

CARLA TORRES BRACONI

**Proteoma do baculovírus *Anticarsia gemmatalis* múltiplo  
nucleopoliedrovírus em linhagens celulares distintas e  
comparação da proteína de envelope GP64 em variantes  
geográficas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Microbiologia do Instituto de Ciências da  
Universidade de São Paulo, para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade  
Zanotto

Versão original

São Paulo  
2013

## RESUMO

Braconi CT. Proteoma do baculovírus *Anticarsia gemmatalis* múltiplo nucleopoliedrovírus em linhagens celulares distintas e comparação da proteína de envelope GP64 em variantes geográficas. [Tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A família *Baculoviridae* compreende um grande e diverso grupo de vírus patogênicos de insetos, com aproximadamente 700 espécies de hospedeiros. Durante o ciclo viral, dois fenótipos são produzidos: o ODV (*occlusion derived virus*) responsável pela infecção primária do intestino médio da larva de insetos e o BV (*Budded virus*) responsável pela infecção sistêmica. No Brasil, desde a década de 1980, o *Anticarsia gemmatalis* múltiplo nucleopoliedrovírus (AgMNPV) é utilizado como controle biológico viral no controle da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis*. Com o sequenciamento do genoma do AgMNPV-2D, foram confirmadas potencialmente 152 ORFs, com 26 ORFs que codificam para proteínas estruturais, entre elas a glicoproteína 64 (GP64), fundamental para infecção secundária. No entanto, dados a respeito das proteínas presentes nos fenótipos do AgMNPV-2D são escassos. Este estudo objetiva identificar as proteínas estruturais presentes no AgMNPV-2D por duas abordagens distintas de espectrometria de massas. Outro objetivo consistiu em comparar possíveis adaptações contextuais da *gp64* de diferentes isolados geográficos do AgMNPV por clonagem, sequenciamento por Sanger e sequenciamento de alta cobertura. Através deste procedimento, identificamos as substituições sinônimas e não sinônimas de *gp64* e vimos que ela não suporta a noção de isolamento geográfico dos AgMNPVs amostrados. Também identificamos 44 e 33 proteínas presentes nos fenótipos ODV e BV no AgMNPV-2D, respectivamente. Embora parte das proteínas já havia sido descrita, o que é coerente com outros proteomas da família *Baculoviridae*, seis proteínas foram identificadas pela primeira vez no ODV e sete delas associadas ao fenótipo BV. Contudo, não foi possível predizer função para as proteínas pobremente categorizadas. Além disso, 11 proteínas celulares foram identificadas no AgMNPV-2D, possivelmente necessárias para infecção viral. Este achado contribui para o melhor entendimento da morfogênese do AgMNPV e fatores associados à multiplicação viral.

**Palavras-chave:** AgMNPV. Baculovírus. Controle Biológico. Proteoma. *gp64*.

## ABSTRACT

Braconi CT. The baculovirus *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus proteome and the comparison of multiple isolated envelope proteins GP64” [Thesis (Ph.D. in Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Baculoviridae are arthropod-specific viruses that commonly infect insect orders, with more than 700 known host species. During the viral life cycle, two distinct phenotypes are produced: the budded virus (BV) and the occlusion-derived virus (ODV) for intra and across host spread, respectively. Since the 80's several countries have been using the *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) as a biological control agent against the velvet bean caterpillar (*A. gemmatalis*). Brazil coordinated the largest program using AgMNPV as a biological pesticide in soybean plantations. The genome of the AgMNPV-2D carries at least 152 potential genes, 26 of which possibly code for structural proteins. Proteomic studies were done on a few baculoviruses, with six ODV and two BV proteomes finished so far. Moreover, there is limited data on virion proteins carried by the AgMNPV-2D. In this study, the structural proteins of AgMNPV-2D were analyzed by two complementary mass spectrometry techniques. The additional objective was to compare the gene *gp64* of different geographical populations of AgMNPV by cloning, Sanger sequencing and next generation sequencing methods. This analysis allowed us to observe the synonymous and non-synonymous substitutions of *gp64* and refuted the notion of a geographical isolation of the sampled AgMNPV. We also observed a total of 44 proteins associated to the ODV and 33 to the BV of AgMNPV-2D. Several proteins have been described as structural already, though our data showed six new proteins in the ODV and seven new proteins carried by the BV. Furthermore, 11 cellular proteins were also identified, which are possibly assorted during viral morphogenesis and carried with the virion. Unfortunately, it was not possible to predict gene function for poorly characterized genes. These findings may provide novel insights into AgMNPV biology and its host interaction, leading us to a better understanding about morphogenesis and also the associated factors of the viral multiplication.

