

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



Tesis Doctoral

**DESARROLLO DE SISTEMAS DE EXPRESIÓN
INTEGRATIVOS Y NO INTEGRATIVOS PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOFÁRMACOS EN
PLANTAS DE TABACO**

SONIA ALEJANDRA WIRTH

Director

DR. FERNANDO BRAVO ALMONACID

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética
Y Biología Molecular (INGEBI-UBA-CONICET)

2005

University of Buenos Aires



Ph.D. Thesis

**DEVELOPMENT OF INTEGRATIVE AND
NON-INTEGRATIVE SYSTEMS FOR
BIOPHARMACEUTICAL PRODUCTION IN
TOBACCO PLANTS**

SONIA ALEJANDRA WIRTH

Director

DR. FERNANDO BRAVO ALMONACID

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética
Y Biología Molecular (INGEBI-UBA-CONICET)

2005

RESÚMEN

En este trabajo se analizó la producción del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) en plantas de tabaco, utilizando sistemas de expresión integrativos y no integrativos. Se comparó la expresión de hEGF en el citoplasma y el apoplasto de plantas transgénicas de tabaco, utilizando distintos promotores y secuencias activadoras de la traducción, así como en el citoplasma y apoplasto de plantas infectadas con dos vectores virales derivados de PVX. Asimismo, se verificó la actividad biológica del hEGF expresado en el apoplasto de ambos sistemas, en dos ensayos distintos, demostrándose un comportamiento similar al rhEGF de origen comercial. Además, se constató la rizosecreción de hEGF en un sistema de producción en hidroponía.

Por otra parte, se diseñaron dos vectores para implementar la técnica de transformación de cloroplastos de tabaco. Mediante cuatro construcciones distintas se analizó la expresión de hEGF en plantas transplastómicas, lo que permitió percibir la complejidad de los sistemas de regulación genética plastídica. Además, se evaluó la expresión en cloroplastos de tabaco de la hormona de crecimiento bovina (bGH) y de los antígenos de *Toxoplasma gondii*, SAG 1 y Gra 4.

Palabras clave: Actividad biológica, Agricultura molecular, Apoplasto, Cloroplastos, hEGF, Plantas transplastómicas, Tabaco transgénico, Vector viral.

ABSTRACT

Human epidermal growth factor (hEGF) was expressed in tobacco plants using integrative and non-integrative systems. hEGF production was compared between cytoplasm and apoplast of transgenic tobacco plants using different promoter and translational enhancer sequences, and in the cytoplasm and the apoplast of plants infected by two distinct PVX derived viral vectors. hEGF biological activity was assessed by two different assays, and a similar behavior to commercial rhEGF was demonstrated. Also, an hydroponic system was used for hEGF production by rizosecretion in apoplastic transgenic plants.

On the other hand, we designed two vectors to establish a chloroplast transformation protocol. Four different genetic constructions allowed us to analyze hEGF expression in transplastomic plants, unveiling the complexity of the plastid genetic regulation networks. In addition, expression of bovine growth hormone (bGH) and the *Toxoplasma gondii* antigens SAG 1 and Gra 4, in tobacco chloroplasts was studied.

Key words: Biological activity, Molecular farming, Apoplast, Chloroplasts, hEGF, Transplastomic, Transgenic tobacco, Viral vector.

A la memoria de A. M. Schmunk

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Bravo Almonacid, por ser el mentor y responsable (sí, responsable) de mi formación profesional. Por su paciencia y su inagotable predisposición para responder nuestras inquietudes con la más alta calidad científica, porque nunca dejó de ser un compañero de trabajo y finalmente, porque es un privilegio trabajar bajo su dirección.

Dr. Alejandro Mentaberry, por permitirme formar parte del grupo “papa”, por sus buenos consejos (no digo que los siga, la rebeldía a la autoridad me lo impide) y por su continuo respaldo durante todos estos años.

A las autoridades del Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, INGEBI, por permitirme realizar mi trabajo en esta institución.

A todo el grupo “Papa”, los que ya se fueron, los que permanecen y los que llegan, por ser mi familia durante todos estos años. Porque sin distinción todos y cada uno, han sido parte esencial de mi trabajo y sin ustedes no habría llegado hasta aquí. A todos por la paciencia para soportar mis rayes. En especial a María Eugenia Segretín por toda su inestimable ayuda con la transformación de cloroplastos (y por las fiestas!). A Juan Pablo Luppi por... uh, bueno necesitaría varias hojas, digamos simplemente por su amistad. A Natalia F. Eraso, por iluminarnos. A Natalia Módena (digna sucesora del cargo de bulldog, así de dulce como la ven) por su eficiencia y disposición para encontrar cualquier cosa que necesitemos y por los laaaargos días en el laboratorio. A Sergio Ghio por su ayuda y buena predisposición en todo momento y por alegrar nuestros días con orquídeas. A Mauro (porrecito) Morgenfeld y Paula Bey de Porrecito por las mejores vacaciones y por todo su cariño. A Patricia Picardo por su dulzura. A Mercedes Rivero por los días de Areco y su bondad. A Silvia Lede por el cariño y la camaradería, por invadir mi mesada, usar mis cubiertos, mi taza, etc, etc. Al maestro Kobashayi por sus lecciones y sabios consejos. A Silvia Cabral por sus locuras y por enseñarme todo lo que sé sobre cultivo de tejidos. A Pablo Zaltz, Paola Vetere, Florencia Verna y Alejandro Suyama por los viejos días de laboratorio. A Marina Clemente por la ayuda con Toxo (y por la paella!). A Roberto Curilovic por la buena música. A Flor Conte, Alicia Zelada, Marcela Soto y Gilda Breckon por confirmarme una vez más “pero, qué lindos son los niños!”

Al grupo Kinasas, en especial a Vero, Pablo, Marce, Isa, Dani, Juan y Rita.
A la Dra. María Teresa Téllez Iñón por su respaldo.

A los Ciclasas, en especial a Guille L., Ale, Briardo y Cata. Al Dr. Alonso por sus... galantes lisonjas. Al Dr. Pereira por los... entusiastas halagos. A la Dra. Cristina Paveto, quien me trajo a INGEBI y me presentó a Alejandro allá hace mucho. A la Dra. Mirta Flawiá por la fe al darme el cuarto de radioactivo. Al Dr. Héctor Torres

Al Dr. Jorge Muschietti (ven, que no soy la única con mal carácter) y sus becarios. A Tamara, Diego (alias bombón de dulce de leche) y María Laura. A Eva y Mariana.

A los chagas. En especial a Juan, Gaby, Naty, Vero y Vani. A Hernán Lorenzi. A Evelyn Mahler por la ayuda con los ELISAs. Al grupo transgénicos, en especial a Diego, Marce, Helena y Dani.

Al Dr. Leonardo Bussmann y el Lic. Mariano Lattanzi por la excelente colaboración y ayuda con los trabajos de actividad biológica.

Al Dr Sergio Ángel por las secuencias de *T. gondii* y los anticuerpos
Al Dr. Judewicz por los reactivos y anticuerpos.

A todo el personal de apoyo de INGEBI, en especial a Irma, Mary y Francisco. A Milagros por los chusmeríos desde la otra compu.

A los amigos no biólogos y a los biólogos no INGEBI. En especial a Irma Roberts y Romina Piccinali porque siempre están, por hacerme reír tanto y por el aguante. A Amit Dhingra y Deepika, Alessandra Barbante, Mike Singleton y Rosa por toda su ayuda y su cariño y por hacer más fácil mi estadía en Orlando.

A Cecilia Alvi (leguleya de día y anaconda de noche), por las noches de cacería y al ex(?) almirante Vesity por usufructuar la caza.

A Pablo por su amor y su paciencia

A mis padres, porque sin su amor y su esfuerzo no habría llegado hasta aquí.

A las víctimas de mi mal carácter

Es decir a todos los integrantes de esta lista...

y a muchos otros...

bueno, después de todo se lo merecían (algo habrían hecho).

Este trabajo fue financiado por:

Beca de Doctoral otorgada por la Agencia Nacional para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología (ANCyP). Proyecto PICT 1998 N° 08-03529.

Beca Doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Subsidio otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Proyecto PICT 1998 N° 08-03529 “Producción de proteínas heterólogas en plantas transgénicas de tabaco mediante sistemas de expresión integrativos y no integrativos”. Investigador responsable Fernando Bravo Almonacid.

Subsidio otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica Proyecto PICT 2000 N° 08-08702 “Transformación del genoma de cloroplastos de papa con genes antifúngicos y antibacterianos”. Investigador responsable Fernando Bravo Almonacid.

INTRODUCCIÓN

LA PRODUCCIÓN DE BIOFÁRMACOS	1
AGRICULTURA MOLECULAR.....	2
Los biorreactores vegetales	2
Vacunas y anticuerpos: ventajas particulares de los sistemas vegetales	4
<i>Vacunas</i>	<i>4</i>
<i>Anticuerpos</i>	<i>6</i>
Otras proteínas expresadas en plantas	7
ESTRATEGIAS PARA OPTIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN LOS SISTEMAS VEGETALES	8
Sistemas de expresión no integrativos	8
<i>Vectores Virales</i>	<i>8</i>
<i>Agroinfiltración</i>	<i>9</i>
<i>Ventajas y limitaciones</i>	<i>10</i>
Sistemas de expresión integrativos I: plantas transgénicas nucleares.....	10
<i>Métodos de transformación</i>	<i>11</i>
Herramientas moleculares	12
<i>Diseño de la construcción genética</i>	<i>12</i>
Promotores constitutivos.....	13
Promotores tejido-específicos	13
Promotores inducibles	14
Otras secuencias reguladoras	14
<i>Localización subcelular</i>	<i>14</i>
La vía de secreción	15
Producción de proteínas recombinantes en suspensiones celulares.....	16
Rizosecreción	16
Localización en las organelas subcelulares	17
<i>Fusiones a proteínas</i>	<i>18</i>
<i>Modificación de los patrones de glicosilación</i>	<i>18</i>
Elección de la especie vegetal	20
Sistemas de expresión integrativos II: plantas transplastómicas	22
<i>Los plástidos vegetales.....</i>	<i>22</i>
<i>Regulación de la expresión genética en cloroplastos</i>	<i>23</i>
<i>La transformación de cloroplastos</i>	<i>28</i>
ASPECTOS REGULATORIOS Y DE BIOSEGURIDAD.....	32
PROTEÍNAS EXPRESADAS EN ESTE TRABAJO.....	33
El factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF).....	33
La hormona de crecimiento bovina (bGH).....	35
Antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i>	36
OBJETIVOS	38

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS	39
1.1 <i>Escherichia coli</i>.....	39
1.1.1 <i>Condiciones de cultivo</i>	39
1.1.2 <i>Preparación de células competentes de E. coli.</i>	39
1.1.3 <i>Transformación de células competentes de E. coli.</i>	40
1.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40
1.2.1 <i>Cepas y condiciones de cultivo.</i>	40
1.2.2 <i>Preparación de células competentes de A. tumefaciens.</i>	40
1.2.3 <i>Transformación de células competentes de A. tumefaciens.</i>	41
2. LÍNEAS DE PLANTAS	41
3. AISLAMIENTOS VIRALES	41
3.1 PVX (Potato virus X).....	41
3.2 PVY (Potato virus Y).....	41
4. PLÁSMIDOS.....	42
4.1 Comerciales.....	42
4.2 No comerciales	42
5. SECUENCIAS.....	47
5.1 Factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF).....	47
5.2 Hormona de crecimiento bovina (bGH).....	47
5.3 Antígeno de superficie 1 (SAG1) de <i>T. gondii</i>.....	48
5.4 Proteína Gra4 de <i>T. gondii</i>	49
6. OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES	50
7. METODOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE.....	51
7.1 Aislamiento de ADN plasmídico	51
7.1.1 <i>Mini preparación de ADN plasmídico.....</i>	51
7.1.1.1 <i>Método de lisis alcalina.....</i>	51
7.1.1.2 <i>Purificación de ADN plasmídico utilizando matrices comerciales de fibra de vidrio.....</i>	51
7.1.2 <i>Preparación del ADN plasmídico a gran escala</i>	52
7.2 Preparación de plásmidos e insertos	52
7.2.1 <i>Amplificación de insertos por PCR</i>	52
7.2.2 <i>Corte con enzimas de restricción</i>	52
7.2.3 <i>Rellenado de extremos 5' extendidos</i>	53
7.2.4 <i>Desfosforilación de extremos compatibles.....</i>	53
7.2.5 <i>Purificación de plásmidos y fragmentos de ADN</i>	53
7.2.5.1 <i>Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....</i>	53
7.2.5.2 <i>Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de poliacrilamida.</i>	54
7.2.5.3 <i>Extracción fenólica.....</i>	54
7.3 Reacciones de ligación.....	54
7.4 Condiciones especiales de ligada. Productos de PCR.....	55
8. INFECCIÓN DE PLANTAS DE TABACO	55
8.1 Transcripción <i>in vitro</i> del ARN viral.....	55
8.2 Inoculación de plantas de tabaco con el ARN viral sintetizado <i>in vitro</i>.	56
8.3 Inoculación de plantas de tabaco con material vegetal infectado.	56

9. TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE TABACO.....	57
9.1 Transformación de plantas de tabaco mediada por <i>A. tumefaciens</i>.....	57
9.2 Transformación de cloroplastos de tabaco por biobalística.	58
9.2.1 Preparación de los microtransportadores (micropartículas de oro).	58
9.2.2 Recubrimiento de los microtransportadores con el ADN.	58
9.2.3 Bombardeo de hojas de tabaco.	59
9.3 Rusticación.....	60
9.4 Esterilización y germinación de semillas de tabaco <i>in vitro</i>.....	60
10. ANÁLISIS DE ADN.....	61
10.1 Aislamiento del ADN de plantas de tabaco.	61
10.1.1 Preparación de ADN total para PCR.	61
10.1.2 Preparación de ADN total para Southern blot.	61
10.1.3 Purificación de ADN de cloroplastos de tabaco.	62
10.2 PCR para chequeo de plantas transgénicas.....	63
10.3 PCR para chequeo de plantas transplastómicas.....	63
10.4 Ensayo de Southern blot.....	64
10.4.1 Electroforesis y transferencia del ADN a membranas de nylon.	64
10.4.2 Hibridación y lavados.	65
10.4.3 Preparación de los moldes para las sondas.	65
10.4.3.1 Molde para la sonda EGF.	65
10.4.3.2 Molde para la sonda aadA.....	66
10.4.3.3 Molde para la sonda trnI/A.	66
10.4.4 Marcado radiactivo de las sondas.	66
10.4.5 Purificación de las sondas marcadas.	67
10.4.5.1 Purificación por precipitación.....	67
10.4.5.2 Purificación por columnas comerciales.....	67
11. ANÁLISIS DE ARN.....	67
11.1 Extracción del ARN total de plantas de tabaco.....	67
11.1.1 Precipitación con LiCl.	68
11.1.2 Extracción con TRIzol.....	68
11.2 Ensayo de Northern blot.....	69
11.2.1 Electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes.	69
11.2.2 Transferencia a membranas de nylon.	69
11.2.3 Hibridación y marcación de sondas.	69
11.3 Síntesis de ADN copia por RT-PCR.....	70
12. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	70
12.1 Extracción de proteínas.....	70
12.1.1 Extracción de proteínas totales de hojas de tabaco.	70
12.1.2 Extracción etanol-ácida de hEGF.	71
12.1.3 Extracción y purificación de proteínas por afinidad a columnas de níquel.....	71
12.1.4 Extracción de proteínas totales de <i>E. coli</i>	72
12.2 Cuantificación de proteínas totales.....	72
12.3 Electroforesis de proteínas.....	72
12.3.1 Geles de SDS - poliacrilamida para electroforesis en buffer Tris-Glicina.	72
12.3.2 Geles de SDS – poliacrilamida para electroforesis en buffer Tris-Tricina.....	73
12.3.3 Tinción con Coomassie Brilliant Blue.....	73
12.4 Ensayo de Western blot.....	73
12.4.1 Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.....	73
12.4.2 Inmunodetección de las proteínas electrotransferidas.	74

12.4.2.1 Revelado con NBT/BCIP.....	74
12.4.2.2 Revelado por quimioluminiscencia.....	74
12.4.2.3 Listado de los primeros anticuerpos utilizados.....	75
12.4.2.4 Controles positivos para <i>Western blot</i>	75
12.5 Squash-blot para la detección de la infección por PVX y PVY.....	75
12.6 Cuantificación de hEGF por ELISA.....	76
12.7 Ensayos de rizosecreción.	77
12.7.1 <i>Cultivo de plantas de tabaco en medio hidropónico.</i>	77
12.7.2 <i>Root blot.</i>	77
12.8 Actividad biológica de hEGF.....	77
12.8.1 <i>Ensayo de radioreceptor.</i>	77
12.8.2 <i>Ensayo de expansión de células del cumulus.</i>	78
12.9 Ensayos de degradación <i>in vitro</i> de hEGF.....	78

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE hEGF EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TABACO.....	80
1.1 Diseño y construcción de plásmidos binarios para la transformación de plantas de tabaco.	80
1.1.1 <i>Breve descripción de los plásmidos previamente obtenidos.</i>	80
1.1.2 <i>Construcción del plásmido p35(L)APEGF</i>	81
1.2 Transformación de plantas de tabaco mediada por <i>A. tumefaciens</i>	84
1.3 Caracterización de las plantas transformadas	84
1.3.1 <i>Análisis preliminar por PCR</i>	84
1.3.2 <i>Análisis de la integración de hegf por Southern blot</i>	85
1.4 Niveles de expresión de <i>hegf</i> en las plantas transformadas.....	86
1.5 Análisis de la transcripción de <i>hegf</i> por Northern blot.	90
2. EXPRESIÓN DE hEGF UTILIZANDO VECTORES VIRALES DERIVADOS DE PVX	92
2.1 Construcción del vector viral apoplástico PVXAPEGF.	92
2.2 Infección de plantas de tabaco.....	94
2.3 Niveles de expresión de hEGF en las plantas infectadas.....	96
2.4 Ensayos de co-infección con PVY	98
3. CARACTERIZACIÓN DEL hEGF EXPRESADO EN EL APOPLASTO DE TABACO	102
3.1 Rizosecreción de hEGF.....	102
3.1.1 <i>Producción de hEGF en un medio hidropónico</i>	102
3.1.2 <i>Ensayo de root blot</i>	103
3.2 Extracción y purificación parcial de hEGF a partir del tejido vegetal.....	103
3.3 Ensayos de <i>Western blot</i> para hEGF	105
3.4 Ensayos de actividad biológica	106
3.2.1 <i>Ensayo de radioreceptor.</i>	106
3.2.2 <i>Ensayo de expansión de células del cumulus de ovocitos bovinos</i>	107
4. EXPRESIÓN DE hEGF EN CLOROPLASTOS DE TABACO.....	110
4.1 Construcción del plásmido pBSWGUS.....	110
4.1.1 <i>Clonado de las secuencias flanqueantes</i>	111
4.1.2 <i>Clonado del promotor Prn</i>	114

4.1.3 Clonado de la secuencia <i>aadA</i>	114
4.1.4 Clonado del terminador <i>Trps16</i>	115
4.1.5 Clonado de la secuencia <i>uidA</i>	115
4.1.6 Ensamblado del plásmido <i>pBSWGUS</i>	116
4.2 Construcción del plásmido <i>pBSWUTRGUS</i>.....	119
4.3 Construcción de los plásmidos <i>pBSWEGF</i> y <i>pBSWUTREGF</i>	120
4.4 Construcción del plásmido <i>pBSWHISE</i>	122
4.5 Construcción del plásmido <i>pBSWGEKE</i>.....	124
4.6 Chequeo previo de las construcciones en <i>E. coli</i>	126
4.7 Transformación de cloroplastos de tabaco por bombardeo.....	128
4.8 Caracterización de las plantas transformadas	131
4.8.1 Análisis preliminar por <i>PCR</i>	131
4.8.2 Análisis de integración y homoplasia por <i>Southern blot</i>	132
4.8.3 Análisis de <i>ARN</i>	135
4.9 Análisis de la expresión de <i>hEGF</i>	137
4.9.1 Cuantificación inicial de los niveles de expresión de <i>hEGF</i> en las plantas transplastómicas.....	137
4.9.2 Ensayos de degradación <i>in vitro</i> de <i>hEGF</i>	138
4.9.3 Expresión <i>hEGF</i> en oscuridad.....	140
5 EXPRESIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINO (bGH) EN CLOROPLASTOS DE TABACO	141
5.1 Construcción del plásmido <i>pBSWUTRbGH</i>.....	141
5.2. Expresión de bGH en <i>E. coli</i>.....	141
5.3. Transformación de cloroplastos y análisis de la expresión en plantas de tabaco	142
5.3.1 Caracterización por <i>PCR</i> de las plantas transformadas	142
5.3.2 Análisis de la expresión de <i>bGH</i> en las plantas transplastómicas.....	143
6 EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE <i>T. GONDII</i> EN CLOROPLASTOS DE TABACO.	144
6.1 Construcción de los plásmidos derivados del <i>pLDctv</i> para la expresión de los antígenos de <i>T. gondii</i>.	144
6.1.1 Construcción de los plásmidos <i>pLDP30</i> y <i>pLDGra4</i>	144
6.1.2 Construcción de los plásmidos <i>pLDHISP30</i> y <i>pLDHISGra4</i>	145
6.2 Transformación de cloroplastos y análisis de la expresión en plantas de tabaco.....	146

DISCUSIÓN

EXPRESIÓN DE <i>hEGF</i> EN EL CITOPLASMA Y APOPLASTO DE PLANTAS DE TABACO. ..	149
Plantas transgénicas	149
Vectores virales.....	150
Caracterización del <i>hEGF</i> expresado en el apoplasto de plantas de tabaco.	152
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN CLOROPLASTOS DE TABACO.....	154
BIBLIOGRAFÍA	164

GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SECUENCIAS

% TPS.....	Porcentaje del total de las proteínas solubles
16S.....	Secuencia del ARN ribosomal 16S plastídico de tabaco (1489 pb)
23S	Secuencia del ARN ribosomal 23S plastídico de tabaco (2809 pb)
35S(L)CaMV.....	Versión extendida del promotor 35SCaMV (1380 pb)
35SCaMV	Promotor 35S del CaMV (835 pb)
5'UTR	Secuencia 5' no traducida del gen <i>psbA</i> de tabaco (200 pb)
aa	aminoácidos
<i>aadA</i>	Secuencia codificante de la aminoglucósido 3' adeniltransferasa, que otorga resistencia a espectinomicina y estreptomycinina (870 pb).
ADN-T	ADN de transferencia de <i>A. tumefaciens</i>
ANA	Ácido α -naftalen acético
AP.....	Secuencia codificante de los primeros 17 aminoácidos de la proteína AP24 madura (51 pb).
ARNm.....	ARN mensajero
ARNr.....	ARN ribosomal
BAP	6-bencilaminopurina
BCIP	5 bromo-4 cloro-3 indoil fosfato
bGH.....	Secuencia de la hormona de crecimiento bovina (576 pb).
BSA.....	Seroalbúmina bovina
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
Ci.....	curies
CMV.....	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CP- <i>hegf</i>	Secuencia codificante de la fusión de hEGF a los primeros 14 aa de la cápside de PVX (207 pb)
cpm.....	cuentas por minuto
CP-ss- <i>hegf</i>	Secuencia codificante de la fusión de hEGF al péptido señal de AP24 y los primeros 14 aa de la cápside de PVX (270 pb).
CSC	Región de copia simple corta del plastoma de tabaco (18571 pb)
CSL	Región de copia simple larga del plastoma de tabaco (86686 pb)
CTAB.....	Bromuro de hexadecil trimetil amonio
cv.	cultivar
D.O.....	Densidad óptica
d.p.i.	Días post inoculación
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs.....	mezcla de los 4 desoxirribonucleótidos trifosfato
EK	Secuencia codificante del pentapéptido DDDDK, reconocido por la enteroquinasa
EK- <i>hegf</i>	Fusión de <i>hegf</i> a EK
GEKE:	Fusión de la secuencia que codifica los primeros 186 aa de GUS a EK- <i>hegf</i>
Gra4:	Secuencia codificante de la proteína Gra4 de <i>T. gondii</i>
rhEGF	hEGF recombinante comercial
<i>hegf</i> :	Secuencia codificante del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) maduro (165 pb)
HISXa:	Secuencia codificante del tracto de seis histidinas y la secuencia IDGR, reconocido por el Factor Xa.

m ⁷ G(5')ppp(5')G....	Análogo de CAP: metil guanosina
MOPS.....	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
NBT.....	Nitroblue tetrazolium
ng:	nanogramos 10 ⁻⁹ gramos
<i>nptII</i> :	Secuencia codificante de la neomicina fosfotransferasa II que otorga resistencia a kanamicina
nt.....	nucleótido
P30:	Secuencia codificante de la proteína P30 (SAG1) de <i>T. gondii</i>
pb.....	pares de bases
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF.....	floruro de fenilmetilsulfonilo
pNOS:.....	promotor del gen de la nopalina sintetasa de <i>A. tumefaciens</i>
Prn:	Promotor del operón de genes ribosomales plastídico de tabaco
Psi.....	Unidad de presión (libras por pulgada cuadrada)
PVX.....	<i>Potato Virus X</i>
PVY.....	<i>Potato Virus Y</i>
r.p.m.....	revoluciones por minuto
RE.....	Retículo endoplasmático
RIA.....	Región repetida invertida A del genoma plastídico
RIB	Región repetida invertida B del genoma plastídico
rNTPs.....	mezcla de los cuatro ribonucleótidos trifosfato
SDS.....	Dodecil sulfato de sodio
ss:	Secuencia codificante del péptido señal del precursor de la proteína AP24 de tabaco
ssAP:	Secuencia de los primeros 38 aminoácidos del precursor de la proteína AP24 de tabaco.
ss-AP- <i>hegf</i> :	Fusión de <i>hegf</i> a la secuencia ssAP
ss- <i>hegf</i> :	Fusión de <i>hegf</i> a la secuencia ss
TMB.....	3,3', 5,5' tetrametilbenzamidina
TMV.....	<i>Tobacco mosaic virus</i>
tNOS:	Terminador del gen de la nopalina sintetasa de <i>A. tumefaciens</i>
trnA:	Secuencia del ARN de transferencia para Alanina
trnI:	Secuencia del ARN de transferencia para Isoleucina
Trps16:	Terminador del gen <i>rps16</i> de tabaco
<i>uidA</i> :	Secuencia codificante de la β-glucuronidasa (GUS) bacteriana
Ω:	Secuencia potenciadora de la traducción del TMV

INTRODUCCIÓN

LA PRODUCCIÓN DE BIOFÁRMACOS

La creciente utilización de péptidos y proteínas terapéuticos tanto en la medicina humana como veterinaria, ha multiplicado los esfuerzos para desarrollar nuevos sistemas de producción de moléculas recombinantes seguras y a bajo costo.

El mercado mundial de biofármacos de uso humano alcanza actualmente los 30.000 millones de U\$S y se estima que éste se duplicará para el año 2010 (www.datamonitor.com). Más de 200 productos se encuentran en evaluación clínica, liderados por los anticuerpos monoclonales de los cuales unos 70 se estarían comercializando en los próximos años (Peterson y Arntzen, 2004). Sólo cuatro moléculas comprenden el 75% de la producción actual y, si las predicciones son correctas, la demanda podría superar la capacidad de manufactura a menos que se desarrollen nuevos sistemas de producción (Dry, L. www.bio.org/pmp/index.asp).

El uso de sistemas de fermentación bacterianos se ve restringido por las dificultades asociadas a la expresión de proteínas animales en un entorno procarionta. La falta de modificaciones postraduccionales, el plegado incorrecto de la proteína y la formación de cuerpos de inclusión, limitan la obtención de productos biológicamente activos o cuyo costo de purificación y renaturalización sea económicamente sostenible.

La utilización de sistemas basados en cultivos de células eucariotas tiene la ventaja de que permiten la síntesis de proteínas animales con un alto grado de similitud con el organismo nativo. Sin embargo, la obtención y mantenimiento de las líneas celulares es un proceso largo y costoso que implica grandes inversiones adicionales cuando se requiere incrementar la escala de producción (Giddings *et al.*, 2000).

Estos sistemas requieren de personal técnico especializado y conllevan grandes riesgos económicos en caso de que ocurran contaminaciones en la línea de producción, tanto si el contaminante es o no patogénico para la salud humana. En este entorno económico, la agricultura molecular, es decir, la utilización de animales o plantas como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes, se ha constituido en una alternativa posible a los sistemas de producción en microorganismos y cultivos de células animales (Chadd y Chamow, 2001; Larrick y Thomas, 2001).

AGRICULTURA MOLECULAR

Aunque la producción de proteínas terapéuticas en animales transgénicos permite obtener productos muy similares a los sintetizados en el organismo animal original, requiere un tiempo de desarrollo muy largo y costoso. El aumento en la escala de producción es lento y se limita a los ciclos naturales de crecimiento de la especie utilizada. Además, existe el riesgo de contaminación con virus animales y priones (Chadd y Chamow, 2001; Larrick y Thomas, 2001; Ma *et al.*, 2003).

Es por ello que las ventajas asociadas a la producción de proteínas recombinantes en biorreactores vegetales ha transformado a éstos en una opción altamente competitiva.

LOS BIORREACTORES VEGETALES

La principal ventaja de las plantas como sistemas de producción es la disponibilidad prácticamente ilimitada de biomasa que puede obtenerse utilizando la infraestructura ya existente para la siembra, cosecha, almacenamiento y procesado de los cultivos. El capital de inversión inicial y el costo para el aumento en la escala de producción son relativamente bajos. Más aún, el volumen de producción es extremadamente flexible y puede adaptarse rápidamente a las demandas del mercado incrementando o disminuyendo la superficie sembrada. Por otra parte, una vez establecido el cultivo, no se requiere de personal especializado, no hay riesgos de contaminación con patógenos animales, endotoxinas bacterianas o secuencias de ADN oncogénicas y puede aprovecharse el conocimiento previo de los sistemas de molienda y extracción en las primeras etapas del proceso de purificación. Una ventaja adicional es que las plantas permiten el almacenamiento estable de la proteína recombinante en semillas y tubérculos, facilitando su conservación, transporte y distribución. Los mecanismos de síntesis y secreción de proteínas y las modificaciones postraduccionales son las propias de las células eucariotas y permiten la producción y ensamblado de proteínas multiméricas como por ejemplo, anticuerpos. Además, gozarían de una mayor aceptación pública que la utilización de animales transgénicos (Daniell *et al.*, 2001a; Fischer *et al.*, 2004; Giddings, 2001; Ma *et al.*, 2003; Twyman, *et al.*, 2003).

Los costos de producción de proteínas recombinantes en distintos sistemas de expresión han sido comparados en diversos estudios. Aunque las inferencias hechas en cada caso son diferentes, en todos se demuestra que, a menos que los niveles de expresión sean excesivamente bajos, los costos de producción en plantas son generalmente inferiores a los de otros sistemas. Los valores para la producción de proteínas recombinantes en cultivos de la línea celular CHO, fluctúan entre los 300 y los 3.000 U\$\$/g de proteína dependiendo del rendimiento y de factores operacionales. Asimismo, la producción de anticuerpos en hibridomas alcanza costos de casi 5.000 U\$\$/g de proteína (Khoudi *et al.*, 1999). Por el contrario, en una evaluación económica completa para la producción de la enzima β -glucuronidasa en semillas de maíz, se calculó un costo de 43 U\$\$/g de enzima purificada, incluso con un nivel de expresión tan bajo como el 0,015% del total de las proteínas solubles (% TPS) (Evangelista *et al.*, 1998). Algunas estimaciones consideran inclusive que los costos de producción en plantas pueden reducirse a menos de 0,2 U\$\$/g de proteína recombinante incrementando los niveles de expresión a valores de entre el 0,5% y el 1% de las proteínas totales (Smith y Glick, 2000).

Más del 85% del costo de producción de una proteína recombinante depende del proceso de purificación. En este sentido, las plantas poseen ventajas propias que permiten reducir ampliamente estos valores, a través de la expresión directa en tejidos comestibles o la acumulación en tubérculos o semillas, lo que permite restringir el volumen inicial del tejido a extraer. Las perspectivas de aumentar aún más los niveles de expresión, y el desarrollo de técnicas para reducir los costos de purificación de las proteínas sintetizadas en los sistemas vegetales, pronostican que pueden alcanzarse costos entre 10 y 100 veces inferiores a los de los fermentadores bacterianos (Chadd y Chamow, 2001; Kusnadi *et al.*, 1997; Smith y Glick, 2000; Twyman *et al.*, 2003).

