

Biología molecular de los baculovirus (replicación y regulación de la expresión génica)

VÍCTOR ROMANOWSKI Y P. DANIEL GHIRINGHELLI

1. Introducción	120
2. Regulación de la transcripción	120
2.1. Expresión de genes tempranos (utilización de la maquinaria celular)	121
2.2. Transición de la fase temprana a la tardía (replicación del DNA)	125
2.3. Ensamble de viriones	127
2.4. Fase muy tardía (producción de cuerpos de inclusión)	127
3. Interacciones moleculares virus-huésped a nivel celular	130
4. Interacciones moleculares virus-huésped a nivel larva	131
5. Espectro de huéspedes	132
6. Conclusiones y perspectivas	134
7. Bibliografía	134

1. Introducción

Los baculovirus comprenden una familia numerosa de virus que infectan exclusivamente a artrópodos, exhibiendo, salvo contadas excepciones, un rango de huéspedes muy estrecho. Su patrón de replicación es complejo e incluye la producción de progenie con dos fenotipos diferentes, que poseen la misma información genética. La producción de los fenotipos se encuentra regulada y ocurre en sitios y etapas diferentes de la infección. Los primeros viriones que se producen durante el ciclo de infección brotan de la membrana plasmática y reciben el nombre de virus brotantes (BV, *budded virus*), mientras que en etapas tardías se observa la formación de viriones rodeados por una matriz proteica pseudocristalina, que se acumula en la célula como cuerpos de inclusión que contienen una o más nucleocápsides envueltas (OV, *occluded virus*). En función de la morfología de los cuerpos de inclusión y de algunas características diferenciales en la biología de la infección se distinguen dos géneros en la familia Baculoviridae: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV), cuyos cuerpos de inclusión se encuentran en el núcleo de la célula infectada, son poliédricos y pueden contener uno o más viriones (los tamaños publicados varían entre 0,5 y 15 μm , pero la mayoría de los NPVs tienen poliedros de 0,8-2,0 μm), y *Granulovirus* (GV), cuyos cuerpos de inclusión son ovoides, de menor tamaño (ovoides de 0,15-0,30 μm x 0,30-0,50 μm), y se detectan en las células infectadas que ya han perdido la integridad de la membrana nuclear (FEDERICI, 1986). Dado que los estudios de los GVs se han visto entorpecidos por la dificultad en el desarrollo de sistemas de cultivos celulares susceptibles, la mayor parte de los conocimientos en biología molecular y celular deriva de las investigaciones realizadas sobre los NPVs. En este capítulo, se utilizará como modelo de referencia el *Nucleopolyhedrovirus* de *Autographa californica* (AcMNPV), extensamente estudiado en diferentes planos desde los años 70, debido a la facilidad en su propagación en diferentes insectos huésped (es el baculovirus de mayor rango de huéspedes conocido) y líneas celulares. La secuencia nucleotídica de su genoma fue la primera en ser determinada en forma completa, permitiendo una aceleración en el conocimiento de la complejidad de la organización genética y la detección de nuevos genes y funciones en los 134 kb (kilo pares de bases) de DNA (AYRES *et al.*, 1994; ver Capítulo 3).

En este capítulo se describe la secuencia de etapas de la infección, la interacción del virus y sus productos génicos con el huésped tanto al nivel celular y como del organismo desde una perspectiva bioquímica y molecular.

2. Regulación de la transcripción

El DNA desnudo es infeccioso, lo que demuestra que no se requiere ninguno de los componentes asociados con el virión maduro para el inicio de la infección. La continuación de la infección es, como en todo virus, dependiente de la síntesis de proteínas codificadas por el virus (BURAND *et al.*, 1980; WANG Y KELLY, 1983; LU Y MILLER, 1997).

La expresión de genes virales parece estar regulada en forma de cascada y ocurre en tres fases: temprana, tardía y muy tardía (Figura 1). Durante la fase temprana se expresan, entre otros, los genes requeridos para la replicación del DNA viral. Por su parte, la replicación del DNA viral es un paso necesario para el comienzo de la expresión génica tardía y muy tardía. En la fase tardía se producen proteínas virales estructurales necesarias para el ensamblaje de los BV, que una vez formados se liberan al medio extracelular, mientras que la etapa muy tardía está dedicada a la expresión de las proteínas necesarias para la formación de los viriones destinados a la oclusión, y a su inclusión en los OB.

Se considera que el mecanismo más importante en el control de la expresión génica consiste en la regulación a nivel de la iniciación de la transcripción, es decir en la etapa de reconocimiento de los promotores. Sin embargo, también se especula sobre la regulación negativa (*downregulation*) de la transcripción de los RNAs mensajeros (mRNAs) tempranos por los procesos de transcripción de genes tardíos; en particular, cuando los productos de transcripción corresponden a regiones parcialmente superpuestas pero de sentido opuesto (efecto de RNA antisentido [*antisense* RNA], OOI Y MILLER, 1990) o a transcritos tardíos que se inician con solapamiento o próximos a la región 5' de transcritos tempranos dando lugar a un efecto de ocultamiento del promotor temprano (FRIESEN Y MILLER, 1986).

2.1. Expresión de genes tempranos (utilización de la maquinaria celular)

Inmediatamente después de la desagregación de la nucleocápsida y del desnudamiento del genoma, algunos genes del DNA viral son transcritos por la RNA polimerasa II de la célula huésped. Por lo tanto, en esta etapa, la transcripción es sensible a la inhibición por α -amanitina.

Se han empleado dos estrategias para evaluar si un gen puede ser expresado sin la intervención de otros genes virales y establecer si su expresión ocurre inmediatamente o tempranamente después de la infección. Uno de los métodos mide la actividad del promotor en experimentos de expresión transitoria, mientras que el otro evalúa la transcripción durante la infección en presencia de un inhibidor de la traducción como la cicloheximida.

Los genes de transcripción temprana pueden subdividirse en dos clases, que difieren en sus promotores y en las secuencias activadoras a distancia (*enhancers*). La transcripción de los genes tempranos inmediatos (*immediate early*), tales como *ie-1*, no requiere proteínas virales adicionales ni elementos *enhancers*, mientras que los genes tempranos retrasados (*delayed-early*) son transcritos a niveles basales en ausencia de factores virales. Sin embargo, para llegar a los niveles de expresión máximos estos genes requieren de la unión a los *enhancers* de transactivadores virales expresados previamente (GUARINO Y DONG, 1991; HOOPES Y ROHRMANN, 1991; GUARINO Y SMITH, 1992; PULLEN Y FRIESEN, 1995a). La proteína IE-1 parece ser, hasta el momento, el transactivador viral más importante.

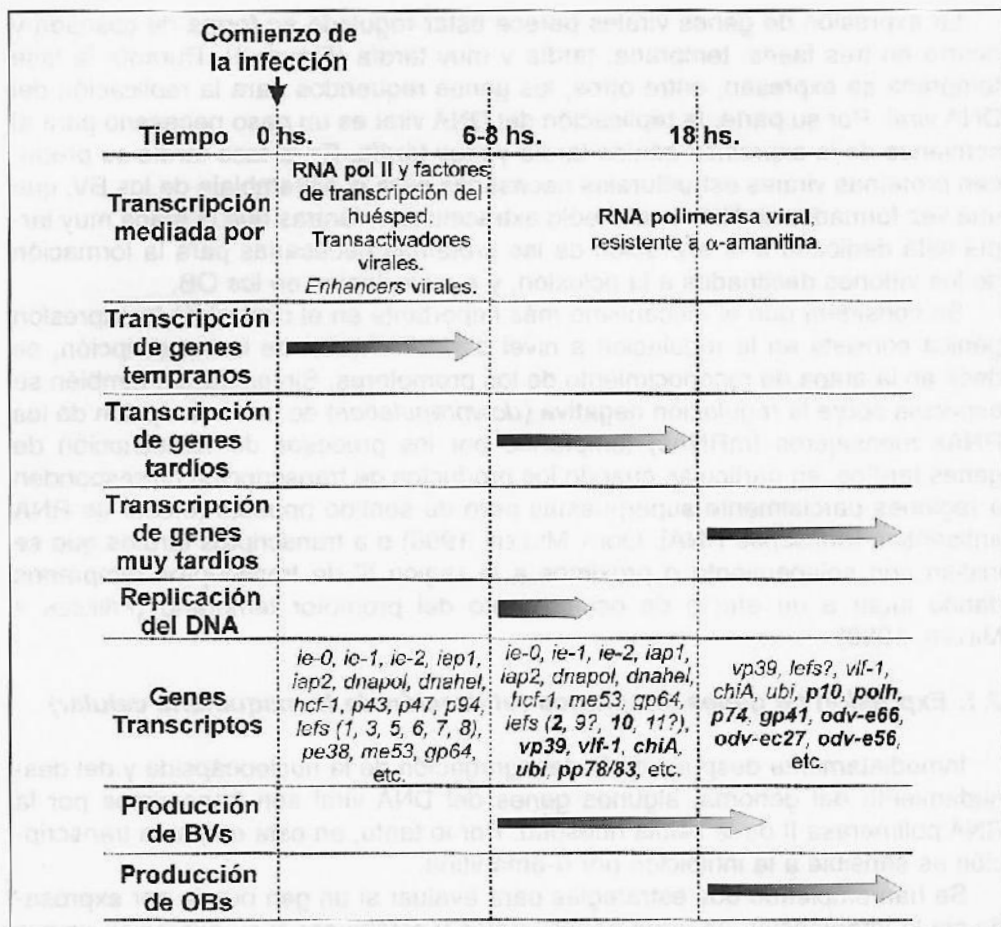


Figura 1. Diagrama de los principales eventos transcripcionales relacionados con el ciclo viral. La expresión de genes virales parece estar regulada en forma de cascada y ocurre en tres fases: temprana, tardía y muy tardía. Durante la fase temprana se expresan, entre otros, los genes requeridos para la replicación del DNA viral y muchos de los transactivadores necesarios para la transcripción de los genes tardíos y muy tardíos. Por otra parte, la replicación del DNA viral es un paso necesario para el comienzo de la expresión génica tardía y muy tardía. En la fase tardía se producen, principalmente, proteínas virales estructurales y se ensamblan y liberan al medio extracelular viriones infectivos, mientras que en la etapa muy tardía se producen las proteínas necesarias para la generación de los cuerpos de inclusión. En el diagrama se mencionan algunos ejemplos de genes activos durante las distintas etapas. En las etapas tardía y muy tardía, se señalan en **negrita** algunos genes que se activan especialmente en la etapa respectiva. Esta figura sólo tiene una finalidad ilustrativa. En la realidad, las divisiones temporales no son tan netas como las indicadas.