**Key words:** AgMNPV. Baculovirus. Biological Control. Proteome. *gp64*.

## 1 INTRODUÇÃO

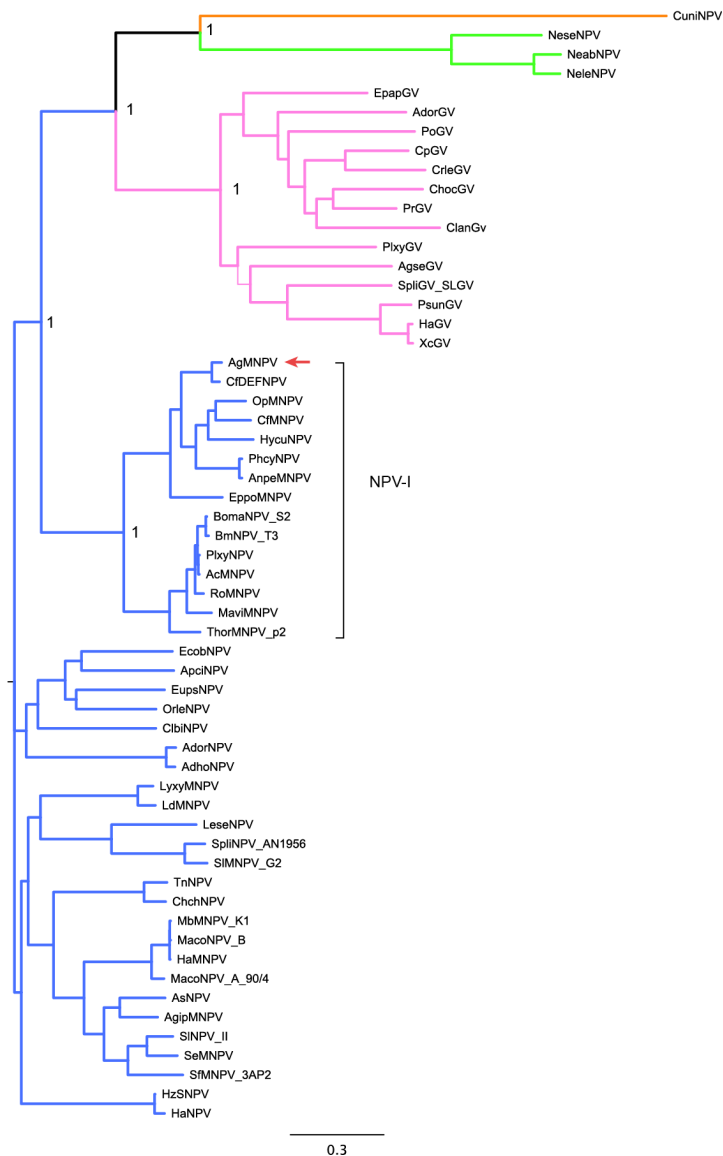
### 1.1 A Família *Baculoviridae*, taxonomia e morfologia

Vírus representam um importante desafio aos insetos e doze famílias já foram associadas a estes artrópodes (Erlandson, 2008). A família *Baculoviridae* compreende um grande e diverso grupo de vírus patogênicos a artrópodes, que infectam insetos das ordens; Lepidóptera, Himenóptera e Díptera. Aproximadamente 700 espécies de hospedeiros de baculovírus já foram reportados na literatura, majoritariamente isolados em Lepidópteras (O'Reilly et al., 1993; Tanada, Kaya, 1993). Estes vírus são estáveis no ambiente e ocorrem naturalmente em populações de insetos e apresentam alta especificidade de hospedeiros (Moscardi, 1999). Estas características tornaram a família *Baculoviridae* interessante para a aplicação segura como controle biológico de pragas presentes em áreas de manejo de agrícola, pastos e áreas florestais (Moscardi, 1999; Szewczyk et al., 2006; Tanada, Kaya, 1993). Além disso, com o amplo desenvolvimento tecnológico na década de 80, alguns baculovírus, como o AcMNPV e o BmNPV, tornaram-se úteis como vetores versáteis de expressão de genes heterólogos (Maeda, 1989). Os vetores baseados em baculovírus são um excelente sistema de produção de proteínas recombinantes em linhagens de células de insetos (Boyce, Bucher, 1996; Hofmann et al., 1995; Smith et al., 1983; Smith et al., 1985). Recentemente, alguns estudos os descreveram como vetores para transdução *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* em uma variedade de linhagens celulares de mamíferos tornando-os possíveis candidatos para o uso em terapia gênica (Airenne et al., 2013; Hu, 2006; Kost et al., 2005; Wang, Balasundaram, 2010).

