTATATTGCAACAGTTAAGGT
SeMNPV_ORF80_glycoprotein_41kD...	795	AAACATTTTTGAATTTATCGCCACGCTCGCCACCAACTCTGGTAAGAAACCAGCGTTTT
SeMNPV_ORF81	268	CTAGTGTGGGATTGTTGACATTTTTCTGTGACTCGTATTGTTGTACGCAATATTTTAC
SeMNPV_ORF81	266	GTCTAGTGTGGGATTGTTGACATTTTTCTGTGACTCGTATTGTTGTACGCAATATTTT
SeMNPV_ORF82_very_late_factor_1...	1027	AAATTTGACGTCGACATCGACGACCCGACGACGAGATTAGCGAAGAAAAACGACATTGAA
SeMNPV_ORF82_very_late_factor_1...	947	ACAACAAAGGCATACCATTGCAGCGAGTGGCAAAACTCATGAACCACTCCTCGTACAAAA
SeMNPV_ORF83	293	CGAAATGCGTGCTGTTGTCGGTGAAAATTGACAAAAAATTGAAGTTTTGACGAAATCAA
SeMNPV_ORF83	257	TGCGCAGTTACAAACATAATGTTAATGTAATTTCAACGAAATGCGTGCTGTTGTGCGTGA
SeMNPV_ORF84	574	CAAGTCATAATGTACACTTTTGC GTTTAAACCTTGC GTTCTTTGGTGCCGGCTTTCAA
SeMNPV_ORF84	431	TGAATATACCAGAAACGACGTGTCGCTCTGCAAAAAGTTCATGAAAAGTTGGAGAAGCG
SeMNPV_ORF85	194	CATCATCTTTGTCAAACAATATGATATCGATGAAAGGGATGTGTATTTGCGAGAAACCA
SeMNPV_ORF85	193	GCATCATCTTTGTCAAACAATATGATATCGATGAAAGGGATGTGTATTTGCGAGAAACC
SeMNPV_ORF86	75	GTTTTACAAGGTTAATTTACCAGACAATACCGTCTGTTTCTTGGAAAACGCATTGAAAA
SeMNPV_ORF86	74	CGTTTTACAAGGTTAATTTACCAGACAATACCGTCTGTTTCTTGGAAAACGCATTGAAAA
SeMNPV_ORF87_p26	646	GTGACTTTCGACAAAAAGACGTGTACGTGATGTAATATACAATGGTGAACACTATTTCA