En consecuencia, la producción económicamente rentable de proteínas recombinantes en plantas implica cumplir con tres requisitos primordiales: a) elevar los niveles de expresión, b) reducir los costos de purificación, y c) lograr un producto de características idénticas o similares al sintetizado en el sistema nativo.

VACUNAS Y ANTICUERPOS: VENTAJAS PARTICULARES DE LOS SISTEMAS VEGETALES.

Vacunas

La mayoría de las vacunas utilizadas actualmente consiste en cepas de virus o bacterias inactivadas o atenuadas. A excepción de tres vacunas orales (la Sabin contra el virus de la polio, una vacuna contra la fiebre tifoidea y una contra rotavirus), las demás son suministradas por inyección. La utilización de estos agentes atenuados o de agentes relacionados, que pueden mutar y volverse infecciosos, implica riesgos particularmente importantes en casos de inmunosupresión por malnutrición o enfermedades como el SIDA.

El desarrollo de las vacunas a subunidades trajo asociado un margen de seguridad considerable, pues comprende la utilización de sólo una parte del patógeno. Sin embargo, éstas no son eficaces para generar una respuesta inmune por vía oral y deben ser inyectadas en todos los casos. Esto conduce a un aumento de su costo final, limitando su distribución en países en desarrollo donde las enfermedades infecciosas son de mayor importancia epidemiológica. Una de las aplicaciones más prometedoras de las plantas como biorreactores es su potencial uso para la producción de antígenos en tejidos comestibles. Esto combinaría las ventajas de las vacunas orales con las de las vacunas recombinantes, es decir la posibilidad de generar inmunidad en las mucosas (sitio de contacto inicial de la mayoría de los patógenos humanos), con la seguridad que brindan las vacunas a subunidades. La producción de proteínas antigénicas en el tejido vegetal permitiría protegerlas en cierta medida, de la degradación en el ambiente del tracto gastrointestinal, un factor crítico para desarrollar una vacuna oral exitosa. A su potencial bajo costo de producción, se suma la ventaja de su fácil distribución y administración. La expresión en tejidos de almacenamiento, en los que las proteínas son estables a temperatura ambiente, permitiría obviar la necesidad de establecer y mantener una cadena de frío, una de las limitaciones económicas más importantes para la distribución de las vacunas en muchas regiones geográficas del mundo (Mason *et al.*, 2002; Mor *et al.*, 1998; Sala *et al.*, 2003; Streatfield y Howard, 2003; Walmsley y Arntzen, 2003).

Además de la obtención de altos niveles de expresión del antígeno, la producción de vacunas orales en plantas debe enfrentar otros desafíos. El antígeno debe conservar su integridad estructural y actividad funcional para inducir una respuesta inmune protectora, y el vehículo vegetal utilizado no debe ser inmunogénico, al mismo tiempo que el antígeno no debe generar tolerancia (Tacket y Mason, 1999).

Aunque inicialmente se pensó en utilizar para la vacunación oral el tejido vegetal sin procesar, la variabilidad en el nivel de expresión del antígeno entre plantas de un mismo cultivo, y la necesidad de controlar la dosis suministrada en forma precisa, llevaron a plantear la producción de cápsulas conteniendo tejido liofilizado. De esta forma, puede controlarse la dosis a administrar y, en algunos casos, utilizar compuestos naturalmente presentes en las plantas a modo de adyuvantes (Mason *et al.*, 2002).

Hasta la actualidad, se ha expresado en plantas un número considerable de antígenos, que incluyen potenciales vacunas contra los agentes causales de diarreas, como los rotavirus, las cepas enterotoxigénicas de *E. coli* (Vieira da Silva *et al.*, 2002, Haq *et al.*, 1995), el *Vibrio cholerae* (Wang *et al.*, 2001) y el virus Norwalk (Mason *et al.*, 1996), así como contra las infecciones producidas por los virus de la hepatitis B y C (Thanavala *et al.*, 1995, Mason *et al.*, 1992), HIV (Yusinov *et al.*, 1997), el virus respiratorio sincicial (Korban *et al.*, 2002), el virus del papiloma humano, el virus de la rabia (Modelska *et al.*, 1998), y el virus aftosa (Carrillo *et al.*, 1998, Dus Santos *et al.*, 2002), agentes patógenos bacterianos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus anthracis* y el parásito responsable de la malaria, *Plasmodium falciparum* (Ghosh *et al.*, 2002), entre otros (Streatfield y Howard, 2003). Cuatro de estos antígenos se evaluaron en ensayos clínicos en humanos. Estos incluyen la inmunización por ingestión de hojas de lechuga que expresan el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B humana (HBsAg) (Kapusta *et al.*, 1999), tubérculos de papa que expresan la subunidad B de la toxina de *E. coli* enterotoxigénica (Tacket *et al.*, 1998), o la cápside del virus Norwalk (Tacket *et al.*, 2000) y hojas de espinaca infectadas con un vector viral derivado del *Alfalfa mosaic virus* (AIMV) que expresa determinantes antigénicos del virus de la rabia (Yusinov *et al.*, 2002). En todos ellos se observó algún tipo de respuesta inmune, tanto sistémica como en mucosas, lo que alienta las posibilidades de desarrollar vacunas orales contra éstos y otros patógenos humanos.

Anticuerpos

Los anticuerpos séricos de mamíferos son glicoproteínas constituidas por dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas, unidas entre sí por puentes disulfuro. El extremo amino terminal de las cuatro cadenas es variable y determina la especificidad, reconocimiento y unión al antígeno. En mamíferos se producen cinco clases de inmunoglobulinas (G, M, A, D y E), cada una con distintas propiedades efectoras. Los anticuerpos secretorios son dímeros de los anticuerpos séricos unidos por un componente adicional llamado cadena de unión, y protegidos de la acción de las proteasas por un polipéptido extra, el componente secretorio (Chadd y Chamow, 2001; Fischer *et al.*, 2003; Peeters *et al.*, 2001).

Las fuentes tradicionales de anticuerpos monoclonales son los hibridomas, líneas de células B murinas inmortalizadas por fusión a un mieloma. Sin embargo, y al igual que en otros sistemas basados en células en cultivo, los costos de establecimiento, mantenimiento y aumento en la escala de producción son altos. La capacidad de las plantas de ensamblar moléculas complejas como los anticuerpos, las ha transformado en uno de los sistemas más promisorios para responder a las necesidades de producción. Los sistemas vegetales han resultado ser eficientes para la producción funcional de los distintos tipos de moléculas derivadas de los anticuerpos como los fragmentos Fab o las porciones de cadena simple variables (scFv), e incluso para el ensamblado de los anticuerpos secretorios por cruzamiento de plantas transgénicas precursoras que producen cada una de las subunidades (Ma *et al.*, 1995).

Entre los anticuerpos expresados en plantas se encuentran los que reconocen el antígeno carcinoembriogénico, un antígeno del virus respiratorio sincicial (EPIcyte www.epicyte.com), el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B humano (HBsAg) (Ramírez *et al.*, 2002), la glicoproteína B del virus del herpes simple humano de tipo 2, HSV-2 (Zeitlin *et al.*, 1998), anticuerpos anti-esperma para su utilización como anticonceptivos, anti-idiotipos del linfoma no Hodgkins y un reactivo para diagnóstico del HIV (Schünmann *et al.*, 2002), (Fischer *et al.*, 2003; Hood *et al.*, 2002; Larrick y Thomas, 2001; Peeters *et al.*, 2001; Stöger *et al.*, 2002).

Uno de los ejemplos más avanzados es el caso de una IgA secretoria expresada en tabaco que reconoce un antígeno de *Streptococcus mutans*, el principal agente causal de la caries dental. En ensayos clínicos llevados a cabo en humanos, en los que se aplicó

este anticuerpo en forma tópica luego del tratamiento con un antiséptico, se verificó una protección efectiva y específica contra la recolonización por *S. mutants* durante al menos cuatro meses (www.planetbiotechnology.com, Ma *et al.*, 1998, Larrick *et al.*, 2001). Estos resultados son altamente promisorios, especialmente si se considera la expresión de este anticuerpo en un tejido comestible. Es importante destacar que en ninguno de los voluntarios se detectó respuesta inmunológica contra la proteína recombinante o las cadenas de glicanos vegetales (Fischer *et al.*, 2003).

OTRAS PROTEÍNAS EXPRESADAS EN PLANTAS

Además de los antígenos y anticuerpos, existen diversos ejemplos de proteínas de uso farmacológico e industrial expresadas en tejidos vegetales. La producción de somatotropina humana (hST) en semillas de tabaco (Leite *et al.*, 2000), la seroalbúmina humana (HSA) en papas (Sijmons *et al.*, 1990), la aprotinina bovina en semillas de maíz (Zhong *et al.*, 1999, Azzoni *et al.*, 2002), y el factor estimulante de granulocitos y macrófagos (hGM-CSF) en semillas de tabaco (Sardana *et al.*, 2002) son sólo algunos de ellos (Daniell *et al.*, 2001a; Giddings *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2003). Uno de los más destacados es la expresión en tabaco de la lipasa gástrica canina, utilizada para el tratamiento de insuficiencias pancreáticas y fibrosis quística, que se encuentra en la etapa de ensayos clínicos (Gruber *et al.*, 2001; www.meristem-therapeutics.com).

Otras aplicaciones de las plantas como biorreactores son la producción de enzimas de uso industrial, como la avidina de pollo y la tripsina bovina en semillas de maíz, ambas aprobadas para su comercialización (Hood *et al.*, 1997; Kusnadi *et al.*, 1998; Woodard *et al.*, 2003; www.prodigene.com), suplementos alimenticios como la fitasa de *A. niger* en semillas de tabaco y colza (Pen *et al.*, 1990; Ponstein *et al.*, 2002) o polímeros como el colágeno (Ruggiero *et al.*, 2000), la seda de araña (Scheller *et al.*, 2001), o plásticos biodegradables (Bohmert *et al.*, 2000).

ESTRATEGIAS PARA OPTIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN LOS SISTEMAS VEGETALES.

La optimización de los niveles de producción de la proteína recombinante puede lograrse siguiendo diversas estrategias. La elección de la misma o combinación de ellas, dependerá de las características de la proteína a sintetizar, de la especie vegetal utilizada y de las necesidades de producción. Generalmente, es difícil predecir cual de estos aspectos tendrá mayor peso para una proteína particular. Ello requiere, por lo tanto, ensayar múltiples variables hasta alcanzar las mejores condiciones para un procedimiento de producción determinado. Los elementos a tener en cuenta son la elección del sistema de expresión y del germoplasma a transformar y el uso de herramientas moleculares para el diseño de las construcciones que contengan las secuencias de las proteínas a expresar.

SISTEMAS DE EXPRESIÓN NO INTEGRATIVOS

Los sistemas de expresión no integrativos o de expresión transitoria utilizados para la producción de proteínas recombinantes en tejidos vegetales se basan en el uso de vectores virales o la técnica de agroinfiltración.

Vectores Virales

En los vectores virales, el gen de interés es clonado dentro del genoma de un virus vegetal, generalmente a ARN, bajo el control de un promotor subgenómico. Los transcriptos virales son entonces utilizados para infectar los tejidos vegetales y producir así la proteína recombinante, aprovechando las altas tasas de multiplicación propias de la replicación viral. La inserción del transgén en el genoma viral puede hacerse por reemplazo de genes no esenciales, mediante el clonado bajo un promotor subgenómico adicional o por fusión a un gen viral. Las fusiones a la proteína de la cápside permiten la presentación de antígenos en la superficie de las partículas virales, una estrategia de gran interés para la producción de vacunas (Fischer *et al.*, 1999a; Gleba *et al.*, 2004). La infección inicial con vectores virales a ARN se efectúa generalmente por inoculación

mecánica de las hojas del huésped con transcriptos obtenidos *in vitro*. En etapas posteriores puede amplificarse utilizando directamente extractos infectivos de estas plantas.

Un ejemplo interesante de la aplicación de los vectores virales para la expresión de biofármacos, es la utilización del *Tobacco mosaic virus* (TMV) para la producción de anticuerpos personalizados contra linfomas humanos. La estrategia se basa en el hecho de que cada clon maligno de células B expresa una inmunoglobulina de superficie única que constituye un marcador específico para cada paciente. Aunque la producción de hibridomas que expresen inmunoglobulinas específicas es posible, el proceso es largo, costoso y poco seguro. La utilización de un vector viral permite obtener en pocas semanas cantidades de fragmentos Fv de simple cadena (scFv) de cada anticuerpo a partir del gen específico para cada linfoma (Mc Cormick *et al.*, 1999).

Agroinfiltración

La agroinfiltración consiste en la inoculación mecánica de un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* en el tejido vegetal mediante la infiltración por vacío o por inyección directa utilizando una jeringa. La construcción genética a expresar, clonada entre los bordes derecho e izquierdo (RB y LB) del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, es transferida al núcleo de aquellas células que son infectadas por la bacteria, en donde ocurre la transcripción (Fischer *et al.*, 1999a). Aunque esta técnica se utiliza de rutina para la transformación estable de *A. thaliana* por infiltración de los tejidos reproductivos, su uso más común implica la infiltración de hojas para la expresión transitoria de distintas estructuras genéticas, principalmente amplicones virales. En los amplicones, la secuencia de ADN de un vector viral a ARN es clonada bajo el control transcripcional de un promotor activo en plantas e introducida a su vez entre los bordes RB y LB de un plásmido Ti. De esta forma, la infección en los tejidos infiltrados con las agrobacterias recombinantes se produce inicialmente por la transcripción del ARN viral a partir del promotor vegetal y se amplifica rápidamente por la multiplicación del virus a partir de su propia replicasa.

Ventajas y limitaciones

La principal ventaja de los sistemas de expresión transitoria es que son particularmente adecuados como una forma rápida de verificar la funcionalidad y estabilidad del producto genético antes de proceder a la producción a gran escala en plantas transgénicas (Fischer *et al.*, 1999a). Por otra parte, la expresión del gen heterólogo se realiza en un estadio avanzado del crecimiento de la planta, lo que eliminaría potenciales efectos negativos sobre el desarrollo. Sin embargo, su aplicación práctica se ve limitada por la necesidad de infectar o infiltrar plantas en cada ciclo de producción, la inestabilidad genética, las restricciones en el tamaño de la secuencia a introducir, la generación de síntomas, y la alta tasa de silenciamiento, así como por planteos de bioseguridad referidos a la contención genética.

El silenciamiento postranscripcional es un conjunto de fenómenos epigénéticos que se inician en respuesta a la infección viral y que conducen a la degradación específica de los mensajeros que iniciaron el silenciamiento y a la restricción de la infección sistémica. Muchos virus expresan proteínas que bloquean algunos de estos pasos, inhibiendo el establecimiento de este mecanismo. Esta supresión del silenciamiento no es específica, y puede extenderse a otros virus que co-infecten la misma planta. La identificación y clonado de estas proteínas permitió obtener plantas transgénicas en las que el silenciamiento está suprimido, y que pueden utilizarse para incrementar los niveles de expresión de las proteínas expresadas por los vectores virales o los amplicones. Los supresores de silenciamiento más ampliamente estudiados son la proteína HC-PRO del *Potato virus Y* (PVY), la 2b del *Cucumber mosaic virus* (CMV), la p25 de los potexvirus, y la p19 de *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) (Baulcombe, 2002; Baulcombe, 2004; Roth *et al.*, 2004).

SISTEMAS DE EXPRESIÓN INTEGRATIVOS I: PLANTAS TRANSGÉNICAS

NUCLEARES

La utilización de sistemas de expresión integrativos permite la obtención de líneas estables de plantas en las que la información genética introducida se transmite a las generaciones sucesivas. Sin embargo, diversos factores que no pueden ser controlados precisamente mediante el diseño de la construcción, conducen a una

expresión variable del transgén y en algunos casos a su completa inactivación. Tales factores incluyen el sitio de integración, la estructura del *locus* transgénico, el número de copias, y la presencia de copias truncadas o rearrregladas del transgén así como el silenciamiento génico transcripcional y postranscripcional asociados a los factores antes mencionados. Aunque se están investigando formas de mejorar la localización genética para eliminar estos efectos de posición, en la práctica el desarrollo de plantas transgénicas comerciales requiere el análisis de una gran cantidad de eventos de transformación para identificar variaciones fenotípicas y agronómicas que determinen rendimientos económicamente viables (Ma *et al.*, 2003).

Métodos de transformación

Las dos técnicas más utilizadas para la obtención de plantas transgénicas son la transformación mediada por *Agrobacterium sp.* y la biobalística. La elección de cada método dependerá de una combinación de elementos, como la especie a transformar y la experiencia del laboratorio, así como de aspectos de propiedad intelectual.

La transformación mediada por *Agrobacterium sp.* es el método más utilizado en la mayoría de las dicotiledóneas. Este se basa en la capacidad de la bacteria de transferir e integrar en el genoma nuclear aquellas secuencias clonadas entre los bordes RB y LB del plásmido Ti. Este mecanismo está bien establecido y se han diseñado numerosos vectores binarios de transformación en los que las funciones requeridas en *trans* son aportadas por un derivado del plásmido Ti, y la construcción a transformar es clonada entre las secuencias RB y LB en un plásmido capaz de replicarse en *E. coli* y *A. tumefaciens*. La baja susceptibilidad de las monocotiledóneas a la infección por *A. tumefaciens*, ha restringido la aplicación de esta técnica en este grupo de plantas. No obstante, se han establecido protocolos para la transformación de algunas monocotiledóneas, principalmente de arroz (Chan *et al.*, 1992; Hiei *et al.*, 1994).

La biobalística posee la ventaja de que puede aplicarse a casi cualquier especie, puesto que no depende de la susceptibilidad a la infección por *Agrobacterium*, y es el método de elección para la transformación de la mayoría de las monocotiledóneas. El procedimiento consiste en la inoculación física de las células blanco mediante el disparo, sobre el tejido vegetal, de micropartículas de oro o tungsteno recubiertas con el ADN a transformar. La aceleración necesaria para que estas partículas atraviesen la

pared y membrana celulares se consigue generalmente mediante la descompresión de un gas a alta presión utilizando un dispositivo denominado cañón génico (Figura I.1).

Una de las principales desventajas de la biobalística es que el número de copias insertadas en el genoma es generalmente alto, lo que dificulta la obtención de homocigotas e incrementa la tasa de silenciamiento transcripcional y postranscripcional.

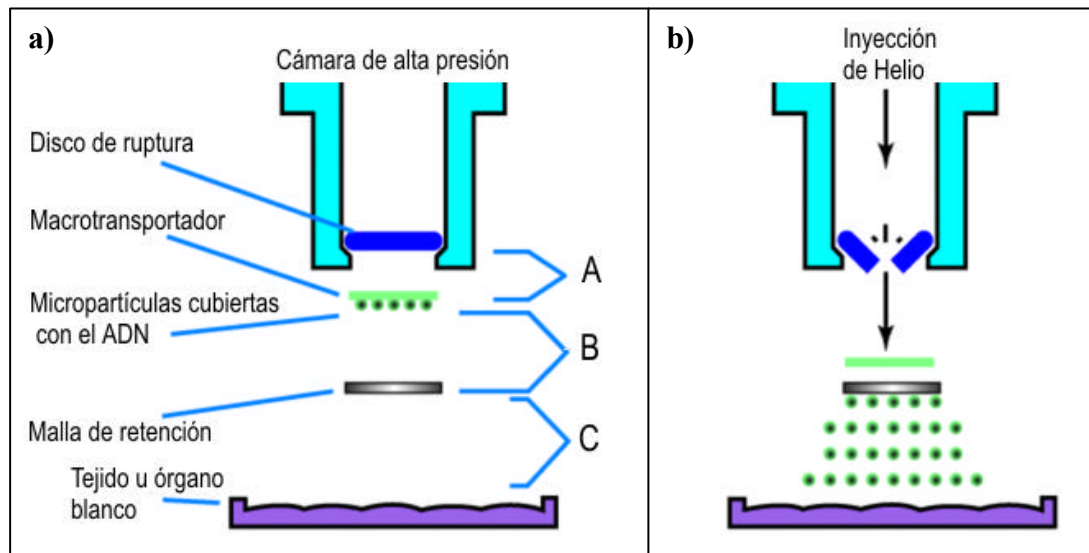


Figura I.1. *Funcionamiento de un cañón génico.* a) Esquema previo al disparo b) El helio inyectado en la cámara de alta presión provoca que el disco de ruptura se fracture al alcanzar el límite de presión máxima que éste soporta. El gas rápidamente descomprimido impulsa al macrotransportador contra la malla de retención liberando las micropartículas con el ADN, que viajan hasta penetrar el tejido blanco. Las distancias A, B y C pueden ser modificadas y determinan la velocidad final que alcanzarán las micropartículas y, por tanto, la capacidad de penetración en el tejido bombardeado.

HERRAMIENTAS MOLECULARES

Diseño de la construcción genética

El diseño de la construcción genética es un elemento importante para mejorar los niveles de transcripción y traducción y así alcanzar altos niveles de acumulación de la proteína sintetizada. Las construcciones para la expresión son estructuras en las cuales la secuencia que codifica la proteína recombinante, se encuentra flanqueada por elementos reguladores que son activos en plantas, como promotores, sitios de poliadenilación, intrones, secuencias de localización subcelular y secuencias 5' y 3' no traducidas (Ma *et al.*, 2003, Twyman *et al.*, 2003).

Promotores constitutivos

La necesidad de optimizar los niveles de expresión ha llevado al estudio de secuencias que en la naturaleza inducen altas tasas de transcripción, para su uso directo o como promotores quiméricos en los que se ensamblan diversas regiones reguladoras (Rancé *et al.*, 2002). El promotor 35S del *Cauliflower mosaic virus* (35SCaMV) es, por mucho, el más utilizado para la expresión en dicotiledóneas puesto que posee alta actividad y se expresa en forma constitutiva en la mayoría de los tejidos. En monocotiledóneas este promotor posee baja actividad y en cambio se emplean los de la ubiquitina 1 de maíz y de la actina de arroz. Un blanco sumamente atractivo para el estudio de su regulación es el promotor de la ribulosa bifosfato carboxilasa (rubisco), la enzima responsable de la fijación del CO₂ y la de mayor expresión en plantas. Si bien estos altos niveles de expresión dependen de diversos factores, y no sólo de la tasa de transcripción, el uso del promotor del gen de la subunidad pequeña (*rbcS1*) de la rubisco del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) para la expresión de la β -glucuronidasa en tabaco, resultó en un nivel de producción de hasta un 10% TPS (Outchkourov *et al.*, 2003).

Promotores tejido-específicos

Los promotores constitutivos no son de utilidad cuando se desea limitar la expresión a un tejido en particular como semillas o tubérculos. Para ello se utilizan promotores tejido-específicos como los de la glutelina de arroz y trigo, y las leguminas de *Phaseolus*, las que se expresan exclusivamente en semillas. La utilización de estos promotores tiene la ventaja de que, al restringir la expresión a determinados tejidos, se evita la exposición de la proteína recombinante a herbívoros, insectos polinizadores y microorganismos de la rizósfera, así como los efectos adversos de la expresión de la proteína recombinante, si los hubiera, sobre el crecimiento y desarrollo de las partes vegetativas de la planta (Twyman *et al.*, 2003).

Un ejemplo de cómo la elección del promotor influye sobre el rendimiento es un trabajo en el que se evalúa la expresión de anticuerpos de cadena simple en semillas de *A. thaliana*. Mientras que la utilización del promotor 35SCaMV produjo niveles de expresión de sólo el 1% TPS, al utilizar el promotor de la β -faseolina de *Phaseolus vulgaris* se obtuvo hasta un 36% TPS en semillas (De Jaeger *et al.*, 2002).

Promotores inducibles

Otra posibilidad es limitar la expresión a un momento o a un estadio determinado del desarrollo, por ejemplo, inmediatamente antes de la cosecha e incluso luego de producirse ésta. En este caso, se han desarrollado sistemas de promotores inducibles por aplicación de diversos estímulos químicos o físicos externos. Estos promotores o sistemas inducibles incluyen aquellos que responden a heridas, luz UV, etanol, cobre, tetraciclina, al insecticida metoxifenocida, o dexametasona y otros esteroides (Padidam, 2003; Yoshida y Shinmyo, 2000; Kim *et al.*, 2003).

Otras secuencias reguladoras

Un elemento a tener en cuenta en el diseño de las construcciones genéticas es la elección de las secuencias terminadoras de la transcripción. Dentro de las secuencias 3' no traducidas más utilizadas se encuentra la del gen 35S del CaMV y la del gen de la nopalina sintetasa (*nos*) de *A. tumefaciens*. Un ejemplo de la importancia de esta elección, es el estudio de la expresión del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B humana (HBsAg) en tubérculos de papa. En este trabajo, el reemplazo de la secuencia terminadora de la transcripción de la nopalina sintetasa por la del gen del inhibidor de la proteinasa II de papa, condujo a un aumento en los niveles de expresión del HBsAg de 0,33 µg/g de tubérculo a 16 µg/g (Richter *et al.*, 2000).

Otros factores que pueden incrementar la tasa de expresión son la incorporación de secuencias potenciadoras de la transcripción y la traducción, la utilización de un intrón en la secuencia 5' no traducida, la eliminación de secuencias que desestabilizan al mensajero y la optimización del consenso en el codón de iniciación y del uso de codones de acuerdo a la especie a transformar (Diehn *et al.*, 1996; Gallie, 1998; Ma *et al.*, 2003; Twyman *et al.*, 2003).

Localización subcelular

La compartimentalización de la proteína recombinante es una estrategia que puede utilizarse tanto para incrementar los niveles de expresión, como para facilitar su purificación. El compartimento subcelular al cual se dirige la proteína recombinante influirá sobre el plegado, el ensamblado y las modificaciones postraduccionales. Estos

factores pueden contribuir a la estabilidad de la misma y determinarán el rendimiento final (Twyman *et al.*, 2003, Figura I.2).

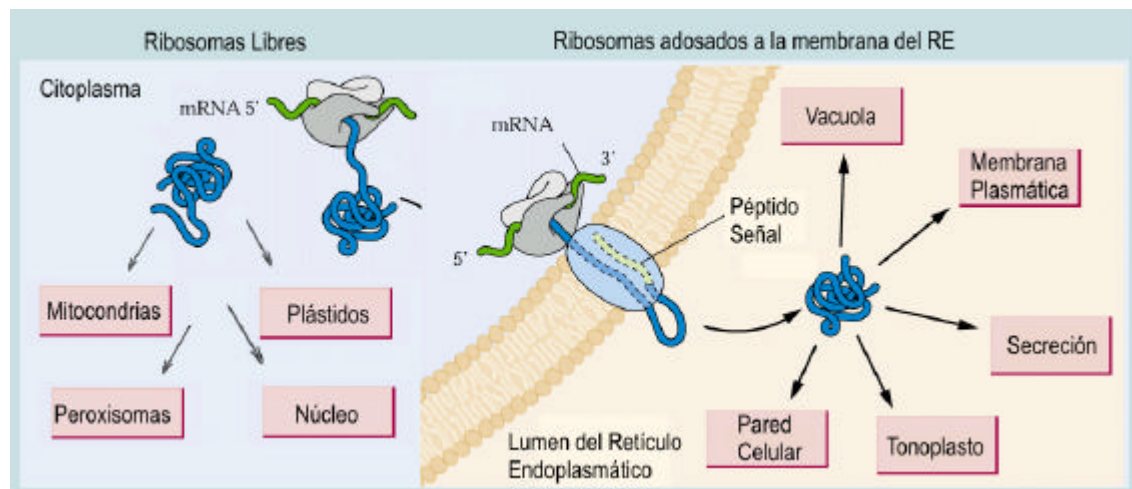


Figura I.2. Esquema general de los diversos compartimentos subcelulares a los que puede dirigirse la proteína sintetizada. Las proteínas que poseen péptidos señal son sintetizadas por los ribosomas adosados a la membrana del retículo endoplasmático y transportadas hacia el lumen de manera co-traducciona, en donde son retenidas o transportadas hacia otros compartimentos. El resto de las proteínas son traducidas por los ribosomas libres en el citoplasma y dirigidas de forma postraducciona a distintas organelas (Adaptado de Raikhel y Chrispeels, 2000).

La vía de secreción

En las células eucariotas las proteínas secretadas se sintetizan como pre-proteínas con un péptido señal amino terminal que dirige su transporte hacia el lumen del retículo endoplasmático (RE). Estos péptidos señal exhiben muy poca homología a nivel de aminoácidos, pero su función y estructura se encuentran altamente conservadas entre plantas y animales. Se caracterizan por tener una estructura tripartita con un segmento amino terminal corto, rico en aminoácidos cargados positivamente, un segmento hidrofóbico central y un segmento carboxilo terminal polar, que contiene el sitio de corte de la peptidasa de la señal (Emanuelsson y von Heijne, 2001). El reconocimiento y corte de estos péptidos señal puede ser afectado por mutaciones que modifiquen su estructura, pero se ha demostrado que son las posiciones -1 y -3 respecto del sitio de corte, las que determinan la fidelidad del mismo. Estas posiciones están generalmente ocupadas por aminoácidos pequeños y neutros, siendo alanina el más frecuente (von Heijne 1983; von Heijne y Abrahmsen, 1989).

Los ARNm que codifican estos péptidos señal, son traducidos por los ribosomas adosados a la membrana del RE y la proteína sintetizada es transportada al lumen en forma co-traducciona. Una vez que el péptido señal ha ingresado al RE, es

inmediatamente escindido por la peptidasa de la señal. El lumen provee un entorno oxidativo, con una alta concentración de chaperonas que contribuyen al plegado y ensamblado de las proteínas sintetizadas, lo que incrementa su estabilidad (Kleizen y Braakman, 2004; Tu y Weissman, 2004). En ausencia de cualquier otra señal, la proteína entrará en la vía secretoria, atravesando el aparato de Golgi hacia el apoplasto. La secreción de las proteínas recombinantes permite la implementación de técnicas para facilitar su purificación a partir del medio de cultivo en suspensiones celulares o por rizosecreción.

Producción de proteínas recombinantes en suspensiones celulares

La producción de proteínas recombinantes en suspensiones celulares tiene la ventaja de que la extracción puede hacerse directamente a partir del medio de cultivo, reduciendo así los costos de purificación. Sin embargo, el costo total de producción sigue siendo mayor que en la planta entera, lo que restringe su aplicación a proteínas con alto valor agregado o que se requieran en bajas cantidades para tratamientos terapéuticos específicos (Doran, 2000). Las limitaciones técnicas de este sistema son las pobres tasas de crecimiento, la variación somaclonal, la inhibición de la formación del producto a altas densidades celulares, la formación de agregados, el crecimiento de la pared celular y la sensibilidad a la ruptura, que requieren de la optimización de las condiciones de cultivo (Fischer *et al.*, 1999b). Existen diversos ejemplos de producción de enzimas y proteínas de valor terapéutico en suspensiones celulares (Doran 2000, Fischer *et al.*, 1999b, Sharp y Doran, 2000, Firek *et al.*, 1993). Uno de los más estudiados, es la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (hGM-CSF) en células de tabaco, en el cual se ha observado que pequeñas variaciones en las condiciones del cultivo, como el agregado de gelatina, permiten elevar los rendimientos de la proteína secretada (Hong *et al.*, 2002; James *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002).

Rizosecreción

La rizosecreción consiste en la recuperación de la proteína recombinante secretada por las raíces a partir del medio hidropónico en el que se desarrolla la planta transgénica. Esta técnica tiene la ventaja de que permite la producción continua en un

medio sencillo. Este sistema se ha utilizado para expresar la proteína GFP (*green fluorescent protein*), una xilanasa bacteriana y la fosfatasa alcalina humana, así como una IgG completa, en plantas de tabaco (Borisjuk *et al.*, 1999; Drake *et al.*, 2003).