A classificação taxonômica da família é baseada em análises filogenéticas e características moleculares de mais de setenta genomas completos. A comparação de seu conteúdo gênico permitiu a identificação de trinta e sete genes conservados entre todos genomas sequenciados, chamados de *core genes* (Garavaglia et al., 2012). Estes genes desempenham funções biológicas importantes durante o ciclo viral, como: transcrição, produção da partícula viral, infecção do intestino do inseto e estabelecimento da infecção (Herniou et al., 2003; Rohrmann, 2008; van Oers, Vlak, 2007). Ademais, o conteúdo e a organização gênica foram considerados para estabelecer as relações evolutivas entre os membros da família *Baculoviridae* (Herniou et al., 2001). Portanto, desde 2008, o Comitê Internacional de Taxonomia de vírus (ICTV) ([www.ictvonline.org](http://www.ictvonline.org)) divide esta família em

quatro gêneros: (i) os *Alphabaculovirus*, (NPVs específicos de lepidópteras), (ii) os *Betabaculovirus* (GVs específicos de lepidópteras), (iii) os *Gamabaculovirus* (NPVs específicos de himenópteras) e (iv) os *Deltabaculovirus* (NPVs específicos de dípteros) (figura 1).

**Figura 1** - Reconstrução filogenética baseada nos 37 genes conservados de baculovírus sequenciados até o momento.



A relação entre os membros da família está demonstrada na divisão dos quatro gêneros na árvore: (i) os ramos em azul são os *Alphabaculovirus*, (NPVs específicos de lepidópteras), (ii) os ramos em rosa são os *Betabaculovirus* (GVs específicos de lepidópteras), (iii) os ramos em verde são os *Gamabaculovirus* (NPVs específicos de himenópteras) e o ramo em laranja os *Deltabaculovirus* (NPVs específicos de dípteros). A seta em vermelho aponta o *Anticarsia gemmatalis* múltiplo nucleopoliedrovírus (AgMNPV).