Anexo III

SeMNPV_ORF87_p2 6	626	TTCCCCGCATCGATGCGTACGTGACTTTCGACAAAAAGAACGTGTACGTGATGTAATAT
SeMNPV_ORF88_iap 2	869	CGTGTGCCGAATGCGCAAAACGTTGTAAAGTATGTTGTATTTGCCGAGAGAAAAATAAAA
SeMNPV_ORF88_iap 2	787	AGCAATATCGATGACATCATGTGCAAGATATGTTTCGAGCGGAGAGACACGTGCTTT
SeMNPV_ORF89	624	CATATACAAACCGGCGCATTCTCGAGCCGCAAACTCTGAAAAGTATTTAGTTTGCAAAGG
SeMNPV_ORF89	584	GTCTTCTCCAAGATTTCGTTTCGCACITTAACGAATTGCCATATACAAACCGGCGCATT
SeMNPV_ORF90	340	AATCCCGACGACGACGACGACAATAACCAATAACGACATTGTCTATAAACAATGGAAGA
SeMNPV_ORF90	268	ATAATGTCAATTCACGTGTTCCCTTGCTTTATTTGCCCATCTATTGACGGTGGCAGTC
SeMNPV_ORF91_lef 3	1210	TGTACCGTGTGGGTTTGACAAAAGTTGAAATGATACCGATCATTTTGAAGGTGTTAA
SeMNPV_ORF91_lef 3	1150	ATTGACGACGACATTTACAAGGTGTTAATTTACGTCGCCGTTGACATTACCACCAATAAT
SeMNPV_ORF92	2056	GATTTCAAACCTCGAATCGAACTCATGGGTAGAAAAGGAGGCTATTAATCGACAAAAGTAA
SeMNPV_ORF92	1996	CTAATCGAGCAAGTGGCTCCTTTGCAAGACAGAATCGAAAGATCGGCAACGGAAATTGAA
SeMNPV_ORF93_DN A_polymerase	3086	TCAATCACACTCATCAGTTTGCAATGATATAAATCTAAACGGGCAGCACCTGTCGACTCGG
SeMNPV_ORF93_DN A_polymerase	2941	CTGTTTCGACGTAAGTATCCCGTCTCAAGACCGTGAACCATATTAATAAATCGAAAAAA
SeMNPV_ORF94	327	AATCAACGATCTCTCACAGTTTCTCGTCAAAGAAATAGACAACGCCATCATGATTAATAA
SeMNPV_ORF94	307	CAACATTTAACGGACGACGAAATCAACGATCTCTCACAGTTTCTCGTCAAAGAAATAGAC
SeMNPV_ORF95	199	CGGGATCTAGAAAAGCGTTTGACGCAATTTTAAATAAGAATAAGAGCTCTGTGACTAA
SeMNPV_ORF95	198	ACGGGATCTAGAAAAGCGTTTGACGCAATTTTAAATAAGAATAAGAGCTCTGTGACTA
SeMNPV_ORF96	282	CACAAATCTATACGCAAGATTTGAGGCAACGAAAAAGAACGACGCAAGATTGTTTTTA
SeMNPV_ORF96	281	ACACAAATCTATACGCAAGATTTGAGGCAACGAAAAAGAACGACGCAAGATTGTTTTT
SeMNPV_ORF97_lef 9	1429	ACTCTACCCTCCGAATTTCTATTCCCCGAACATTTACTCGACATATTTTTGGATCAATAA
SeMNPV_ORF97_lef 9	1359	TCAAAACGCTACTCTCAAAGACGACAACATATGCTACAAAAACGACAACGTGGCTCTCGC
SeMNPV_ORF98	514	ATTTTTATAGTCAAACGAAAACGACATCTACGATCTGTTGGGCAAATGTCGGTGGCG
SeMNPV_ORF98	484	GTGATGGTGC GCGAGAACGAGCGTAGCAAAATTTTTATAGTCAAACGAAAACGACATC
SeMNPV_ORF99_p9 4	2072	GAATCGAGGACAACGGTATTGAGGGTAAAAAGAATATTGAAGACATTATCAACTATTGCA
SeMNPV_ORF99_p9 4	2010	CATTAAGTGCCGATTTTTATTAATGCGATTGAAAGGTCGAGAGACTTTATGATCGTAT
SeMNPV_ORF100	70	ATGAAATTTTTCAATCGTGCATACGAAAAATATCGGTCCGACGCGACCCGCCGCAAATT
SeMNPV_ORF100	64	ATTTACATGAAATTTTTCAATCGTGCATACGAAAAATATCGGTCCGACGCGACCCGCCG
SeMNPV_ORF101	462	CAACAATTATAGATTGATTCGTCAAGAGAGAAGTAGAAAATTGACGCGAGGCGGCGCAGG
SeMNPV_ORF101	432	CGACGATGACGACATTGACGAGTATGATGACAACAATTATAGATTGATTCGTCAAGAGAG
SeMNPV_ORF102	475	GCGGACGACAAGCGAGCTGATCTGGATCGAGAATATGAAATAAAACTATTGGAGTTTACT
SeMNPV_ORF102	410	ACCACAAGCGCTCAGCGGATATGTCGACTTTGAAAATCGCCACAATAAAACTATGTGA
SeMNPV_ORF103	217	GCGGACTCAATGTCGCCGTTAATTTAGTTAAACGCCAAGATAAACATGAAGATAAAACT
SeMNPV_ORF103	168	CAAATATATAACCAATCATCAACGGCACTTGTACGCTTTTGCCTGAAGCGGACTCAAT
SeMNPV_ORF104	91	TTTTATGATCAAAGAAAAGGGACGAGTCATACGTCGGCAGAAGCACGACCTACGATGTG
SeMNPV_ORF104	90	TTTTTATGATCAAAGAAAAGGGACGAGTCATACGTCGGCAGAAGCACGACCTACGATGT