Muchos de los promotores tempranos se parecen a los promotores de la RNA polimerasa II (Figura 2) y contienen un *TATA box* típico aproximadamente 30 nucleótidos antes (*upstream*) del sitio de iniciación de la transcripción. La unión de la TBP (*TATA box binding protein*) a las secuencias TATA recluta al complejo de la RNA polimerasa II, que inicia la transcripción unos 30 nucleótidos más adelante (*downstream*). Los elementos basales de los promotores tempranos, tales como el *TATA box* y el *GC box*, pueden encontrarse combinados y reiterados en algunos genes de baculovirus de expresión temprana (GUARINO Y SMITH, 1992; KOGAN *et al.*, 1995; PULLEN Y FRIESEN, 1995b). También se han encontrado algunos promotores tempranos que no contienen el motivo TATA. Frecuentemente, se encuentra la secuencia conservada CAGT, similar a la de genes de insectos transcritos por la RNA polimerasa II, siendo el nucleótido A el correspondiente al inicio de la transcripción (BLISSARD Y ROHRMANN, 1990; CHERBAS Y CHERBAS, 1993). En la mayoría de los casos en que se ha definido un motivo iniciador funcional (secuencia CAGT), también se observa la presencia de una secuencia TATA. Se ha demostrado que la secuencia CAGT desempeña un importante papel en la eficiencia de transcripción, probablemente influyendo sobre la afinidad por el factor de transcripción TFIID (GUARINO Y SMITH, 1992; PURNELL *et al.*, 1994; KOGAN *et al.*, 1995; PULLEN Y FRIESEN, 1995b).

Los estudios de unión DNA-proteínas (retardo de la movilidad electroforética) y de mutagénesis dirigida (niveles de transcripción o expresión transitoria, o baculovirus recombinantes) han permitido identificar algunas secuencias consenso. Las secuencias GATA (T/A GATA A/G) y CACGTG son reconocidas por grandes familias de factores de transcripción eucarióticos, (los factores de unión a secuencias GATA, o *GATA binding proteins*, y las proteínas B-HLH-Zip; GIACCA *et al.*, 1992; ORKIN *et al.*, 1992). Su presencia en los baculovirus responde, probablemente, a una estrategia para garantizar la expresión de los genes tempranos en un espectro de huéspedes amplio (KOGAN Y BLISSARD, 1994; KOGAN *et al.*, 1995; PULLEN Y FRIESEN, 1995b).

Hasta el momento se han identificado en AcMNPV cuatro productos génicos virales que regulan la expresión temprana por transactivación de la transcripción: IE0, IE1, IE2 (antiguamente llamada IEN) y PE38/P34, que son los productos de los genes 141, 147, 151 y 153 de AcMNPV (AYRES *et al.*, 1994).

Los experimentos *in vitro* muestran que IE1 de AcMNPV se une a las secuencias conocidas como regiones homólogas (*hr*, *homologous regions*), que contienen palíndromos imperfectos de unos 28 pares de bases repetidos y separados entre sí por 50-115 pares de bases (Figura 3). Algunos estudios mostraron que los elementos *hr* funcionan como *enhancers* transcripcionales y como orígenes de replicación *in vitro* (ver Capítulo 3).

Si bien la transcripción de los genes tempranos de baculovirus ocurre en el núcleo de la célula huésped mediante la participación de la RNA polimerasa II, el proceso de *splicing* (procesamiento del pre-mRNA para producir el mRNA maduro, eliminando los intrones) no es frecuente para los mRNAs de baculovirus. Solamente en el producto de transcripción del gen *ie0* se identificó el procesa-

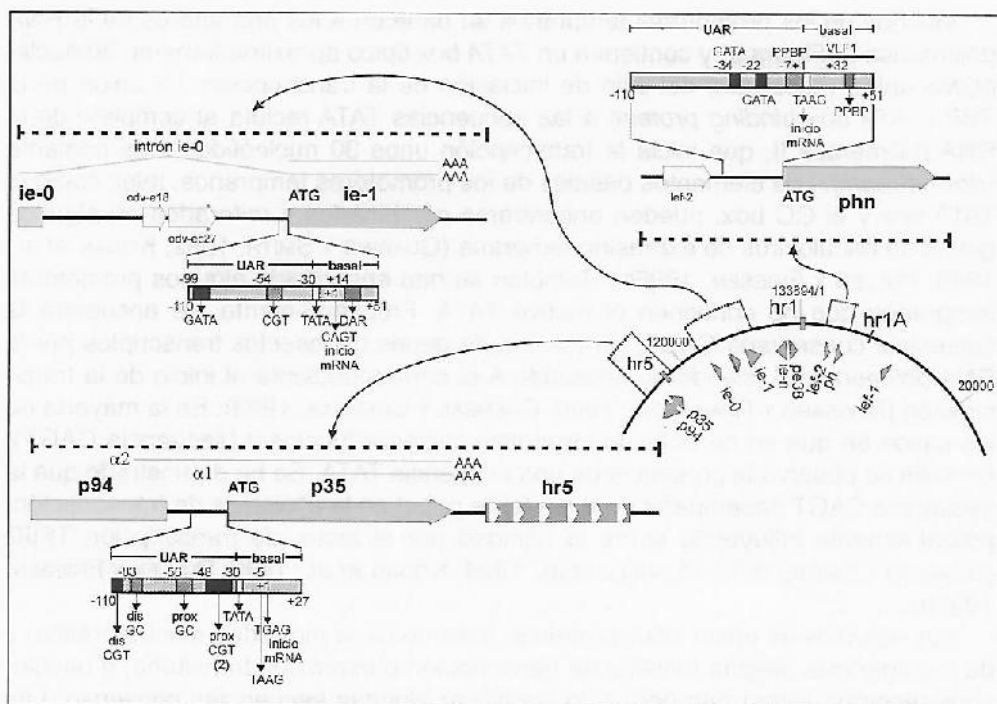


Figura 2. Organización de los elementos regulatorios de la transcripción en promotores tempranos y muy tardíos. En los promotores de baculovirus se pueden diferenciar dos regiones asociadas con la regulación de la transcripción. Una región con elementos regulatorios que hacen a la transcripción basal (*core promoter*) y una región con elementos regulatorios adicionales llamada UAR (*upstream activating region*). Muchos de los promotores de genes de transcripción temprana se parecen a los promotores de la RNA polimerasa II eucariótica y son transcritos por ésta.

La transcripción de los genes tempranos inmediatos (*immediate early*) tales como *ie-1* no requiere proteínas virales adicionales y son suficientes los elementos presentes en la región basal y UAR para asegurar la transcripción en los niveles necesarios. La región basal del promotor de *ie-1* contiene un *TATA box* típico (unión de TBP, *TATA box binding protein*), un INR (*initiator*) con la secuencia CAGT (donde la A es el nucleótido +1 en el producto de transcripción) importante para la interacción con el factor de transcripción TFIID y una zona llamada DAR (*downstream activating region*), cuya secuencia responde al consenso (A/T)CACNG, asociada con la estabilización de la interacción del complejo transcripcional con la zona INR. La región UAR del promotor de *ie-1* contiene un elemento GATA (T/A GATA A/G) y un elemento CGT (CACGTG), los cuales son reconocidos por grandes familias de factores de transcripción eucarióticos, (los factores GATA y las proteínas B-HLH-Zip).

En el caso de los genes tempranos retrasados (*delayed-early*), la transcripción se realiza a niveles basales en ausencia de factores virales y requiere de la unión del transactivador IE-1 a los *enhancers* para llegar a los niveles de expresión máximos. La región basal del promotor de *p35* contiene un *TATA box* típico y un INR con la secuencia TGAG (donde la primer G es el +1 de transcripción). Antes del INR temprano presenta, además, un elemento INR correspondiente a promotores tardíos y muy tardíos (TAAG, donde la primer A es el +1 de transcripción), que asegura la continuidad de la expresión de P35 durante el ciclo viral.

La región **UAR** del promotor de *p35* carece de elementos GATA y presenta tres elementos CGT y dos elementos GC (*GC box*) típicos, los cuales son reconocidos por factores de transcripción del hospedador.