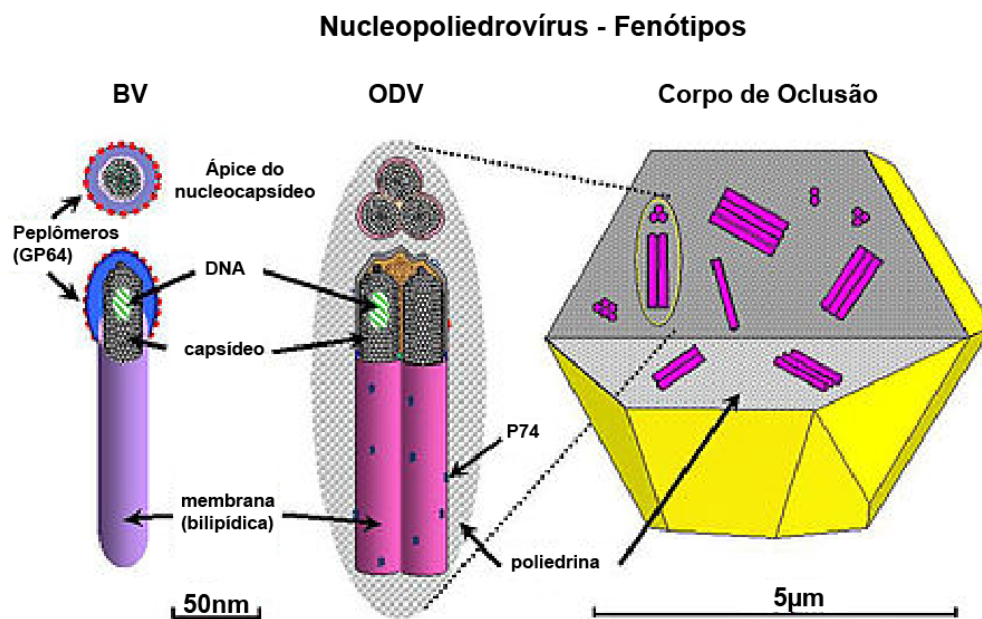
Os baculovírus são envelopados e seu genoma é composto de uma molécula de DNA circular dupla fita covalentemente fechada, que varia de 80 a 180 Kb e codifica de 100 a 180 proteínas (Granados et al., 1986; Herniou et al., 2003; Slack, Arif, 2007). O material genético destes vírus está envolto por um capsídeo proteico (nucleocapsídeo) em forma de bastonete (em latim *baculum*), que forma o vírion, a partícula infectante (Summers, Smith, 1987). Os vírions dessa família podem ser oclusos em uma matriz para-cristalina denominada de corpo de oclusão (*Occlusion body*, OB) (Tanada, Kaya, 1993). Os baculovírus foram inicialmente divididos em dois grupos com base nas diferenças morfológicas encontradas nestes corpos de oclusão em: nucleopoliedrovírus (NPVs) e granulovírus (GVs). Os NPVs podem apresentar apenas um nucleocapsídeo (SNPV - *Single Nuclear Polydrosis Virus*) ou até dezenas (MNPV - *Multiple Nuclear Polydrosis Virus*) por corpo de oclusão (Bilimoria, 1991). Neste grupo os vírions são oclusos em corpos denominados poliedros, constituídos principalmente pela proteína poliedrina (28 kDa) (Bilimoria, 1991; Granados et al., 1986). Os NPVs específicos de lepidópteras ainda são subdivididos em grupos I e II baseado em estudos filogenéticos com o gene da poliedrina (*polh*) (Zanotto et al., 1992; Zanotto et al., 1993), genes conservados da família *Baculoviridae* (Herniou et al., 2003) e genomas completos (Oliveira et al., 2006b; Wolff et al., 2008; Zanotto, Krakauer, 2008). Os dois grupos requerem proteínas de envelope distintas para fusão do vírus com a célula hospedeira: a glicoproteína GP64 está presente no grupo I, enquanto a proteína F está no grupo II (Herniou et al., 2003; Monsma et al., 1996; Pearson et al., 2000). Alguns baculovírus apresentam as duas proteínas no envelope viral, porém apenas uma mantém função de fusão (Okano et al., 2006). Além disso, 11 genes adicionais parecem ser exclusivos dos NPVs (Herniou et al., 2001; Jehle et al., 2006). Os GVs, por outro lado, normalmente apresentam um nucleocapsídeo por corpo de oclusão com formato ovicilíndrico, denominados grânulo (Crook, 1991; Summers, Smith, 1987). Os grânulos são compostos principalmente pela proteína granulina (28 kDa), que apresenta 50% de similaridade com a sequência de aminoácidos da poliedrina (Akiyoshi et al., 1985; Crook, 1991). Ademais, os GVs foram somente isolados de Lepidópteras e alguns membros deste grupo causam infecção limitada ao intestino médio (Tanada, Kaya, 1993).

## 1.2 Fenótipos virais e ciclo de vida dos *Alphabaculovirus*

Os baculovírus possuem uma característica peculiar no ciclo infeccioso: a produção de dois fenótipos distintos em estrutura e função, mas de mesma composição gênica (Blissard,

1996). Como mencionado, os fenótipos desempenham funções diferentes durante o ciclo viral: o ODV (*occlusion derived virus*) é responsável pela transmissão horizontal entre os hospedeiros e pela infecção primária das células colunares do intestino médio da larva de insetos (Granados et al., 1986); e o BV (*Budded virus*) não ocluso, é responsável pela infecção sistêmica, *i.e.*, propagação da infecção célula a célula, infectando inicialmente os hemócitos na hemolinfa e subsequentemente espalhando a infecção para os demais tecidos do hospedeiro (Figura 2).