SeMNPV_ORF105_v p1054_virion_pro...	822	CCATTACGCCAAAATGGTCACGTACGCCAAAACAATTACCGACGCTATTTGAACTTATCGT
SeMNPV_ORF105_v p1054_virion_pro...	782	ACATTATGTGCCCGCCGCGCAAATGATCAAGAAAATATTCCATTACGCCAAAATGGTCAC
SeMNPV_ORF106_le f10	175	AAGTACCCAGTGTCCGATTATCTGTTTCGAGCGAACTGCAAAGTGATCAAACGCTATGA
SeMNPV_ORF106_le f10	173	ACAAGTACCCAGTGTCCGATTATCTGTTTCGAGCGAACTGCAAAGTGATCAAACGCTAT
SeMNPV_ORF107	976	CACGTTATTAGTTTTCCATTGCGTGTATACAATTTACCCAATTGAAATTTGACTGA
SeMNPV_ORF107	910	ATCAAACACACTCGGGACAACGATGTTAATACGTTTGGTAGTAGGCTCGGAAAAATACC
SeMNPV_ORF108	355	ACTAACGAACACCTACTCGACGTTGAATTGGATTTTTCTAATCTACTTTGCTACAAGTAA
SeMNPV_ORF108	354	CACTAACGAACACCTACTCGACGTTGAATTGGATTTTTCTAATCTACTTTGCTACAAGTA
SeMNPV_ORF109	427	TCACAGCAAAAACGAACAACGTCGGCGCCAAATTCACCTATTTCACAGCAGCAATGTTTTG
SeMNPV_ORF109	392	TTATACGAAGTGCCTATCCGCAATGCTATCAATGTCACAGCAAAAACGAACAACGTCGGC
SeMNPV_ORF110_ia p-3	866	AATGTTCTGTTCATTGAAAAATGTCCTCTATGTCGACGTAATTTTTCGCATGCTCAAA
SeMNPV_ORF110_ia p-3	826	ATGTTGTTCTGTGCGGTGCGGTCTATGATTGCGTGTGAAAAATGTTCTGTTCATTGAA
SeMNPV_ORF111	1189	AGCGGAGACGAGTTGGACGACGACGACGAATCTATGATGACATTAATGATATGATGTAA
SeMNPV_ORF111	1129	AGTCTTGAATCGATCGAAAACAAATTAACCTTACGTCGGCTTTTATGAAAAATGAAAAGC
SeMNPV_ORF112_le f8	2659	AATAGCGGCGAATCAACGTAATGTCTAGTCTGCTACATTGCAACAATACAATAATGAGA
SeMNPV_ORF112_le f8	2506	AATATATTTAAAGAGTTCATCAAAGGCAACTATACGGGCCACGAAAAAGGTAGAGGGCAGC
SeMNPV_ORF113	20	GCATTTTGTGTGAAGAAATCGTTTTATTACACAAAAGATACACGAATAGACCGAGCGATA
SeMNPV_ORF113	19	TGCATTTTGTGTGAAGAAATCGTTTTATTACACAAAAGATACACGAATAGACCGAGCGAT
SeMNPV_ORF114_o dv-e66	1999	ACGCCGTACGCGTTCACGTTTGAAAATCTCTAGGGAACCAATTCAAATTTACTTTTGA
SeMNPV_ORF114_o dv-e66	1922	ACTACGAAGACATTCAGGGTTTGCTCGATCAAGTCGCTCGGCATTCAAGACTTACTAT
SeMNPV_ORF115_p 47	1082	GAGCCGCCGACAGTCACGTGTGATAAATACGATAATGAAATTTAAATTTGATTTTATCA
SeMNPV_ORF115_p 47	1021	GAAAAATCCCAAAATTTACAATCCGCTCGAGCTGTCGACGAGGCGACTCAATTCGATAAAA
SeMNPV_ORF116	616	CTGTATCGTCTCATCAACGTCGAAGCGAACAATCCACATCGACAACAAGGAATTTTAAAT
SeMNPV_ORF116	563	AGAAACAGCAGCAATTGCCTAATCCTCCTATTGTTTTGAACTCCCAATTTCTGTATC
SeMNPV_ORF117	503	AATTGTGTAAGGATGACGCTAGACTGGCAGAGTTTAGAGATTTGCAAGGCCGTATGG
SeMNPV_ORF117	473	ACTTGCTACAAAAGATAAATCGTACGCGCAATTGTGTAAGGATCGACGCTAGACTGG
SeMNPV_ORF118	722	CATCATCACCACAATACTATACTGGCGTCTACAAAGGATTTAAGGAAAATCATCAATGTG
SeMNPV_ORF118	515	AGCAATTGACGACATACGATTGAGCAACTATTTAAAAGTTTTGCAATTTGTCAAAGCGC
SeMNPV_ORF119_le f11	234	AATAACATCTCTTGAACCGAATACAAAAGCTGCCGTGAGTAAATGACGGCGACAAAACA
SeMNPV_ORF119_le f11	170	GCGAGCAACCATACTGCAAGCGACTCTCTTATCACATTTAAAAGAATTAACAAAATATTCA
SeMNPV_ORF120_3 9K_/pp31	723	AAATGCTAAAGCAATCGAAAATGTAATAAACGAAAACGACAAGAAGCGCGCGGACGA
SeMNPV_ORF120_3 9K_/pp31	630	CCAAGCGCTTGAGGAAGGAATCTTGGTTTTTAAAGATTTTTATCCAAATACGATCAATC
SeMNPV_ORF121	232	TGTTTTTTATACACGAAAAGGATTCAACGTATATTTTCAACGTCATCTACCCTGTGCTGA
SeMNPV_ORF121	231	CTGTTTTTTATACACGAAAAGGATTCAACGTATATTTTCAACGTCATCTACCCTGTGCTG
SeMNPV_ORF122	151	TTACAAGCGATCGTCTTCGGCACGATGGACCTCATATTGACTTGATATTGCTAGAGTAG