Por otra parte, salvo raras excepciones, la transcripción de los genes tardíos y muy tardíos se inicia en la primera A de la secuencia conservada TAAG, que constituye el límite de la región basal. En los promotores tardíos sólo los 6-8 nucleótidos adyacentes al elemento central TAAG parecen ser responsables del nivel transcripcional adecuado, mientras que en los promotores muy tardíos, las secuencias ricas en AT inmediatamente *downstream* del sitio de iniciación de la transcripción parecen influir también en la eficiencia de la actividad del promotor. En los promotores muy tardíos, como el de policodrina (*polh* o *phn*), el nivel de expresión depende de la naturaleza de la secuencia nucleotídica situada entre el sitio de iniciación de la transcripción y el codón de iniciación de la traducción. Esta secuencia *leader* no traducida de los mRNAs es requerida para la hiperexpresión, y se la conoce con el nombre de "*burst sequence*" (responsable de la expresión explosiva de los genes muy tardíos). En la *burst sequence* se encuentran elementos de unión tanto a factores virales (VLF-1) como celulares (PPBP, *polyhedrin promoter binding protein*); existen evidencias experimentales de la importancia de ambos tipos de factores para la hiperexpresión del gen *phn* (YANG Y MILLER, 1999; GHOSH *et al.*, 1998). En la región UAR del gen *phn* se encuentran dos elementos GATA típicos y un elemento PPBP adicional, los cuales interactúan con un factor celular no identificado de aproximadamente 200 kDa. Es de destacar que la ausencia de estos elementos no afecta significativamente los niveles de transcripción de *phn*.

miento (*splicing*) de un intrón, responsable de la producción de un mRNA que se traduce a una proteína que contiene 54 aminoácidos adicionales en el extremo N de la secuencia de IE1 (CHISHOLM Y HENNER, 1988; KOVACS *et al.*, 1991a).

2.2. Transición de la fase temprana a la tardía (replicación del DNA)

Las proteínas responsables de la replicación del genoma viral se expresan en la etapa temprana de la infección. En células de *Spodoptera frugiperda* infectadas con AcMNPV la replicación del DNA se detecta 6 hs postinfección y continúa hasta alrededor de las 18 hs postinfección, declinando luego (TJIA *et al.*, 1979).

Se han identificado elementos de secuencia nucleotídica que son requeridos en *cis* para una replicación eficiente de plásmidos en cultivos de células infectados por baculovirus. Esta capacidad de replicación sugiere que las secuencias virales contenidas en los plásmidos tienen una función de origen de replicación del DNA viral. Se trata de las regiones homólogas citadas anteriormente que contienen palíndromos imperfectos (*hrs*) y otro tipo de secuencias no repetidas en el genoma denominadas *non-hrs* (KOOL *et al.*, 1995). Los *hrs* contienen grupos de 1 a 8 secuencias palindrómicas de unas 28 pb repetidas en forma dispersa en el genoma (Figura 3; COCHRAN Y FAULKNER, 1983) y también funcionan como *enhancers* (GUARINO Y SUMMERS, 1986). Las regiones *non-hrs* son de estructura más compleja: contienen regiones ricas en AT, repeticiones directas y palíndromos no relacionados con las *hrs* (PEARSON *et al.*, 1993; KOOL *et al.*, 1994a; HELDENS *et al.*, 1997).

La replicación del DNA parece ser un prerequisite para el comienzo de la expresión de genes tardíos de los baculovirus. Esto se apoya en la evidencia de que la

inhibición de la replicación del DNA por afidicolina también bloquea la transcripción este grupo de genes (MILLER *et al.*, 1981; RICE Y MILLER, 1986).

A diferencia de los genes de expresión temprana, los genes tardíos y muy tardíos son transcritos por una RNA polimerasa codificada por el virus y resistente a la α -amanitina (GRULA *et al.*, 1981; YANG *et al.*, 1991; GLOCKER *et al.*, 1993; XU *et al.*, 1995).

En experimentos de expresión transitoria se ha identificado una serie de diecinueve productos génicos necesarios para la transcripción de genes tardíos de AcMNPV. De estos productos génicos denominados factores de expresión tardíos (LEF, *late expression factors*) una parte está relacionada con la replicación del DNA viral, mientras que el resto parece afectar la transcripción de los genes tardíos de una manera más directa (KOOL *et al.*, 1994b; TODD *et al.*, 1995; LU Y MILLER, 1995; RAPP *et al.*, 1998).

Los genes *ie-1* (transactivación de genes tempranos), *ie-2* (transactivación de genes tempranos y bloqueo del ciclo celular), *lef-1* (posiblemente DNA primasa?), *lef-2*, *lef-3*, *p143* (*dnahel*, helicasa), *dnapol* (DNA polimerasa), *p35* (inhibidor de caspasa), *pe38* y *lef-7* son requeridos para una replicación óptima de plásmidos dependientes de *hr* en células *Sf-21*. Algunos de estos productos génicos no son esenciales en diferentes líneas celulares (KOOL *et al.*, 1993; KOOL *et al.*, 1994b; LU Y MILLER, 1995; RAPP *et al.*, 1998). La DNA polimerasa viral ha sido purificada y estudiada a nivel bioquímico (HANG Y GUARINO, 1999; McDOUGAL Y GUARINO, 1999).

Por otra parte, más recientemente se han identificado genes adicionales que influyen sobre la expresión de genes tardíos (LI *et al.*, 1999). El requerimiento de todos estos genes surge de experimentos de replicación transitoria, pero su delección en el genoma de *Bombyx mori* NPV nos da indicaciones adicionales sobre su importancia *in vivo* (GOMI *et al.*, 1997). En esos experimentos se determinó que los genes *39K*, *ie-2*, *lef-7* y *p35* no son esenciales para la replicación viral, aunque estas conclusiones son estrictamente válidas para el sistema particular de interacción virus-huésped. Así, la infección con BmNPV no induce un efecto de apoptosis notable en las células infectadas, y por tanto el inhibidor de apoptosis *p35* no es esencial para la replicación viral.

Las subunidades de la RNA polimerasa viral, resistente a la α -amanitina, se encuentran codificadas por cuatro genes virales (*lef-8*, *lef-4*, *lef-9* y *p47*) que son esenciales para la transcripción de los genes tardíos y muy tardíos (GUARINO *et al.*, 1998a y 1998b).

Salvo raras excepciones, la transcripción de genes tardíos y muy tardíos se inicia en la primer A de la secuencia conservada TAAG (sitio de iniciación transcripcional, llamado "caja de Rohrmann"). Esta secuencia se encuentra generalmente precedida por una A y menos frecuentemente, por una T o G. La presencia de estos últimos nucleótidos está asociada a promotores menos fuertes que los que contienen la secuencia ATAAG. El análisis del promotor tardío del gen de la proteína de la cápside *vp39* mediante mutagénesis demostró que sólo los 6-8 nucleótidos adyacentes al elemento central TAAG son responsables de su nivel de actividad transcripcional (MORRIS Y MILLER, 1994). En esta etapa también se expresa el gen *vlf-1*

cuyo promotor también posee un motivo TAAG. El producto de este gen ejerce, a su vez, un papel regulatorio positivo sobre algunos de los promotores muy tardíos (ver sección 2.4.)

En la etapa tardía de la infección, simultáneamente con la replicación del DNA viral se observa una disminución en la síntesis de los mRNAs celulares (Ooi y MILLER, 1988). Asimismo, en células Sf-21 infectadas con AcMNPV se ha demostrado una disminución de la síntesis de proteínas celulares a partir de las 6 horas post-infección y la detención completa de la traducción de las mismas a las 24 horas del inicio de la infección (CARSTENS *et al.*, 1979; WOOD, 1980).

2.3. Ensamblaje de viriones

Con la síntesis de los productos génicos tardíos comienza la etapa de ensamblaje de nucleocápsides en el núcleo de la célula infectada. Los estudios de microscopía electrónica muestran el ensamblaje de nucleocápsides vacías asociadas a un "estroma virogénico" denso a los electrones (FRASER, 1986; YOUNG *et al.*, 1993). La actina nuclear y la proteína de la nucleocápside aparecen co-localizadas en estudios de inmunofluorescencia, sugiriendo que la actina puede desempeñar algún papel en el ensamblaje de las cápsides (CHARLTON y VOLKMAN, 1991). En relación a esto, puede teorizarse que los procesos de ensamblaje y ubicación intracelular de las nucleocápsides siguen mecanismos similares a los estudiados en la etapa de desensamblaje. En este sentido, se ha demostrado que algunos inhibidores de la polimerización de actina también inhiben la infección (CHARLTON y VOLKMAN, 1991, 1993a y 1993b). Los cambios notables observados en la distribución de los microfilamentos de actina del citoesqueleto han sido atribuidos a la expresión temprana del gen *arif-1* de AcMNPV (RONCARATI y KNEBEL-MÖRSDORF, 1997).

Las cápsides aparecen frecuentemente asociadas por uno de sus extremos con el estroma virogénico y se especula que son llenados luego con el DNA. En este sentido, el empaquetamiento del DNA podría estar relacionado con la defosforilación de la proteína básica P6,9 (WILSON *et al.*, 1987; RUSSEL y ROHRMANN, 1990; FUNK y CONSIGLI, 1993). Al menos nueve proteínas constituyen la cápside, aunque el polipéptido mayoritario es VP39 (THIEM y MILLER, 1989; BJORNSEN y ROHRMANN, 1992).