Localización en las organelas subcelulares

La incorporación de otras señales a la proteína sintetizada, permite su retención en el lumen del RE o el transporte a otras organelas como las vacuolas o los cloroplastos. La localización más apropiada para optimizar la acumulación de una proteína recombinante dependerá de las características de la misma. Estudios comparativos realizados con anticuerpos han demostrado que, salvo algunas excepciones, la retención en el lumen del RE (mediante el agregado del tetrapéptido H/KDEL), permite obtener rendimientos superiores a los obtenidos cuando estos anticuerpos son secretados al apoplasto (De Wilde *et al.*, 2002; Stöger *et al.*, 2000; Twyman *et al.*, 2003). Otra ventaja de la retención en el RE es que se previene el pasaje por el aparato de Golgi, en donde se incorporan los glicanos específicos de plantas que difieren de los presentes en mamíferos.

Las señales de transporte a las vacuolas no se encuentran tan conservadas como las de los péptidos señal, y pueden estar ubicadas en ambos extremos de la proteína, así como dentro de la misma, requiriendo o no del pasaje a través del aparato de Golgi (Jiang y Sun, 2002; Miller y Anderson, 1999).

Aunque estos mecanismos son válidos para la mayoría de las células, las vías de localización subcelular no parecen ser tan claras en el endosperma de los cereales, debido a la existencia de diversos tipos de vacuolas especializadas en la acumulación de proteínas de almacenamiento. Este es un elemento muy importante a tener en cuenta cuando se planea una estrategia de expresión en semillas, ya que se ha observado la localización imprevista de proteínas en compartimentos subcelulares diferentes a los que se intentaba dirigirlos. Por ejemplo, un intento de expresar la subunidad B de la toxina de *E. coli* enterotoxigénica (LT-B) en el apoplasto de maíz, condujo a su localización en los gránulos de almidón del endosperma (Chikwamba *et al.*, 2003; Hood, 2004). En otro trabajo, la seroalbúmina humana fusionada a una señal de retención KDEL, y una fitasa recombinante dirigida al apoplasto se acumularon como agregados en las vacuolas del endosperma de trigo (Arcalis *et al.*, 2004).

Otra estrategia utilizada es la incorporación de péptidos de tránsito que permiten dirigir la proteína sintetizada al cloroplasto y a sus membranas y espacios internos (Jobling *et al.*, 2002, Menassa *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando se intenta expresar la proteína en el estroma de los cloroplastos, la técnica de elección es la transformación directa del genoma plastídico, a pesar de que la misma está establecida sólo para unas pocas especies vegetales.

Fusiones a proteínas

Una alternativa para incrementar la expresión de la proteína recombinante consiste en sintetizarla como una fusión a otra proteína que le confiere estabilidad. Un ejemplo de este enfoque, es la fusión a ubiquitina, una proteína altamente conservada, estable y abundante en eucariotas. Una característica particular de esta proteína es que sus monómeros son sintetizados en tándem o fusionados a otras proteínas, de las que son rápidamente separados por una familia de proteasas deubiquitinizantes. Como esta reacción ocurre independientemente del tipo de aminoácido presente en la posición +1, la fusión a ubiquitina permite la producción de proteínas cuyo primer aminoácido puede ser otro que metionina. Además de que puede incrementar su acumulación, la expresión de proteínas como fusiones a ubiquitina, no interfiere con las secuencias de localización subcelular, lo que permite combinar ambas estrategias (Hondred *et al.*, 1999).

Otro ejemplo es la expresión de la proteína recombinante como fusión a una oleosina. Las oleosinas son proteínas pequeñas que se encuentran insertadas en la monocapa fosfolípida de los cuerpos grasos en las semillas de las plantas oleaginosas. La purificación de estas proteínas de fusión es sumamente sencilla y permite concentrar varias veces el producto de interés (van Rooijen y Moloney, 1995; www.PlantBioSys.com). Un ejemplo de la aplicación de esta técnica es la producción de hirudina, un inhibidor de trombina que se utiliza como anticoagulante, en plantas de *Brassica napus* (Parmenter *et al.*, 1995).

Modificación de los patrones de glicosilación

Una de las diferencias más importantes entre las modificaciones postraduccionales en plantas y animales, es el patrón de N-glicosilación. La unión de

carbohidratos a un polipéptido puede afectar sus propiedades físico-químicas, incluyendo su resistencia a la desnaturalización térmica y a la degradación proteolítica, así como su solubilidad y funciones biológicas esenciales, como la biodistribución, su inmunogenicidad, la actividad específica, la tasa de reciclado en sangre y las interacciones ligando-receptor.

El problema de la glicosilación no es trivial ni se encuentra limitado a las proteínas producidas en plantas. Las levaduras sólo incorporan residuos de alta manosa que, aunque no son inmunogénicos, disminuyen la vida media de la proteína sintetizada. En la línea de células CHO, los patrones de glicosilación varían con las condiciones del cultivo. Las proteínas recombinantes sintetizadas en plantas presentan generalmente grupos carbohidratos del tipo $\beta(1,2)$ -xilosa y $\alpha(1,3)$ -fucosa, los cuales están ausentes en mamíferos. y carecen de residuos terminales de galactosa y ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) que están presentes en muchas proteínas humanas (Gomord y Faye, 2004; Figura I.3). Estos residuos están asociados también con muchas glicoproteínas que forman parte de nuestra dieta y, por tanto, no es de esperar que sean extraños a nuestro sistema inmune (Ma *et al.*, 2003, Peeters *et al.*, 2001, Fischer *et al.*, 2003). Sin embargo, si bien su presencia no es indicativa de una reacción alérgica adversa, se han encontrado en sueros humanos anticuerpos contra xilosa y fucosa. Por otra parte, en estudios efectuados en ratones inmunizados por vía subcutánea con el anticuerpo contra *S. mutants* producido en tabaco, y en los ensayos clínicos en humanos mencionados anteriormente, no se observó reacción inmune contra la proteína recombinante o sus glicanos (Chargelegue *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2003; Peeters *et al.*, 2001). A pesar de estos antecedentes, la presencia de estos glicanos es uno de los principales factores que afectan el uso y aceptación de las proteínas recombinantes derivadas de plantas, por lo que se han desarrollado distintas estrategias para “humanizar” los patrones de glicosilación. Estas incluyen la expresión de la $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa humana en plantas transgénicas para la producción de anticuerpos recombinantes con glicanos extendidos en galactosa (Bakker *et al.*, 2001), la inactivación de la $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferasa y la $\beta(1,2)$ -xilosiltransferasa (Gomord y Faye, 2004) y la retención de la proteína en el retículo endoplasmático evitando el pasaje a través del aparato de Golgi, en donde son incorporados los grupos carbohidratos $\beta(1,2)$ -xilosa y $\alpha(1,3)$ -fucosa.

La incorporación de ácido siálico en plantas, es un proceso que demandará más tiempo porque los vegetales carecen de las vías metabólicas para su producción. Es así que se requerirá introducir los genes de varias enzimas y lograr su expresión en forma coordinada (Ma *et al.*, 2003 Gomord y Faye, 2004).

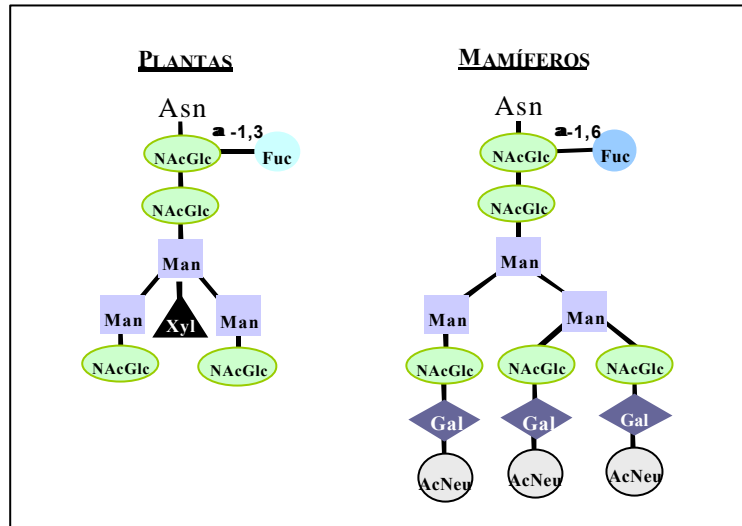


Figura I.3. Diferencias entre los patrones de N-glicosilación en plantas y mamíferos. Fuc: fucosa, Man: manosa, NAcGlc: N-acetilglucosamina, Xyl: xilosa, Gal: Galactosa y AcNeu: ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico). Adaptado de Raikhel y Chrispeels, 2000.

ELECCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL

Uno de los factores críticos a tener en cuenta cuando se diseña una estrategia de expresión, es la elección de la especie vegetal a transformar. Muchas veces, esta elección se hace en base a la experiencia previa con un cultivo particular, sin tener en cuenta cuál será el destino final de la proteína sintetizada, sus características intrínsecas y las necesidades de producción, lo que puede conducir al fracaso de la estrategia de expresión. La especie y el tejido elegidos para la producción, pueden afectar la calidad, cantidad, facilidad de purificación y por tanto, el costo final del producto (Kusnadi *et al.*, 1997).

El tabaco es una de las especies más utilizadas para la expresión de proteínas en hojas debido a que se dispone de protocolos de transformación y de elementos reguladores de la expresión genética bien caracterizados. Además, como no es un cultivo comestible, el riesgo de contaminación de las cadenas alimenticias humanas es muy bajo. Sin embargo, muchos cultivares de tabaco producen altos niveles de alcaloides tóxicos, y aunque existen variedades de bajo contenido en nicotina, se está

estudiando la utilización de otros cultivos de alta producción de biomasa vegetativa, como la alfalfa o la lechuga. La alfalfa tiene la ventaja de ser un cultivo perenne fijador de N₂ en que las glicoproteínas sintetizadas tienden a adquirir estructuras de glicanos homogéneas (Twyman *et al.*, 2003, Fischer *et al.*, 2004). Aunque estos cultivos producen grandes cantidades de biomasa, las proteínas son expresadas en un entorno acuoso que es usualmente inestable, haciendo que el material cosechado deba ser procesado inmediatamente, congelado o secado para su transporte (Ma *et al.*, 2003).

Una alternativa a la expresión en hojas, es la expresión en semillas o tubérculos. Estos órganos permiten el almacenamiento por largos períodos de tiempo, sin pérdidas significativas en la actividad del producto (Artsaenko *et al.*, 1998; De Wilde *et al.*, 2002; Hood *et al.*, 1997; Stöger *et al.*, 2000). La producción de proteínas recombinantes en el endosperma de semillas de arroz, trigo, maíz, soja y cebada, así como la expresión en tubérculos de papa, se encuentran entre los principales blancos de estudio (Fischer *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2003; Mason *et al.*, 2002).

Finalmente, se han desarrollado sistemas para la expresión de proteínas en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, la planta acuática *Lemna minor* y el musgo *Physcomitrella patens*. La producción en estos organismos tiene la ventaja de que puede hacerse en condiciones controladas, bajo luz artificial en contenedores aislados que permiten una propagación clonal muy rápida.

C. reinhardtii puede transformarse fácilmente tanto a nivel nuclear como de cloroplastos y es capaz de crecer en forma heterotrófica o fototrófica. Además, existe una amplia disponibilidad de promotores regulados por luz o por nutrientes (Franklin y Mayfield, 2004). *L. minor*, tiene la ventaja de que, por tratarse de una planta acuática, las proteínas pueden ser secretadas al medio por rizosecreción. Asimismo, al no haber floración o producción de semillas, se logra una mejor contención del transgén (Gasdaska *et al.*, 2003; www.bioplex.com). El musgo *P. Patens* crece en un amplio rango de pH (4-8), lo que permite adaptar las condiciones de cultivo según las características de la proteína sintetizada. Además, como la transformación se hace por recombinación homóloga, se han logrado eliminar los genes de las enzimas α 1,3-fucosiltransferasa y de la β 1,2-xilosiltransferasa, en un intento por obtener patrones de glicosilación humanizados (Decker y Reski, 2004, www.greenovation.com).

SISTEMAS DE EXPRESIÓN INTEGRATIVOS II: PLANTAS TRANSPLASTÓMICAS

Los plástidos vegetales

Los plástidos vegetales son organelas que se originaron por endosimbiosis entre una cianobacteria y una célula eucariota hace más de 1.500 millones de años. Se comportan de manera semiautónoma, dividiéndose en forma independiente y poseen su propio aparato transcripcional y traduccional de tipo bacteriano. En el transcurso de la evolución, la mayor parte de su genoma (más de 3.000 genes) fue transferido al núcleo. Los plástidos vegetales se diferencian a partir de un proplástido progenitor común presente en las células meristemáticas. Los amiloplastos y elaioplastos están especializados en el almacenamiento de almidón y aceites respectivamente. Los cromoplastos, que poseen una alta concentración de carotenos y xantofilas, son los responsables de los colores de muchos frutos, flores y raíces. Los leucoplastos están involucrados en la síntesis de monoterpenos y los cloroplastos son los responsables de la fotosíntesis. A pesar de su especialización, todos estos plástidos poseen una extraordinaria capacidad de desdiferenciación y rediferenciación en respuesta a distintas condiciones ambientales y de desarrollo (Staehein y Newcomb, 2000). El número de plástidos por célula es altamente variable dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, en tabaco las células meristemáticas contienen entre 10 y 14 proplástidos, mientras que las células fotosintéticamente activas de las hojas pueden contener hasta 100 cloroplastos cada una.

La secuenciación de diversos genomas plastídicos, ha revelado una organización genética muy conservada entre distintas especies vegetales. El genoma plastídico (o plastoma) de las plantas superiores es altamente poliploide, pudiendo contener hasta 100 genomas por organela. Está constituido por una molécula de ADN circular de doble cadena de 120 a 180 Kpb de tamaño, con dos regiones duplicadas invertidas (RIA y RIB) de unas 25 Kpb cada una (Figura I.4). Ambas cadenas de ADN codifican entre 120 y 130 genes que se encuentran densamente agrupados y que pertenecen a dos categorías generales: a) genes relacionados a la formación del aparato fotosintético y b) genes pertenecientes a los sistemas de transcripción y traducción (Bock y Khan 2004). Los demás polipéptidos requeridos para las múltiples funciones de los plástidos están codificados por el genoma nuclear. Estas proteínas son sintetizadas en el citoplasma

como fusiones a péptidos de tránsito que dirigen su traslocación a través de la doble membrana plastídica.

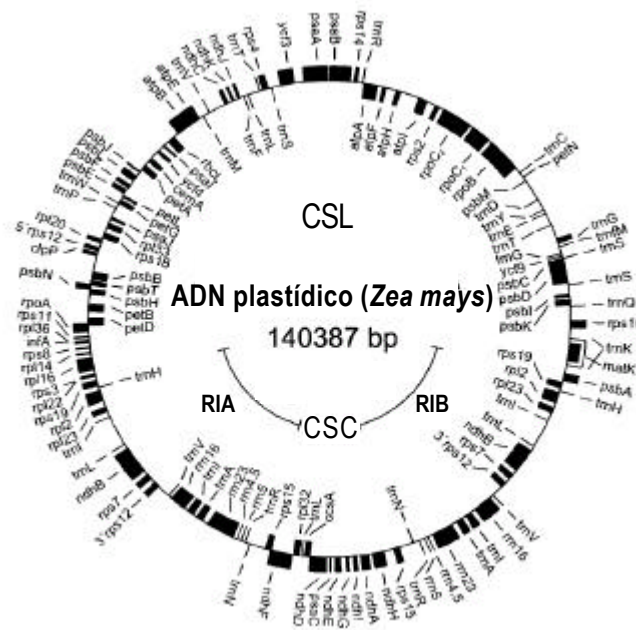


Figura I.4. Mapa físico del genoma plastídico de maíz (*Zea mays*). Se muestra la ubicación de los genes en ambas cadenas, así como de las regiones invertidas A y B, (RIA y RIB) y de las regiones de copia simple larga (CSL) y corta (CSC) (Tomado de Hager y Bock, 2000).

Regulación de la expresión genética en cloroplastos

Existen dos ARN polimerasas activas en los cloroplastos. La primera, denominada PEP por *plastid-encoded RNA polymerase*, posee las características de las polimerasas eubacterianas y sus subunidades son codificadas por un operón plastídico, mientras que los factores de transcripción sigma asociados son codificados por el genoma nuclear. Los promotores reconocidos por la PEP poseen las secuencias -10 (TATAAT) y -35 (TTGACA) presentes en los promotores eubacterianos, y dirigen la síntesis de los genes fotosintéticos. La segunda polimerasa, denominada NEP por *nuclear-encoded RNA polymerase*, es codificada por el genoma nuclear y estaría constituida por una única subunidad similar a las polimerasas de los fagos bacterianos. La mayor parte de los genes del sistema genético plastídico, requeridos para la transcripción y traducción, poseen promotores de los dos tipos mencionados, mientras que unos pocos genes parecen poseer promotores NEP exclusivamente (Weihe y Börner, 1999; Somanchi y Mayfield, 1999).

Los productos de transcripción de ambas polimerasas son en general policistrónicos y poseen en la región 3' no traducida (3' UTR) secuencias repetidas invertidas capaces de formar horquillas que estabilizan el ARNm (Somanchi y Mayfield, 1999; Monde *et al.*, 2000). Dado que la terminación de la transcripción en las secuencias invertidas es poco eficiente, los extremos 3' de los ARNm maduros son generados mediante un mecanismo que implica un corte endonucleolítico a unos 10 a 15 nucleótidos de la horquilla, seguido de la degradación 3' – 5' por una exoribonucleasa (Barkam y Goldschmidt-Clermont, 2000; Hayes *et al.*, 1999; Monde *et al.*, 2000). Asimismo, la maduración del extremo 5' se produciría por la acción de una exoribonucleasa con actividad 5' – 3', aún no identificada. Los ARNm monocistrónicos maduros se generan por procesado de las regiones intercistrónicas y de los intrones de tipo I y II, presentes en muchos genes cloroplásticos. Además, algunos ARNm son también editados mediante cambios C a U que generalmente crean codones de inicio o reintroducen un aminoácido conservado en la proteína (Bock, 2000; Monde *et al.*, 2000; Somanchi y Mayfield, 1999). La unión de factores reguladores de origen nuclear a las regiones 5' no traducidas (5' UTR) es otro elemento estabilizador del ARNm que además acoplaría las reacciones de transcripción y traducción (Barkam y Goldschmidt-Clermont, 2000; Choquet y Wollman, 2002; Stern *et al.*, 1997; Figura I.5).

La degradación del ARN en los cloroplastos ocurre por un mecanismo que sería inducido por la desprotección de la secuencia codificante al liberarse los ribosomas y por la ausencia de los factores estabilizadores en las regiones 5' UTR y 3' UTR. En el corte de la secuencia de ARN y el procesado de la horquilla de terminación estarían implicadas al menos dos endoribonucleasas distintas. La subsiguiente degradación exoribonucleolítica estaría inducida por la marcación de los fragmentos de ARN por poliadenilación (Hayes *et al.*, 1999; Monde *et al.*, 2000).

La regulación de la expresión en cloroplastos se produce principalmente a nivel traduccional y postraduccional. Esto se debe a que los complejos fotosintéticos consisten en varias subunidades cuya acumulación y ensamblado deben estar coordinadas en forma estequiométrica. Ello requiere del mantenimiento de un equilibrio estricto bajo distintas condiciones ambientales y de desarrollo, entre las proteínas que son sintetizadas en el citoplasma y las que son sintetizadas en el cloroplasto (Choquet y Wollman, 2002; Rochaix, 2001).

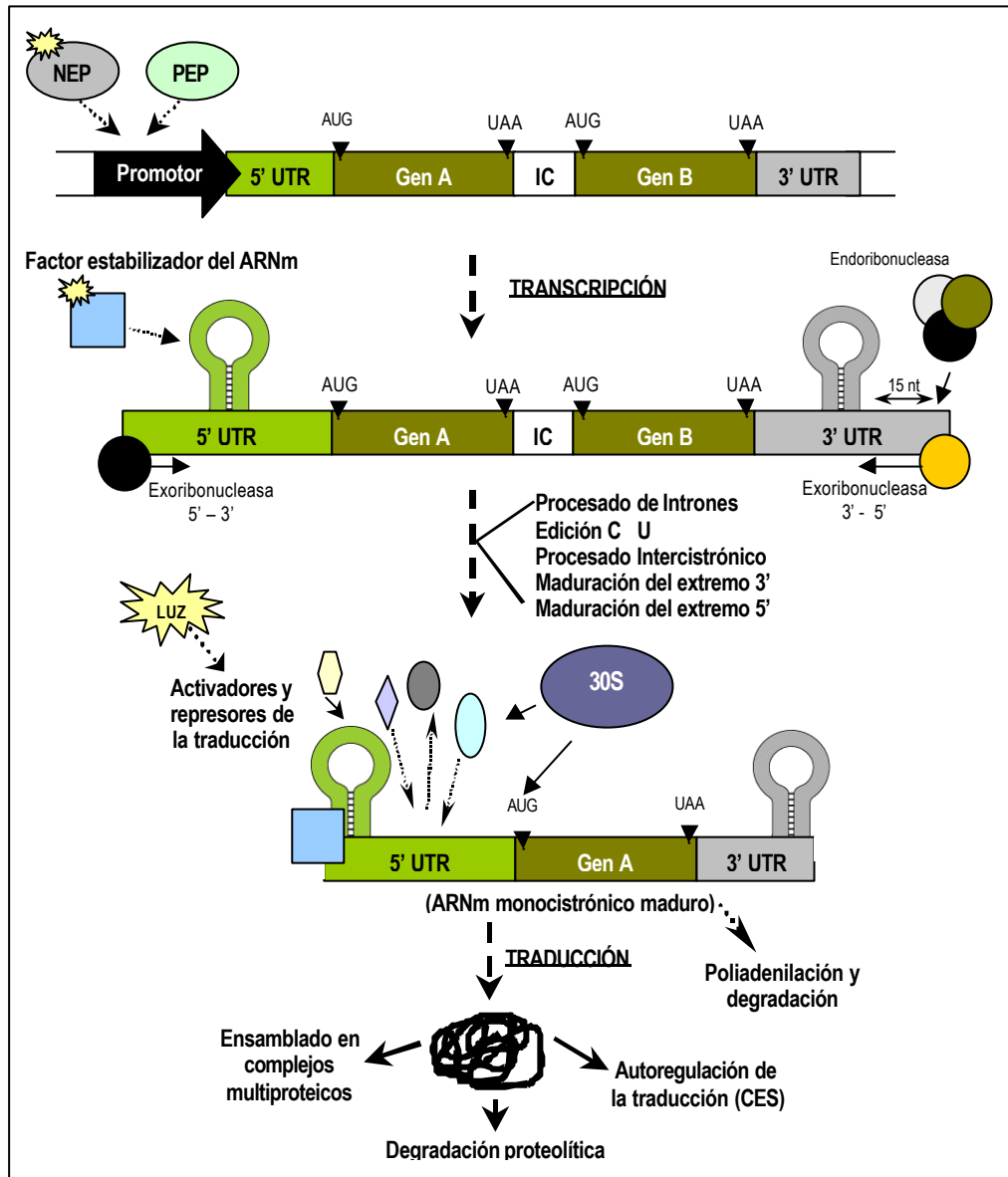


Figura I.5. Esquema de la regulación genética en los cloroplastos. La transcripción de los ARNm policistrónicos es efectuada por las polimerasas PEP o NEP. La maduración de los ARNm puede producirse por eliminación de los intrones y de las secuencias intercistricas, modificación de los extremos 5' y 3' y edición de C a U. La unión de factores nucleares a la región 5' no traducida (5' UTR) estabilizaría al ARNm maduro. La iniciación de la traducción es regulada por la unión y liberación de factores nucleares controlados por la luz y el estado oxidativo del cloroplasto. Las proteínas sintetizadas que no se ensamblan en los complejos multiprotéicos pueden ser degradadas por proteólisis o funcionar como inhibidores de su propia síntesis al interactuar con los factores de inicio de la traducción. IC: región intercistrica.

La regulación de la iniciación de la traducción en los cloroplastos depende de la unión de factores nucleares a elementos ubicados en la región 5' UTR, que funcionan como activadores o represores. Aunque el sistema traduccional plastídico posee una alta similitud estructural con el procarionta, existen algunas diferencias que le otorgan características particulares. Muchos de los genes plastídicos poseen secuencias de unión

al ribosoma (RBS) similares a la secuencia Shine-Dalgarno (SD) bacteriana, aunque la distancia entre estas secuencias y el codón de inicio de la traducción, está menos conservada que en las células procariotas. En tanto que en las bacterias estos motivos se encuentran a 7 ± 2 nt hacia 5' del sitio de inicio de la traducción, en los cloroplastos pueden ubicarse en el rango de 2 a 29 nt, e incluso estar ausentes. Los factores reguladores de la traducción funcionarían uniéndose a elementos específicos presentes en la región 5' UTR, reclutando directamente a la subunidad ribosomal 30S, plegando el ARNm para reducir la distancia entre el RBS y el sitio de inicio de la traducción o eliminando estructuras secundarias que impidan el acceso del ribosoma a su sitio de unión (Figura I.6; Stern *et al.*, 1997; Maliga, 2003). Estas proteínas efectoras parecen estar reguladas por la luz, a través de la relación ATP/ADP y por el estado oxidativo del cloroplasto, así como por factores de diferenciación y desarrollo. (Bruick y Mayfield, 1999; Monde *et al.*, 2000; Somanchi y Mayfield, 1999; Zerges, 2000).

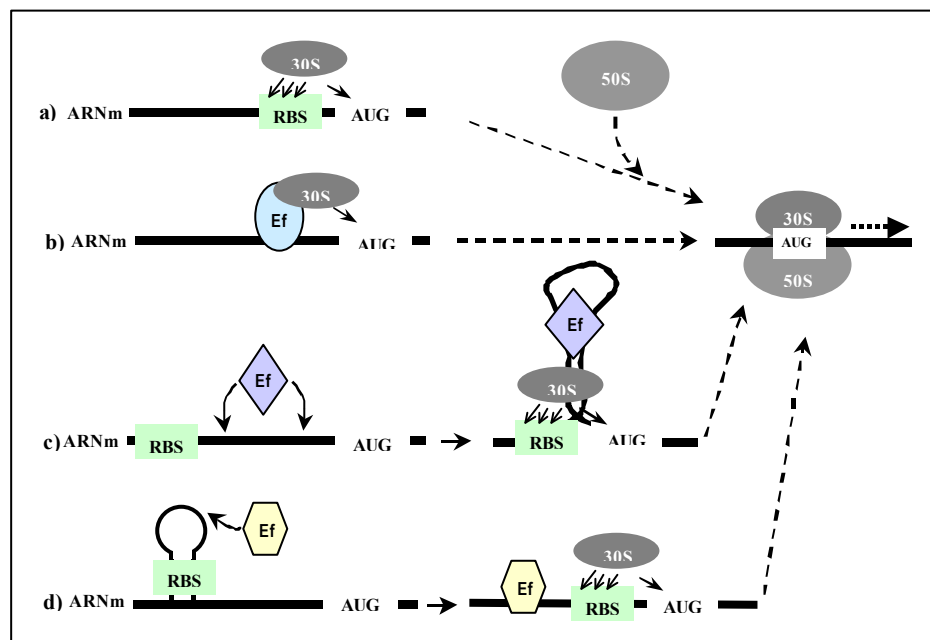


Figura I.6. Mecanismos de iniciación de la traducción en cloroplastos. El reclutamiento de la subunidad ribosomal 30S puede ocurrir por reconocimiento directo de secuencias RBS (a) o por unión a un efector (Ef) que reconoce motivos específicos en la secuencia 5' UTR (b). Otros mecanismos proponen la existencia de efectores (Ef) que modifican el plegamiento del ARNm para aproximar el sitio de unión del ribosoma (RBS) y el sitio de inicio de la traducción (AUG) (c), o facilitando el acceso del ribosoma al RBS por desarmado de estructuras secundarias (d). Adaptado de Maliga, 2003 y Stern *et al.*, 1997.

El citocromo b_6f de *C. reinhardtii* es un interesante ejemplo de la forma en que puede censarse y regularse la relación estequiométrica entre las subunidades de un mismo complejo proteico. Mediante el estudio de mutantes de algunas de las subunidades de este complejo (citocromo b_6 , citocromo f y subunidad IV) se observó

que en ausencia del citocromo *f*, no había cambios en las tasas de síntesis del citocromo b_6 ni de la subunidad IV, pero éstas eran rápidamente degradadas. Al contrario en ausencia del citocromo b_6 y la subunidad IV, la vida media del citocromo *f* no se veía alterada, pero se observaba una reducción en su tasa de síntesis. Estos resultados sugieren que existe un orden en la expresión de las subunidades del mismo complejo proteico y llevaron a plantear un sistema de autoregulación de la traducción denominado CES, por control de la síntesis por epistasia. En este caso el citocromo *f* no ensamblado expone un motivo represor (identificado en el dominio transmembrana de la proteína) que se une a un efector necesario para la traducción de su propio ARNm. Cuando el complejo b_6f está ensamblado, el motivo represor queda oculto y el efector es liberado para activar la traducción del ARNm del citocromo *f* (Choquet *et al.*, 1998; Choquet y Wollman, 2002).

Otro mecanismo de control implica la acción de una serie de proteasas plastídicas que intervienen en la degradación de subunidades no ensambladas, proteínas que carecen de sus grupos prostéticos y proteínas que han sufrido daño fotooxidativo. Las proteasas identificadas en cloroplastos, incluyen homólogos de Clp, FtsH y DegP de *E. coli*, pero con una mayor diversidad de isómeros (Figura I.7). A excepción de un isómero de la subunidad proteolítica de Clp que es codificado por el genoma plastídico, las demás proteasas son de origen nuclear. En el genoma de *A. thaliana* se identificaron los genes de otros dos homólogos, Lon y SppA, ambos fusionados a potenciales péptidos de tránsito, pero que aún no han sido caracterizados en detalle (Adam y Clarke, 2002).

La FtsH es una metaloproteasa dependiente de ATP que se encuentra unida a la membrana tilacoide y que proyecta su subunidad catalítica y el dominio ATPasa hacia el estroma. Su expresión es dependiente de la luz e interviene en la degradación de la proteína D1 fotodañada, del centro de reacción del fotosistema II (Adam, 1996, Adam y Clarke, 2002). Las DegPs son serina-proteasas independientes de ATP, asociadas a la membrana de los tilacoides, de las cuales DegP1 se ubica del lado luminal, mientras que DegP2 lo hace del lado del estroma. DegP1 estaría implicada en la regulación proteolítica en el lumen y DegP2 en la degradación inicial de la proteína D1 fotodañada haciéndola susceptible a FtsH (Adam y Oestersetzer, 2001). La Clp es una serina-proteasa dependiente de ATP que, en *E. coli*, está compuesta por una subunidad proteolítica ClpP y una subunidad reguladora ClpA o ClpX con función ATPasa. Las

subunidades proteolíticas forman dos anillos heptaméricos, que están flanqueados por un anillo hexamérico de subunidades reguladoras a cada lado del complejo. La función de las subunidades reguladoras es desplegar las proteínas para que sean degradadas por las subunidades proteolíticas. En plantas, se ha encontrado un complejo homólogo a esta proteasa ubicado en el estroma de los cloroplastos y más de un isómero de cada subunidad (Adam y Clarke, 2002; Peltier *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2002). Aún no se ha establecido si esta proteasa posee sustratos específicos o tiene una función general en la remoción de precursores citoplasmáticos incorrectamente procesados y proteínas mal plegadas. La observación de que esta proteasa puede degradar una proteína luminal cuando ésta es retenida intencionalmente en el estroma, y el hallazgo de la expresión de estas proteasas en tejidos no fotosintéticos, apoyan la hipótesis de que Clp estaría implicada en el reciclado general de proteínas en el estroma (Halperin *et al.*, 2001; Peltier *et al.*, 2004; Porankiewicz *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2002).