Anexo III

SeMNPV_ORF122	150	ATTACAAGCGATCGTCCTTCGGCAGCATGGACCTCATATTGACTTGATATTGCTAGAGTA
SeMNPV_ORF123_v-ubiquitin	182	TTCAAAAAGAGTCTACAATCCACTTGGTGTGAGATTACGCGGAGGTAGATGGTGGTGGT
SeMNPV_ORF123_v-ubiquitin	181	ATTCAAAAAGAGTCTACAATCCACTTGGTGTGAGATTACGCGGAGGTAGATGGTGGTGG
SeMNPV_ORF124	502	TACAACACTACGAATGTAGCGACGACGCTCGACACCGTACCTTACGAAACTATGGATTGTGAA
SeMNPV_ORF124	400	CTCTATTACACGTATCTGGGAGTGTCTGCTTGGAGAATGTTTCGTTGATGATGATGCGC
SeMNPV_ORF125	311	ATCTAATTTTTAATGTTAGCGCAAACGACACGACGACTACGACGATTGCGTCCTCTTCAT
SeMNPV_ORF125	291	TTTTTCATCGTTCAACGACAATCTAATTTTTAATGTTAGCGCAAACGACACGACGACTAC
SeMNPV_ORF126_D NA_binding_protein	925	GTGAGCGAGAAATCGTATTGCGCTCGCATCAAACCCATGGTGTTCACATTGAAGAA
SeMNPV_ORF126_D NA_binding_protein	873	CAAGCAGGGCAAAAACGACATTGAATTCGATACATTAGTAAACAATAAGAAGGTGAGCGA
SeMNPV_ORF127_le f6	392	CCGCCTTCATAGACATAAACTTTGATGATGATATTAACAACGACAACGACAAGTCATATT
SeMNPV_ORF127_le f6	391	ACCGCCTTCATAGACATAAACTTTGATGATGATATTAACAACGACAACGACAAGTCATAT
SeMNPV_ORF128	345	CAACATTGACGAAAAGCTATTTAGGATGCGCATGGAATTTCTCAAATTTAGCACAAAACA
SeMNPV_ORF128	344	CCAACATTGACGAAAAGCTATTTAGGATGCGCATGGAATTTCTCAAATTTAGCACAAAACA
SeMNPV_ORF129_p 26	778	CTGATTACGAATCAGAACAAGACGACGACGACGACGACGATTTGGCAATATCGTATAG
SeMNPV_ORF129_p 26	777	TCTGATTACGAATCAGAACAAGACGACGACGACGACGACGATTTGGCAATATCGTATA
SeMNPV_ORF130_p 10	208	CCCAGCGTGCCTGGCAATCTACAAAAGCAGCAACAGCAAAAAGAAAAGCAACAAAAGTAA
SeMNPV_ORF130_p 10	207	GCCCGACGTGCCTGGCAATCTACAAAAGCAGCAACAGCAAAAAGAAAAGCAACAAAAGTAA
SeMNPV_ORF131_p 74	1900	AATTTACGACGACAAAACCAACTATTTACAGAATCGATGGTACGACAATCTCTATTTCGGAA
SeMNPV_ORF131_p 74	1735	ATCCTTTACAATTATCAGAGCAGGATTCTAGTGCCAATTTCTTTCATCGCCGGAGCTCTC
SeMNPV_ORF132_le 1	2076	CGTTGAAAGTTTCAACTGCAACTTTGAAAAGGTCTATACGACAAGAAGAATGCTAAATC
SeMNPV_ORF132_le 1	1991	TCAACATTGTCACAAACGGTATGATTAACACTATTGTCCAATACGGGCGCGCCGCTTGA
SeMNPV_ORF133	527	CTATGAAGCTAATTTATCCGACTTTGCGCATCAATACGGACGACGTGATCGTGAATGTC
SeMNPV_ORF133	503	CACCCAACGTCGAGGACGTCGATACTATGAAGCTAATTTATCCGACTTTGCGCATCAATA
SeMNPV_ORF134	57	TCAAGATTTACATCATGATCTTCACACGCGCAAAATATGTCCGAGCGGCTATCACGGACT
SeMNPV_ORF134	56	TTCAAGATTTACATCATGATCTTCACACGCGCAAAATATGTCCGAGCGGCTATCACGGAC
SeMNPV_ORF135_o dv-ec27	787	GACGGCGCAAAAATTCTTGAACAACAAACACCTTGGGCATTTTGGATTATAACAATTGA
SeMNPV_ORF135_o dv-ec27	727	CCCACGCTGAACAGCAATTATTCAAACATGTTGTTGAGTAAATTTAAGTTTAGAGTGGAA
SeMNPV_ORF136_o dv-e18	184	CTAAACGCCACGATGAGAGCTAATCCTTTTCGTCACACGCGCACAGCTAACATGTTATAA
SeMNPV_ORF136_o dv-e18	85	ATTGCTCTCGTCATAATCATATTGATCATACTGCTCTTCCAATCTAGCAGTCAGCCGGGC
SeMNPV_ORF137	1324	ACTCTCGATCACTTGAAAAATCCTTGGGTAAAAATACGCTATTGAAGCTATTACAGTAA
SeMNPV_ORF137	1264	GTACCTCGTGTGCCTGCATATTTAATTATAAGAGGAGATTACGAAAAGTTCTCAATTCAAA
SeMNPV_ORF138_ie 0	676	AAGACGAGTTTCAAGAATTCAAAGTTGGAACGTAACCTAGCACCAGCGCTGAGCTATAG
SeMNPV_ORF138_ie 0	608	ATTTGTGTTACGTGTGCTACGTGGAACCTGTGGAACATTGCAGTCTATATCCCGTCTGTG
SeMNPV_ORF139_ri bonucleotide_re...	2140	CACTTTTACGCGTGGGAGAAAAAAGTAAAACGGGCATGTATTATTTGCGCACAAAACCC
SeMNPV_ORF139_ri bonucleotide_re...	2071	TTCATAGATCAGAGTCAATCGCTGAATTTATTTGTCGCCGAACCCACTTACTCGTGGTG

