

Trabajo de Laboratorio

Desarrollo de aplicaciones biotecnológicas sobre un baculovirus

A continuación se describen los aspectos fundamentales del Trabajo de laboratorio que se realizará en el marco de la asignatura Ingeniería Genética II, necesarios para la elaboración del plan de trabajo correspondiente.

I. Estado del arte

Los baculovirus

Los baculovirus pertenecen a una familia de virus de insectos ampliamente distribuida alrededor del mundo. Poseen un genoma de ADN doble cadena circular covalentemente cerrado, de entre 80-180 kpb. Estos virus presentan dos fenotipos a lo largo de su ciclo de multiplicación: Viriones Brotantes y Viriones Ocluidos (**Figura 1**).

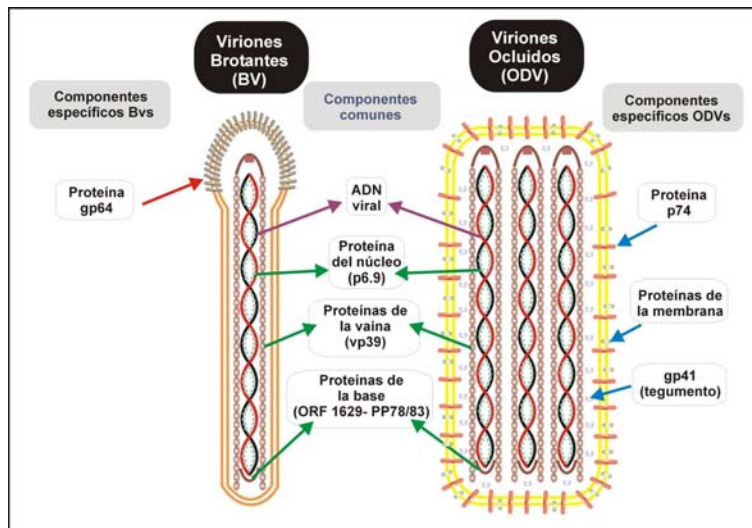


Figura 1. Dibujo esquemático de los fenotipos Brotantes y Ocluidos de los baculovirus.

Actualmente se sabe que los baculovirus se emplean para el *delivery* de genes, para el manejo integrado de plagas, y como sistemas de expresión de proteínas en contextos eucariotas. En este sentido, el sistema de expresión baculovirus/insectos es muy utilizado para la producción de proteínas derivadas de organismos eucariotas, con el plegamiento y las modificaciones *post* traduccionales similares a las de la proteína nativa. Además, se pueden expresar genes de gran tamaño, son seguros, y se obtienen grandes niveles de proteínas recombinantes. Este sistema

requiere de los Viriones Ocluidos para la infección de larvas (hospedadores naturales del baculovirus), y de los Viriones Brotantes para la infección en células susceptibles creciendo en condiciones de laboratorio.

El sistema *Bac to Bac*

El sistema *Bac to Bac* se basa en la transposición sitio específica de un casete de expresión desde un vector plasmídico donador a un vector baculoviral (bácmido) que se propaga en *Escherichia coli* (**Figura 2**). El bácmido contiene el replicón mini-F de bajo número de copias, un marcador de resistencia a kanamicina, y un segmento de ADN que codifica para el péptido *LacZ α* . Insertado en el N-terminal del gen *lacZ α* hay un segmento corto que contiene el sitio de inserción para el transposón bacteriano Tn7 (mini-*att*Tn7), el cual no interrumpe el marco de lectura del péptido *lacZ α* . El bácmido se propaga en *E. coli* DH10BAC como un megaplásmido que le confiere resistencia a kanamicina, y puede complementar la delección *lacZ* presente en el cromosoma para formar colonias azules (*lac*⁺) en presencia del sustrato cromogénico X-gal y el inductor IPTG.

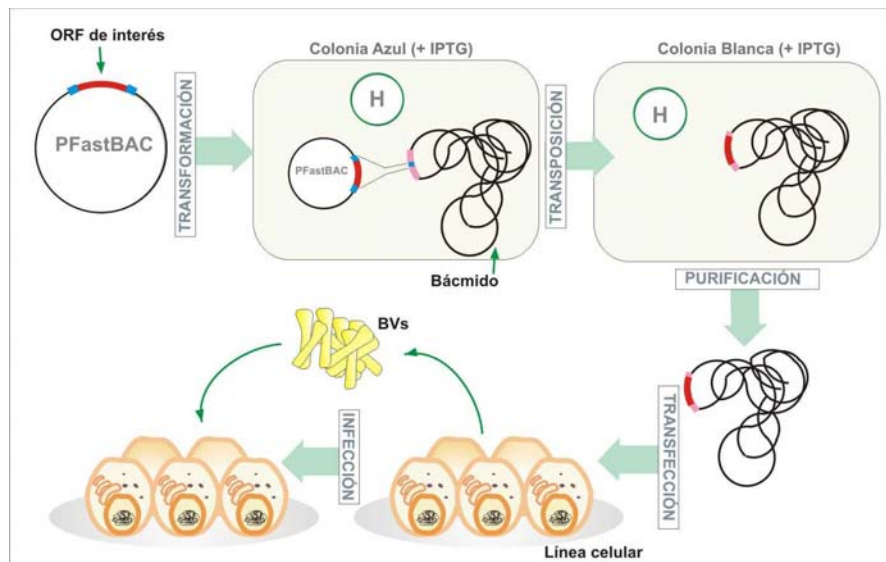


Figura 2. Sistema *Bac to Bac* (Invitrogen).