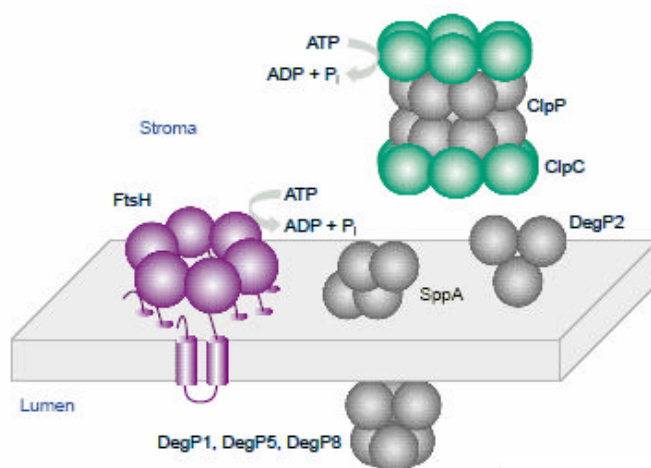


Figura I.7. *Complejos proteicos plastídicos.* Se muestra la ubicación de los complejos proteicos identificados en cloroplastos. La FtsH es una metaloproteasa que se encuentra insertada en la membrana de los tilacoides. Las DegP son serina-proteasas que están asociadas a la membrana de los tilacoides y Clp es un complejo multimérico del estroma compuesto por monómeros de una subunidad reguladora dependiente de ATP (ClpC) y una subunidad catalítica (ClpP). Tomado de Adam y Clarke, 2002.

La transformación de cloroplastos

Las características particulares de los cloroplastos los han convertido en un blanco sumamente atractivo para su utilización en la expresión de proteínas recombinantes. La transformación de cloroplastos se realiza por inserción del gen de interés y un marcador de selección mediante recombinación homóloga en una o unas pocas copias del genoma plastídico seguida de la pérdida gradual de los genomas no transformados en medio selectivo (Figura I.8). De esta manera, es posible seleccionar el sitio de inserción evitando los efectos de posición característicos de la transformación

nuclear. Este mecanismo permite además realizar estudios genéticos por eliminación o reemplazo de genes, así como por reconstitución de funciones (Leister, 2003). Se ha probado que la inserción del ADN en el plastoma ocurre por múltiples eventos de recombinación (Kavanagh *et al.*, 1999) lo que ha contribuido al desarrollo de vectores de transformación que son funcionales en más de una especie (Ruf *et al.*, 2001; Sidorov *et al.*, 1999).

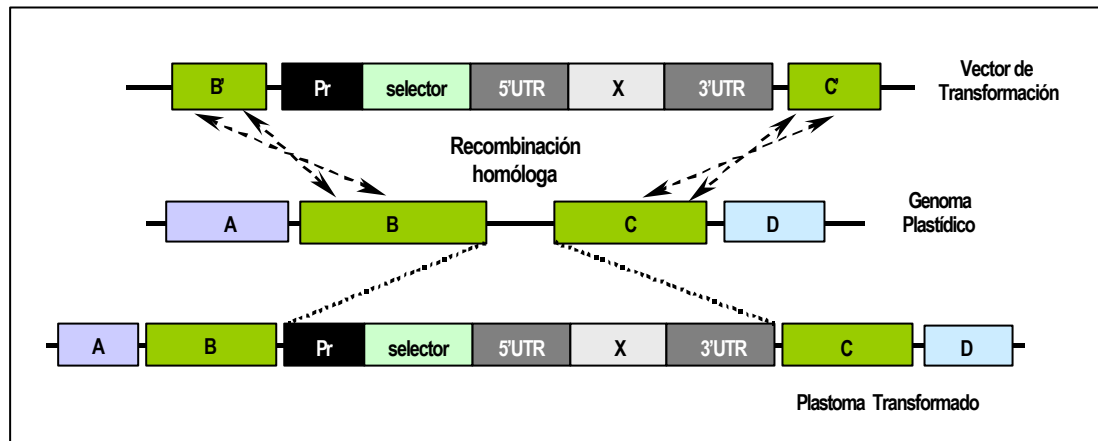


Figura I.8. Transformación del genoma plastídico por recombinación homóloga. Las secuencias B' y C' de origen plastídico recombinan con el plastoma para insertar la construcción en una región intergénica.

La extraordinaria poliploidía de los cloroplastos y la ausencia de mecanismos de silenciamiento, sugieren que el gen insertado en múltiples copias por célula alcanzará altos niveles de transcripción. Además, se pueden introducir múltiples genes como unidades transcripcionales policistrónicas. Esto abre la posibilidad de incorporar rutas metabólicas completas, como por ejemplo la de síntesis de la vitamina A (Bock y Khan, 2004). Otra ventaja es que, en muchas especies, los cloroplastos se heredan exclusivamente por vía materna, impidiendo su pasaje al polen y por tanto incrementando la contención genética (Bock y Khan, 2004; Daniell *et al.*, 2002).

Para obtener plantas transplastómicas se deben resolver diversas cuestiones técnicas: lograr que el ADN atraviese la doble membrana plastídica, conseguir que las secuencias de interés se inserten en el plastoma sin que los sistemas de regulación genética limiten la expresión de la proteína recombinante y lograr que cada copia del genoma plastídico este transformada (estado denominado homoplastía), para evitar la segregación somática y la inestabilidad genética en ausencia de la presión de selección (Bock y Khan, 2004; Heifetz, 2000).

Los plásmidos de transformación son en general derivados de vectores de *E. coli* en los que la construcción genética a introducir está flanqueada por secuencias

plastídicas de entre 1 y 2 Kpb que determinarán el sitio de inserción en el plastoma. Estas secuencias no poseen propiedades particulares y, en teoría, pueden derivar de cualquier parte del genoma plastídico. Alrededor de 14 regiones intergénicas fueron probadas, sin que la inserción de secuencias heterólogas interfiera con la expresión de los genes plastídicos (Maliga, 2004).

En la construcción genética, las secuencias heterólogas pueden estar ordenadas en operones, cada una con su secuencia de unión al ribosoma RBS, o mediante secuencias 5' UTR más complejas que ayuden a estabilizar los ARNm e incrementar los niveles de traducción. Estas secuencias 5' UTR pueden ser plastídicas, como las del gen *psbA* (subunidad D1 del fotosistema II) o del gen *rbcL* (subunidad mayor de la rubisco) o incluso de origen viral como la del gen 10 del fago T7. La construcción completa puede estar bajo el control transcripcional de un único promotor o cada gen puede llevar un promotor independiente. Además, la correcta formación de los ARNm maduros requiere de la presencia de secuencias 3' UTR específicas. Las más utilizadas son las de los genes *psbA*, *rbcL* y *rps16* (proteína ribosomal 16S). La importancia de la elección de estas secuencias estabilizadoras se ve reflejada en distintos ejemplos. Los niveles de expresión de la seroalbúmina humana en cloroplastos de tabaco se incrementaron de un 0,02% a un 0,11% TPS al reemplazar la secuencia SD por la región 5' UTR y el promotor del gen *psbA* (Fernández-San Millán *et al.*, 2003). En otro caso, al expresar en tabaco el gen *CP4* que otorga resistencia al herbicida glifosato, se logró incrementar los rendimientos de un 0,002% TPS hasta un 0,3% TPS al reemplazar la secuencia 5' UTR del gen *rbcL* por la del gen 10 de fago T7, y hasta un 10% TPS mediante la fusión amino terminal a los primeros 14 aminoácidos de la proteína GFP (Ye *et al.*, 2001).

La transformación estable de cloroplastos puede efectuarse utilizando la técnica de biobalística o por tratamiento de protoplastos con polietilenglicol (PEG). La biobalística se utiliza con mayor frecuencia, puesto que no requiere experiencia en el cultivo de protoplastos. La transformación de cloroplastos es un proceso que depende del reemplazo gradual de los plastomas no transformados en sucesivas rondas de regeneración en un medio selectivo y requiere, por lo tanto, de una capacidad de regeneración sostenible. Aunque se ha reportado la transformación de plástidos de papa (Sidorov *et al.*, 1999), tomate (Ruf *et al.*, 2001) y brassicáceas como *A. thaliana* (Sikdar *et al.*, 1998), *Brassica napus* (Hou *et al.*, 2002) y *Lesquerella fendleri* (Skarjinskaia *et al.*, 2003), esta técnica es de rutina sólo en el alga *C. reinhardtii* y en tabaco. Una

dificultad para el desarrollo de la transformación de cloroplastos en cereales es que en éstos, la regeneración se produce a partir de tejido embriogénico no verde, que contiene sólo unos pocos proplástidos con muy baja actividad.

Entre los marcadores de selección utilizados se encuentran la secuencia *aadA*, que codifica la enzima aminoglucósido 3' adeniltransferasa, que otorga resistencia a los antibióticos espectinomicina y estreptomycinina y las secuencias *nptII*, que codifica la neomicina fosfotransferasa II, y *aphA-6*, que codifica la aminoglicósido fosfotransferasa, que otorgan resistencia al antibiótico kanamicina. Las secuencias que codifican proteínas que confieren resistencia a herbicidas, como la fosfinotricina y el glifosato, son dosis dependientes y pueden utilizarse como marcadores secundarios, cuando la mayor parte de las copias del genoma están transformadas (Maliga, 2004). Otro marcador es la secuencia que codifica la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) de espinaca, la cual confiere resistencia al compuesto tóxico aldehído de betaína (Daniell *et al.*, 2001b).

La primer aplicación biotecnológica de la transformación de cloroplastos fue la expresión de la toxina de *Bacillus thuringiensis* en tabaco, con rendimientos del 3% al 5% del TPS (Bock y Khan, 2004). Más tarde la co-expresión del operón bacteriano completo, incrementó los niveles de expresión hasta un 45% TPS (De Cosa *et al.*, 2001). En la tabla I se muestran algunos ejemplos de proteínas recombinantes expresadas en cloroplastos de tabaco.

Gen o proteína	% TPS	Promotor	5' UTR	3' UTR	Referencias
bar (resist a fosfinotricina)	7	<i>Prrn</i>	<i>RBS</i>	<i>rbcl</i>	Lutz <i>et al.</i> , 2001
<i>Cry1Ac</i>	5	<i>Prrn</i>	<i>rbcl</i>	<i>rps16</i>	Maliga, 2003
<i>Cry1Ia5</i>	3	<i>PpsbA</i>	<i>psbA</i>	<i>rbcl</i>	Reddy <i>et al.</i> , 2002
<i>Cry2Aa2</i>	45	<i>Prrn</i>	<i>RBS</i>	<i>psbA</i>	De Cosa <i>et al.</i> , 2001
Toxina del cólera (CTB)	4	<i>Prrn</i>	<i>RBS</i>	<i>psbA</i>	Daniell <i>et al.</i> , 2001c
EPSPS (resist. a glifosato) ^a	> 10	<i>Prrn</i>	<i>T7 g10</i>	<i>rps16</i>	Ye <i>et al.</i> , 2001
EPSPS (resist. a glifosato) ^b	0,3	<i>Prrn</i>	<i>T7 g10</i>	<i>rps16</i>	Ye <i>et al.</i> , 2001
EPSPS (resist. a glifosato)	0,002	<i>Prrn</i>	<i>rbcl</i>	<i>rps16</i>	Ye <i>et al.</i> , 2001
GUS	2,5	<i>PpsbA</i>	<i>psbA</i>	<i>psbA</i>	Maliga, 2003
Seroalbúmina humana	0,02	<i>Prrn</i>	-	<i>psbA</i>	Fernandez-San Millán <i>et al.</i> , 2003
Seroalbúmina humana	11	<i>Prrn</i>	<i>psbA</i>	<i>psbA</i>	Fernandez-San Millán <i>et al.</i> , 2003
Somatotropina humana	1	<i>PpsbA</i>	<i>psbA</i>	<i>rps16</i>	Staub <i>et al.</i> , 2000
Somatotropina humana	7	<i>Prrn</i>	<i>T7g10</i>	<i>rps16</i>	Staub <i>et al.</i> , 2000
Antígeno de <i>B. anthracis</i>	18	<i>Prrn</i>	<i>psbA</i>	<i>psbA</i>	Daniell <i>et al.</i> , 2004
Toxina del tétanos (TetC)	25	<i>Prrn</i>	<i>T7g10</i>	<i>rbcl</i>	Tregoning <i>et al.</i> , 2003
Proteína VP6 de rotavirus	3	<i>Prrn</i>	<i>rbcl</i>	<i>rrnB (E.coli)</i>	Birch-Machin <i>et al.</i> , 2004.
Proteína VP6 de rotavirus	0.6	<i>PpsbA</i>	<i>psbA</i>	<i>rrnB(E.coli)</i>	Birch-Machin, <i>et al</i> , 2004

Tabla I. Expresión de proteínas recombinantes en cloroplastos de tabaco. Se muestran los ejemplos más destacados de la expresión de proteínas recombinantes en cloroplastos de tabaco. % TPS: porcentaje de la proteína expresada, respecto del total de las proteínas solubles. También se muestra el promotor utilizado

y las regiones 5' UTR y 3' UTR que flanquean al gen de interés. La diferencia entre a y b es que en a, el gen CP4, que codifica la enzima EPSPS, se fusionó a la secuencia de los primeros 14 aminoácidos de la proteína GFP.

ASPECTOS REGULATORIOS Y DE BIOSEGURIDAD

La producción de proteínas heterólogas en plantas presupone medidas especiales de bioseguridad y control. En el caso de la producción de proteínas terapéuticas o con actividad biológica, se deben establecer condiciones de bioseguridad aún más estrictas que las adoptadas para otros OGMs, ya que éstas no deben ingresar bajo ningún punto de vista a la cadena alimentaria humana o animal. La mayor parte de los problemas relacionados a la contención genética podría solucionarse si la producción se realiza en cultivos restringidos a invernaderos o recintos cerrados. Sin embargo, en el caso de las moléculas que requieran una gran producción de biomasa, y que por lo tanto, los cultivos deban hacerse en el campo, pueden implementarse una serie de medidas físicas y genéticas comunes a las establecidas para otras plantas transgénicas. Estas incluyen el aislamiento físico utilizando barreras de cultivos no relacionados, la transformación de cloroplastos en especies de herencia materna, la utilización de cultivos de floración cerrada (autopolinización) y la restricción de la expresión a un tejido en particular. La expresión específica de proteínas recombinantes en semillas tiene la ventaja de que reduce su exposición a herbívoros y otros organismos no blanco. Sin embargo, es necesario que las plantas pasen por el período de floración, mientras que en el caso de las proteínas producidas en los órganos vegetativos pueden ser cosechadas antes de la floración, previniendo así, la liberación de polen y eliminando el riesgo de transferencia horizontal. Plantas como la alfalfa o la colza, que son polinizadas por abejas, pueden cruzarse con muchas especies de malezas presentes en las zonas sembradas y cuyas semillas pueden permanecer en latencia por muchos años no son recomendables para la producción de biofármacos (Mascia y Flavell, 2004). Además, se sugiere no utilizar especies vegetales que participen de las cadenas alimentarias humanas o animales, no crecer el cultivo para la producción de biofármacos en zonas utilizadas normalmente para el crecimiento de plantas que serán usadas en alimentación y utilizar equipo de cultivo, cosecha, transporte y almacenamiento que debe ser limpiado meticulosamente y no emplearse para otros cultivos. Asimismo, se debe tener en cuenta que los procesos en la elaboración de fármacos deberán ajustarse a los requerimientos regulatorios

tradicionales, independientemente del sistema de producción (Peterson y Artzen, 2004; Stein y Webber, 2001; Miele, 1997; Felsot, 2002; Thomas *et al.*, 2002; www.bio.com).

PROTEÍNAS EXPRESADAS EN ESTE TRABAJO

En el presente trabajo se estudian distintas estrategias para la expresión en plantas de tabaco de cuatro polipéptidos de potencial uso farmacológico, el factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), la hormona de crecimiento bovina (bGH) y dos antígenos de *Toxoplasma gondii*, el antígeno de superficie SAG1 y la proteína de los gránulos densos, GRA4.

EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO, (hEGF).

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un pequeño polipéptido mitogénico de 53 aminoácidos y un peso molecular de 6,2 Kda, que fue purificado por primera vez de las glándulas submaxilares de ratón (Carpenter y Cohen, 1979). El hEGF o urogastrona es sintetizado como un precursor de 114 Kda (pre-pro-EGF), con las características de una proteína de transmembrana glicosilada, que es procesado proteolíticamente para dar el monómero de hEGF maduro. El péptido maduro posee tres puentes disulfuro necesarios para su actividad biológica y está altamente conservado entre muchas especies de mamíferos tanto en estructura como en función (Figura I.9; Carpenter y Cohen, 1979; Simpson *et al.*, 1985).

Se han encontrado cantidades sustanciales de hEGF inmunoreactivo en una amplia variedad de extractos de tejidos y fluidos biológicos humanos, como líquido amniótico, leche, saliva, contenido gástrico y duodenal, jugos pancreáticos, bilis, orina, sangre, suero y plasma (Berlanga Acosta y Mella Lizama, 1998; Howarth y Shoubridge, 2001). Su respuesta biológica está mediada por la unión a un receptor de membrana de tipo tirosina-quinasa presente en casi todos los tipos celulares, con la excepción de las células circulantes del sistema hematopoyético, lo que indica que este factor posee múltiples acciones (Rougeot *et al.*, 2000).

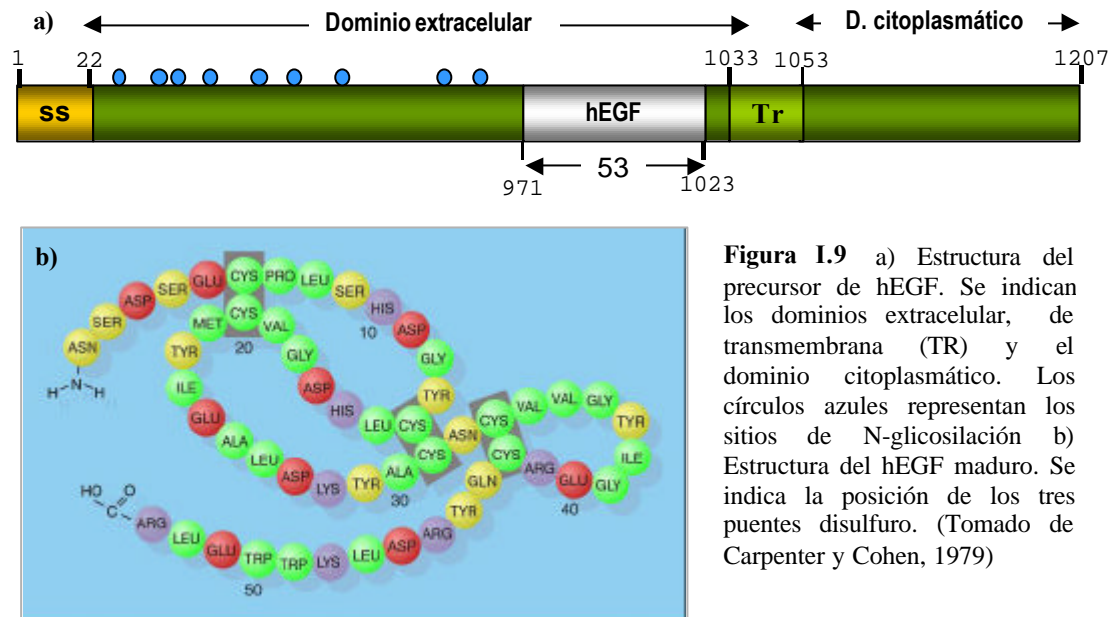


Figura 1.9 a) Estructura del precursor de hEGF. Se indican los dominios extracelular, de transmembrana (TR) y el dominio citoplasmático. Los círculos azules representan los sitios de N-glicosilación b) Estructura del hEGF maduro. Se indica la posición de los tres puentes disulfuro. (Tomado de Carpenter y Cohen, 1979)

El hEGF posee una potente actividad mitogénica en células epidérmicas y no epidérmicas. Es fundamental para el desarrollo, diferenciación, reparación y protección de muchos tejidos epiteliales como la piel y córnea. Es capaz de prevenir la secreción gástrica en humanos (Howarth y Shoubridge, 2001) y regula la producción de mucus (Nadel y Burgel, 2001). Además, es un factor embriotrófico que estimula la mitogénesis, desarrollo e implantación en muchas especies animales (Berlanga Acosta y Mella Lizama, 1998).

Estos efectos de hEGF condujeron a su uso tópico para el tratamiento de heridas y quemaduras y como agente reparador en transplantes de córnea y tratamientos de úlceras gástricas y otras afecciones gastrointestinales. El hecho de que hEGF posea tan amplia respuesta en múltiples tejidos ha alertado sobre sus potenciales efectos secundarios. Sin embargo, los datos experimentales indican que los efectos de la administración parenteral por largos períodos de altas dosis de hEGF son autolimitantes, no progresivos, dependientes de la dosis y del tratamiento y reversibles luego de suspender la administración. A pesar de su exacerbada actividad mitogénica y la sobreexpresión de su receptor en muchos tumores epiteliales se ha observado que hEGF puede incrementar la sensibilidad de las células cancerígenas a los agentes quimioterapéuticos (Berlanga Acosta y Mella Lizama, 1998). Además de su potencial utilización como agente terapéutico, se han sumado dos recientes y singulares aplicaciones de EGF. Al menos dos empresas ofrecen líneas completas de productos

cosméticos conteniendo hEGF recombinante como inhibidor de la senescencia en células epiteliales (www.leadergene.com; www.revive.com) y una empresa australiana comercializa EGF para la remoción de la lana de ovejas, una especie de esquilado químico, registrado como Bioclip (www.csiro.au).

En el año 1999, el costo de hEGF se estimaba entre los 210 y 1.000 U\$S/mg (Huang *et al.*, 1999) con un espectro de aplicaciones creciente que impulsa el continuo ensayo de nuevos sistemas para incrementar el rendimiento. Se han utilizado diversos sistemas basados en la producción por secreción al medio de cultivo en *E. coli* K12 (Sivakesava *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2004, Lee, *et al.*, 2000, Huang *et al.*, 1999) y en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* (Hamsa *et al.*, 1998) y *Hansenula polymorpha* (Heo *et al.*, 2002, Moon *et al.*, 2002), con rendimientos que van desde los 60 a 300 mg/l hasta un máximo de 1,5 g/l en un cultivo extendido de *Bacillus brevis*.

En un primer intento de producción de hEGF en plantas transgénicas de tabaco se clonó la secuencia *hegf* bajo el control del promotor 35SCaMV. Se obtuvieron niveles de expresión del 0,001% TPS (Higo, *et al.*, 1993). En el presente trabajo se estudia la expresión y actividad biológica de hEGF en el citoplasma y apoplasto de plantas transgénicas de tabaco y plantas infectadas con vectores virales derivados del *Potato virus X*, PVX (Wirth *et al.*, 2004). Además, se ensayan diversas estrategias para la expresión de hEGF en cloroplastos de tabaco, utilizando un vector diseñado enteramente en el laboratorio.

LA HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA (bGH).

La hormona de crecimiento o somatotropina bovina, es una hormona peptídica sintetizada por la glándula pituitaria (Miller *et al.*, 1980). La bGH es necesaria para el crecimiento de los animales jóvenes y actúa como un estimulante de la producción de leche y como inductor de la fertilización en bovinos adultos. La hormona nativa existe como cuatro variantes biológicamente activas de 190 a 191 aminoácidos y un peso molecular de unos 22 Kda. Posee dos puentes disulfuro y es sintetizada como un precursor de 217 aminoácidos con un péptido señal amino terminal para su secreción. La bGH ha sido producida en *E. coli*, *Streptomyces lividans*, células de ratón y en plantas transgénicas de tabaco, en donde se mostró que altera la morfología de las raíces

(Oh *et al.*, 2003). En este trabajo se presentan los primeros resultados del proyecto de expresión de la bGH en cloroplastos de tabaco.

ANTÍGENOS DE *TOXOPLASMA GONDII*

T. gondii es un parásito protozoario intracelular obligado, agente causal de la toxoplasmosis, una infección de amplia distribución mundial. Este parásito posee un ciclo de vida complejo con una fase sexual que ocurre en el epitelio intestinal de los felinos, sus huéspedes definitivos, y una fase de proliferación asexual que ocurre en una gran variedad de aves y mamíferos, incluyendo al humano. Tanto en los huéspedes intermediarios como en los felinos, las formas de alta capacidad replicativa denominadas taquizoitos pueden proliferar en diversos tejidos y pasar a una forma infectiva crónica, los bradizoitos, que forman quistes en cerebro, hígado y músculo. Existen tres formas de transmisión del parásito: por consumo de carne infectada poco cocida o cruda, por transmisión congénita a través de la placenta y por ingestión o inhalación de las formas replicativas liberadas con las heces de los felinos (Tenter *et al.*, 2000)

Aunque en la mayoría de los casos la infección tanto aguda como crónica es asintomática, puede causar encefalitis severa en individuos inmunosuprimidos y ocasionar daños congénitos como retinocondritis, hepatoesplenomegalia, hidrocefalia y calcificación intracerebral en niños (Suzuki, 2002). La infección congénita puede causar la muerte del feto, especialmente si el contagio se produce durante el primer trimestre del embarazo, y es la principal causa de aborto en ovejas y cabras (Duncanson *et al.*, 2001).

Aunque la infección puede prevenirse, la educación para la salud únicamente, ha mostrado no ser efectiva. La inmunización contra *T. gondii* en animales utilizados para la alimentación detendría la principal vía de transmisión de la enfermedad, y a pesar de que existe una vacuna atenuada para uso veterinario, ésta causa efectos secundarios, tiene corta vida y provee protección por no más de tres años (Nielsen *et al.*, 1999). Además, la obtención de una vacuna eficaz y segura contra *T. gondii* sería valiosa para prevenir la infección congénita y la reactivación en individuos inmunosuprimidos, así como para evitar las pérdidas económicas debido a abortos en animales de granja.

La infección con *T. gondii* se produce por vía intestinal, y se ha observado que la producción de IgA en mucosas genera una respuesta protectora (Velge-Roussel *et al.*, 1994). Tanto la proteína de los gránulos densos GRA4, como el antígeno de superficie SAG1 (también conocido como P30), han demostrado ser capaces de inducir una respuesta inmune sistémica y a nivel de mucosas, lo que los transforma en buenos candidatos para el desarrollo de una vacuna oral (Velge-Roussel *et al.*, 1994; 2001; Mévélec *et al.*, 1998; Desolme *et al.*, 2000). Dadas las ventajas que poseen las plantas para la producción de antígenos, se estudió la expresión de SAG1 y GRA4 en cloroplastos de tabaco utilizando el vector pLDctV en un trabajo realizado como parte de una colaboración con el Dr. Sergio Angel del Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-UNSAM) y el Dr. Henry Daniell de la University of Central Florida, Orlando, EEUU.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS.

1.1 - *ESCHERICHIA COLI*

1.1.1 - Condiciones de cultivo.

Se utilizaron las cepas DH5 α , y BL21 de *Escherichia coli*. Los cultivos líquidos crecieron a 37°C en medio LB (peptona de caseína o triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, y NaCl 5 g/l) con agitación a 220 r.p.m. Los cultivos sólidos se hicieron en placas de petri a 37°C en medio LB adicionado con 1,5 % de agar. El medio se suplementó con antibióticos de acuerdo a la resistencia otorgada por cada plásmido y en las siguientes concentraciones: ampicilina 100 mg/l, kanamicina 50 mg/l, espectinomicina 100 mg/l, estreptomycinina 100 mg/l.

1.1.2 - Preparación de células competentes de *E. coli*.

Las células de *E. coli* se hicieron competentes utilizando el método de Hanahan (1985). Una colonia aislada creció toda la noche en 5 ml de medio LB líquido y de este cultivo, 4 ml se inocularon en 100 ml de medio LB líquido fresco y se dejó crecer nuevamente hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,3. El cultivo se enfrió en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 1900 g durante 5 minutos a 4°C. El precipitado de bacterias se resuspendió suavemente en 40 ml de solución TFB I fría, manteniendo siempre en hielo. Se volvió a centrifugar a 1900 g durante 5 minutos a 4°C y el precipitado se resuspendió en 4 ml de solución TFB II fría. Se incubó en hielo durante 15 minutos para luego alicuotar y conservar a -70°C.

TFB I		TFB II	
Acetato de Potasio	30 mM	MOPS	10 mM
RbCl ₂ o KCl	100 mM	RbCl ₂ o KCl	10 mM
CaCl ₂	10 mM	CaCl ₂	75 mM
MnCl ₂	50 mM	Glicerol	15 %
Glicerol	15 %		
Ajustar a pH 5,8 con 0,2 M de ácido acético		Ajustar a pH 6,5 con KOH 1 M	

1.1.3 - Transformación de células competentes de *E. coli*.

Se incubó el ADN con 100 µl de células competentes en hielo durante 15 minutos. La transformación se hizo mediante el pasaje rápido de la mezcla de ADN y bacterias a 42°C durante 90 segundos. Transcurrido este tiempo se incubó nuevamente en hielo durante 5 minutos y se agregaron 0,8 ml de medio LB líquido. Las bacterias se incubaron luego a 37°C durante 30 minutos, antes de sembrarlas en medio sólido con antibióticos.

1.2 - *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

1.2.1 - Cepas y condiciones de cultivo.

Se utilizaron las cepas GV3101, que posee resistencia genómica a rifampicina (100 mg/l) y plasmídica (pTiC58) a gentamicina (100 mg/l), y LBA4404 que posee resistencia genómica a rifampicina y plasmídica (pAL4404) a estreptomycinina (100 mg/l). Los cultivos de *A. tumefaciens* se crecieron en el medio LB ya descrito o en medio YM (extracto de levadura 0,04 %, manitol 1 %, NaCl 1,7 mM, MgSO₄ 0,8 mM, K₂HPO₄ 2,2 mM, pH 7). El cultivo se hizo a 28°C con agitación a 200 r.p.m.

1.2.2 - Preparación de células competentes de *A. tumefaciens*.

Una colonia aislada de *A. tumefaciens* se sembró en 5 ml de medio LB o YM y se cultivó durante toda la noche a 28°C con agitación. Este cultivo se utilizó como inóculo para sembrar 200 ml de medio fresco, que crecieron con agitación a 28°C hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,5. Ambos medios de cultivo se suplementaron con los antibióticos para los cuales es resistente la cepa de *A. tumefaciens* utilizada. El cultivo se centrifugó a 1100 g durante 15 minutos a 4°C y el precipitado se resuspendió suavemente y en frío, en 200 ml de agua bidestilada estéril. Se volvió a centrifugar y se resuspendió el precipitado en 1 ml de glicerol 10 % estéril. Las bacterias así preparadas se separaron en alícuotas y se conservaron a -70°C.

1.2.3 - Transformación de células competentes de *A. tumefaciens*.

Las bacterias de *A. tumefaciens* competentes se transformaron utilizando el método descrito por Holsters *et al* (1978). Se incubaron en N₂ líquido durante 10 minutos, 50 µl de medio LB, 50 µl de bacterias competentes y entre 500 ng y 1 µg de ADN, seguidos de 10 minutos a 37°C. Este proceso de pasaje de temperatura se repitió un total de tres veces y las bacterias luego se incubaron en 5 ml de medio LB sin antibióticos durante 5 horas a 28°C. El cultivo se concentró por centrifugación y se sembró en medio sólido selectivo incubando a 28°C durante al menos 48 horas.

2. LÍNEAS DE PLANTAS

Se utilizaron *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi D8 para las transformaciones mediadas por *A. tumefaciens* y *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana para las transformaciones de cloroplastos por biobalística.

Las infecciones con los vectores virales se hicieron en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum* cv. Xanthi D8.

3. AISLAMIENTOS VIRALES

3.1 – PVX (POTATO VIRUS X)

Se utilizó la cepa CP del virus X de la papa (PVX-CP), (Orman *et al*, 1990).

3.2 – PVY (POTATO VIRUS Y)

Se utilizó la cepa de virus Y de la papa ordinaria (PVY⁰) aislada en el Centro Internacional de la Papa (Lima-Perú) y caracterizada parcialmente en nuestro laboratorio (Bravo-Almonacid y Mentaberry, 1989).

4. PLÁSMIDOS

4.1 - COMERCIALES

- i) **pBlueScript** (Invitrogen Life Technologies) y **pGem-3Zf(-)** (Promega): vectores de clonado.
- ii) **pBI121** (Clontech Laboratories): plásmido binario derivado del pBin19, que posee orígenes de replicación para *E. coli* y *A. tumefaciens*. Este plásmido contiene la secuencia *uidA* que codifica la enzima β -glucuronidasa bacteriana (GUS), bajo el control transcripcional del promotor 35S del CaMV (35SCaMV) y la señal de terminación de la transcripción del gen de la nopalina sintetasa de *A. tumefaciens*. Contiene además, la secuencia codificante de la neomicina fosfotrasferasa II (*npt II*), que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, bajo el control del promotor (pNOS) y la secuencia terminadora (tNOS) del gen de la nopalina sintetasa de *A. tumefaciens*. Ambos genes se encuentran clonados entre los bordes derecho e izquierdo del ADN-T.
- iii) **pZeRO-2**, (Invitrogen Life Technologies) y **pGEM-T-easy** (Promega): vectores de clonado para productos de amplificación por PCR.