No se sabe nada sobre el mecanismo que define si una nucleocápside migra hacia la membrana plasmática para generar BV o si permanece en el núcleo para adquirir una envoltura y formar un cuerpo de inclusión (OB, *occlusion body*; o OV, *occluded virus*).

2.4. Fase muy tardía (producción de cuerpos de inclusión)

La fase muy tardía de la infección se caracteriza por la reducción o cesación de la transcripción de muchos de los genes tardíos y por la expresión en proporciones muy elevadas de genes tales como poliedrina (*polh*), que forma los cuerpos de

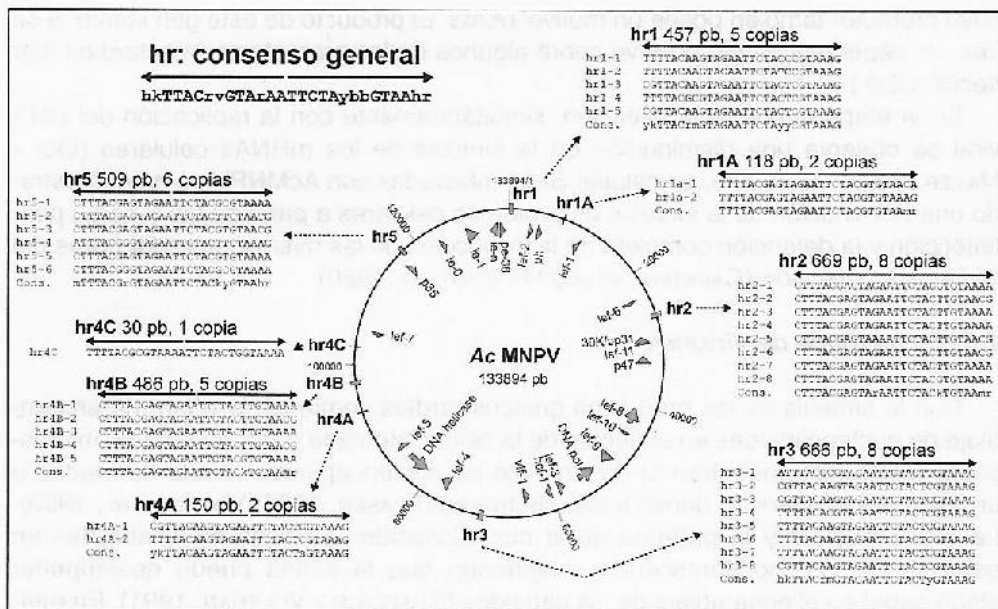


Figura 3. Ubicación genómica y estructura de los *hrs* (*homologous regions*) de AcMNPV. Los genomas de baculovirus contienen múltiples copias de secuencias repetitivas muy conservadas, que funcionan como *enhancers* transcripcionales y, en algunos casos, como orígenes de replicación. En el genoma de AcMNPV se han identificado ocho *hrs*, llamados *hr1*, *hr1A*, *hr2*, *hr3*, *hr4A*, *hr4B*, *hr4C* y *hr5*, cuyas posiciones y secuencias se indican en la figura. Los diferentes *hrs* presentan un número variable (1 a 8) de secuencias de 28 pb que constituyen palíndromos imperfectos (llamados 28-*mer*, y divididos en 28 hs^L y 28 hs^R), en la mayor parte de los cuales el hexanucleótido central corresponde al sitio de reconocimiento para la endonucleasa *EcoRI*. Una característica distintiva de estos palíndromos imperfectos es la gran conservación de secuencia que se observa cuando se comparan tanto los palíndromos de un mismo *hr* como los palíndromos de todos los *hrs*. La organización palindrómica de los 28-*mers* está asociada con su naturaleza de *enhancers* independientes de orientación y posición, y sirve para la unión de dímeros de transreguladores virales como IE-1. Por otra parte, aún cuando un 28-*mer* independiente posee actividad de *enhancer*, los niveles de transcripción alcanzados son sensiblemente menores a los que se logran con la *hr* respectiva completa, esto puede deberse a la estructura modular de los *hrs*. Además de los 28-*mers*, en los *hrs* existen repeticiones directas perfectas de diferente longitud, características de un único *hr* (por ejemplo.: un 24-*mer* presente dos veces en *hr1*, AGTTCGGTTATGAGCCGTGTGCAA) o comunes a varios *hrs* (por ejemplo: un 18-*mer* presente tres veces en *hr2*, una vez en *hr4B* y dos veces en *hr5*, GATGATGTCATTTGTTT). Códigos de ambigüedad utilizados: R=A,G; Y=C,T; M=A,C; K=G,T; S=C,G; W=A,T; H=A,C,T; B=C,G,T; V=A,C,G; D=A,G,T; N=A,C,G,T.

En el mapa de AcMNPV se indica, además, la posición de la mayor parte de los genes virales cuyos productos están asociados con la regulación de los procesos de transcripción/replicación.

inclusión y de *p10*, cuyo producto, la proteína P10, interviene en el proceso de liberación de los OB (KUZIO *et al.*, 1984; ZUIDEMA *et al.*, 1993; VAN-OERS *et al.*, 1994). Asimismo, algunas otras proteínas parecen ser necesarias para la formación eficiente de los OB (FAULKNER *et al.*, 1997; BRAUNAGEL *et al.*, 1999).

En los promotores muy tardíos, a diferencia de los tardíos como el de *vp39*, el nivel de expresión no depende solamente del contexto inmediato en que se encuentra el elemento TAAG, sino también de la naturaleza de la secuencia nucleotídica situada entre el sitio de iniciación de la transcripción y el codón de iniciación de la traducción, que recibe el nombre de secuencia líder. En los promotores muy tardíos, las secuencias líder son ricas en AT e influyen también en la eficiencia de la actividad del promotor (RANKIN *et al.*, 1988; ROHRMANN, 1986; WEYER Y POSSEE, 1989; LUCKOW Y SUMMERS, 1989; OOI *et al.*, 1989). Las mutaciones en la misma reducen la expresión de *polh* en 10-20 veces, mientras que las mutaciones situadas en la región inmediatamente en 5' (*upstream*) del elemento TAAG del promotor sólo resultan en efectos moderados (POSSEE Y HOWARD, 1987; RANKIN *et al.*, 1988; OOI *et al.*, 1989). Por ello, esta región de los promotores muy tardíos se conoce por el nombre de *burst sequence* (expresión explosiva de los genes muy tardíos).

Un factor de transcripción necesario para la "expresión explosiva" de los genes muy tardíos (*vlf-1*; *very late expression factor 1*) fue identificado por rescate de un mutante termosensible incapaz de producir OB a la temperatura no permisiva. Este fenotipo resultaba en una marcada disminución en el nivel de transcripción del gen de *polh* y, en menor medida, del gen *p10* (McLACHLIN Y MILLER, 1994). El efecto de *vlf-1* sobre la transcripción de los genes *polh* y *p10* fue confirmado por experimentos de expresión transitoria (YANG Y MILLER, 1998). Por otra parte, Chaabihi *et al.* (1993) describieron la dependencia de los niveles de expresión de estos dos genes, que sugiere la existencia de factores de transcripción adicionales. Así, la delección del promotor de *p10* conlleva un incremento en el nivel de transcripción de *polh*, mientras que la delección del promotor de *polh* no tiene efecto sobre el nivel transcripcional de *p10*.

Utilizando experimentos de mutagénesis dirigida, análisis de retardo de movilidad electroforética y de protección a DNasa I, Yang y Miller (1999) demostraron que la interacción de VLF-1 con la *burst sequence* constituye una de las bases bioquímicas de la transactivación de la transcripción de los genes muy tardíos. Además, VLF-1 posee motivos de secuencia aminoacídica conservados en proteínas con actividad integrasa-resolvasa, cuya mutación conduce a virus inviables, sugiriendo que se trata de una función separada de la transactivación transcripcional pero esencial para la replicación viral (McLACHLIN Y MILLER, 1994; Yang y Miller, 1998). Por otra parte, la región que incluye la *burst sequence* interactúa con proteínas de la célula huésped, algunas de las cuales parecen ser esenciales para asegurar los altos niveles de expresión de los genes muy tardíos (OOI *et al.*, 1989; BURMA *et al.*, 1994; JAIN Y HASNAIN, 1996; GHOSH *et al.*, 1998).

La proteína de inclusión se asocia y cristaliza alrededor de los viriones envueltos en el núcleo. Este proceso se completa con la envoltura de los OB compuesta por, al menos, una glicoproteína (*polyhedral envelope protein* PEP o PP34; WHITT

Y MANNING, 1988; GOMBART *et al.*, 1989; ROHRMANN, 1992). Asimismo, la maduración y liberación de los OB requiere de P10, que forma estructuras fibrilares en el núcleo y en el citosol. La delección del gen *p10* conduce al agregado defectuoso de la envoltura de los cuerpos de inclusión, producción de poliedros frágiles, bloqueo de la desintegración del núcleo y lisis celular deficiente, que interfiere con la liberación eficiente de poliedros al medio extracelular (VAN-OERS *et al.*, 1994).