**Figura 2** - Os fenótipos virais produzidos durante o ciclo de vida dos baculovírus.



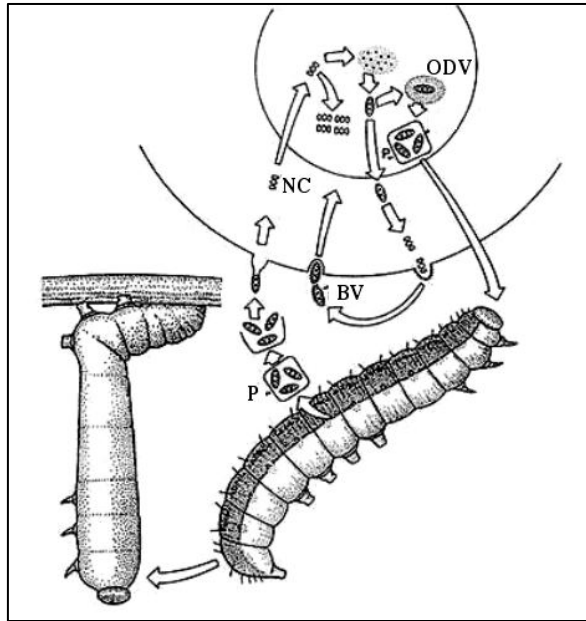
À esquerda está representando o BV, com um único nucleocapsídeo envolto pela membrana celular e proteínas virais inseridas. No caso de um NPV I, a proteína GP64 forma peplômeros em uma das pontas da partícula de BV. Ao meio, está representado um ODV com diversos nucleocapsídeos envoltos pelo mesmo envelope. À direita está representado um corpo de oclusão, o poliedro, onde os ODVs dos NPVs estão embebidos e protegidos das adversidades do ambiente.

Fonte: adaptada de <http://commons.wikimedia.org/wiki/Baculovirus>. Com permissão.

O ciclo infeccioso de um *Alphabaculovirus* tem início quando o inseto ingere o poliedro presente no meio ambiente (Figura 3). Estes vírus evoluíram de forma a iniciar a infecção no intestino médio do inseto, onde o corpo de oclusão é dissolvido em pH alcalino (pH = 10,5 a 11,0) e os ODVs são liberados no lúmen intestinal (Dow, 1992). Essas partículas atravessam a membrana peritrófica (PM), barreira física de proteção do intestino médio do inseto, sendo que alguns baculovírus ainda possuem enhaínas capazes de degradar

componentes da PM (Wang, Granados, 1997). As proteínas responsáveis pela infectividade oral presentes no envelope lipoprotéico dos ODVs se ligam aos receptores das células colunares do intestino médio (Fang et al., 2006; Faulkner et al., 1997; King, Possee, 1992; Peng et al., 2012). Isso permite que os vírions consigam se fundir e penetrar no citoplasma, dando início à infecção primária. Uma vez dentro da célula, os nucleocapsídeos são direcionados ao núcleo através da polimerização de filamentos de actina que penetram pelos poros nucleares, onde são desnudados, liberando o DNA viral (Charlton, Volkman, 1991; Lanier, Volkman, 1998; Ohkawa et al., 2010). A partir desse momento, o vírus controla a maquinaria celular e inicia a sua replicação com a transcrição de alguns genes virais, seguida da síntese de DNA viral (Granados et al., 1986). Os primeiros nucleocapsídeos são produzidos no núcleo e migram para o citoplasma, em direção membrana à plasmática já modificada pela inserção de proteínas do envelope; glicoproteínas GP64 no caso do grupo I e proteínas F no caso do grupo II (Blissard, Rohrmann, 1990). Assim é produzido o fenótipo BV, que deixa a célula hospedeira por brotamento polarizado da membrana celular (O'Reilly et al., 1993). As proteínas presentes no envelope lipoproteico do BV (GP64 e/ou proteína F) formam peplômeros que se ligam aos receptores celulares, dando início à infecção célula a célula. A infecção sistêmica segue pelo tecido traqueal, células da hemolinfa, corpo gorduroso, túbulos de Malpighi e por fim células cerebrais da lagarta (Soares, Ribeiro, 2005). Na fase tardia da infecção há intenso acúmulo de nucleocapsídeos nos núcleos celulares, onde são envelopados em grupos e dão origem aos ODVs, que promovem grande aumento do volume nuclear e culminam na lise da célula (Granados et al., 1986). A nova progênie de poliedros é liberada no ambiente pelo excremento ou quando o inseto morre (Keddie et al., 1989). Alguns insetos infectados podem migrar para um lugar mais elevado na planta, o que facilita a ação de predadores e a dispersão dos corpos de oclusão, comportamento controlado pela expressão de dois genes virais, *ptp* e *egt* (Hoover et al., 2011; Kamita et al., 2005; Katsuma et al., 2012). Os poliedros presentes no solo e nas folhas são responsáveis pela disseminação dos baculovírus de inseto para inseto. Tais estruturas são muito estáveis e resistentes, protegendo os vírions de degradação e inativação no meio ambiente, principalmente por radiação ultravioleta (UV) (Coulibaly et al., 2009; Granados et al., 1986).