4.2 - NO COMERCIALES

- i) **pET-EGF**: plásmido derivado del vector pET11a (Novagen) que contiene la secuencia del factor de crecimiento epidérmico humano (*hegf*) maduro. Este plásmido fue obtenido y gentilmente cedido por el Dr. Gerardo Glikin (BioSidus, Argentina).
- ii) **pGEMEGF**: plásmido derivado del vector pGEM-3Zf(-) (Promega) en el que se clonó el fragmento de ADN que contiene la secuencia *hegf*, cortado con las enzimas Xba I y Hind III del pET-EGF.
- iii) **pHAP12**: plásmido derivado del pUC18 y que contiene la secuencia que codifica el precursor de la proteína AP24 de tabaco bajo el control

transcripcional de una versión extendida del promotor 35S del CaMV (35S(L)CaMV, Coego *et al.*, 1996), la secuencia potenciadora de la traducción Ω del TMV (*Tobacco mosaic virus*) y la secuencia terminadora tNOS. Este plásmido fue obtenido y gentilmente cedido por el Dr. Lázaro Hernández (CIGB, Cuba).

- iv) **p35EGF**: plásmido binario derivado del pBI121, en el cual la secuencia *uidA* se reemplazó por la secuencia *hegf* obtenida del pET EGF cortando con las enzimas Xba I y Sac I (Figura M1a, Wirth *et al.*, 2004).
- v) **p35(L)EGF**: plásmido binario derivado del pBI121 en el cual el promotor 35SCaMV y la secuencia *uidA* se reemplazaron por un fragmento de ADN que contiene el promotor 35S(L)CaMV y la secuencia Ω de TMV, obtenido del plásmido pHAP12, y la secuencia *hegf* obtenida del pET EGF (Figura M1b, Wirth *et al.*, 2004).
- vi) **p35AP_LEGF**: plásmido binario derivado del pBI121 en el cual la secuencia *uidA* se reemplazó por la fusión de la secuencia que codifica los primeros 38 aminoácidos del precursor de AP24 (ssAP) a *hegf* (ssAP-*hegf*) (Figura M1c, Wirth, 1999). La secuencia ssAP incluye la región que codifica el péptido señal de AP24 (primeros 21 aa) y los primeros 17 aa de la proteína madura (Figura M2).
- vii) **p35(L)AP_LEGF**: plásmido binario derivado del pBI121 en el que las secuencias del promotor 35SCaMV y *uidA* se reemplazaron por el promotor 35S(L)CaMV y la secuencia Ω de TMV, obtenidos ambos del plásmido pHAP12, y la fusión ssAP-*hegf* (Figura M1d, Wirth, 1999).
- viii) **pNh-EGF-67**: Plásmido intermediario, derivado del pXNhG-67, obtenido reemplazando la secuencia *uidA* por *hegf*. Contiene el fragmento derivado del genoma de PVX comprendido entre los dos sitios únicos Nhe I (posiciones 4874 y 5792) que incluye parte del bloque triple de genes, parte del gen de la cápside viral con su promotor subgenómico y una duplicación de este promotor y la

secuencia codificante de los primeros 14 aa de la cápside viral fusionada a *hegf* (Figura M3, Calamante, 1998).

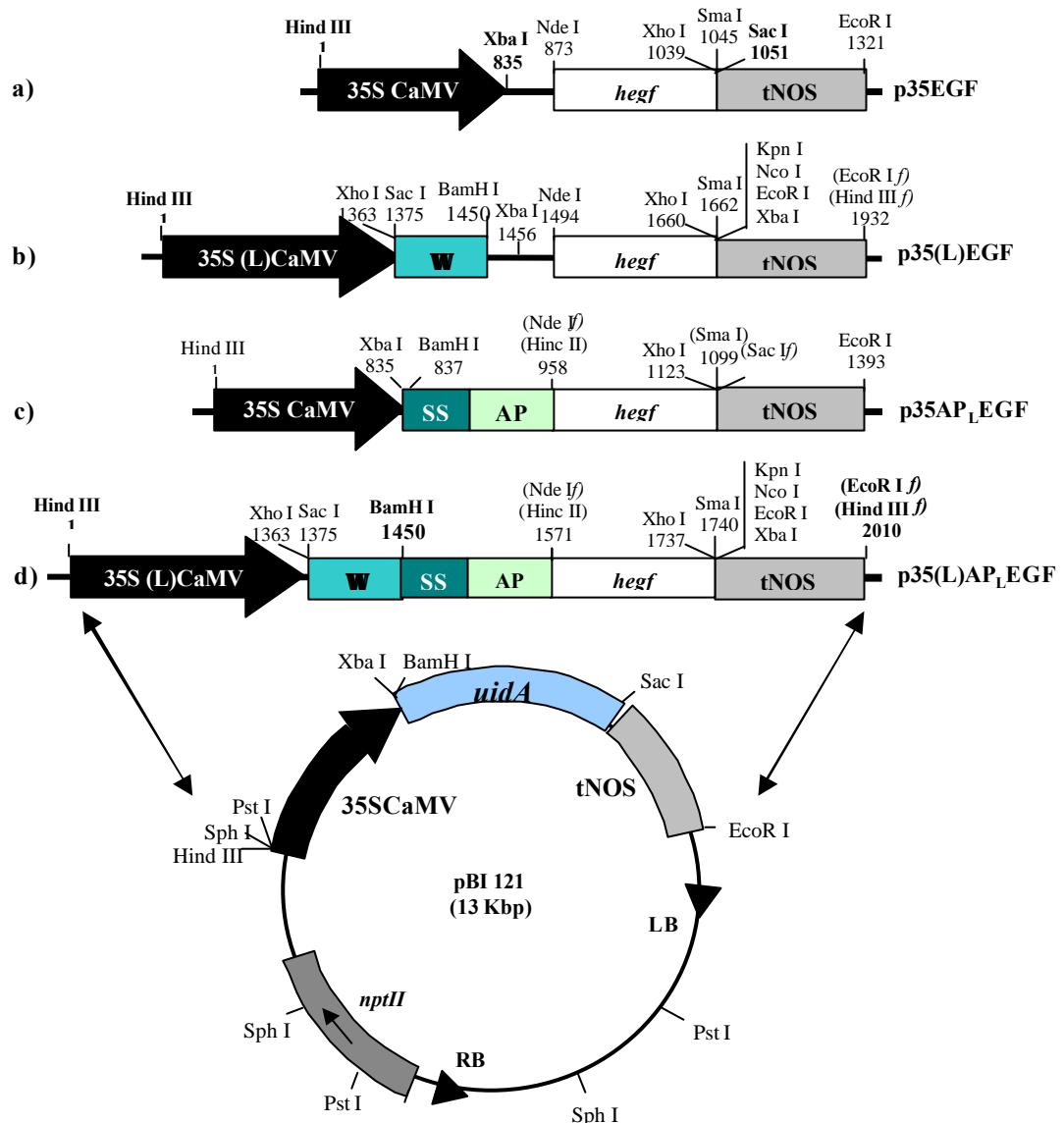


Figura M.1. Mapa detallado de las construcciones utilizadas para la transformación de *N. tabacum* vía *Agrobacterium*. Las cuatro construcciones mostradas derivan del vector binario pBI121. a) y b) versiones citoplasmáticas p35EGF y p35(L)EGF respectivamente. c) y d) Versiones apoplásticas p35AP_LEGF y p35(L)AP_LEGF respectivamente. 35SCaMV: promotor 35S del CaMV, 35S(L)CaMV: versión extendida del promotor 35SCaMV. Ω: secuencia potenciadora de la traducción del TMV. tNOS: Terminador del gen de la nopalina sintetasa de *A. tumefaciens*. *hegf*: secuencia del factor de crecimiento epidérmico humano. ss y AP: secuencias codificantes del péptido señal de AP24 y de los primeros 17 aa de la proteína madura, respectivamente. *nptII*: secuencia codificante de la neomicina fosfotransferasa II. RB y LB: bordes derecho e izquierdo del ADN-T, respectivamente.

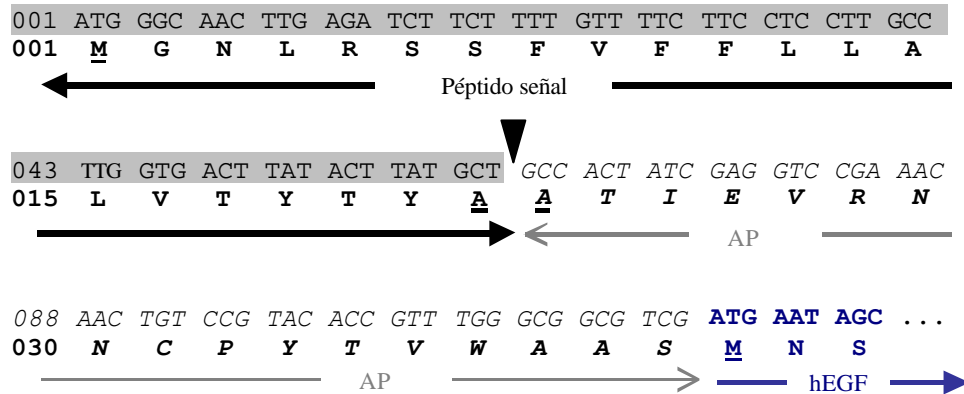


Figura M.2 *Fusión ssAP-hegf*. Se muestra la secuencia nucleotídica de la fusión *ssAP-hegf* (línea superior) y la traducción a partir del ATG inicial (línea inferior). La punta de flecha indica el sitio de corte de la peptidasa endoplasmática entre las posiciones 21 y 22 del precursor de AP24.

ix) **pPVX3**: plásmido derivado del vector pUC18 que lleva el genoma completo de PVX bajo el control transcripcional del promotor del fago T7 (Figura M4, Calamante, 1998).

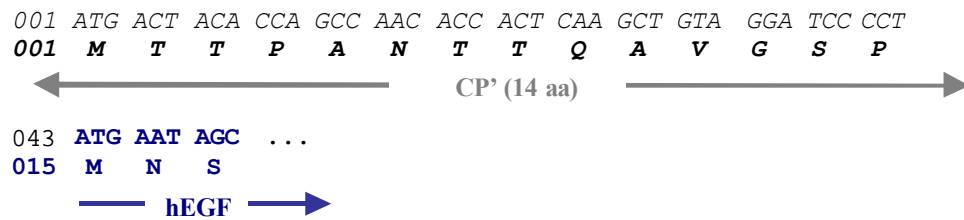


Figura M.3. *Secuencia de la fusión CP-hegf*. Se indica la secuencia nucleotídica (línea superior) y la correspondiente secuencia aminoacídica (línea inferior), de la fusión de *hegf* a la secuencia que codifica los primeros 14 aa de la cápside de PVX. Las posiciones de los aminoácidos se indican a partir de la metionina en donde se inicia la traducción de la fusión.

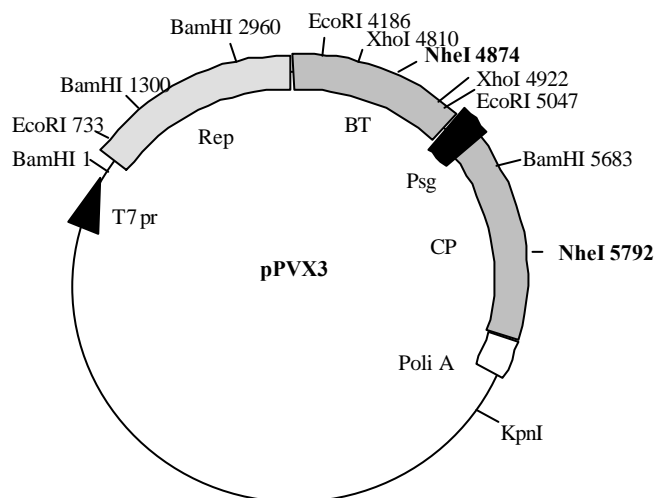


Figura M.4. Estructura del plásmido *pPVX3*. Rep: replicasa de PVX (ARN polimerasa dependiente de ARN). BT: bloque triple de genes. Incluye las secuencias codificantes de las proteínas de movilización p24, p12 y p8. Psg: promotor subgenómico de la cápside. CP: secuencia codificante de la cápside de PVX. poliA: tracto de adeninas. T7 pr: promotor del fago T7.

- x) **pPVXEGF**: plásmido obtenido reemplazando el fragmento comprendido entre los sitios *Nhe I* de *pPVX3* por el fragmento *Nhe I* del *pNh-EGF-67*. Contiene el genoma completo de PVX con la secuencia *hegf* clonada bajo el control transcripcional de una duplicación del promotor subgenómico de la cápside entre los genes del bloque triple y de la cápside viral. Toda la construcción está bajo el control transcripcional del promotor del fago T7 (Figura M5, Calamante, 1998).

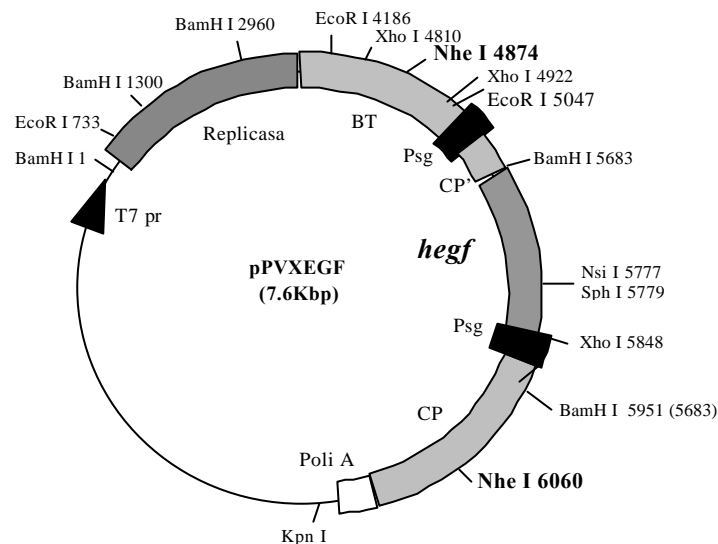


Figura M5. Estructura del plásmido *pPVXEGF*. La secuencia *hegf*, fusionada a las primeras 42 pb de la cápside viral (CP') y bajo el control transcripcional de una duplicación del promotor subgenómico de la cápside (Psg) se clonó entre los genes del bloque triple (BT) y la cápside de PVX (CP). Replicasa: ARN polimerasa dependiente de ARN. T7 pr: promotor del fago T7, poli A: tracto de adeninas. Los números indican la posición respecto del genoma de PVX clonado en el vector *pPVX3*.

- xi) **pBGH VL**: plásmido derivado del *pUCbGH18* (BioSidus Argentina), que contiene la secuencia codificante de la hormona de crecimiento bovino (bGH).
- xii) **pQE32-SAG 1**: plásmido derivado del *pQE32* (Qiagene) que contiene la secuencia codificante del antígeno de superficie 1 (SAG 1, P30) maduro de *T.*

gondii (aminoácidos 77 a 336) (Nigro *et al.*, 2003). Este plásmido fue gentilmente cedido por el Dr. Sergio Angel.

- xiii) **pQE30-Gra4**: plásmido derivado del pQE30 (Qiagene) que contiene la secuencia codificante de la proteína Gra4 madura de *T. gondii* (aminoácidos 21 a 345). Este plásmido fue gentilmente cedido por el Dr. Sergio Angel.
- xiv) **pLDctv**: Vector de transformación de cloroplastos diseñado por los Drs. Lee y Daniell y utilizado como parte de una colaboración con la University of Central Florida, Orlando, EE.UU., y con el Dr. Sergio Angel para la expresión de antígenos de *T. gondii* en cloroplastos de tabaco.

5. SECUENCIAS

5.1 - FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO (hEGF).

Se muestra la secuencia nucleotídica (línea superior) y la correspondiente secuencia aminoacídica (línea inferior) del hEGF maduro. Las cisteínas que forman los tres puentes disulfuro (6-20, 14-31 y 33-42) se encuentran sombreadas. Secuencia completa (pre-pro-hEGF): Número de acceso del Genbank: NM_001963, Swiss Prot: P01133.

```

001 aatagcgattctgaatgtccgctgtcccacgatgggtactgcctccatgatgggtgtgtgc
001 N S D S E C P L S H D G Y C L H D G V C
061 atgtatattgaagcattggacaagtatgcatgcaactgtgttggctacatcggggag
021 M Y I E A L D K Y A C N C V V G Y I G E
121 cgatgtcagtaccgagacctgaagtgggtgggaactgcgc
041 R C Q Y R D L K W W E L R

```

5.2 - HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINO (bGH).

Secuencia nucleotídica (línea superior) y la correspondiente secuencia aminoacídica (línea inferior) de la bGH madura. Las cisteínas que forman los puentes

disulfuro (52-163 y 180-188) se encuentran sombreadas. Número de acceso del Genebank: NM_180996, Swiss Prot: P01246.

```

001 ttcccagccatgtccttgtccggcctgtttgccaacgctgtgctccgggctcagcacctg
001 F P A M S L S G L F A N A V L R A Q H L
061 catcagctggctgctgacaccttcaaagagtttgagcgcacctacatcccggaggacag
021 H Q L A A D T F K E F E R T Y I P E G Q
121 agatactccatccagaacaccaggttgcttctgcttctctgaaaccatcccggccccc
041 R Y S I Q N T Q V A F C F S E T I P A P
181 acgggcaagaatgaggcccagcagaaatcagacttgagctgcttcgcatctcactgctc
061 T G K N E A Q Q K S D L E L L R I S L L
241 ctcacccagctcgtggcttgggcccctgcagttcctcagcagagtcttcaccaacagcttg
081 L I Q S W L G P L Q F L S R V F T N S L
301 gtgtttggcacctcggaccgtgtctatgagaagctgaaggacctggaggaaggcatcctg
101 V F G T S D R V Y E K L K D L E E G I L
361 gccctgatgcgggagctcgaagatggcaccctgggctgggcagatcctcaagcagacc
121 A L M R E L E D G T P R A G Q I L K Q T
421 tatgacaaaatttgacacaaacatgcgcagtgacgacgcgctgctcaagaactacggctctg
141 Y D K F D T N M R S D D A L L K N Y G L
481 ctctctgcttccggaaggacctgcataagacggagacgtacctgagggatcatgaagtgc
161 L S C F R K D L H K T E T Y L R V M K C
541 cgccgcttcggggaggccagctgtgccttc taa
181 R R F G E A S C A F -

```

5.3 - ANTÍGENO DE SUPERFICIE 1 (SAG 1) DE *T. GONDII*.

Secuencia nucleotídica (línea superior) y peptídica (línea inferior) del antígeno mayor de superficie 1 (SAG 1) maduro de *T. gondii*. Se muestra sombreada la región carboxilo terminal clonada en pLDctV.

```

001 ttactctcaagtgccctaaaacagcgcctcacagagcctcccactcttgcgtactcacc
001 F T L K C P K T A L T E P P T L A Y S P
061 aacaggcaaatctgcccagcgggtactacaagtagctgtacatcaaaggctgtaacattg
021 N R Q I C P A G T T S S C T S K A V T L
121 agctccttgattcctgaagcagaagatagctggaggcgggggattctgctagtctcgac
041 S S L I P E A E D S W W T G D S A S L D
181 acggcaggcatcaaactcacagttccaatcgagaagttccccgtgacaacgcagacgttt
061 T A G I K L T V P I E K F P V T T Q T F
241 gtggtcgggtgcatcaaggagacgacgcacagagttgtatgggtcacagtgcagtagtaa
081 V V G C I K G D D A Q S C M V T V T V Q
301 gccagagcctcatcggctcgtcaataatgtcgcaagggtgctcctacgggtgaaacagcact
101 A R A S S V V N N V A R C S Y G A N S T
361 cttggctcctgtcaagttgtctgcggaaggaccactacaatgaccctcgtgtgcgggaaa
121 L G P V K L S A E G P T T M T L V C G K
421 gatggagtcaaagttcctcaagacaacaatcagtagtcttccgggacgacgctgactgg
141 D G V K V P Q D N N Q Y C S G T T L T G
481 tgcaacgagaaatcgttcaagatattttgccaaaattaagtgagaaccctggcagggt

```



```

161 C N E K S F K D I L P K L S E N P W Q G
541 aacgcttcgagtgataatggtgccacgctaacgatcaacaaggaagcatttccagccgag
181 N A S S D N G A T L T I N K E A F P A E
601 tcaaaaagcgtcattattggatgcacaggggatcgctgagaagcatcactgtaccgtg
201 S K S V I I G C T G G S P E K H H C T V
661 caactggagtttgccggggtgcaggggtcagcaaatcgtctgcgggaacagccagtcac
221 Q L E F A G A A G S A K S S A G T A S H
721 gtttccatttccgcatggtgaccggacttattggttctatcgcagcttgtgtcgcgtga
241 V S I F A M V T G L I G S I A A C V A -

```

5.4 - PROTEÍNA GRA4 DE *T. GONDII*

Secuencia nucleotídica (línea superior) y peptídica (línea inferior) de la proteína de los gránulos densos Gra4 madura de *T. gondii*. Se muestra sombreada la región carboxilo terminal clonada en pLDctV.

```

001 ggtgagtgagcgtttggttctcacctcgcagatatggcgggcctctcggggcggcatgac
001 G E C S F G S H L A D M A G L S G R H D
061 aaagaacgccatcaggcgaaaaagagataactaccactcgatgtacggaaaccaaactccg
021 K E R H Q A K K R Y Y H S M Y G N Q T P
121 tatccctacgcaaatggacagcaggcctctccacctcctcagggacagctacttattatc
041 Y P Y A N G Q Q A S P P P Q G Q L L I I
181 caaaaccctgatggatctttcatgatcgtagaccaacaaggcgtcccgcaggtgccccag
061 Q N P D G S F M I V D Q Q G V P Q V P Q
241 gcggcgaggagcccggttctcccatgaatggcgggtactacatgcctacaggtgtctac
081 A A G G P G S P M N G G Y Y M P T G V Y
301 actgcacaagtcgttccaggaacacctggtcaccccgtagaggcattccgcagcagcct
101 T A Q V V P G T P G H P V Q A I P Q Q P
361 cttcgcacacaagcaacggccacctattatcacccggcagcagttcctcctcccgggtcct
121 L R T Q A T A T Y Y H P A A V P P P G P
421 tcagttttgtcttcacccatcctctgttcaaccgggtgcggagggtgactcccggttat
141 S V F V F T P S S V Q P G A E V T P G Y
481 tctggtctgcagttgagacaacagtctcaatacgggttacagctatccaggtactacttct
161 S G L Q L R Q Q S Q Y G Y S Y P G T T S
541 actcccacgcctccaccaccagcgtcgtacgggtaccagtgtttccggcatttccacgg
181 T P T P P P P A S Y G Y P V F P A F P R
601 ctgcccgcgttttctgactcagtttccggttcaactgaagatagtggttctacagggcgc
201 L P A F S D S V S V S T E D S G L T G V
661 aaagactcgtcatcctctgaatccacggtcacgccggcagacgaagctgcttcggagtc
221 K D S S S S E S T V T P A D E A A S E S
721 gaagagggagacaagacaagcaggaaatctaagggtcaagaaggaatcctgacgggggta
241 E E G D K T S R K S K V K K G I L T G L
781 ggggtagcagcaacgctggcagcagcagcggccgcgcaaaaggctgtcaagggatttgg
261 G V A A T L A A A A A A A K A V K G F G
841 ggcacccgcacttccacggcctgctgaggctggaaaaacggagttggacgacggat
281 G T R T S T A P A E A G K T E L D D G Y
901 cgcccgccttcaaccgcgaccctcaccctacgccgagttattgaaggatttggaa
301 R P P P F N P R P S P Y A E L L K D L E
961 agaatgcgcaagagtg 978
321 R M R K E - 325

```

6. OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES

Las secuencias de los oligonucleótidos iniciadores utilizados a lo largo de este trabajo se muestran en la siguiente tabla. Los nt sombreados corresponden a la secuencia de los sitios enumerados en la tercer columna. RBS: secuencia GGAGG, sitio de unión del ribosoma.

Nombre	Secuencia 5' – 3'	Sitios
3'Gra4XbaI	GCT CTA GA_TCA CTC TTT GCG CAT TC	Xba I
3'P30XbaI	GCT CTA GAT CAC GCG ACA CAA GCT GCG	Xba I
35S	ATC TCC ACT GAC GTA AGG GA	
4P	CCC TTA TGC CCT TGG CGA CAC ACG T	
5'Gra4blunt	CTG CAG TTG AGA CAA CAG TCT C	
5'Gra4NdeI	GGA ATT CCA TAT GCT GCA GTT GAG ACA ACA G	Nde I
5'P30blunt	ATG GTC ACG GTG ACA GTA C	
5'P30NdeI	GGA ATT CCA TAT GGT CAC GGT GAC AGT AC	Nde I
aadA5	AGC CGC GGT AAA AGG AGG TTA AAC ATC	Sac II / RBS
aadArev	TTG AGC TCG ACA TTA TTT GC	BamH I
APA	CTC GGA ATT CGC AGC ATA AG	EcoR I
bGHantisense	CGT CTA GAT TAG AAG GCA CAG C	Xba I
bGHsense	GTG CAT ATG TTC CCA GCC ATG	Nde I
cloroFw	GTA TCT GGG GAA TAA GCA TCG G	
cloroRv	CGA TGA CGC CAA CTA CCT CTG	
EGF3	CTC GAG TCA GCG CAG TTC	
EGFB	ATG AAT TCC GAT TCT GAA TG	EcoR I
ENKEGF	GAT ATC GAT GAT GAT GAT AAT ATG AAT AGC GAT TCT G	EcoR V
GUS3	GGA GAG TTC TAG ATT CAT TG	
GUS5	GGA GCT CCG GGA GGT CAG TCC CAT ATG T	Sac I/RBS/Nde I
HIS3	AGG CCT TCC ATC TAT ACC AGA AGA ATG ATG ATG	Stu I
HIS5	TCC CAT ATG CAC CAT CAT CAT CAT CAT TCT TC	Nde I
prn3	TAG ACA CCG CGG ATT CG	Sac II
prn5	TTT ACT AGT TGG ATT TGC TC	Spe I
SP6	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G	
Trps163	ACG GGA TCC AAT GGA AGC	
Trps165	AAT CTA GAC TAA TCA ACC GA	
UpsbA3	CTA AAA TTG CAG TCA TAT GAA AAT C	Nde I
UpsbA5	TCG GTA CCG AGC TCC GTA TTT TTC C	Kpn I

7. METODOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE

7.1 - AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

7.1.1 - Mini preparación de ADN plasmídico

7.1.1.1 - Método de lisis alcalina

Se inoculó una colonia bacteriana en 5 ml de medio LB suplementado con antibióticos y se cultivó toda la noche con agitación a 37°C. Se cosecharon por centrifugación entre 1,5 y 4,5 ml de cultivo y se resuspendieron en 300 µl de solución 1 (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, ribonucleasa A 100 µg/ml). Se agregaron 300 µl de solución 2 (NaOH 200 mM, SDS 1 %), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos. Se agregaron luego, 300 µl de solución 3 (acetato de potasio 3 M, pH 5,5), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Transcurrida la incubación se centrifugaron las muestras a 15700 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, al cual se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol. Se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente 15700 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70 %, se secó y se resuspendió en 30 µl de H₂O bidestilada.

7.1.1.2 -Purificación de ADN plasmídico utilizando matrices comerciales de fibra de vidrio

Las preparaciones de ADN plasmídico para secuenciación se hicieron utilizando los sistemas de purificación *Wizard plus SV minipreps DNA Purification System* (Promega) y *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham Biosciences), siguiendo los protocolos suministrados con los mismos. Ambos sistemas consisten en una modificación del método de lisis alcalina, en la que el paso de precipitación del ADN con isopropanol, se reemplazó por el pasaje a través de una columna conteniendo una matriz de fibra de vidrio. El ADN unido diferencialmente a la columna se eluyó con 50 a 100 µl de H₂O de acuerdo a la concentración final de ADN deseada.

7.1.2 - Preparación del ADN plasmídico a gran escala

Para la preparación de ADN plasmídico a gran escala se utilizaron los sistemas comerciales *QIAGEN Plasmid Midi Kit* y *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (Qiagen), siguiendo los protocolos sugeridos por la empresa.

7.2 - PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS E INSERTOS

7.2.1 - Amplificación de insertos por PCR

La amplificación de fragmentos de ADN por PCR, se hizo utilizando las enzimas *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies) o *Pfu* ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies), de acuerdo a las condiciones sugeridas y con los *buffers* suministrados por la empresa proveedora. Se utilizaron 10 ng de ADN molde y entre 100 y 150 ng de cada oligonucleótido iniciador por reacción.

7.2.2 – Corte con enzimas de restricción

Los cortes de plásmidos e insertos de ADN para clonado, así como los mapeos de restricción, se realizador con enzimas comerciales de acuerdo a las condiciones especificadas por cada empresa proveedora (New England Biolabs, Promega, Amersham Biosciences, Gibco BRL). Los cortes que implicaron el uso de más de una enzima de restricción, cuyas condiciones de incubación eran incompatibles entre sí, se hicieron en forma secuencial, purificando el ADN por precipitación con acetato de amonio y etanol luego de cada reacción. Todas las reacciones se incubaron entre 1 y 2 horas a la temperatura correspondiente y utilizando 5 unidades de enzima por cada μg de ADN. Los productos cortados se separaron por electroforesis en geles de agarosa entre 1 y 2 % en TAE 1X (Tris-ácido acético 40 mM pH 8, EDTA disódico 2 mM) conteniendo 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio para su visualización por exposición a luz UV en un transiluminador *Image Master VDS* (Pharmacia Biotech).

7.2.3 - Rellenado de extremos 5' extendidos

El relleno de extremos 5' extendidos generados por restricción, se hizo por polimerización con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (New England Biolabs). El ADN cortado se llevó a una concentración de 50 ng/μl en cualquiera de los *buffers* de restricción y se incubó con 33 μM de cada dNTP y 1 unidad de Klenow por cada μg de ADN, a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se detuvo incubándola a 75°C durante 20 minutos. Puesto que esta enzima puede conservar parte de su actividad 3' - 5' exonucleasa luego del tratamiento con calor, se hizo una extracción fenólica para asegurar su inactivación y evitar el posible daño de los extremos rellenos.

7.2.4 - Desfosforilación de extremos compatibles

Los plásmidos con extremos romos y cohesivos compatibles, se desfosforilaron previamente a la reacción de ligación. Se utilizó la fosfatasa alcalina SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, Promega), en las condiciones indicadas por el fabricante. El ADN purificado se incubó a 37°C durante 15 minutos con 1 unidad de SAP por cada μg de ADN, en el *buffer* suministrado con la enzima. en 50 μl de reacción. La enzima se inactivó calentando la reacción a 65°C durante 15 minutos.

7.2.5 - Purificación de plásmidos y fragmentos de ADN

7.2.5.1 - Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de Agarosa.

Los plásmidos, fragmentos de ADN y productos de PCR se separaron e identificaron por electroforesis en geles de agarosa entre 1 y 2 % en TAE 1X y geles de agarosa de bajo punto de fusión 1 % (*Low Melt Point Agarose*, Gibco BRL). Las bandas de interés se cortaron del gel y el ADN se purificó utilizando sistemas comerciales basados en el pegado diferencial del ADN a una matriz de fibra de vidrio (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, Amersham Biosciences o *Wizard PCR Preps DNA Purification System*, Promega).

7.2.5.2 - Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de poliacrilamida.

Los fragmentos de tamaños inferiores a 100 pb se separaron y purificaron a partir de minigeles de poliacrilamida 8 % de 10 x 10 cm y 1,5 mm de espesor. Para el armado de cada gel, 4 ml de una mezcla 30:1 de acrilamida: bisacrilamida se llevaron a un volumen final de 15 ml en TBE 1X (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH 8), a los que se agregaron 8,5 μ l de TEMED (N,N,N,N-Tetrametilethilendienamina) y 62,5 μ l de persulfato de amonio 10 %. La electroforesis se realizó en *buffer* TBE 1X a 100V. La banda de interés se identificó por tinción del gel con bromuro de etidio. Se cortó la porción del gel que contenía el fragmento a purificar y se incubó con 2 volúmenes de *buffer* de elución (acetato de amonio 0,5 M, acetato de magnesio 10 mM, EDTA disódico 1 mM, SDS 0,1 %), a 50°C durante 1 hora. Los restos de poliacrilamida se eliminaron por filtrando a través de papel GF/C (Whatman International Ltd.).