3. Interacciones moleculares virus-huésped a nivel celular

Aunque no se conocen en detalle las respuestas celulares a la infección por baculovirus, un mecanismo general que interviene tanto en la eliminación de células infectadas o dañadas como en la proliferación de tejidos consiste en la "muerte celular programada" o apoptosis. Este proceso se caracteriza por la disminución del tamaño de las células (*shrinkage*) de las células, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear, la degradación del DNA cromosómico para dar fragmentos de longitud oligonucleosómica, un profuso desgarro de la membrana plasmática y el desprendimiento de vesículas hacia el medio (*blebbing*). Después de la infección viral muchos tipos de células son capaces de inducir una cascada de eventos moleculares que conducen a la apoptosis como medida de defensa del organismo (VAUX Y STRASSER, 1996; CLEM, 1997).

Como una respuesta evolutiva para contrarrestar este mecanismo de defensa de la célula, muchos virus poseen genes que codifican para inhibidores de la apoptosis. La inducción de la apoptosis en células de insecto infectadas por baculovirus se observó por primera vez en células Sf21 infectadas con un AcMNPV que carecía del gen *p35* funcional (CLEM *et al.*, 1991). Numerosos estudios demostraron que el producto del gen *p35* es capaz de inhibir la apoptosis en muchos tipos de células, incluso de mamíferos; sin embargo, el inhibidor de apoptosis de mamíferos *bcl-2* no es capaz de complementar la falta de P35 en los sistemas de baculovirus y células de insecto.

En otros baculovirus se identificaron productos de genes capaces de complementar funcionalmente la falta de P35 en mutantes de AcMNPV que se denominaron IAP (*inhibitor of apoptosis*) (CROOK *et al.*, 1993; BIRNBAUM *et al.*, 1994). Estos polipéptidos no presentan una homología de secuencia con P35; sin embargo, pueden considerarse homólogos funcionales de éste en el sentido amplio (aunque bloquean la apoptosis en etapas diferentes; LACOUNT *et al.*, 2000). En AcMNPV se encontraron dos genes, *iap-1* e *iap-2*, con alta homología de secuencia con los *iap* de CpGV y OpMNPV, aunque no pueden sustituir funcionalmente a *p35* (CROOK *et al.*, 1993; AYRES *et al.*, 1994; GRIFFITHS *et al.*, 1999). Sin embargo, los IAP de CpGV y OpMNPV presentan una homología significativa con un inhibidor de la apoptosis neuronal (NIAP, ROY *et al.*, 1995).

Los inhibidores de apoptosis de los baculovirus tienen la obvia misión de proveer un medio intracelular propicio para evitar el aborto de la infección y facilitar así la producción de una progenie abundante. Muy probablemente, los genes con

homología a *p35* o *iap* son el resultado de la adquisición por intercambio de información genética con huéspedes diferentes a lo largo de la evolución o de la duplicación de un gen ancestral similar a *iap* y su posterior evolución divergente, dando genes funcionales o no. De hecho *P35* es funcional en las células de *Spodoptera frugiperda*, en las que AcMNPV replica perfectamente, pero no es suficiente para bloquear la apoptosis en *Spodoptera littoralis*, dando una progenie muy disminuida (CHEJANOVSKY Y GERSHBURG, 1995; GRIFFITHS *et al.*, 1999). Sin embargo, la delección del gen *p35* no afecta la replicación normal de AcMNPV en una serie de huéspedes como *Trichoplusia ni*, *Mamestra brassicae* y *Panolis flammea*. Asimismo, se han documentado casos de líneas celulares semipermissivas, en las cuales el producto del gen *p35* solo no es suficiente para inhibir totalmente la apoptosis. Estos resultados, junto con el concepto de que los diferentes IAPs actúan bloqueando diferentes etapas del mecanismo de apoptosis en diferentes organismos, sugieren que los genes *iap* son uno de los componentes genéticos que definen el rango de huéspedes de los baculovirus (CHEJANOVSKY Y GERSHBURG, 1995; CLEM *et al.*, 1996; GRIFFITHS *et al.*, 1999). Se ha hipotetizado que AcMNPV posee un rango muy amplio de huéspedes precisamente por poseer un gen antiapoptótico *p35* y genes de la familia *iap*, comparado con los NPVs que poseen sólo uno u otro tipo de inhibidores de apoptosis.

En el genoma de los baculovirus existe una serie de genes que codifican para polipéptidos con gran homología con proteínas eucarióticas conocidas; sin embargo, existen muchos interrogantes sobre la posible función y los resultados de la delección de algunos de ellos sugieren que no se trata de genes esenciales para el desarrollo y capacidad infectiva del virus (O'REILLY, 1997).

4. Interacciones moleculares virus-huésped a nivel larva

Además de productos génicos que interactúan con componentes celulares, los baculovirus codifican una serie de productos que funcionan a nivel de organismo y, de esta manera, alteran o manipulan la fisiología y estructura del animal infectado.

Uno de ellos, el producto del gen *egt* (*ecdysteroid UDP-glucosyltransferase*) extiende la duración del estado larval al inactivar los ecdisteroides del huésped, que actúan como hormonas que regulan la muda del insecto (O'REILLY Y MILLER, 1989; O'REILLY Y MILLER, 1990; O'REILLY *et al.*, 1992). Las células infectadas secretan la EGT codificada por el virus a la hemolinfa, donde esta enzima cataliza la transferencia de glucosa y/o galactosa a la ecdisona produciendo un conjugado inactivo de la hormona. De esta manera, la EGT viral impide la acumulación de ecdisona activa a niveles suficientes para inducir la muda hacia el estadio siguiente.

Las células infectadas producen OBs en las etapas muy tardías de la infección y las larvas infectadas se convierten en una masa amorfa repleta de OB encerrada en la cutícula en el momento de la muerte. Poco tiempo después, el insecto infectado se licúa produciendo un inóculo fresco para infectar otros huéspedes (VOLKMAN Y KEDDIE, 1990). Los productos de los genes virales *chiA* (*chitinase A*, qui-

tinasa) y *cath* (*cathepsin*, catepsina) proveen las actividades enzimáticas necesarias para la liberación de la progenie de los OBs a partir de los cadáveres de las larvas infectadas y, de esta manera, facilitan la propagación del virus a nivel de poblaciones de insectos (HAWTIN *et al.*, 1997). La delección del gen *chiA* en AcMNPV no causó efectos notorios sobre los parámetros de la infección DL_{50} (dosis letal 50%) y TL_{50} (tiempo letal 50%) en *Trichoplusia ni* (HAWTIN *et al.*, 1997).

Los *enhancins* o *viral enhancing factors* (*vef*) son un grupo de proteínas que se encuentran en los cuerpos de inclusión de ciertos baculovirus y son capaces de incrementar significativamente la eficacia de la infección viral en los insectos (ver review CORSARO *et al.*, 1993). Estudios sobre el VEF del virus de la granulosis de *Trichoplusia ni* (TnGV), indican que degrada proteínas de la membrana peritrófica del intestino medio y facilita el pasaje de virus desde el lumen del intestino medio a las células epiteliales del mismo (DERKSEN Y GRANADOS, 1988; WANG *et al.*, 1994; WANG Y GRANADOS, 1998). Los resultados más dramáticos se observaron en larvas de *T. ni* infectadas con AgMNPV en presencia de este mismo VEF, donde la eficiencia de infección fue 16 veces mayor y el TL_{50} (tiempo letal 50%) se redujo en 55 hrs. (CORSARO *et al.*, 1993). Más recientemente, también se identificaron por primera vez dos genes *vef* en el genoma del NPV de *Lymantria dispar* (BISCHOFF Y SLAVICEK, 1997; KUZIO *et al.*, 1999). La delección de ambos genes en el DNA de LdMNPV resulta en una disminución de 1000 veces de la DL_{50} mientras que la inactivación de uno solo de los genes *vef* no tiene efecto sobre el fenotipo (JIM SALVICK, comunicación personal).

5. Espectro de huéspedes

El espectro de huéspedes de un virus se debe a la especificidad de la interacción con el huésped en diferentes etapas de la infección (liberación de ODVs, entrada a las células de los ODVs y BVs, mecanismos de defensa celulares, expresión regulada de genes virales, etc.) y a las restricciones en distintos niveles (filum, especie, tejido).

Los baculovirus infectan sólo a artrópodos. Además, la mayoría de los baculovirus parecen replicarse en un número muy limitado de especies de insectos; sin embargo, algunos son capaces de infectar un amplio rango de especies, aunque la eficiencia puede variar ampliamente con la especie de insecto. Por otra parte, los virus pueden mostrar una especificidad a nivel de tejido, de manera que un baculovirus particular puede tener un tropismo tisular determinado, dependiendo del huésped. Para definir las bases moleculares de la especificidad del huésped es necesario caracterizar las limitaciones al proceso de infección. Probablemente, la matriz proteica que rodea a los virus no incide en la restricción de los huéspedes, pero seguramente impide el contacto con las células de los vertebrados. En el caso de las células de insectos, es más probable que los mecanismos moleculares que restringen el rango de huéspedes dependa de la interacción de productos génicos virales con componentes celulares. Para lograr una replicación completa, los bacu-

lovirus deben sortear o bloquear uno o más mecanismos de defensa celular y expresar sus genes esenciales (MILLER Y LU, 1997).