Los bácmidos recombinantes se generan mediante transposición del elemento mini-Tn7, desde el plásmido donador pFASTBAC, al sitio de inserción mini-*att*Tn7 en el bácmido, cuando las funciones de transposición Tn7 se proveen *en trans* por un plásmido *helper*. El casete que se va a transponer desde el vector donador contiene un promotor baculoviral específico (poliedrina, p10 o ambos), un gen de resistencia a gentamicina, un sitio de clonado múltiple, y una señal de poliadenilación insertada entre los brazos derecho e izquierdo del Tn7. La transposición interrumpe el marco de lectura del péptido *LacZ α* permitiendo identificar aquellas bacterias que

llevan bácmidos recombinantes mediante el desarrollo de colonias blancas. Luego este ADN recombinante es utilizado para transfectar células de insecto. El stock viral cosechado de las células transfectadas es utilizado para infectar nuevas células de insecto para la posterior expresión, purificación y análisis de proteínas.

II. Los objetivos

El **objetivo general** de este trabajo consiste en el desarrollo de una plataforma viral para la expresión de proteínas en contextos eucariotas, la vehiculización de genes terapéuticos en animales y la formulación de biocontroladores de plagas agrícolas. Para llegar a cumplir dicha meta, se plantean como **objetivos específicos** los siguientes:

- 1) Generar un baculovirus con capacidad de replicación y modificación en *Escherichia coli* (Bácmido).
- 2) Evaluar la expresión de proteínas en entornos eucariotas utilizando el Bácmido.
- 3) Evaluar la actividad bioinsecticida del Bácmido en hospedadores susceptibles.
- 4) Evaluar la capacidad del Bácmido para transducir animales no susceptibles.

III. Esquema experimental

Para la generación de baculovirus con capacidad de replicación y modificación en *Escherichia coli* (Bácmido) se seguirá el siguiente esquema (**Figura 3**):

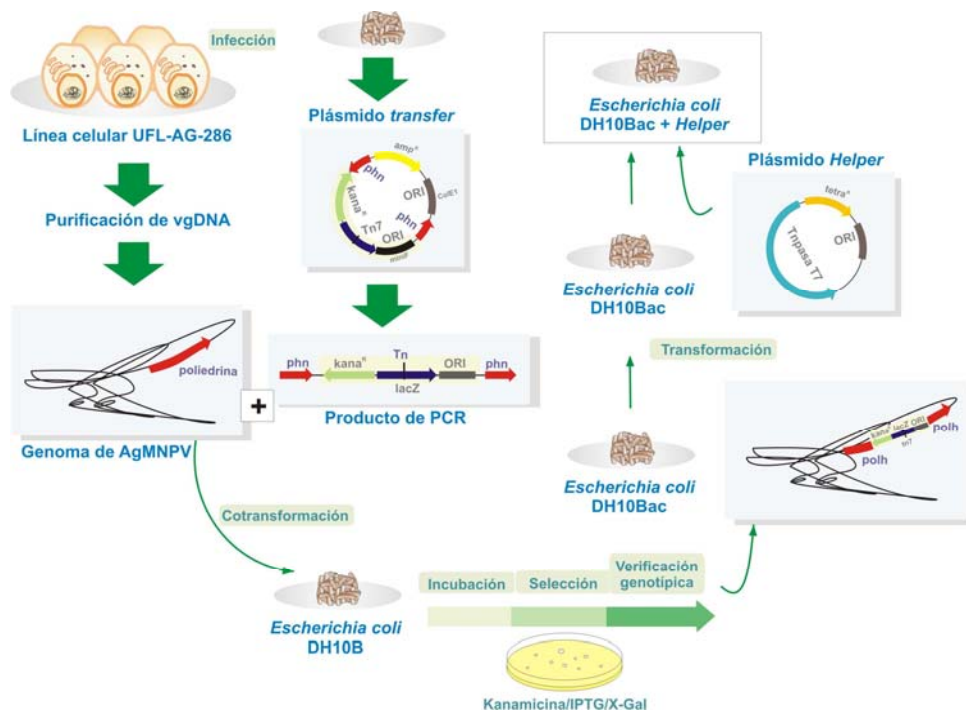


Figura 3. Estrategia desarrollada para la generación del Bácmido.

Para evaluar la capacidad del Bácmido como vector para terapia génica, sistema de expresión y control biológico, se contará con los plásmidos donores (pFastBAC) expuestos en la **Figura 4**.



Figura 4. Plásmidos donores.

IV. Metodología

Los materiales y métodos que se emplearán en este trabajo de laboratorio se encuentran descritos en el anexo 1.

V. Bibliografía

- **Ferrelli M.L., Berretta M., Belaich M.N, Ghiringhelli P.D., Sciocco-Cap A., Romanowski V.** The baculoviral genome. The Viral Genome. InTech - Open Access Publisher. Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia. 2012. Pág 1-32.
- **Miele A.B., Garavaglia M.J., Belaich M.N. & Ghiringhelli P.D.** Baculovirus: Molecular insights on their diversity and conservation. International Journal of Evolutionary Biology. 2011. Article ID 379424, doi:10.4061/2011/379424. ISSN 2090052X.
- **Thomas A Kost, J Patrick Condreay & Donald L Jarvis.** Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. Nature Biotechnology. 2005. Pág 567 – 575.