7.2.5.3 - Extracción fenólica.

Se agregó a la mezcla de reacción a purificar, 1 volumen de fenol equilibrado con Tris-HCl 1 M pH 8. Se mezcló agitando vigorosamente y se centrifugó a 15000 g durante 3 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se transvasó a un nuevo tubo y se extrajo con un volumen de cloroformo. Se centrifugó nuevamente y se precipitó el ADN de la fase acuosa con 0,5 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M y 3 volúmenes de etanol absoluto frío, incubando a -70°C durante 15 minutos o a -20°C durante 30 minutos. Se centrifugó a 15000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con etanol 70 %, se dejó secar y se resuspendió en H₂O bidestilada.

7.3 - REACCIONES DE LIGACIÓN

Las reacciones de ligación de plásmidos e insertos se hicieron utilizando la ADN ligasa del fago T4 (Gibco BRL; Invitrogen Life Technologies). Se usaron entre 25 y 50 ng de plásmido y relaciones molares de extremos plásmido:inserto variables entre 1:1 y 1:10. En cada caso se utilizó el *buffer* suministrado junto con la enzima en un volumen final de 20 μ l de reacción. La cantidad de T4 ADN ligasa utilizada varió de acuerdo a

las características de los extremos a ligar. Se utilizaron 0,1 y 1 unidad de enzima por reacción cuando se intentaban ligar extremos cohesivos o romos respectivamente y 0,5 unidades cuando ambos tipos de extremos estaban presentes. Las reacciones se incubaron a 16°C entre 4 y 16 horas.

7.4 - CONDICIONES ESPECIALES DE LIGADA. PRODUCTOS DE PCR

Los productos de amplificación con *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies) se ligaron al vector pGEM-T-Easy (Promega) utilizando la ADN ligasa y el *buffer* de ligado rápido suministrados junto con el vector de clonado. La reacción se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Las bacterias transformadas con el producto de la ligación se sembraron en placas adicionadas con 30 µl de IPTG 100 mM y 30 µl de X-gal 2 % en dimetilformamida, para diferenciar los posibles clones positivos por la coloración blanca de las colonias respecto de la azul de los vectores religados o sin cortar que expresan la β-galactosidasa.

Los fragmentos amplificados con las ADN polimerasas *Pfu* o *Pfx* (Invitrogen Life Technologies) se subclonaron en el vector pZeRO-2 (Invitrogen Life Technologies), utilizando el *buffer* y la ADN ligasa suministradas. . Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 16°C.

8. INFECCIÓN DE PLANTAS DE TABACO

8.1 - TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO* DEL ARN VIRAL.

El ARN viral utilizado para la infección de plantas de *N. benthamiana* se obtuvo por transcripción *in vitro* utilizando el sistema *RiboMAX T7* (Promega). Entre 1 y 3 µg de los plásmidos pPVX3, pPVXEGF y pPVXAPEGF, linealizados con la enzima Kpn I (New England Biolabs), se incubaron con 5 unidades del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (Promega) y 4 µl de *buffer* de transcripción T7 5X, a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrida la incubación se agregaron a la reacción 5 µl de rNTPs (6,25 mM de rATP, rCTP y rUTP y 0,6 mM de rGTP), 0,6 mM de análogo de

CAP (m⁷G(5')ppp(5')G; New England Biolabs), 10 % v/v de DMSO y 2 µl de la enzima T7 ARN polimerasa. La mezcla se incubó a 37°C durante una hora. Se tomó una alícuota para verificar la presencia del transcripto por electroforesis en un gel 1 % de agarosa, no desnaturizante, y al resto de la reacción se le agregaron 1µl de rGTP 100 mM y 1µl de T7 ARN polimerasa y se incubó a 37°C durante una hora más. Se obtuvieron entre 1 y 2 µg de ARN viral por reacción.

8.2 - INOCULACIÓN DE PLANTAS DE TABACO CON EL ARN VIRAL SINTETIZADO *IN VITRO*.

Al producto final de la reacción de transcripción *in vitro* se agregaron 80 µl de *buffer* sodio-fosfato 20 mM pH 7 libre de ribonucleasas y se utilizaron 40 µl de esta mezcla por cada planta a ser infectada. Se seleccionaron dos hojas completamente expandidas de plantas jóvenes (13 semanas luego de la germinación de las semillas) y se espolvorearon con *carborundum* (Fisher Scientific) como abrasivo, sobre el cual se distribuyeron, en pequeñas gotas, 20 µl de la reacción de transcripción por hoja. La inoculación se hizo distribuyendo suavemente con un dedo de una mano enguantada, el *carborundum* y el ARN por toda la superficie de la hoja. De esta forma se provocan micro-heridas por donde ingresa el transcripto viral. Se dejó secar y se lavaron los restos de *carborundum* con agua. Los síntomas se visualizaron aproximadamente a la semana de infección como manchas cloróticas. Algunas hojas de esta primera infección se liofilizaron y conservaron a -70°C para su utilización como fuente de virus en las infecciones posteriores.

8.3 - INOCULACIÓN DE PLANTAS DE TABACO CON MATERIAL VEGETAL INFECTADO.

La inoculación de plantas de tabaco con material infectado se hizo de la misma forma que la inoculación con la mezcla de transcripción *in vitro*, pero utilizando como inóculo extractos de hojas colectadas y liofilizadas luego de la primera infección de *N. benthamiana* y de hojas de plantas de *N. tabacum* infectado con PVY. Los síntomas fueron visibles aproximadamente a la semana de la infección como evidentes manchas

cloróticas en las infecciones con PVX y como una leve clorosis en las plantas infectadas con PVY.

9. TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE TABACO.

9.1 - TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE TABACO MEDIADA POR *A. TUMEFACIENS*.

La transformación de plantas de *N. tabacum* cv Xanthi D8 por *A. tumefaciens* se hizo siguiendo el protocolo descrito por Horsch *et al* (1985). Brevemente, se cortaron discos de unos 2 a 4 cm² de hojas de plantas cultivadas *in vitro* a los que se hicieron pequeñas heridas y se los incubó entre 30 minutos y una hora en 20 ml de medio MS líquido (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 200 µl de un cultivo de *A. tumefaciens* recombinante crecido durante toda la noche. Los discos se secaron entonces sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de bacterias y se transfirieron a frascos con medio MS sólido (MS adicionado con 0,8 % de agar), suplementado con las hormonas ácido α -naftalenacético (ANA) 0,1 mg/l (SigmaChemical) y 6-bencilaminopurina (BAP) 1 mg/l (Sigma Chemical). Como controles de regeneración y eficacia del agente selectivo se sometió a un grupo de discos de hojas al mismo tratamiento pero omitiendo el agregado del cultivo de *A. tumefaciens*. Los frascos se incubaron durante 48 horas a 26°C con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

Transcurridas las 48 horas de co-cultivo los discos se transfirieron a nuevos frascos conteniendo medio MS sólido suplementado con hormonas (ANA 0,1 mg/l, BAP 1 mg/l), kanamicina 50 mg/l y cefotaxime 200 mg/l. De los explantos control 10 discos se repicaron a un medio con ambos antibióticos para verificar la efectividad del agente de selección y 10 discos se transfirieron a un frasco sin kanamicina como control de regeneración. La incubación se hizo a 26°C con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad y los discos se repicaron a medio fresco con hormonas y antibióticos cada 3 semanas.

Los brotes, que aparecieron entre 90 y 120 días más tarde, se separaron del explanto y se repicaron a medio MS sólido sin hormonas y suplementado con antibióticos (kanamicina, 50 mg/l y cefotaxime 200 mg/l) para que desarrollen raíces. Para evitar la duplicación de plantas que pudieran surgir del mismo evento de

transformación, sólo se tomaron aquellos brotes que fueron bien diferenciados de los adyacentes y luego de separar cada brote se descartó el área del disco circundante. Cuando más de un tallo surgió de un mismo cayo, sólo uno de ellos se transfirió para enraizar y el resto se descartó. Las plantas se mantuvieron *in vitro* realizando repiques a medio MS sólido con kanamicina cada 4 semanas.

9.2 - TRANSFORMACIÓN DE CLOROPLASTOS DE TABACO POR BIOBALÍSTICA.

9.2.1 - Preparación de los microtransportadores (micropartículas de oro).

Se mezclaron 50 mg de partículas de oro de 0,6 μm de diámetro (0,6 μm *Gold Microcarriers* Bio-Rad), por agitación con *vortex* durante 2 minutos en 1 ml de etanol absoluto y se centrifugaron a 15000 g durante 2 a 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó al precipitado 1 ml de etanol 70 %, resuspendiendo con agitación durante 1 y 2 minutos. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, agitando cada 3 minutos y se volvió a centrifugar a 15000 g durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con 1 ml de agua estéril, resuspendiendo con *vortex* y centrifugando a 15000 g durante 2 minutos cada vez. Finalmente, las partículas se resuspendieron en 1 ml de glicerol 50 % estéril y se conservaron a -20°C.

9.2.2 - Recubrimiento de los microtransportadores con el ADN.

Se tomaron 50 μl de la preparación de partículas de oro resuspendidas con la ayuda de un *vortex* y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga. Se agregaron en orden secuencial y agitando con *vortex* cada vez, 10 μg del plásmido para transformar, a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 5 μl de CaCl_2 2,5 M y 20 μl de espermidina 0,1 M. La mezcla se incubó con agitación a 4°C durante 20 minutos. Luego se agregaron 200 μl de etanol absoluto, se agitó con *vortex* y se centrifugó a 800 g durante 1 minuto a 4°C. Se descartó el sobrenadante con pipeta y con cuidado de no remover el precipitado. Las partículas se lavaron de esta misma forma 5 veces con 200 μl de etanol absoluto,

resuspendiendo muy bien entre cada centrifugación. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 40 μ l de etanol absoluto, conservándose en hielo un máximo de 2 horas hasta su utilización.

9.2.3 - Bombardeo de hojas de tabaco.

Los macrotransportadores (*Macrocarriers*, Bio-Rad), previamente esterilizados por inmersión en etanol 100 % durante 15 minutos, se secaron en el flujo laminar y se ensamblaron con los soportes para macrotransportadores (*Macrocarrier Holders*, Bio-Rad) esterilizados en autoclave. Entre 7 y 8 μ l de los microtransportadores recubiertos con el ADN, se distribuyeron sobre la zona central de los macrotransportadores y se dejaron secar en el flujo laminar. Entretanto, se cortaron hojas jóvenes de plantas de *N. tabacum* cv Petit Havana germinadas *in vitro* y se colocaron con al cara abaxial hacia arriba sobre un disco de papel de filtro (Whatman International) de 6 a 7 cm de diámetro, en una placa de petri con medio RMOP (sales MS, tiamina 1 mg/l, mio-inositol 100 mg/l, sacarosa 30 g/l, agar 0,8 %).

El bombardeo se hizo utilizando el dispositivo para biobalística *PDS-1000/He Particle Delivery System* (Bio-Rad). Los discos de ruptura (1100 psi *Rupture Disks*, Bio-Rad) se esterilizaron con etanol 100 % y se dejaron secar en el flujo laminar. Un disco de ruptura por disparo se ensambló en la rosca soporte (*Rupture Disk Retaining Cap*) sellando la cámara de alta presión de helio. Se colocaron una malla de detención (*Stopping Screen*, Bio-Rad) y el macrotransportador cargado con la mezcla de partículas de oro y ADN, en la bandeja de detención (*Stopping Plate*). La distancia entre el disco de ruptura y la cubierta del macrotransportador (*Macrocarrier Cover Lid*) fue de 0,625 cm (1/4 de pulgada) y la distancia entre el macrotransportador y la malla de retención de 11 mm. La bandeja con la placa de petri conteniendo la hoja a bombardear se colocó a una distancia de 9 cm de la bandeja de detención. Se cerró la cámara y se hizo vacío hasta alcanzar una presión de 28 mmHg. A continuación se permitió el ingreso de helio con una presión de 1350 psi hasta que se produjo el disparo. Se liberó el vacío y las hojas bombardeadas se incubaron en oscuridad a 26°C durante 48 horas. Como control el primer disparo siempre se hizo utilizando un macrotransportador no cargado con partículas.

Transcurrida la incubación y luego de eliminar la nervadura central, cada hoja se cortó en fragmentos de 2 a 4 cm², que se transfirieron a medio RMOP suplementado con ANA 0,1 mg/l, BAP 1 mg/l y espectinomicina 500 mg/l. La mitad de los discos de la hoja sometida al primer disparo sin partículas se transfirieron a medio RMOP suplementado con hormonas y espectinomicina (control de selección) y la otra mitad a medio con hormonas pero sin agente selectivo (control de regeneración). Los discos se incubaron a 26°C con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad. Al cabo de un mes comenzaron a aparecer los primeros brotes que se transfirieron a medio RMOP sin hormonas y suplementado con espectinomicina 500 mg/l. De las plantas que desarrollaron raíces en medio selectivo se cortaron discos de hoja y se volvieron a cultivar en medio RMOP suplementado con hormonas y espectinomicina (segunda ronda de regeneración). Las plantas transformadas se sometieron al menos a dos rondas de regeneración en medio selectivo antes de ser transferidas a tierra.

9.3 – RUSTICACIÓN.

Para su pasaje a tierra, las raíces de cada planta se lavaron cuidadosamente con agua corriente para eliminar los restos de medio y se plantaron en macetas conteniendo una mezcla 3:1:1 de humus, turba y perlita. Durante la primer semana, las plantas se mantuvieron cubiertas con un film de polietileno para evitar su deshidratación en el proceso de adaptación a las nuevas condiciones de humedad. El crecimiento se hizo en un invernadero cerrado con un fotoperíodo controlado de 14/10 horas luz/oscuridad y a una temperatura de entre 25 y 30°C.

9.4 - ESTERILIZACIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE TABACO *IN VITRO*.

Se sumergieron las semillas en etanol 70 % y luego se traspasó a una solución 0,9 % de lavandina comercial, en la que se incubaron durante 15 minutos. A continuación se hicieron tres pasajes sucesivos por agua estéril para eliminar los restos de lavandina, se secaron y se sembraron en medio MS sólido. Las semillas se germinaron y crecieron a 26°C con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

10. ANÁLISIS DE ADN

10.1 - AISLAMIENTO DEL ADN DE PLANTAS DE TABACO.

10.1.1 – Preparación de ADN total para PCR.

Se molieron en un tubo de microcentrífuga 50 mg de hoja con la ayuda de un vástago plástico de punta cónica y se agregaron 350 μ l de solución de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA disódico 10 mM pH 8, NaCl 100 mM, SDS 1 % y 2-mercaptoetanol 10 mM). Se resuspendió por agitación y se incubó a 65°C durante 10 minutos. Luego se agregaron 150 μ l de acetato de potasio 3 M, pH 5,5 frío, agitando por inversión e incubando en hielo durante 20 minutos. Transcurrida la incubación se centrifugó a 15000 g durante 10 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregó 1 μ l de ribonucleasa A 100 μ g/ml y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. El ADN se precipitó con 1 volumen de isopropanol y se centrifugó a 15000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se lavó con etanol 80 %, se dejó secar y finalmente se resuspendió en 25 μ l de H₂O bidestilada.

10.1.2 – Preparación de ADN total para Southern blot.

Se utilizó una modificación del protocolo de purificación de ADN desarrollado por Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983). Se molió 1 gramo de tejido vegetal fresco con nitrógeno líquido en un mortero hasta formar un polvo fino. Se agregaron 5 ml de *buffer* CTAB (CTAB, bromuro de hexadecil trimetil amonio, Sigma Chemical) 2 % en etanol, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA disódico 20 mM pH 8 y 2-mercaptoetanol 0,2 %) pre-calentado a 65°C y se incubó a esa misma temperatura en un tubo de polipropileno entre 30 minutos y 1 hora agitando cada 10 minutos. Posteriormente, se agregó un volumen de cloroformo y se agitó con *vortex*. Luego de centrifugar a 5000 g durante 10 minutos a 4°C, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se repitió la extracción con cloroformo. Se adicionó ribonucleasa A, a una concentración final de 100 μ g/ml y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Luego de la incubación se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol frío y se mezcló suavemente por inversión. Cuando se formó el ovillo de ADN, este se tomó con un ansa y se transfirió a

un tubo de microcentrífuga conteniendo 1 ml de etanol 70 %. Cuando el ovillo no se formó, se centrifugó a 10000 g durante 20 minutos y el precipitado se lavó con etanol 70 %. En ambos casos el precipitado se secó y se resuspendió a 4°C toda la noche, con agitación suave, en 1 ml de H₂O bidestilada.

10.1.3 - Purificación de ADN de cloroplastos de tabaco.

Se utilizó una combinación de dos protocolos publicados (Tewari, K. 1986 y Triboush, S. *et al*, 1998). Se colocaron plantas de *N. tabacum* cv Xanthi D8 durante 48 horas en oscuridad para reducir el nivel de almidón en las hojas, y 5 gramos de estas hojas se homogeneizaron en 25 ml de *buffer* STM (sacarosa 0,5 M, Tris-HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM y 2-mercaptoetanol 0,2 %). El homogenato se filtró por una malla de 104 µm y el filtrado se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 5 ml de STM y se volvió a centrifugar a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió ahora en 4 ml de STM con el agregado de 1 ml de Tritón X 100 12,5 % y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Luego de la incubación, los cloroplastos lisados se centrifugaron a 5000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se volvió a centrifugar a 5000 g durante 30 minutos a 4°C. El ADN se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M y 1 volumen de isopropanol frío, durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente, se centrifugó a 17000 g durante 5 minutos y el precipitado se lavó con etanol 70 % y nuevamente con etanol 100 %, se secó a temperatura ambiente y se disolvió en 1,5 ml de agua bidestilada, agregando 200 µl de SDS 10 % en forma de gotas, y se incubó a 65°C durante 15 minutos. Se agregaron luego 500 µl de acetato de potasio 5 M y se agitó a 65°C hasta que el precipitado se disolvió completamente. Se incubó a -20°C durante una hora y se centrifugó a 17000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se precipitó agregando 0,1 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M y 1 volumen de isopropanol frío e incubando 1 hora a -20°C. El ADN se recuperó por centrifugación a 17000 g. durante 10 minutos y el precipitado se lavó con etanol 70 %, se secó y disolvió en H₂O bidestilada.

10.2 – PCR PARA CHEQUEO DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.

Una primera evaluación de las plantas transformadas con *A. tumefaciens* se hizo mediante la amplificación por PCR de las secuencias específicas contenidas entre la región 3' del promotor 35SCaMV, en donde hibrida el oligonucleótido 35S y la región 3' de la secuencia *hegf*, en donde hibrida el oligonucleótido EGF3. El tamaño de los fragmentos amplificados varió en cada construcción de acuerdo a la presencia o no de la secuencia Ω , la secuencia del péptido señal y la secuencia AP. Aproximadamente 100 ng del ADN purificado según el punto 10.1.1, contenidos en un volumen final de 25 μ l de H₂O, se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos. Transcurrida la incubación se colocaron los tubos en hielo y se agregó a cada uno, 25 μ l de la mezcla de reacción para PCR conteniendo 100 ng de cada oligonucleótido iniciador, 1,25 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies), 0,4 mM de una mezcla de los cuatro dNTPs y 3 mM MgCl₂, en el *buffer* suministrado con la enzima. Se realizaron 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 45 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C en un termociclador *Mastercycler* (Eppendorf), con una incubación previa a 95°C durante 2 minutos y una final a 72°C durante 5 minutos, para completar la polimerización.

10.3 - PCR PARA CHEQUEO DE PLANTAS TRANSPLASTÓMICAS.

La integración del ADN en el genoma plastídico se verificó por amplificación por PCR. Se utilizó el oligonucleótido CloroFw, que hibrida con una región de la secuencia del ARNr 16S por fuera del sitio de recombinación de los plásmidos derivados del pBSWGUS y el pBSWUTRGUS y el oligonucleótido CloroRv, que hibrida con la región 5' de la secuencia *aadA*, de forma tal que se amplifica un fragmento de 1450 pb sólo si hubo inserción.

La integración en las construcciones hechas en el vector pLDctV se verificó por amplificación de un fragmento de 1600 pb con el oligonucleótido 4P, que hibrida sobre la secuencia 16S por fuera de la región de recombinación homóloga del pLDctv y con el oligonucleótido cloroRv.

En todos los casos, 2,5 ng del ADN extraído según el punto 10.1.1, se llevaron a 25 μ l con H₂O y se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos. Transcurrida la

incubación se colocaron los tubos en hielo y se agregaron a cada uno, 25 μ l de la mezcla de reacción para PCR conteniendo 150 ng de cada oligonucleótido iniciador, 1,25 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies), 0,4 mM de una mezcla de los cuatro dNTPs y 3 mM $MgCl_2$, en el *buffer* suministrado con la enzima. Se realizaron 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C en un termociclador *Mastercycler* (Eppendorf), con una incubación previa a 95°C durante 2 minutos y una final a 72°C durante 10 minutos, para completar la polimerización.

10.4 - ENSAYO DE *SOUTHERN* BLOT.

La integración del transgén en las plantas transgénicas nucleares y la integración y homoplastía en las plantas transplastómicas se evaluaron en ensayos de *Southern blot*. Extracciones de ADN total (10 μ g) de las plantas transformadas a nivel nuclear, se incubaron durante una hora con 40 unidades de Hind III (New England Biolabs), utilizando el *buffer* sugerido. Luego se agregó espermidina (Sigma Chemical) a una concentración final de 1 mM y se volvió a incubar a 37°C, durante toda la noche. En el caso de las plantas transplastómicas, 4 μ g de ADN total se cortaron con 20 unidades de Nco I (New England Biolabs), en el *buffer* sugerido por la empresa, a 37°C durante toda la noche, con el agregado de espermidina 1 mM final luego de la primer hora de incubación. Como controles se utilizaron extracciones de ADN total de *N. tabacum* cv Xanthi D8 ó *N. tabacum* cv Petit Havana sin transformar, cortado con Hind III y Nco I, respectivamente.

10.4.1 - Electroforesis y transferencia del ADN a membranas de nylon.

El ADN cortado se separó por electroforesis en geles de agarosa 0,8 % en TAE 1X, a 30 mA de corriente constante durante toda la noche. Los geles se lavaron con agua, se incubaron en HCl 0,25 M durante 10 minutos, y luego en 10 volúmenes de solución desnaturalizante (NaOH 0,4 M, NaCl 1,5 M) durante 20 minutos, con agitación suave. El ADN se transfirió por capilaridad con NaOH 0,4 M a membranas de *nylon Hybond N⁺* (Amersham Biosciences).

10.4.2 - Hibridación y lavados.

Las membranas conteniendo el ADN se incubaron en 15 ml de solución de hibridación *Church* (SDS 7 %, BSA 1 %, buffer sodio fosfato 1 M pH 7,2, 0,2 % y EDTA-Na₂ 1 mM, pH 8) durante 2 horas a 65°C en un horno de hibridación rotatorio. Luego de esta pre-hibridación, se agregó a la solución, la sonda desnaturalizada y se incubó toda la noche a 65°C. Al otro día, se descartó la solución con la sonda y se hizo un enjuague con SSC 2X, SDS 0,1 % seguido de tres lavados sucesivos de 15 minutos cada uno con 1): SSC 2X, SDS 0,1 % a temperatura ambiente, 2): SSC 2X, SDS 0,1 % a 65°C y 3): SSC 0,2X, SDS 0,1 % a 65°C. (20X SSC: Citrato de Sodio 300 mM pH 7, NaCl 3 M). Las membranas se expusieron a placas radiográficas (*Kodak X-Omat*, Kodak) a -70°C por períodos de tiempo variables. En todos los casos se utilizó una pantalla amplificadora de la señal. Cuando fue necesario rehibridizar una membrana, la sonda se eliminó de la membrana sumergiéndola en una solución de SDS 0,1 %, precalentada a 100°C y se incubó hasta que ésta alcanzó la temperatura ambiente.

10.4.3 - Preparación de los moldes para las sondas.

10.4.3.1 - Molde para la sonda *EGF*.

La utilización directa de *hegf* como molde en reacciones de marcación radiactiva por iniciación al azar, genera sondas de baja actividad específica debido al reducido tamaño de esta secuencia (165 pb). Por ello se diseñó una estrategia para obtener fragmentos de ADN que contienen entre 2 y 7 copias concatenadas de *hegf* (340 a 1225 pb), las que se utilizaron como molde para la sonda *EGF*. La secuencia *hegf* se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores *EGFB* y *EGF3* y se clonó en un vector pGEM-T-easy. La secuencia de *hegf* se liberó entonces por corte con *EcoR* I que, en este plásmido flanquea el sitio de clonado, se purificó y ligó entre sí con T4 ADN ligasa. Esta mezcla de fragmentos autoligados se subclonó directamente al vector pGEM-T-easy cortado con la enzima *EcoR* I y desfosforilado. Se seleccionaron aquellos clones que contenían más de una copia de *hegf* concatenadas, en los que la liberación del fragmento de 165 pb se verificó por restricción con *EcoR* I. El molde que se utilizó

como sonda se obtuvo purificando el fragmento liberado por corte con la enzima Not I que flanquea a los sitios EcoR I en pGEM-T-easy y que no está presente en *hegf*.

10.4.3.2 - Molde para la sonda *aadA*.

El fragmento molde para la sonda *aadA*, se obtuvo por amplificación por PCR de la secuencia *aadA* (800 pb) del plásmido pPZP200, utilizando como iniciadores los oligonucleótidos *aadA5* y *aadARev*.

10.4.3.3 - Molde para la sonda *trnI/A*.

La sonda *trnI/A* se obtuvo por purificación del fragmento de 815 pb obtenido a partir del plásmido pBS16S-23S por corte con las enzimas BamH I y Bgl II correspondientes a las posiciones 104805 y 105620 respectivamente del genoma plasmídico de tabaco.

10.4.4 - Marcado radiactivo de las sondas.

Las sondas utilizadas en los ensayos de *Southern* y *Northern blot* se prepararon mediante el sistema de iniciación al azar *Prime-a-gene* (Promega). 25 ng de fragmento molde se desnaturalizaron por incubación a 95°C durante 5 minutos y se mezclaron con 400 µg/ml de seroalbúmina bovina, 5 unidades de Klenow ADN polimerasa I, 20 µM de dATP, dGTP y dTTP, 50 µCi (333 nM) de α -³²P dCTP 3000 Ci/mmol y el *buffer* de marcación 5X, que contiene los oligonucleótidos iniciadores, en un volumen final de 50 µl. Esta mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente. La reacción se detuvo calentando a 95°C 2 minutos y por agregado de EDTA a una concentración final de 20 mM.

10.4.5 - Purificación de las sondas marcadas.

La sonda marcada se purificó de los nucleótidos no incorporados por precipitación o utilizando los sistemas de purificación comerciales *S&S ELUTIP* (Schleicher & Schuell) o *MicroSpin HR200* (Amersham Biosciences).

10.4.5.1 - Purificación por precipitación.

La mezcla de reacción de marcación se llevó hasta un volumen final de 200 μ l con H_2O , se agregó 1 μ g de ADN de esperma de salmón (Sigma Chemical), y el ADN se precipitó con 0,5 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M pH 7 y 3 volúmenes de etanol 100 %. Se centrifugó a 15000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el precipitado se resuspendió en 100 μ l de H_2O bidestilada.

10.4.5.2 - Purificación por columnas comerciales.

Se utilizaron columnas *elutip-d* (Schleicher & Schuell) o *microSpin HR200* (Amersham Biosciences) siguiendo los protocolos sugeridos por los fabricantes.

Todo el trabajo con material radiactivo se hizo en un cuarto aislado destinado a tal fin y de acuerdo a las normativas establecidas por el Ente Regulador de la Energía Atómica.

11. ANÁLISIS DE ARN

11.1 - EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL DE PLANTAS DE TABACO.

El ARN total de las plantas transformadas y de los controles sin transformar se purificó por dos métodos en forma indistinta: precipitación con LiCl o extracción con TRIzol (Invitrogen Life Technologies).

11.1.1 - Precipitación con LiCl.

Se utilizó el método descrito por Verwoerd *et al* (1989). Todas las soluciones y materiales utilizados estaban libres de ribonucleasas. Se congelaron 120 mg de hojas de tabaco en N₂ líquido y se molieron en un mortero, previamente lavado con una solución de SDS 1 %. Se agregaron 500 µl de *buffer* de extracción (EDTA-Na₂ 10 mM pH 8, SDS 1 %, LiCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8 y un volumen de fenol equilibrado a pH 8) pre-calentado a 80°C. La mezcla se transfirió a un tubo para microcentrífuga y se agitó con *vortex* durante 45 segundos. Se agregaron 250 µl de cloroformo y se volvió a agitar con *vortex*. Se centrifugó a 15000 g durante 5 minutos y la fase acuosa se transvasó a un tubo nuevo. Se agregó un volumen de LiCl 4 M, se mezcló por inversión y se incubó a 4°C durante 60 minutos. Posteriormente se centrifugó a 15000 g durante 15 minutos a 4°C, el precipitado se resuspendió en 250 µl de H₂O y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se agregaron entonces, 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,5 y 2 volúmenes de etanol 100 % y se incubó en hielo durante 10 minutos. Luego se centrifugó a 15000 g durante 10 minutos a 4°C y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70 %. Se dejó secar, se resuspendió en 50 µl de H₂O bidestilada y finalmente, se conservó a -70°C.

11.1.2 - Extracción con TRIzol.

Se congelaron 200 mg de hojas de tabaco en N₂ líquido y se molieron en un mortero previamente lavado con una solución de SDS 1 %. Se agregó 1ml de TRIzol (Invitrogen Life Technologies) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos un tubo de microcentrífuga. Se agregaron 0,2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Luego se centrifugó a 15000 g durante 15 minutos a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. El ARN se precipitó agregando 0,5 ml de isopropanol e incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguidos de una centrifugación a 15000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 75 %, se dejó secar y se resuspendió en 60 µl de H₂O incubando a 60°C durante 10 minutos.

11.2 - ENSAYO DE *NORTHERN BLOT*.

11.2.1 - *Electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes.*

Entre 5 y 20 μg de ARN se sembraron en geles de agarosa 1,5 % en condiciones desnaturalizantes. La muestra se preparó incubando 15 μl de la extracción de ARN con 54 μl de mezcla de siembra (MOPS 10X 166 μl , formaldehído 37 % 300 μl y formamida 830 μl) a 65°C durante 10 minutos, seguidos de 2 minutos en hielo. Se agregó entonces bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y buffer de siembra 1X (glicerol 5 %, azul de bromofenol 0,02 %), ambos libres de ribonucleasas. Para armar el gel desnaturalizante, se fundieron 1,5 gramos de agarosa en 72 ml de H_2O , se dejó enfriar, y antes de que comience a gelificar, se agregaron 10 ml de MOPS 10X y 18 ml de formaldehído 37 %. La electroforesis se realizó a 65 V constantes en una solución conteniendo 100 ml de MOPS 10X, 180 ml de formaldehído 37 % y 720 ml de H_2O (MOPS 10X: MOPS 0,2 M, acetato de sodio 0,05 M, EDTA disódico 0,01 M, pH 7).

11.2.2 - *Transferencia a membranas de nylon.*

Una vez finalizada la electroforesis los geles se lavaron con agua y el ARN se transfirió por capilaridad a membranas de *nylon Hybond N⁺* (Amersham Biosciences), utilizando como *buffer* de transferencia SSC 20X (NaCl 3 M, Citrato de sodio 0,3 M, pH 7).

11.2.3 - *Hibridación y marcación de sondas.*

La hibridación de las membranas y la marcación de las sondas para los *Northern blot* se realizaron utilizando los mismos protocolos que para las membranas de *Southern blot* descritos anteriormente.

11.3 - SÍNTESIS DE ADN COPIA POR RT-PCR.