En general, los baculovirus son capaces de entrar en un amplio número de células diversas, pero no son capaces de llegar al núcleo de la mayoría de las células de vertebrados, con la notable excepción de los hepatocitos de mamíferos (HOFMANN *et al.*, 1995; BOYCE Y BUCHER, 1996). La expresión de genes virales en células de insectos no permisivos o semi-permisivos parece estar bloqueada en diferentes puntos. Generalmente, la expresión de genes tempranos, dependiente de la transcripción por la RNA polimerasa II, no se ve entorpecida, pero la expresión de los genes tardíos se ve disminuida o anulada. Se han encontrado varios genes que influyen sobre la capacidad de replicación de AcMNPV y otros baculovirus en ciertas líneas celulares: los inhibidores de apoptosis (*p35* y varios miembros de la familia *iap*), la helicasa (*dnahel* o *p143*), el factor determinante de la célula huésped 1 (*host cell factor 1*, *hcf-1*) y el factor de espectro de huéspedes 1 (*host range factor 1*, *hrf-1*) (LU Y CARSTENS, 1991; CLEM *et al.*, 1991; AYRES *et al.*, 1994).

El efecto de mutaciones en diferentes genes puede afectar el rango de huéspedes en forma indirecta al influir sobre la replicación del DNA viral o la expresión de genes tardíos o muy tardíos o impidiendo el bloqueo de la síntesis de proteínas de la célula huésped, etc. (CLEM Y MILLER, 1994; CLEM *et al.*, 1994; LU Y MILLER, 1995). En particular, la replicación del DNA puede requerir de la interacción de los productos virales con factores de la célula huésped. Estas interacciones pueden ser afectadas de manera diferencial en diferentes tipos celulares por mutaciones en los genes virales implicados, dando lugar a efectos especie-específicos o específicos de tipo celular.

La función de los genes antiapoptóticos se discutió brevemente más arriba y consiste en impedir el comienzo de una respuesta de defensa celular, que abortaría el desarrollo de la infección viral.

El producto del gen *hcf-1* de AcMNPV es necesario para la replicación del virus en un amplio espectro de líneas celulares y larvas. Su delección o mutación por inserción del gen *lacZ* en AcMNPVs (mutantes *hcf-1*⁻) conduce a una restricción del rango de huéspedes, de tal manera que el fenotipo viral parece indistinguible del virus silvestre (*wt* AcMNPV) en ciertos insectos y líneas celulares (permisivas), mientras en otros huéspedes se manifiesta el fenotipo mutante (LU Y MILLER, 1996). Otros factores, como *ie-2* y *lef-7*, que controlan la replicación del DNA viral y la expresión tardía, también han sido implicados en la restricción del rango de huéspedes (CHEN Y THIEM, 1997; MILLER Y LU, 1997).

Thiem y colaboradores (1996) identificaron el gen *hrf-1* en LdMNPV. La suplementación con este gen de AcMNPV le confiere la capacidad de replicarse en larvas y en líneas celulares de *Lymantria dispar*, normalmente no permisivas para el AcMNPV silvestre.

AcMNPV no es capaz de replicarse en *Bombyx mori* ni en células BmN o Bm5 (ARGAUD *et al.*, 1998) y BmNPV no se replica en células Sf21 más que a un nivel residual (MARTIN Y CROIZIER, 1997). Por cotransfección de células Sf21 con los DNAs de ambos virus se obtuvieron variantes de AcMNPV con inserciones de por-

ciones del DNA de BmNPV, capaces de replicarse en células BmN (KONDO Y MAEDA, 1991; MORI *et al.*, 1992). En estudios sucesivos se pudo atribuir la expansión del rango de huéspedes a la sustitución en el genoma de AcMNPV de una región de la DNA helicasa (*p143*) por la correspondiente a los aminoácidos 413-602 de la región homóloga de BmNPV, luego a los aminoácidos 550 a 576 (MAEDA *et al.*, 1993; CROIZIER *et al.*, 1994), siendo un solo cambio de aminoácido (KAMITA Y MAEDA, 1997) o dos (ARGAUD *et al.*, 1998) los responsables de la expansión del espectro de huéspedes.

El mecanismo molecular de este efecto no es del todo claro, pero se ha demostrado que la helicasa (una proteína que participa no solamente en la replicación del DNA) de AcMNPV ejerce un efecto tóxico para las células BmN, bloqueando la síntesis de proteínas (KAMITA Y MAEDA, 1993), aunque el efecto no es tan marcado con cepas de AcMNPV diferentes a las utilizadas en estos estudios. Estudios adicionales realizados seleccionando los recombinantes de AcMNPV capaces de replicar en larvas de *B. mori* han definido que los aminoácidos en posición 564 y 577 de la DNA helicasa son los responsables de matar a este insecto (ARGAUD *et al.*, 1998). Por lo tanto, el reemplazo de estos residuos de aminoácidos en la helicasa de AcMNPV amplía su espectro de huéspedes a *B. mori*.

Si bien estos resultados son extremadamente interesantes, los hallazgos de las investigaciones sobre los determinantes moleculares del rango de huéspedes no son directamente extrapolables a sistemas virus-huésped diferentes a los ensayados. La complejidad del problema limita por ahora los diseños racionales de modificaciones genéticas dirigidas a su aplicación como medio de control biológico de plagas.

6. Conclusiones y perspectivas

El limitado espectro de huéspedes capaces de mantener la replicación de los baculovirus es paradójicamente su principal ventaja (ecológica) y desventaja (económica) en el momento de decidir su aplicación al control de plagas. El conocimiento de los procesos de expresión regulada de grupos de genes y de las interacciones de los productos génicos virales con componentes celulares, como así también de la fisiología de los insectos, permitirá el diseño de estrategias para la modificación genética orientada al desarrollo de insecticidas biológicos que puedan competir con éxito con los productos químicos tóxicos de acción rápida.

7. Bibliografía

- ARGAUD, O., L. CROIZIER, M. LÓPEZ-FERBER Y G. CROIZIER. 1998. *Two key mutations in the host-range specificity domain of the p143 gene of Autographa californica nucleopolyhedrovirus are required to kill Bombyx mori larvae*. J. Gen. Virol. 79:931-935.

- AYRES, M.D., S.C. HOWARD, J. KUZIO, M. LÓPEZ-FERBER Y R.D. POSSEE. 1994. *The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. Virology **202**:586-605.
- BIRNBAUM, M.J., R.J. CLEM Y L.K. MILLER. 1994. *An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs*. J. Virol. **68**:2521-2528.
- BISCHOFF, D.S. Y J.M. SLAVICEK. 1997. *Molecular Analysis of an enhancin Gene in the Lymantria dispar Nuclear Polyhedrosis Virus*. J. Virol. **71**:8133-8140.
- BJORNSON, R.M. Y G.F. ROHRMANN. 1992. *Nucleotide sequence of the polyhedron envelope protein gene region of the Lymantria dispar nuclear polyhedrosis virus*. J. Gen. Virol. **73**:1499-1504.
- BLISSARD, G.W. Y G.F. ROHRMANN. 1990. *Baculovirus diversity and molecular biology*. Annu. Rev. Entomol. **35**:127-155.
- BOYCE, F.M. Y N.L.R. BUCHER. 1996. *Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**:2348-2352.
- BRAUNAGEL, S.C., J.K. BURKS, G. ROSAS-ACOSTA, R.L. HARRISON, H. MA Y M.D. SUMMERS. 1999. *Mutations within the Autographa californica nucleopolyhedrovirus FP25K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport*. J. Virol. **73**:8559-8570.
- BURAND, J.P., M.D. SUMMERS Y G. SMITH. 1980. *Transfection with baculovirus DNA*. Virology **101**:286-290.
- BURMA, S., B. MUKHERJEE, A. JAIN, S. HABIB Y S.E. HASNAIN. 1994. *An unusual 30-kDa protein binding to the polyhedrin gene promoter of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. J. Biol. Chem. **269**:2750-2757.
- CARSTENS, E.B., S.T. TJIA Y W. DOERFLER. 1979. *Infection of Spodoptera frugiperda cells with Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. I. Synthesis of intracellular proteins after virus infection*. Virology. **99**:386-398.
- CHAABIHI H., M.H. OGLIASTRO, M. MARTIN, C. GIRAUD, G. DEVAUCHELLE Y M. CERUTTI. 1993. *Competition between baculovirus polyhedrin and p10 gene expression during infection of insect cells*. J. Virol. **67**:2664-2671.
- CHARLTON, C.A. Y L.E. VOLKMAN. 1991. *Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected Spodoptera frugiperda cells*. J. Virol. **65**:1219-1227.
- CHARLTON, C.A. Y L.E. VOLKMAN. 1993a. *Penetration of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf-21 cells induces actin cable formation*. Virology. **197**:245-254.
- CHARLTON, C.A. Y L.E. VOLKMAN. 1993b. *Baculoviruses, vertebrate viruses and cytoskeletons*, p. 103-125. En: N.E. Beckage, S.N. Thompson y B.A. Federici (ed.), Parasites and Pathogens of Insects. Academic Press, New York.
- CHEJANOVSKY, N. Y E. GERSHBURG. 1995. *The wild type Autographa californica nuclear polyhedrosis virus induces apoptosis of Spodoptera littoralis cells*. Virology **209**:519-525.
- CHEN, C.J. Y S.M. THIEM. 1997. *Differential Infectivity of two Autographa californica nucleopolyhedrovirus mutants on three permissive cell lines is the result of lef-7 deletion*. Virology **227**:88-95.