**Figura 3** - Ciclo biológico ilustrativo de um *Alphabaculovirus*.

Os poliedros presentes nas plantações (P) são ingeridos pelas lagartas. No intestino médio, são dissolvidos e os ODVs são liberados, iniciando a infecção primária. Os nucleocapsídeos (NC) são encaminhados para o núcleo, onde há intensa replicação viral culminando na produção de BVs, responsáveis pela infecção secundária dos tecidos da lagarta. Nos estágios finais da infecção, os poliedros são acumulados nos núcleos das células infectadas e ocasionam lise. A nova progênie de poliedros (P) é liberada no ambiente, onde servirão de inóculo para infecções em novas lagartas.

Fonte: Adaptada com permissão de (King, Possee, 1992).

### 1.3 Regulação gênica e replicação dos baculovírus

A produção de dois fenótipos durante o ciclo de vida dos baculovírus é reflexo de um diferente padrão de regulação gênica que ocorre em cascata, onde genes expressos em uma fase temporal coordenam a expressão de genes da fase seguinte (O'Reilly et al., 1993). Nesta cascata, a expressão gênica viral é dividida em três fases: (i) precoce (*early - E*), composta de genes preferencialmente expressos de uma a seis horas pós infecção (p.i.), (ii) tardia (*late - L*), genes expressos de seis a dezoito horas p.i. e (iii) muito tardia (*very late - VL*), genes expressos de dezoito horas p.i. até o final da montagem viral (King, Possee, 1992).

### 1.3.1 Fase precoce e replicação do DNA viral

Esta fase se caracteriza pelo começo do ciclo viral e da manipulação do metabolismo celular. Os genes desta fase são transcritos pela RNA polimerase DNA-dependente II celular que reconhece os promotores precoces virais similares aos celulares (Herniou et al., 2003; King, Possee, 1992). Além disso, os genes desta fase são subdivididos em duas classes: imediata (*immediate-early - IE*) e precoce tardia (*delayed early - DE*). Na fase imediata, dois genes críticos são transcritos, *ie-1* e *ie-0*. A proteína IE-1 é acumulada muito precocemente no núcleo e interage diretamente com o DNA viral. IE-1 e IE-0 são responsáveis pela ativação transcricional de genes da fase seguinte. Ademais, a expressão de IE-1 está diretamente relacionada à replicação do DNA viral e à inibição precoce de apoptose na célula infectada (Choi, Guarino, 1995; Leisy et al., 1995; Schultz et al., 2009). Os genes expressos na fase DE estão relacionados à síntese do DNA viral, como *DNA pol*, *helicase (p143)*, *lef-1 (late expression factor-1)*, *lef-2* e *lef-3*. Com os produtos destes genes traduzidos, a maquinaria de replicação é formada.

Acredita-se que os baculovírus utilizem diferentes regiões do genoma como pontos de origem de replicação ou sequências iniciadoras, como: (i) regiões homólogas repetitivas, (*hrs*), (ii) sequências não *hrs* e (iii) promotores precoces. As *hrs* são frequentemente palíndromos imperfeitos, com 30 pb, que ocorrem em várias regiões do genoma (Wu et al., 1999). A proteína IE-1 se liga as *hrs* facilitando a entrada da maquinaria de replicação do DNA viral (Kool et al., 1994; Okano et al., 2006). Sucintamente, a Helicase inicia a abertura da dupla fita de DNA com a provável ajuda de uma topoisomerase celular (Craig, Nash, 1983; Okano et al., 2006). Uma vez formada a forquilha de replicação, os DNAs fita simples são estabilizados pela LEF-3, que possibilita a formação do complexo de primases, LEF-1 e LEF-2. Este complexo sintetiza uma sequência curta de oligonucleotídeos que servirá de molde para a DNA polimerase continuar o processo no sentido 5'-3' da nova cadeia. No sentido contrário, são produzidos os fragmentos de Okasaki na replicação da fita 3'-5' que serão ligados pela DNA ligase do hospedeiro, uma vez que a DNA polimerase processa apenas no sentido 5'-3' (Okano et al., 2006). A Helicase (P143) e LEF-3 também atuam na inibição de apoptose na célula infectada (Schultz, Friesen, 2009). Além dessas, outras proteínas também estão envolvidas no processo de síntese de DNA, como a nuclease alcalina (Alk-Exo), conservada em todos os baculovírus. Esta proteína se associa ao DNA de fita simples, apresenta atividade exonuclease e endonuclease no sentido 5'-3', digere uma pequena região

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