El ARN extraído según el punto 10.1 (4µg), se incubó con 4 unidades de ADNasa RQ1 (Promega) en el *buffer* suministrado con la enzima, en un volumen final de 10 µl, a 37°C durante 30 minutos. La enzima se inactivó incubando la reacción a 65°C durante 10 minutos. La presencia de ADN se descartó por amplificación de *hegf* por PCR utilizando como molde una alícuota de la reacción (1 µl) y un control positivo no tratado con desoxiribonucleasa. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo utilizando el sistema Omniscript (Qiagene), en las condiciones especificadas y utilizando 800 ng de ARN de la reacción con ADNasa como molde y el oligonucleótido EGF 3 como iniciador.

12. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

12.1 - EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.

12.1.1 - Extracción de proteínas totales de hojas de tabaco.

Entre 10 y 50 mg de tejido vegetal se molieron con N₂ líquido y se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X pH 7,2 (NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 14,4 g/l, KH₂PO₄ 2 g/l) con o sin el agregado de inhibidores de proteasas (Pepstatina A 1 µg/ml, PMSF 1 mM, leupeptina 0,5 µg/ml, aprotinina 2 µg/ml, benzamidina 0,1 mM e inhibidor de tripsina 2 µg/ml). Estos homogenatos se usaron directamente para medir proteínas totales o para cuantificar hEGF utilizando un ensayo de ELISA. Para los ensayos de *Western blot*, se agregó *buffer* de siembra 1X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2 %, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 0,2 %, azul de bromofenol 0,02 mg/ml) o *buffer* no reductor 1X (*buffer* de siembra sin 2-mercaptoetanol) a las extracciones en PBS o directamente al tejido vegetal molido.

12.1.2 - Extracción etanol-ácida de hEGF.

Para la purificación de hEGF se adaptó un protocolo diseñado para la extracción de péptidos pequeños a partir de glándulas submaxilares de ratón (Roberts *et al*, 1980). Se molieron en un mortero con N₂ líquido aproximadamente 30 g de hojas de tabaco hasta obtener un polvo fino. Se agregaron por cada gramo de tejido molido, 4 ml de una solución conteniendo 375 ml de etanol 95 % (v/v), 7,5 ml de HCl concentrado, 33 mg de PMSF y 1,9 mg de pepstatina y se llevó a 6 ml con H₂O. Esta mezcla se extrajo con agitación suave durante toda la noche a 4°C y se centrifugó a 4300 g durante 30 minutos a 4°C, transfiriendo el sobrenadante a un tubo nuevo. Se ajustó el pH a 5,2 con hidróxido de amonio concentrado y se agregó 1 ml de acetato de amonio 2 M pH 5,3 por cada 85 ml de extracto. Se agregaron entonces, 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 4 volúmenes de éter anhidro frío y se incubó durante 48 horas a -20°C. El precipitado se recuperó por centrifugación a 6000 g durante 30 minutos a 4°C. y se disolvió en 3 a 4 ml de ácido acético 1 M por cada gramo de tejido. La fracción insoluble se eliminó por centrifugación y el sobrenadante se dializó toda la noche, contra *buffer* PBS 1X pH 7,2 utilizando una membrana de diálisis Spectra/Por 7 de poro de 3,5 kDa (Spectrum Laboratories).

12.1.3 - Extracción y purificación de proteínas por afinidad a columnas de níquel.

Se molieron entre 1 y 2 gramos de tejido en N₂ líquido, y se extrajeron con 5 ml de solución A (Urea 8 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris-HCl 0,01 M pH 8) con agitación durante 1 hora a 4°C. Se centrifugó a 15000 g durante 5 minutos a 4°C y 2 ml del sobrenadante se sembraron en una columna de níquel previamente equilibrada durante una hora a 4°C en solución A. A los 5 minutos de sembrada la columna, se tomó el percolado y se hicieron 3 lavados, cada uno con 1 ml de solución B (Solución A llevada a pH 6,5). La elución se hizo en cuatro etapas, cada una con 1 ml de solución C (solución A llevada a pH 5). Alícuotas de cada fracción se utilizaron directamente para cuantificar proteínas totales y para su análisis en geles de poliacrilamida.

12.1.4 - Extracción de proteínas totales de *E. coli*.

Se cosecharon por centrifugación entre 1 y 2 ml de cultivo bacteriano crecido durante toda la noche a 37°C. El sedimento de bacterias se resuspendió en 500 µl de *buffer* de extracción (Tris-HCl pH 6,8 50 mM, EDTA-Na₂ 10 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 0,5 µg/ml, aprotinina 2 µg/ml, benzamidina 0,1 mM e inhibidor de tripsina 2 µg/ml), se congeló a -70°C durante 15 minutos y se sonicó en 3 ciclos de 30 segundos cada uno. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 15000 g durante 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se utilizó directamente para medir proteínas totales, para ensayos de ELISA o para ensayos de *Western blot*.

Cuando se trabajó con bacterias que contenían un plásmido inducible, estas se crecieron hasta una D.O._{600nm} de 0,4 a 0,6, se agregó IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se incubaron nuevamente a 37°C. Luego de una hora se tomó una alícuota y se dejó crecer el resto del cultivo durante otras 2 horas. Ambas fracciones se cosecharon y sonicaron como se indicó anteriormente.

12.2 - CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

Las proteínas totales contenidas en los extractos de plantas y de bacterias se cuantificaron utilizando el sistema *BCA protein assay* (Pierce), siguiendo las instrucciones del proveedor. Como estándar se utilizó una curva realizada con distintas concentraciones de seroalbúmina bovina (Sigma Chemical).

12.3 - ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.

12.3.1 - Geles de SDS - poliacrilamida para electroforesis en buffer Tris-Glicina.

Se prepararon geles de poliacrilamida desnaturalizantes de 10 x 10 cm y de 1 ó 1,5 mm de espesor, utilizando el sistema armador *SE 260 Mini Vertical Unit* (Hoeffer) y de acuerdo a los protocolos publicados (Sambrook *et al*, 1989).

Las muestras se prepararon en *buffer* de siembra 1X o *buffer* de siembra 1X no reductor y calentadas a 100°C durante 5 minutos para desnaturalizar totalmente las proteínas. La electroforesis se realizó a 25 mA constantes en *buffer* Tris-Glicina (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1 %).

12.3.2 - Geles de SDS – poliacrilamida para electroforesis en *buffer* Tris-Tricina.

Las electroforesis de hEGF se hicieron en geles de poliacrilamida 16 % en *buffer* Tris-Tricina que permite una mejor resolución de proteínas de bajo peso molecular. Se siguieron protocolos publicados (Sambrook *et al*, 1989). La electroforesis se hizo a 25 mA constante usando como *buffer* para el ánodo Tris-HCl 0,5 M pH 8,9 y para el cátodo Tris base 0,1 M, Tricina 17,92 g y SDS 0,1 %.

12.3.3 - Tinción con Coomassie Brilliant Blue.

Los geles se incubaron a 37°C durante 2 horas como mínimo en solución de tinción (Coomassie Brilliant Blue R250 0,05 %, metanol 40 %, ácido acético 10 %). Luego ésta solución se reemplazó por solución de lavado (metanol 50 %, ácido acético 10 %) y se incubó a temperatura ambiente.

12.4 - ENSAYO DE WESTERN BLOT.

12.4.1 - Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.

Se utilizó el sistema de transferencia *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad) y membranas de nitrocelulosa *Hybond C* (Amersham Biosciences). La transferencia se llevó a cabo a 60V constantes, durante 60 minutos para la cápside de PVX, bGH y los antígenos de *T. gondii* y a 45V durante 45 minutos para hEGF. Como *buffer* de transferencia se utilizó Tris-HCl 50 mM pH 7,5, glicina 196 mM, metanol 20 %.

12.4.2 - Inmunodetección de las proteínas electrotransferidas.

Luego de la transferencia, se incubaron las membranas en solución de bloqueo (5 % de leche descremada en polvo en *buffer* TTBS: Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1 % v/v) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave. Transcurrida la incubación, se agregó a la solución el primer anticuerpo, diluido en TTBS, y se incubó una hora más a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno con TTBS y se agregó una solución de leche 5 % en TTBS conteniendo el segundo anticuerpo según corresponda: anti-IgG de ratón 1/1000 (Gibco BRL) o anti-IgG de conejo 1/5000 (Gibco BRL) conjugados a fosfatasa alcalina o anti-IgG de ratón 1/5000 (Gibco BRL) y anti-IgG humana 1/5000 (NEN Life Science) conjugados a peroxidasa. Se incubó durante una hora y se hicieron luego otros cuatro lavados de 5 minutos cada uno con TTBS.

12.4.2.1 - Revelado con NBT/BCIP.

Los anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina se revelaron utilizando como sustrato cromogénico una mezcla de NBT (Nitroblue tetrazolium, Sigma Chemical) y BCIP (5 bromo-4 cloro-3 indoil fosfato, Sigma Chemical). Luego del último lavado con TTBS se hizo una incubación durante 10 minutos en *buffer* fosfatasa (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM). Transcurrida la incubación, cada membrana se reveló en oscuridad, con 10 ml de *buffer* fosfatasa conteniendo 30 µl de BCIP (30 mg/ml en dimetilformamida 100 %) y 30 µl de NBT (50 mg/ml, en dimetilformamida 70 %).

12.4.2.2 - Revelado por quimioluminiscencia.

Los anticuerpos conjugados a peroxidasa se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el sistema comercial *ECL plus Western blotting Detection System* (Amersham Biosciences) de acuerdo al protocolo suministrado. Las membranas tratadas se expusieron durante tiempos variables de entre 1 y 5 minutos a películas radiográficas *Kodak X-Omat* (Kodak)

12.4.2.3 - Listado de los primeros anticuerpos utilizados.

- i) IgG de conejo anti-CP de PVX 1/2000
- ii) IgG de conejo anti-CP de PVY 1/1000
- iii) IgG de ratón anti-hEGF monoclonal (R&D Systems) 2 µg/ml
- iv) IgG de ratón anti-bGH monoclonal 1/500 (gentileza del Dr. Judewicz, Biosidus)
- v) IgG de conejo anti-bGH policlonal 1/500 (gentileza del Dr. Judewicz, Biosidus)
- vi) IgG de ratón anti-GRA4 1/500 (gentileza del Dr. Sergio Angel, INTECH)
- vii) IgG de conejo anti-P30 1/500 (gentileza del Dr. Sergio Angel, INTECH)
- viii) suero humano positivo para *T. gondii* (gentileza del Dr. Sergio Angel, INTECH)
- ix) suero humano negativo para *T. gondii* (gentileza del Dr. Sergio Angel, INTECH)

12.4.2.4 - Controles positivos para Western blot.

- i) hEGF: hEGF recombinante (rhEGF) comercial expresado en *E. coli* (Gibco BRL)
- ii) bGH: Lisados de la cepas bGH45 y bGH67 de *E. coli* BL21 DE transformadas con plásmidos pET que expresan bGH (50 µg de proteínas totales por calle), gentileza del Dr. Judewicz (BioSidus, Argentina).
- iii) P30: SAG 1 recombinante expresada en *E. coli*, gentileza del Dr. Sergio Angel (INTECH, Chascomús).
- iv) GRA4: Lisado de taquizoitos de *T. gondii* y Gra4 recombinante expresada en *E. coli* (entre 5 y 10 ng por calle), gentileza del Dr. Sergio Angel (INTECH, Chascomús).

12.5 - SQUASH-BLOT PARA LA DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR PVX Y PVY.

Se cortaron discos de hoja de aproximadamente 0,5 cm de diámetro utilizando la tapa de un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Estos discos se ubicaron sobre una membrana de nitrocelulosa (*Hybond C*, Amersham Biosciences) presionándolos entre la membrana y un film de polietileno con una punta roma (la base de un tubo de microcentrífuga), con cuidado de restringir la impronta al diámetro del disco y no

contaminar las muestras vecinas. La membrana se incubó en solución de bloqueo (leche descremada en polvo 5 % en TTBS) y la inmunodetección se hizo de manera idéntica a la descrita para las membranas de *Western blot*. Adicionalmente, y luego de la detección con NBT/BCIP, el exceso de clorofila se eliminó lavando la membrana con una solución de lavandina comercial diluida al décimo.

12.6 - CUANTIFICACIÓN DE hEGF POR ELISA.

La cuantificación de hEGF se realizó mediante el método de ELISA utilizando anticuerpos comerciales y siguiendo los protocolos sugeridos por la empresa proveedora (R&D Systems). Microplacas de 96 pocillos (*Falcon 3913 Micro Test III*, Falcon) se cubrieron con 100 μ l por pocillo, de anticuerpo monoclonal anti-hEGF 3 μ g/ml en PBS 1X y se incubaron en una cámara húmeda durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación las placas se lavaron tres veces con PBST (PBS 1X pH 7,4, Tween 20 0,05 % v/v) y se bloquearon entre una y dos horas a temperatura ambiente con 200 μ l por pocillo de PBS conteniendo seroalbúmina bovina 1 % y sacarosa 5 %. Pasado este tiempo, las placas se lavaron nuevamente tres veces con PBST y se sembraron 100 μ l por pocillo de la muestra a cuantificar incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó entonces tres veces con PBST y se incubó durante 2 horas con 100 μ l por pocillo del segundo anticuerpo (anti-hEGF policlonal biotinilado, 20 ng/ml). Se lavó nuevamente tres veces con PBST y se incubó durante 20 minutos con una dilución 1:2000 de estreptavidina-peroxidasa 125 μ g/ml (Sigma Chemical). Se realizaron tres lavados con PBST y se agregaron a cada pocillo 100 μ l de la solución conteniendo el sustrato cromogénico: 100 μ l de TMB (3,3', 5,5' tetrametilbenzamidina, Sigma Chemical) 10 mg/ml en DMSO y 2 μ l de H₂O₂ por cada 10 ml de *buffer* citrato-fosfato 0,05 M pH 5 (25,7 ml de Na₂HPO₄ 0,2 M y 24,3 ml de ácido cítrico 0,1 M). La reacción se detuvo por agregando 50 μ l de H₂SO₄ 1 M a cada pocillo y se leyó a 450 nm. El límite de detección del ensayo es de 0,1 ng de hEGF por gramo de tejido fresco.

12.7- ENSAYOS DE RIZOSECRECIÓN.

12.7.1 - Cultivo de plantas de tabaco en medio hidropónico.

Se seleccionaron plantas de tabaco cultivadas *in vitro* que tuvieran raíces bien desarrolladas, se separaron del medio sólido y se lavaron las raíces con H₂O estéril para eliminar todos los restos de agar. Las plantas se cultivaron en 200 ml de medio MS líquido diluido a la mitad, en un sistema de inmersión temporal, con cuatro ciclos de reflujo diarios de 5 minutos de duración cada uno. Se tomaron muestras de 1 ml cada una y sin renovación del medio, a las 24 horas y a los 5, 15, 24 y 31 días de iniciado el cultivo, y se cuantificaron los niveles de hEGF y las proteínas totales de acuerdo a 12.6 y 12.2 respectivamente.

12.7.2 - Root blot.

Se germinaron *in vitro* semillas de tabaco sobre un disco de nitrocelulosa estéril apoyado a su vez sobre un disco de papel de filtro en una placa de petri conteniendo medio MS sólido suplementado con kanamicina. Una vez que las plántulas desarrollaron raíces de 3 a 4 cm de longitud sobre la nitrocelulosa (entre 20 y 30 días luego de la germinación), éstas se quitaron, marcando la posición original de las semillas y la membrana se reveló utilizando el anticuerpo monoclonal anti-hEGF de acuerdo a 12.4.2.

12.8 - ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE hEGF.

12.8.1 - Ensayo de radioreceptor.

Las propiedades de unión del hEGF en los extractos dializados se analizaron mediante el ensayo de radioreceptor descrito por Bussmann *et al* (1996). Se trataron membranas de placenta humana con glicina 50 mM y NaCl 100 mM pH 3 para eliminar los factores de crecimiento endógenos. Las membranas se incubaron con 40.000 cpm de ¹²⁵I-hEGF y distintas diluciones del extracto de plantas dializado en TBSA (Tris 50 mM, MgCl₂ 2 mM, BSA 1 %, pH 7). La incubación se detuvo colocando las muestras en hielo y agregando 2 ml de TBSC (Tris 50 mM, MgCl₂ 10 mM, BSA 0,1 %, celite 0,1

%, pH 7). El factor unido a las membranas se separó por centrifugación a 6000 g por 30 minutos y las cuentas presentes en el precipitado se contaron en un espectrómetro LKB gama (LKB Instruments). La sensibilidad del ensayo es de 0,15 ng por reacción y el coeficiente de variación medio dentro del ensayo del 9 %. Los análisis de regresión no lineal y el cálculo de Kd se hicieron utilizando el programa GraphPad Prism versión 3.02 para Windows (GraphPad Software).

12.8.2 - Ensayo de expansión de células del cumulus.

Se partió de ovarios bovinos colectados y transportados en PBS a 30°C. Los complejos inmaduros de oocitos y *cumulus* se aspiraron de folículos antrales de 2 a 6 mm con una aguja 19 unida a una jeringa de 5 ml. Se seleccionaron sólo los complejos que poseían oocitos con un citoplasma homogéneo y *cumulus* compacto. Los oocitos se lavaron en medio de maduración (medio de cultivo de tejidos 199 suplementado con sales de Earle (Gibco BRL), bicarbonato 2,2 g/l y gentamicina 50 µg/ml) y se asignaron al azar a los diferentes grupos experimentales. La maduración *in vitro* de los complejos de oocitos y *cumulus* se hizo en gotas de 50 µl bajo aceite mineral (5 complejos por gota) en placas de petri de 35 mm (Nunc), mantenidas en una atmósfera húmeda de 5 % de CO₂ en aire a 39°C por 24 horas. El medio de maduración de cada grupo se adicionó con 10 ng de hEGF comercial (Gibco BRL) o extractos de plantas conteniendo 10 ng de hEGF previamente determinado por ELISA. Todas las muestras de plantas se normalizaron para contener la misma cantidad de proteínas totales. Luego de la maduración la expansión del *cumulus* se visualizó en un estereomicroscopio (Nikon).

12.9 - ENSAYOS DE DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE hEGF.

Se prepararon extractos de cloroplastos lisados con Tritón X-100, siguiendo parte del protocolo de purificación de ADN plasmídico descrito en el punto 9.1.3. Se colocaron plantas de *N. tabacum* cv Xanthi D8 durante 48 horas en oscuridad para reducir el nivel de almidón en las hojas y 5 gramos de estas hojas se homogeneizaron en 25 ml de *buffer* STM (sacarosa 0,5 M, Tris-HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM y 2-mercaptoetanol 0,2 %). El homogenato se filtró por una malla de 104 µm y el filtrado se

centrifugó a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en 5 ml de STM, sin 2-mercaptoetanol, y se volvió a centrifugar a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió ahora en 4 ml de STM sin 2-mercaptoetanol, y con el agregado de 1 ml de Tritón X 100 12,5 % y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Luego de la incubación los cloroplastos lisados se centrifugaron a 5000 g durante 30 minutos a 4°C. el sobrenadante se dializó toda la noche, contra *buffer* STM sin 2-mercaptoetanol, utilizando una membrana de diálisis Spectra/Por 7 de poro de 3,5 kDa (Spectrum Laboratories).

Los ensayos de degradación *in vitro* se hicieron incubando 200 ng/ml de rhEGF comercial (Gibco BRL) o 20 µl de los extractos sonicados de *E. coli* transformados con el plásmido pBSWGEKE, en 100 a 150 µl de los extractos de cloroplastos a 26°C en condiciones de luz u oscuridad continuas. Las muestras (30 µl) se tomaron al inicio del ensayo y luego de 1 y 2 horas de incubación. En los ensayos con ATP éste se agregó previamente al hEGF, en una concentración final de 5 mM.

Los niveles de hEGF y proteínas totales se cuantificaron de acuerdo a los puntos 12.6 y 12.2, respectivamente. En los ensayos con los extractos de *E. coli* transformadas con el pBSWGEKE, las muestras se prepararon con *buffer* de siembra 1X y volúmenes idénticos de cada una se separaron en un gel de poliacrilamida 15 % de acuerdo al punto 12.3.1. La fusión GEKE, se detectó en un ensayo de *Western blot*, revelando las membranas con un anticuerpo monoclonal anti-hEGF de acuerdo a los protocolos descritos en el punto 12.4.

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE hEGF EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TABACO

El primer objetivo de este trabajo consistió en la optimización de la expresión de hEGF en plantas transgénicas de *N. tabacum*. Con este fin, se compararon los niveles de expresión en plantas transformadas con cinco construcciones distintas. En ellas la secuencia codificante de hEGF o la fusión a la secuencia codificante del péptido señal de la proteína AP24, se clonaron bajo el control de dos versiones del promotor 35S del CaMV y de la secuencia potenciadora de la traducción Ω del TMV.

1.1 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS BINARIOS PARA LA TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE TABACO.

1.1.1 Breve descripción de los plásmidos previamente obtenidos.

Para la transformación de plantas de tabaco, se utilizaron inicialmente cuatro plásmidos binarios derivados del pBI121, construidos durante mi trabajo de Seminario de la Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Por tanto, se hará una muy breve descripción de las construcciones para facilitar la interpretación de los resultados obtenidos. Un mayor detalle de estos plásmidos se brinda en la sección Materiales y Métodos.

En los plásmidos p35EGF y p35(L)EGF, la secuencia *hegf* que codifica el hEGF maduro se clonó bajo el control transcripcional del promotor 35S del CaMV (35SCaMV) o de una versión extendida de este mismo promotor (35S(L)CaMV) y la secuencia potenciadora de la traducción Ω del TMV, respectivamente. Estos dos plásmidos (y las plantas transgénicas obtenidas con ellos) se referirán de aquí en más como versiones citoplasmáticas (Figura 1.1, Wirth *et al.*, 2004).

En los plásmidos p35AP_LEGF y p35(L)AP_LEGF, la secuencia ssAP, que codifica los primeros 38 aminoácidos del precursor de la proteína AP24 de tabaco fusionada a *hegf* (ssAP-*hegf*), se clonó bajo el control del promotor 35SCaMV o 35S(L)CaMV y la secuencia Ω , respectivamente (Figura 1.1, Wirth, 1999). La secuencia ssAP incluye la región codificante del péptido señal (ss) y de los primeros 17 aminoácidos de la proteína AP24 madura (AP).

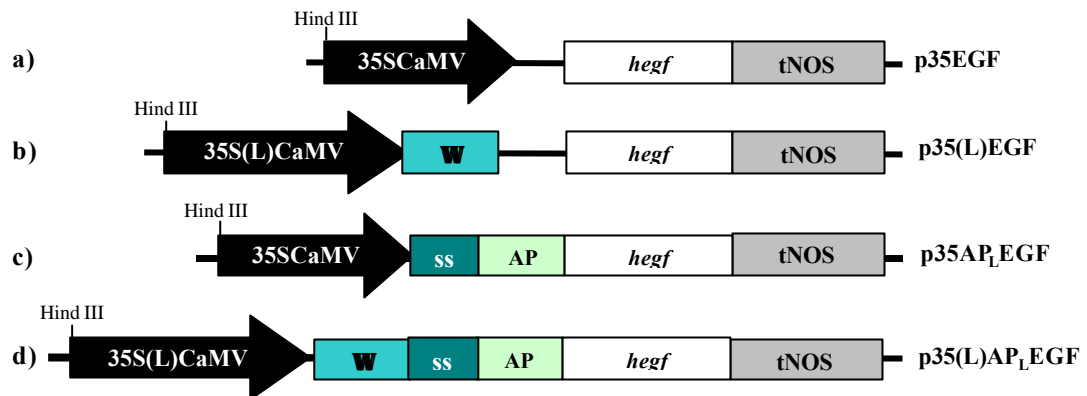


Figura 1.1 Esquema de las construcciones clonadas en pBI121. a) y b): versiones citoplasmáticas p35EGF y p35(L)EGF, respectivamente. c) y d): versiones apoplásticas p35AP_LEGF y p35(L)AP_LEGF, respectivamente. 35SCaMV y 35S(L)CaMV: promotores 35S y 35S extendido del CaMV, respectivamente. Ω: secuencia potenciadora de la traducción del TMV. ss y AP: secuencias codificantes del péptido señal de AP24 y de los primeros 17 aminoácidos de la proteína AP24 madura, respectivamente. tNOS: terminador del gen de la nopalina sintetasa de *A. tumefaciens*. *hegf*: secuencia codificante de hEGF. Se muestra la posición del único sitio Hind III utilizado en los ensayos de *Southern blot*.

1.1.2 Construcción del plásmido p35(L)APEGF

En los plásmidos p35AP_LEGF y p35(L)AP_LEGF, hEGF es sintetizado como una fusión a los primeros 38 aminoácidos del precursor de AP24 luego del corte del péptido señal, queda fusionado a los primeros 17 aminoácidos de la proteína AP24 madura. Esta fusión permitió hacer una evaluación preliminar del efecto de la localización subcelular sobre los niveles de expresión de hEGF. Sin embargo, uno de los objetivos primordiales en el diseño de una estrategia de producción de proteínas recombinantes es la obtención de un producto similar al sintetizado en el sistema de origen. Con este fin, se diseñó una nueva construcción apoplástica en la que la secuencia *hegf* se fusionó directamente a la secuencia ss, que codifica el péptido señal de AP24 (ss-*hegf*). Para el clonado de la secuencia ss-*hegf* se incorporaron sendos sitios EcoR I en los extremos 3' de ss y 5' de *hegf*, que permiten la fusión de ambas secuencias en marco de lectura continuo (Figura 1.2).

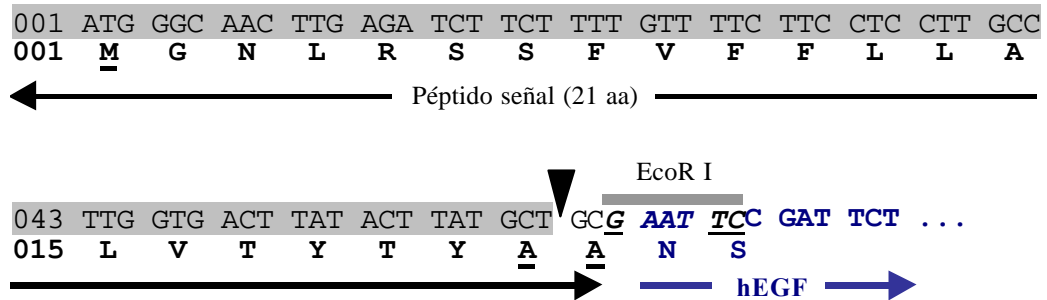


Figura 1.2 *Fusión ss-hegf*. Se muestra la secuencia nucleotídica de la fusión *ss-hegf* (línea superior) y la traducción a partir del ATG inicial (línea inferior). La punta de flecha indica el sitio de corte de la peptidasa endoplasmática entre las posiciones 21 y 22 del precursor de AP24. La metionina inicial de hEGF se reemplazó por la alanina 22 de AP24. Se muestra además el sitio EcoR I, creado por mutagénesis de las bases subrayadas y utilizado para el clonado de la fusión.

Para la incorporación del sitio EcoR I en la secuencia *ss*, se amplificó por PCR un fragmento de ADN de 265 pb a partir del plásmido pHAP12, utilizando los oligonucleótidos iniciadores 35S, que hibrida sobre la región 3' del promotor 35S(L)CaMV y APA, que hibrida sobre la porción 3' de la región codificante del péptido señal de AP24 y que aporta el sitio EcoR I. El fragmento que contiene las secuencias Ω y *ss*, se obtuvo cortando el producto de amplificación con las enzimas Sac I y EcoR I.

El sitio EcoR I en *hegf* se incorporó amplificando por PCR un fragmento de ADN de 660 pb a partir del plásmido pGEMEGF, utilizando los oligonucleótidos iniciadores EGFB, que hibrida con la región 5' de *hegf* y que aporta el sitio EcoR I y SP6, que hibrida con el promotor del fago SP6 presente en el pGEMEGF. La secuencia *hegf* se liberó del producto amplificado, con las enzimas EcoR I y Hind III y se clonó, junto con el fragmento que contiene las secuencias Ω y *ss*, cortado con Sac I y EcoR I, en el vector pGEM-3Zf(-) (Promega), para generar el plásmido intermediario pGEMAPEGF (Figura 1.3). La fusión de *ss* y *hegf* se verificó por secuenciación.

El plásmido binario p35(L)APEGF se construyó clonando la fusión *ss-hegf*, obtenida del pGEMAPEGF con BamH I y Sac I, y el fragmento que contiene la secuencia Ω y promotor 35S(L)CaMV liberado del pHAP12 con Hind III y BamH I, en pBI121 reemplazando al promotor 35SCaMV y la secuencia *uidA*. (Figura 1.4).

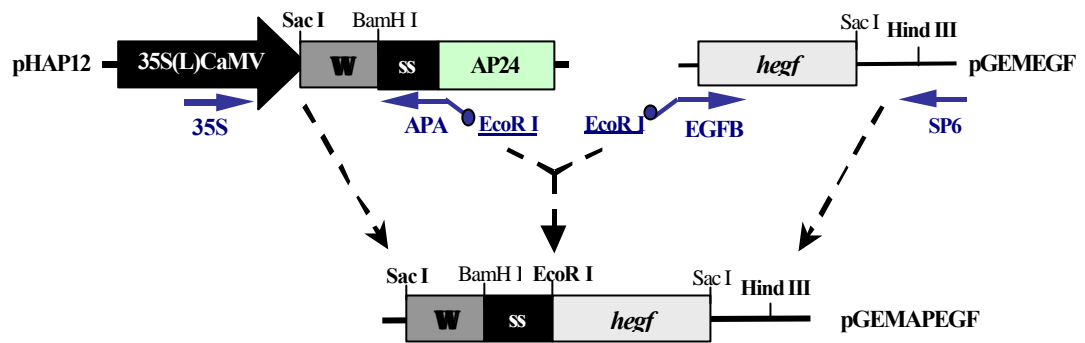


Figura 1.3 Construcción del plásmido intermediario *pGEMAPEGF*. Se amplificaron por PCR dos fragmentos de ADN a partir de los plásmidos pHAP12 y pGEMEGF, utilizando los pares de oligonucleótidos 35S y APA, y EGFB y SP6, respectivamente. Los oligonucleótidos APA y EGFB incorporan un sitio EcoR I cada uno, para la fusión en marco de lectura continuo de *ss* y *hegf*. El producto amplificado a partir de pHAP12 se cortó con Sac I y EcoR I y el fragmento obtenido de pGEMEGF se cortó con EcoR I y Hind III. Ambos insertos se clonaron en el vector pGem-3Zf(-), previamente cortado con Sac I y Hind III, para obtener el plásmido pGEMAPEGF. Por simplicidad, se muestran sólo algunos sitios de restricción.

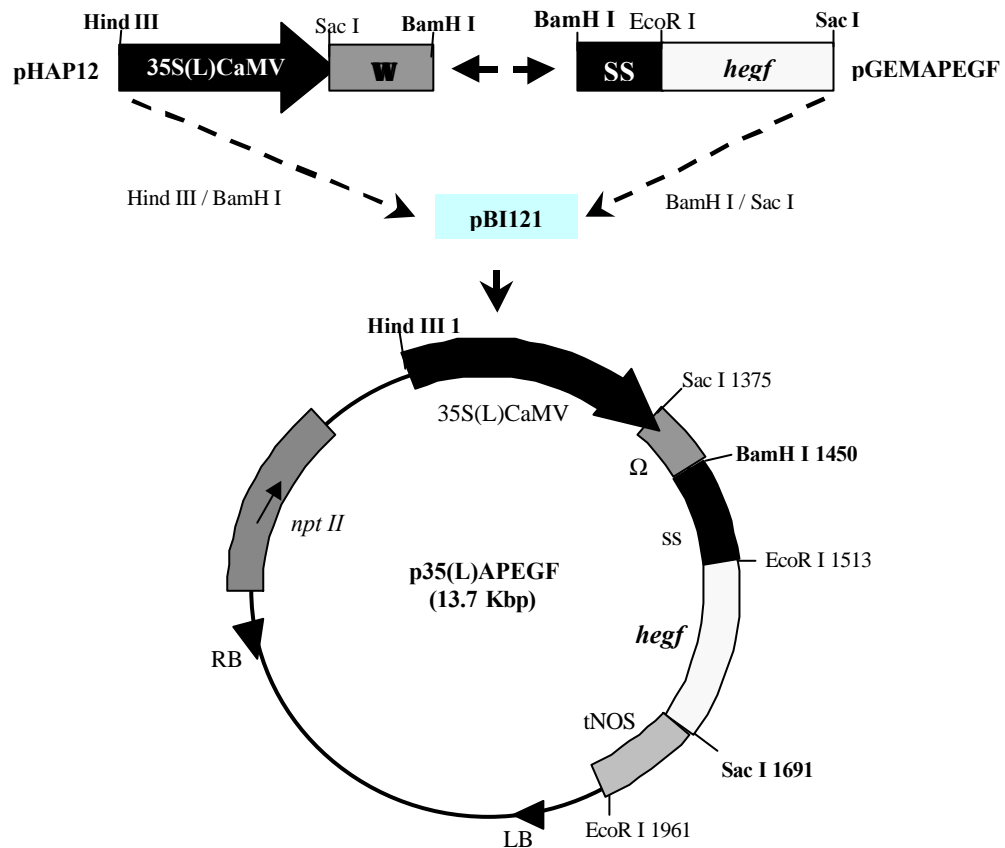


Figura 1.4 Ensamblado del plásmido binario *p35(L)APEGF*. El fragmento obtenido del pHAP12 con Hind III y BamH I y que contiene el promotor 35S(L)CaMV y la secuencia Ω del TMV se clonó, junto con la secuencia *ss-hegf* obtenida del pGEMAPEGF con BamH I y Sac I, en el plásmido pBI121. tNOS:

terminador del gen de la nopalina sintetasa de *A. tumefaciens*, *nptII*: secuencia de la neomicina fosfotrasferasa II, RB y LB: bordes derecho e izquierdo del ADN-T, respectivamente.