- CHERBAS, L. Y P. CHERBAS. 1993. *The arthropod initiator: the cap-site consensus plays an important role in transcription*. Insect Biochem. Molec. Biol. **23**:81-90.
- CHISHOLM, G.E. Y D.J. HENNER. 1988. *Multiple early transcripts and splicing of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene*. J. Virol., **62**:3193-3200.
- CLEM, R.J., M. FECHHEIMER Y L.K. MILLER. 1991. *Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells*. Science. **254**:1388-1390.
- CLEM, R.J. Y L.K. MILLER. 1994. *Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap*. Mol. Cell. Biol. **14**:5212-5222.
- CLEM, R.J., M. ROBSON Y L.K. MILLER. 1994. *Influence of infection route on the infectivity of baculovirus mutants lacking the apoptosis-inhibiting gene p35 and adjacent gene p94*. J. Virol. **68**:6759-
- CLEM, R.J., J.M. HARDWICK Y L.K. MILLER. 1996. *Anti-apoptotic genes of baculoviruses*. Cell Death Diff. **3**:9-16.
- CLEM, R.J. 1997. *Regulation of programmed cell death and apoptosis*, p. 237-266. En: L.K. Miller (ed.), The Baculoviruses. Plenum Press, New York.
- COCHRAN, M.A. Y P. FAULKNER. 1983. *Localization of homologous DNA sequences interspersed at five regions in the baculovirus AcMNPV genome*. J. Virol. **45**:961-970.
- CORSARO, B.G., M. GIJZEN, P. WANG Y R.R. GRANADOS. 1993. *Baculovirus enhancing proteins as determinants of viral pathogenesis*. In: Parasites and Pathogens of insects **2**:127-145.
- CROIZIER, G., L. CROIZIER, O. ARGAUD Y D. POUDÉVIGNE. 1994. *Extension of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**:48-52.
- CROOK, N.E., R.J. CLEM Y L.K. MILLER. 1993. *An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif*. J. Virol. **67**:2168-2174.
- DERKSEN, A.C.G. Y R.R. GRANADOS. 1988. *Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculovirus and enhancement of viral infection*. Virology **167**:242-250.
- FAULKNER, P., J. KUZIO, G.V. WILLIAMST Y J.A. WILSON. 1997. *Analysis of p74, a PDV envelope protein of Autographa californica nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity in vivo*. J. Gen. Virol. **78**:3091-3100.
- FRASER, M.J. 1986. *Ultrastructural observations of virion maturation in Autographa californica nuclear polyhedrosis virus infected Spodoptera frugiperda cell cultures*. Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research **95**:189-195.
- FRIESEN, P.D. Y L.K. MILLER. 1986. *The Regulation of Baculovirus Gene Expression*, p. 31-49. En: W. Doerfler y P. Böhm (ed.), Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag, Berlin.
- FUNK, C.J. Y R.A. CONSIGLI. 1993. *Phosphate cycling on the basic protein of Plodia interpunctella granulosis virus*. Virology **193**:396-402.
- GHOSH, S., A. JAIN, B. MUKHERJEE, S. HABIB Y S.E. HASNAIN. 1998. *The host factor polyhedrin promoter binding protein PPBP is involved in transcription from the baculovirus polyhedrin gene promoter*. J. Virol. **72**:7484-1493.

- GIACCA, M., M.I. GUTIERREZ, S. MENZO, F.D. DI FAGAGNA Y A. FALASCHI. 1992. A human binding site for transcription factor USF/MLTF mimics the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **186**:133-147.
- GLOCKER, B., R.R. HOOPES JR., L. HODGES Y G.F. ROHRMANN. 1993. *In vitro* transcription from baculovirus late gene promoters: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts prepared from infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* **67**:3771-3776.
- GOMBART, A.F., M.N. PEARSON, G.F. ROHRMANN Y G.S. BEAUDREAU. 1989. A baculovirus polyhedral envelope-associated protein: Genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization. *Virology* **169**:182-193.
- GOMI, S., C. ECALE ZHOU, W. YIH, K. MAJIMA Y S. MAEDA. 1997. Deletion analysis of eighteen late gene expression gene homologues of the baculovirus BmNPV. *Virology* **230**:35-47.
- GRIFFITHS, C.M., A.L. BARNETT, M.D. AYRES, J. WINDASS, L.A. KING Y R.D. POSSEE. 1999. *In vitro* host range of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus recombinants lacking functional p35, iap1 or iap2. *J. Gen. Virol.* **80**:1055-1066.
- GRULA, M.A., P.L. BULLER Y R.F. WEAVER. 1981. -Amanitin-resistant viral RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus-infected *Heliothis zea* larvae and *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* **38**:916-921.
- GUARINO, L.A. Y M.D. SUMMERS. 1986. Interspersed homologous DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhances delayed early gene expression. *J. Virol.* **60**:215-223.
- GUARINO, L.A. Y W. DONG. 1991. Transient expression of an enhancer-binding protein in insect cells transfected with the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE1 gene. *J. Virol.* **65**:3676-3680.
- GUARINO, L.A. Y M. SMITH. 1992. Regulation of delayed-early gene transcription of dual TATA boxes. *J. Virol.* **66**:3722-3739.
- GUARINO, L.A., B. XU, J. JIN, Y W. DONG. 1998a. A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus - infected cells. *J. Virol.* **72**:7985-7991.
- GUARINO, L.A., J. JIN, Y W. DONG. 1998b. Guanylyltransferase activity of the LEF-4 subunit of baculovirus RNA polymerase. *J. Virol.* **72**:10003-10010.
- HANG, X. Y L.A. GUARINO. 1999. Purification of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus DNA polymerase from infected insect cells. *J. Gen. Virol.* **80**:2519-2526.
- HAWTIN, R.E., T. ZARKOWSKA, K. ARNOLD, C.J. THOMAS, G.W. GOODAY, L.A. KING, J.A. KUZIO Y R.D. POSSEE. 1997. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* **238**:243-253.
- HELDENS, J.G.M., R. BROER, D. ZUIDEMA, R.W. GOLDBACH Y J.M. VLAK. 1997. Identification and functional analysis of a non-hr origin of DNA replication in the genome of *Spodoptera exigua multicapsi* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* **78**:1497-1506.
- HOFMANN, C., V. SANDIG, G. JENNINS, M. RUDOLPH, P. SCHLAG Y M. STRAUSS. 1995. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:10099-10106.

- HOOPES, R.R. Y G.F. ROHRMANN. 1991. *In vitro* transcription of baculovirus immediate early genes: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:4513-4517.
- JAIN, A. Y S.E. HASNAIN. 1996. A 30-kDa host protein binds to two very late baculovirus promoters. *Eur. J. Biochem.* **239**:384-390.
- KAMITA, S.G. Y S. MAEDA. 1993. Inhibition of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus replication by the putative DNA helicase gene of *Autographa californica* NPV. *J. Virol.* **67**:6239-6247.
- KAMITA, S.G. Y S. MAEDA. 1997. Sequencing of the putative DNA helicase-encoding gene of the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and fine-mapping of a region involved in host range expansion. *Gene* **190**:173-179.
- KOGAN, P.H. Y G.W. BLISSARD. 1994. A baculovirus gp64 early promoter is activated by host transcription factor binding to CACGTG and GATA elements. *J. Virol.* **68**:813-822.
- KOGAN, P.H., X. CHEN Y G.W. BLISSARD. 1995. Overlapping TATA-dependent and TATA-independent early promoter activities in the baculovirus gp64 envelope fusion protein gene. *J. Virol.* **69**:1452-1461.
- KONDO, A. Y S. MAEDA. 1991. Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **65**:3625-3632.
- KOOL, M., P.M.M.M. VAN DEN BERG, J. TRAMPER, R.W. GOLDBACH Y J.M. VLAK. 1993a. Location of two putative origins of DNA replication of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **192**:94-101.
- KOOL, M., R.W. GOLDBACH Y J.M. VLAK. 1994a. A putative non-hr origin of DNA replication in the HindIII-K fragment of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **75**:3345-3352.
- KOOL, M., C.H. AHRENS, R.W. GOLDBACH, G.F. ROHRMANN Y J.M. VLAK. 1994b. Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:11212-11216.
- KOOL, M., C.H. AHRENS, J.M. VLAK Y G.F. ROHRMANN. 1995. Replication of baculovirus DNA. *J. Gen. Virol.* **76**:2103-2118.
- KOVACS, G.R., L.A. GUARINO, B.L. GRAHAM Y M.D. SUMMERS. 1991a. Identification of spliced baculovirus RNAs expressed late in infection. *Virology* **185**:633-643.
- KUZIO, J., M.N. PEARSON, S.H. HARWOOD, C.J. FUNK, J.T. EVANS, J.M. SLAVICEK Y G.F. ROHRMANN. 1999. Sequence analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology* **253**:17-34.
- KUZIO, J., D.Z. ROHEL, C.J. CURRY, A. KREBS, E.B. CARSTENS Y P. FAULKNER. 1984. Nucleotide sequence of the p10 polypeptide gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **139**:414-418.
- LACOUNT, D.J., S.F. HANSON, C.L. SCHNEIDER Y P.D. FRIESEN. 2000. Caspase inhibitor P35 and inhibitor of apoptosis Op-IAP block *in vivo* proteolytic activation of an effector caspase at different steps. *J. Biol. Chem.* **275**:15657-15664.
- LI, L., S.H. HARWOOD Y G.F. ROHRMANN. 1999. Identification of additional genes that influence baculovirus late gene expression. *Virology* **255**:9-19.