Anexo IV: Sequence of the primers employed in Chapter 2

Primer name	Sequence (5'-3')
Cloning	
Se-Lef5 ^F	CTCGAGATGTCTAAAGCTGACGCATGCCA
Se-Lef5 ^R	GCTAGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGATCATAGCCCATACTG GTCC
qPCR	
qF-AcMNPV-pol	GGGTCAGGCTCCTCTTTGC
qR-AcMNPV-pol	TTACGCAGCCATCACAAACAC
qF-Se-Lef5	GTGTCGACGCAGGAAAACG
qR-Se-Lef5	CAAGAATAGATCGTAACAATCGTGATG
qF-gfp	AGCGGCACGACTTCTTCAA
qR-gfp	TGGTCCTCTCCTGCACGTATC
qF-Ac-p74	AAGCCTACTGTGACGTTTC
qR-Ac-p74	GAGCGATTCCCACCATCTAAA
qF-Ac-pif1	CATGAAGAGGTGCGTTATCCT
qR-Ac-pif1	GTGTGCATTGCCTTCGATTAC
qF-Ac-lef3	TGACATGGGCGATAACAAGT
qR-Ac-lef3	CAAGTCGGAAGAGGTAGAACAG
qF-ATPsynthase	TCCTGCTGTTGTTTCGCTTTC
qR-ATPsynthase	CCACACATTTCGATTCCATGGC

Anexo V: Sequence of the primers employed in Chapter 3

Primer name	Sequence (5'-3')
Variability of the library & clone identification	
pDest670 ^F	CTCTCGAGCATACCGTCCCACCATCG
pDest670 ^R	CGATGCATTGATCCTCTAGTACTTCTCG
Cloning	
P2H-14 ^F	CAGCGGCCGCGTGCGTGTGACCTGCTGTA
P2H-14 ^R	CACTGCAGTCTAGAGGGCATTGGTATTTGTTGAC
P2H-31 ^F	CAGCGGCCGCGGGCAGACAAGAGGAAACC
P2H-31 ^R	CACTGCAGTCTAGACACAGTTTCGAAACAGATTG
P2F-10.2 ^F	CAGCGGCCGCGGTGACAGTCTATCAAATG
P2F-10.2 ^R	CACTGCAGTCTAGACAAAGTTTCCTGTATTCATAGC
qPCR	
qF-AcMNPV-pol	GGGTCAGGCTCCTCTTTGC
qR-AcMNPV-pol	TTACGCAGCCATCACAAACAC