- LU, A. Y E.B. CARSTENS. 1991. *Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. *Virology* **181**:336-347.
- LU, A. Y L.K. MILLER. 1995. *Differential requirements for baculovirus late expression factor genes in two cell lines*. *J. Virol.* **69**:6265-6272.
- LU, A. Y L.K. MILLER. 1996. *Species-specific effects of the hcf-1 gene on baculovirus virulence*. *J. Virol.* **70**:5123-5130.
- LU, A. Y L.K. MILLER. 1997. *Generation of recombinant baculoviruses by direct cloning*. *BioTechniques* **21**:63-67.
- LUCKOW, V.A. Y M.D. SUMMERS. 1989. *High level expression of nonfused foreign genes with Autographa californica nuclear polyhedrosis virus expression vectors*. *Virology* **170**:31-39.
- MAEDA, S., S.G. KAMITA Y A. KONDO. 1993. *Host range expansion of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus NPV following recombination of a 0.6-kilobase-pair DNA fragment originating from Bombyx mori NPV*. *J. Virol.* **67**:6234-6238.
- MARTÍN, O. Y G. CROIZIER. 1997. *Infection of a Spodoptera frugiperda cell line with Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. *Virus Res.* **47**:179-85.
- MCDUGALL, V.V. Y L.A. GUARINO. L.A. 1999. *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase: measurements of processivity and strand displacement*. *J. Virol.* **73**:4908-4918.
- MCLACHLIN, J.R. Y L.K. MILLER. 1994. *Identification and characterization of vlf-1, a baculovirus gene involved in very late gene expression*. *J. Virol.* **68**:7746-7756.
- MILLER, L.K., J.E. JEWELL Y D. BROWNE. 1981. *Baculovirus induction of a DNA polymerase*. *J. Virol.* **40**:305-308.
- MILLER, L. K Y A. LU. 1997. *The molecular basis of baculovirus host range*, p. 217-235. *En*: L.K. Miller (ed.), *The Baculoviruses*. Plenum Press, New York.
- MORRIS, T.D. Y L.K. MILLER. 1994. *Mutational analysis of a baculovirus major late promoter*. *Gene*. **140**:147-153.
- O'REILLY, D.R. Y L.K. MILLER. 1989. *A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase*. *Science*. **245**:1110-1112.
- O'REILLY, D.R. Y L.K. MILLER. 1990. *Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDP glucosyl transferase gene*. *J. Virol.* **64**:1321-1324.
- O'REILLY, D.R., M.R. BROWN Y L.K. MILLER. 1992. *Alteration of ecdysteroid metabolism due to baculovirus infection of the fall armyworm Spodoptera frugiperda: Host ecdysteroids are conjugated with galactose*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **22**:313-317.
- O'REILLY, D.R. 1997. *Auxiliary genes of baculoviruses*, p. 267-300. *En*: L.K. Miller (ed.), *The Baculoviruses*. Plenum Press, New York.
- OI, B.G. Y L.K. MILLER. 1988. *Regulation of host RNA levels during baculovirus infection*. *Virology* **166**:515-523.
- OI, B.G., C. RANKIN Y L.K. MILLER. 1989. *Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene*. *J. Mol. Biol.* **210**:721-736.

- Ooi, B.G. y L.K. MILLER. 1990. *Transcription of the baculovirus polyhedrin gene reduces the levels of an antisense transcripts initiated downstream*. J. Virol. **64**:3126-3129.
- OOMENS, A.G.P., S.A. MONSMA y G.W. BLISSARD. 1995. *The baculovirus GP64 envelope fusion protein: synthesis, oligomerization and processing*. Virology **209**:592-603.
- ORKIN, S. H. 1992. *GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells*. Blood **80**:575-581.
- PEARSON, M., R.M. BJORNSON, C.H. AHRENS y G.F. ROHRMANN. 1993. *Identification and characterization of a putative origin of DNA replication in the genome of a baculovirus pathogenic for Orgyia pseudotsugata*. Virology **197**:715-725.
- POSSEE, R.D. y S.C. HOWARD. 1987. *Analysis of the polyhedrin gene promoter of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. Nucleic Acids Res. **15**:10233-10248.
- PULLEN, S.S. y P.D. FRIESEN. 1995a. *The CAGT motif functions as an initiator element during early transcription of the baculovirus transregulator IE-1*. J. Virol. **69**:3575-3583.
- PULLEN, S.S. y P.D. FRIESEN. 1995b. *Early transcription of the ie1 transregulator gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus is regulated by DNA sequences within its 5' noncoding leader region*. J. Virol. **69**:156-165.
- PURNELL, B.A., P.A. EMANUEL y D.S. GILMOUR. 1994. *TFIID sequence recognition of the initiator and sequences farther downstream in Drosophila class II genes*. Genes Dev. **8**:830-842.
- RANKIN, C., B.G. OOI y L.K. MILLER. 1988. *Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression*. Gene **70**:39-50.
- RAPP, J.C., J.A. WILSON y L.K. MILLER. 1998. *Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression*. J. Virol. **72**:10197-10206.
- ROHRMANN, G.F. 1986. *Polyhedrin structure*. J. Gen. Virol. **67**:1499-1513.
- ROHRMANN, G.F. 1992. *Baculovirus structural proteins*. J. Gen. Virol. **73**:749-761.
- RONCARATI, R. y D. KNEBEL-MÖRSDORF. 1997. *Identification of the early actin-arrangement-inducing factor gene, arif-1, from Autographa californica multicapsid nuclear polyhedrosis virus*. J. Virol. **71**:7933-7941.
- ROY, N., M.S. MAHADEVAN, M. MCLEAN, G. SHUTLER, Z. YARAGHI, R. FARAHANI, S. BAIRD, A. BESNER-JOHNSTON, C. LEFEBVRE, X. KANG y A. MCKENZIE. 1995. *The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy*. Cell **80**:167-178.
- RUSSELL, R.L.Q. y G.F. ROHRMANN. 1990. *A baculovirus polyhedron envelope protein: Immunogold localization in infected cells and mature polyhedra*. Virology **174**:177-184.
- THIEM, S.M. y L.K. MILLER. 1989. *Identification, sequence and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. J. Virol. **63**:2008-2018.
- TJIA, S.T., E.B. CARSTENS y W. DOERFLER. 1979. *Infection of Spodoptera frugiperda*

- cells with *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. 11. The viral DNA and the kinetics of its replication. *Virology* **99**:391-409.
- TODD, J.W., A.L. PASSARELLI Y L.K. MILLER. 1995. *Eighteen baculovirus genes including lef-77, p35, 39k and p47 support late gene expression*. *J. Virol.* **69**:968-974.
- VAN OERS, M.M., J.T. FLIPSEN, C.B. REUSKEN Y J.M. VLAK. 1994. *Specificity of baculovirus p10 functions*. *Virology* **200**:513-523.
- VAUX, D.L. Y A. STRASSER. 1996. *The molecular biology of apoptosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **93**:2239-2244.
- VOLKMAN, L.E. Y B.A. KEDDIE. 1990. *Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis*. *Seminars in Virology* **1**:249-256.
- WANG, X. Y D.C. KELLY. 1983. *Baculovirus replication: Purification and identification of the Trichoplusia ni nuclear polyhedrosis virus-induced DNA polymerase*. *J. Gen. Virol.* **64**:2229-2336.
- WANG, P., D.A. HAMMER Y R.R. GRANADOS. 1994. *Interaction of Trichoplusia ni granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects*. *J. Gen. Virol.* **75**:1961-1967.
- WANG, P. Y R.R. GRANADOS. 1998. *Observations on the presence of the peritrophic membrane in larval Trichoplusia ni and its role in limiting baculovirus infection*. *J. Invertebr. Pathol.* **72**:57-62.
- WEYER, U. Y R.D. POSSEE. 1989. *Analysis of the promoter of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus p10 gene*. *J. Gen. Virol.* **70**:203208.
- WHITT, M.A. Y J.E. MANNING. 1988. *A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body*. *Virology* **163**:33-42.
- WILSON, M.E., T.H. MAINPRIZE, P.D. FRIESEN Y L.K. MILLER. 1987. *Location, transcription and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine rich polypeptide*. *J. Virol.* **61**:661-666.
- WOOD, H.A. 1980. *Isolation and replication of an occlusion body deficient mutant of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. *Virology* **105**:338-344.
- XU, B., S. YOO Y L.A. GUARINO. 1995. *Differential transcription of baculovirus late and very late promoters: Fractionation of nuclear extracts by phosphocellulose chromatography*. *J. Virol.* **69**:2912-2917.
- YANG, C.L., D.A. STETLER Y R.F. WEAVER. 1991. *Structural comparison of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus-induced RNA polymerase and the three nuclear RNA polymerases from the host, Spodoptera frugiperda*. *Virus Res.* **20**:251-264.
- YANG, S. Y L.K. MILLER. 1998. *Expression and mutational analysis of the baculovirus very late factor 1 vlf-1 gene*. *Virology* **245**:99-109.
- YANG, S. Y L.K. MILLER. 1999. *Activation baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1*. *J. Virol.* **73**:3404-3409.
- YOUNG, J.C., E.A. MACKINNON Y P. FAULKNER. 1993. *The architecture of the virogenic stroma in isolated nuclei of Spodoptera frugiperda cells in vitro infected by Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. *Journal of Structural Biology* **110**:141-153.

ZUIDEMA, D., M.M. VAN OERS, E.A. VAN STRIEN, P.C. CABALLERO, E.J. KLOK, R.W. GOLDBACH Y J.M. VLAK. 1993. *Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the p10 gene of Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus*. J. Gen. Virol. 74:1017-1024.