1.2 TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE TABACO MEDIADA POR *A. TUMEFACIENS*

Se transformaron discos de *N. tabacum* cv Xanthi D8 mediante cultivos obtenidos a partir de colonias aisladas de *A. tumefaciens* cepa LBA4404, conteniendo cada uno de los plásmidos binarios descritos. Se obtuvo un promedio de entre uno y dos brotes por disco de hoja, que comenzaron a desarrollarse a partir de los 90 días de iniciada la transformación. Estos brotes se separaron de los explantos y se transfirieron a medio sin hormonas para inducir el desarrollo de raíces. No se obtuvieron regenerantes en ninguno los controles de selección, validando así la concentración del agente de selección utilizado. Todos los controles en medio sin selección regeneraron normalmente. Un promedio de 16 brotes por construcción desarrolló raíces en el medio selectivo. Todas las plantas crecieron normalmente y ninguno de los regenerantes presentó, *in vitro* o en tierra, diferencias morfológicas respecto de los controles sin transformar.

1.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS PLANTAS TRANSFORMADAS

1.3.1 Análisis preliminar por PCR

Se analizó la presencia del transgén en las plantas que desarrollaron raíces en medio selectivo por amplificación específica por PCR, a partir de extractos de ADN total. Se utilizaron los oligonucleótidos 35S, que hibrida en la región 3' de los promotores 35SCaMV y 35S(L)CaMV, y el oligonucleótido EGF3, que hibrida en la región 3' de *hegf*. En todas las plantas evaluadas se amplificó un fragmento del tamaño esperado para cada construcción. Para cada grupo de plantas se incorporó como control positivo una reacción de amplificación utilizando el plásmido correspondiente empleado en la transformación y como controles negativos una reacción sin agregado de ADN y una reacción con un extracto de ADN total de una planta sin transformar (Figura 1.5).

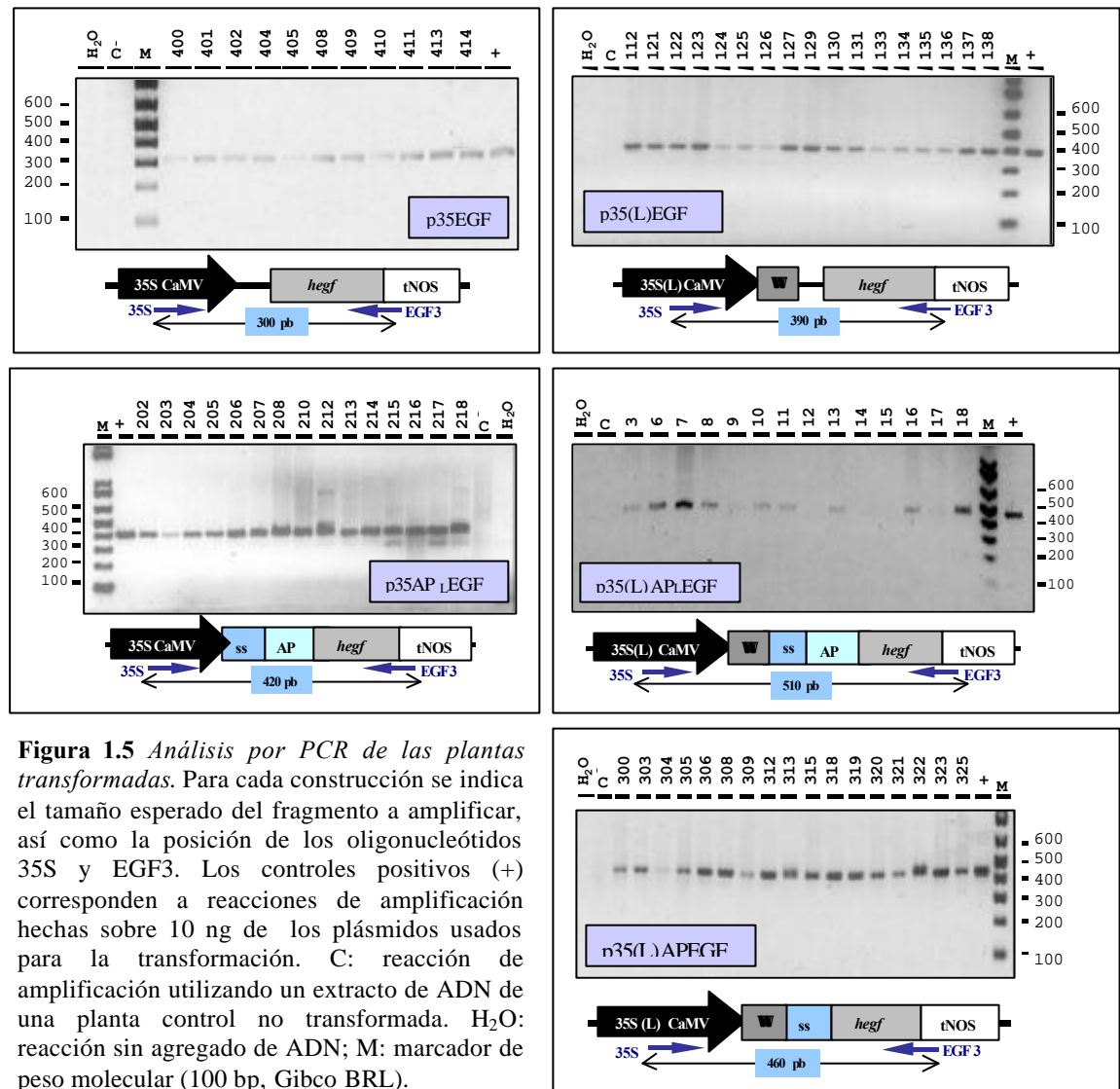


Figura 1.5 Análisis por PCR de las plantas transformadas. Para cada construcción se indica el tamaño esperado del fragmento a amplificar, así como la posición de los oligonucleótidos 35S y EGF3. Los controles positivos (+) corresponden a reacciones de amplificación hechas sobre 10 ng de los plásmidos usados para la transformación. C: reacción de amplificación utilizando un extracto de ADN de una planta control no transformada. H₂O: reacción sin agregado de ADN; M: marcador de peso molecular (100 pb, Gibco BRL).

1.3.2 Análisis de la integración de *hegf* por Southern blot

La integración de la secuencia *hegf* en el genoma nuclear se evaluó en ensayos de *Southern blot*. Los extractos de ADN total de las plantas transformadas y de controles sin transformar, se cortaron con la enzima Hind III, que posee un único sitio de reconocimiento en el extremo 5' de los promotores 35SCaMV y 35S(L)CaMV en todas las construcciones utilizadas (Figuras 1.1 y 1.4). La presencia de *hegf* se detectó por hibridación con una sonda específica. Se observó un número de copias variable, de entre 1 y 6, para cada planta, independientemente de la construcción utilizada en la transformación, confirmando la integración de *hegf* en el genoma nuclear (Figura 1.6).

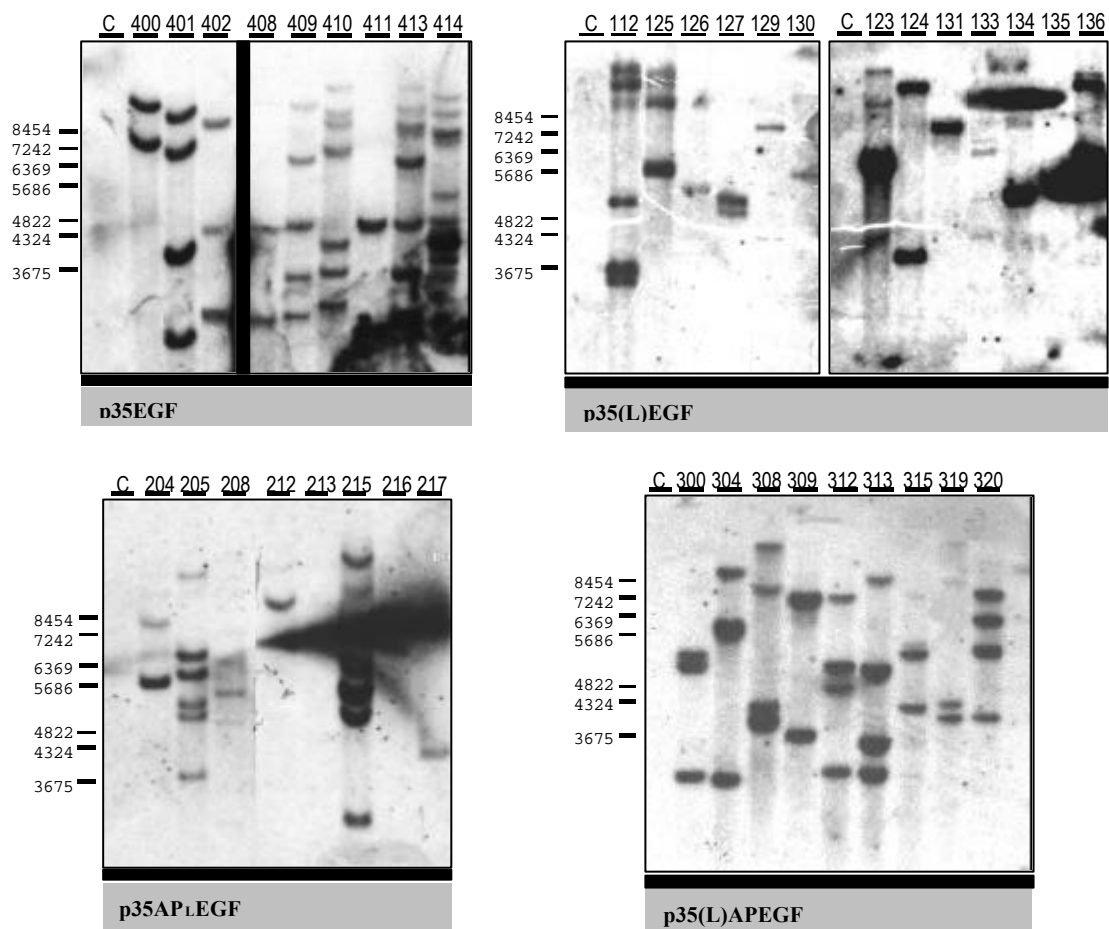


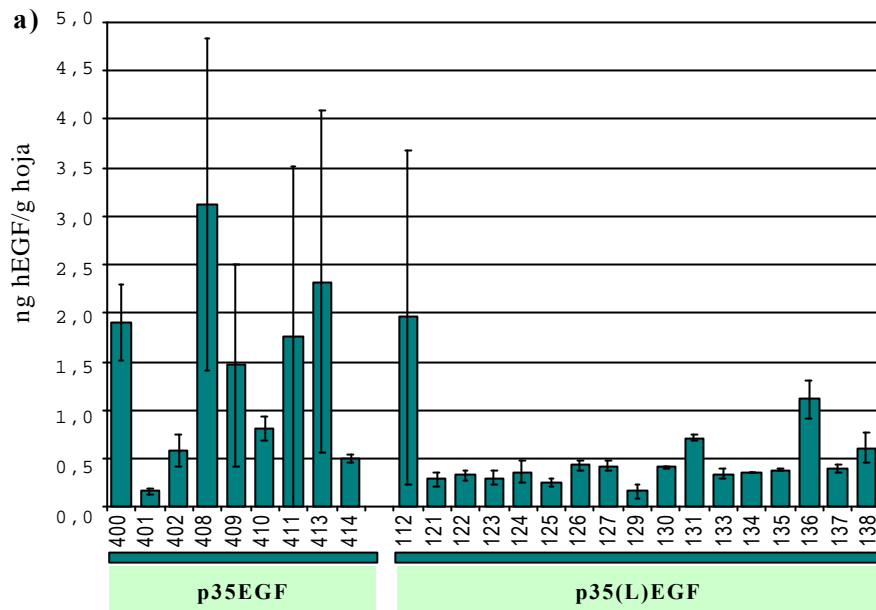
Figura 1.6 Análisis de la integración de *hegf* por Southern blot. Se cortaron 10 μ g de los extractos de ADN total de las plantas transformadas y de controles sin transformar (C) con la enzima Hind III y se separaron por electroforesis en geles de agarosa 0,8 %. El ADN se transfirió a membranas de *nylon*, que se revelaron con una sonda específica para *hegf*. Marcador de peso molecular: λ BstE II (New England Biolabs).

1.4 NIVELES DE EXPRESIÓN DE hEGF EN LAS PLANTAS TRANSFORMADAS.

Los niveles de expresión de hEGF en las hojas de las plantas transformadas se cuantificaron mediante un ensayo de ELISA utilizando anticuerpos específicos y una curva de calibración obtenida con distintas concentraciones de hEGF comercial.

En las plantas transformadas con las versiones citoplasmáticas, los valores de hEGF no superaron en ningún caso el 0,00001% del total de las proteínas solubles (TPS), lo que corresponde a un máximo de 3 ng de hEGF por g de hoja (ng hEGF/g hoja) en la planta 408. En la mayoría de los casos las mediciones fueron muy cercanas al límite de detección del ensayo (0,1 ng hEGF/g hoja). Esto obligó a trabajar con

extractos concentrados del tejido total procesado en cada pocillo de la placa de ELISA, lo que incrementó en gran medida la variabilidad de las mediciones (Figura 1.7).

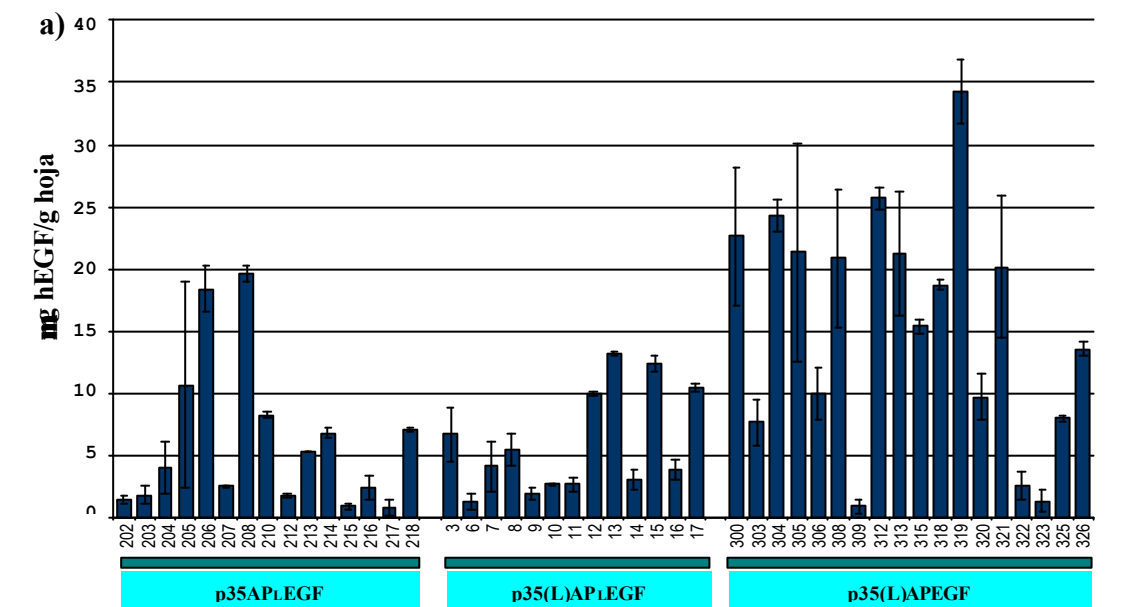


b)

p35EGF			
Planta	ng hEGF/g hoja	DS	% TPS
400	1,91	0,40	0,000006
401	0,16	0,02	0,000001
402	0,59	0,16	0,000002
408	3,12	1,72	0,000010
409	1,46	1,04	0,000005
410	0,81	0,13	0,000003
411	1,75	1,75	0,000006
413	2,32	1,77	0,000008
414	0,50	0,04	0,000002
p35(L)EGF			
Planta	ng hEGF/g hoja	DS	% TPS
112	1,96	1,72	0,000007
121	0,29	0,07	0,000001
122	0,33	0,05	0,000001
123	0,30	0,08	0,000001
124	0,36	0,11	0,000001
125	0,25	0,04	0,000001
126	0,43	0,05	0,000001
127	0,42	0,05	0,000001
129	0,17	0,07	0,000001
130	0,41	0,01	0,000001
131	0,71	0,03	0,000002
133	0,34	0,05	0,000001
134	0,36	0,01	0,000001
135	0,39	0,02	0,000001
136	1,11	0,20	0,000004
137	0,40	0,05	0,000001
138	0,61	0,15	0,000002

Figura 1.7. Niveles de expresión de hEGF en las plantas transformadas con las versiones citoplasmáticas. a) Se grafican los niveles de expresión como ng hEGF/g hoja en 9 y 17 plantas transformadas con los plásmidos p35EGF y p35(L)EGF, respectivamente. Los valores son el promedio de entre 2 y 4 mediciones independientes para cada planta. Las barras representan el desvío estándar (DS) para cada medición. b) Valores de hEGF medidos para cada planta. % TPS: porcentaje de hEGF respecto del total de las proteínas solubles en hoja.

En las versiones apoplásticas en cambio, los valores de expresión de hEGF alcanzaron un 0,11% TPS, correspondiente a un máximo de 34 μg hEGF/g hoja en la planta 319 (Figura 1.8). Estos valores constituyen incrementos de hasta cinco órdenes de magnitud en los niveles de hEGF en las plantas transformadas con las versiones apoplásticas respecto de las citoplasmáticas (Figura 1.9).



b)

p35APL_EGF			
Planta	ng hEGF/g hoja	DS	% TPS
202	1,5	0,4	0,005
203	1,8	0,7	0,006
204	4,0	2,0	0,013
205	10,7	8,3	0,036
206	18,4	1,8	0,061
207	2,6	0,1	0,009
208	19,6	0,7	0,065
210	8,3	0,3	0,028
212	1,8	0,1	0,006
213	5,3	0,0	0,018
214	6,9	0,4	0,023
215	1,0	0,2	0,003
216	2,4	0,9	0,008
217	0,9	0,6	0,003
218	7,1	0,1	0,024

p35(L)APL_EGF			
Planta	ng hEGF/g hoja	DS	% TPS
3	6,7	2,1	0,022
6	1,3	0,7	0,004
7	4,2	2,0	0,014
8	5,5	1,4	0,018
9	2,0	0,5	0,007
10	2,7	0,1	0,009
11	2,7	0,5	0,009
12	10,0	0,1	0,033
13	13,2	0,2	0,044
14	3,1	0,8	0,010
15	12,4	0,7	0,041
16	3,9	0,8	0,013
17	10,4	0,3	0,035

p35(L)APEGF							
Planta	µg hEGF/g hoja	DS	% TPS	Planta	µg hEGF/g hoja	DS	% TPS
300	22,6	5,5	0,075	315	15,5	0,6	0,052
303	7,7	1,9	0,026	318	18,7	0,4	0,062
304	24,3	1,3	0,081	319	34,2	2,6	0,114
305	21,4	8,8	0,071	320	9,8	1,9	0,033
306	10,0	2,1	0,033	321	20,2	5,8	0,067
308	20,9	5,6	0,070	322	2,6	1,1	0,009
309	1,0	0,6	0,003	323	1,4	0,9	0,005
312	25,7	0,9	0,086	325	8,0	0,2	0,027
313	21,3	5,0	0,071	326	13,6	0,6	0,045

Figura 1.8. Niveles de expresión de hEGF en las plantas transformadas con las versiones apoplásticas. a) Se grafican los niveles de expresión como µg hEGF/g hoja en 15, 13 y 18 plantas transformadas con los plásmidos p35AP_LEGF, p35(L)AP_LEGF y p35(L)APEGF, respectivamente. Los valores son el promedio de entre 2 y 4 mediciones independientes para cada planta. Las barras representan el desvío estándar (DS) para cada medición. b) Valores de hEGF medidos para cada planta. % TPS: porcentaje de hEGF sobre el total de las proteínas solubles en hoja.

La regulación de la expresión de los genes codificados por el genoma nuclear se produce principalmente por control transcripcional y postranscripcional. Por tanto, la modificación de las secuencias promotoras de la transcripción puede tener una fuerte influencia sobre los niveles de expresión de la proteína recombinante. Se compararon entonces los niveles de expresión de hEGF en las plantas transformadas con las construcciones en las que la secuencia *hegf* se clonó bajo el control transcripcional del promotor 35SCaMV (p35EGF y p35AP_LEGF) o bajo el control del promotor 35S(L)CaMV y la secuencia Ω (p35(L)EGF, p35(L)AP_LEGF y p35(L)APEGF). A pesar de que en trabajos previos se informó que la combinación del promotor 35S(L)CaMV y la secuencia Ω generó incrementos de hasta 6 veces en la expresión de la β-glucuronidasa respecto de los observados para el promotor 35SCaMV (Coego *et al.*, 1996), en las plantas analizadas en este trabajo no se observaron aumentos en los niveles de expresión de hEGF al utilizar estas secuencias, tanto en las versiones citoplasmáticas como en las apoplásticas (Figura 1.9).

Construcción	Media de ng hEGF/g hoja	n
p35EGF	1,4	9
p35(L)EGF	0,5	17
p35AP _L EGF	6130	15
p35(L)AP _L EGF	6010	13
p35(L)APEGF	15490	18

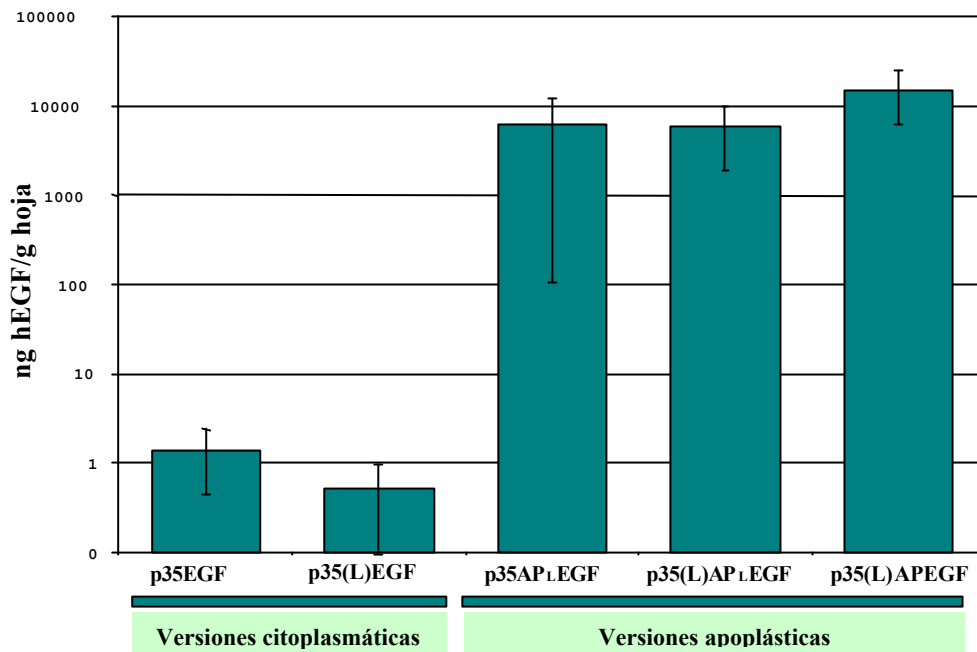


Figura 1.9. Promedio de los niveles de expresión de hEGF para cada construcción. Se grafica la media de los niveles de expresión cuantificados para cada construcción como ng hEGF/g hoja. n: número de plantas analizadas.

1.5 ANÁLISIS DE LA TRANSCRIPCIÓN DE *hEGF* POR *NORTHERN BLOT*.

A fin de evaluar si las diferencias en los niveles de expresión de hEGF entre las versiones citoplasmáticas y apoplásticas se debían a diferencias en la tasa de transcripción del transgén, se compararon los niveles del ARN mensajero (ARNm) entre las plantas 124 y 131, transformadas con el plásmido p35(L)EGF y las plantas 303, 305, 312 y 319, transformadas con el plásmido p35(L)APEGF. En las plantas 305 y 319 se observan altos niveles de ARNm para hEGF, lo que concuerda con los altos niveles de expresión cuantificados. Sin embargo, en las plantas 303 y 312, los niveles de ARNm, son comparables a los observados en las plantas 124 y 131 a pesar de que los niveles de expresión de la proteína recombinante entre estas versiones difieren en 5 ordenes de magnitud (Figura 1.10).

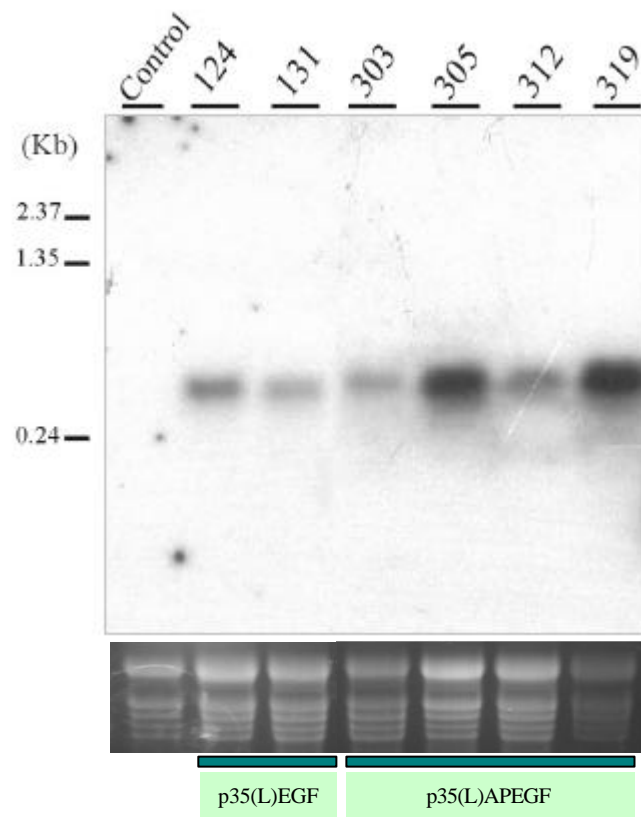


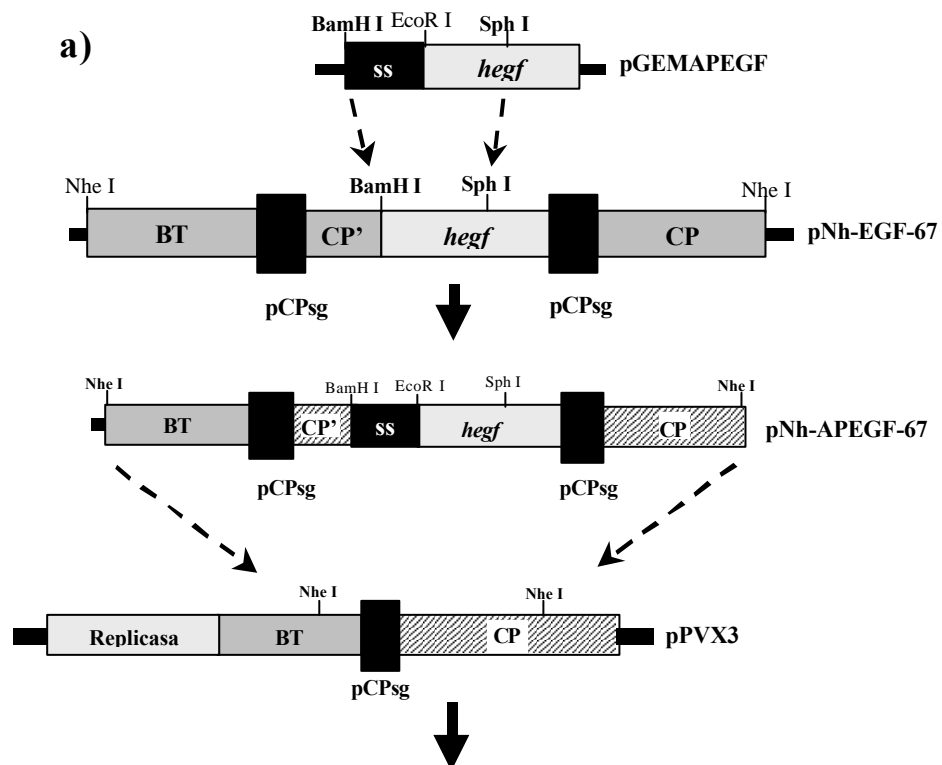
Figura 1.10. Análisis los niveles de transcripción de *hegf* en las plantas transgénicas. 20 μ g de ARN total de las plantas transformadas con el plásmido p35(L)EGF (plantas 124 y 131) y con el plásmido p35(L)APEGF (plantas 303, 305, 312 y 319) y controles sin transformar (C), se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1,5% en condiciones desnaturalizantes. El ARN se transfirió a una membrana de *nylon* y la presencia de los ARNm para hEGF se reveló por hibridación con una sonda específica. La fotografía inferior corresponde al gel de agarosa antes de ser transferido en donde pueden visualizarse los ARN ribosomales mayoritarios.

Estos resultados indican que los incrementos observados en los niveles de expresión de hEGF en las versiones apoplásticas respecto de las citoplasmáticas no pueden explicarse por diferencias en la tasa de transcripción. Tampoco se observó un efecto al utilizar la secuencia potenciadora de la traducción Ω , por tanto las diferencias observadas parecen estar relacionadas a fenómenos postraduccionales. Es posible que en las versiones apoplásticas la traslocación de hEGF al lumen del RE le permita adquirir el plegamiento correcto a través de la formación de los tres puentes disulfuro intramoleculares necesarios para su actividad biológica. Por tanto sería el envío de hEGF a la vía de secreción y la adquisición de la conformación nativa en el lumen del RE, lo que le estaría otorgando una mayor estabilidad respecto al péptido sintetizado en el citoplasma.

2. EXPRESIÓN DE hEGF UTILIZANDO VECTORES VIRALES DERIVADOS DE PVX

2.1 - CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR VIRAL APOPLÁSTICO PVXAPEGF.

Como se disponía de un vector viral derivado de PVX que dirige la síntesis de hEGF en el citoplasma celular (PVXEGF, Calamante, 1998), se construyó una versión apoplástica del mismo a fin de ensayar en este sistema de expresión, la estrategia de relocalización subcelular de hEGF seguida anteriormente para las plantas transgénicas. Este nuevo vector viral se construyó reemplazando en los sitios BamH I y Sph I, del plásmido intermediario pNh-EGF-67 (Calamante, 1998) la región 5' de la secuencia *hegf*, por la región 5' de la fusión *ss-hegf* del pGEMAPEGF, para obtener el plásmido pNh-APEGF-67. El plásmido pPVXAPEGF se obtuvo reemplazando el fragmento cortado con la enzima Nhe I del pPVX3 por el fragmento obtenido por corte con esta misma enzima del pNh-APEGF-67 (Figura 2.1).



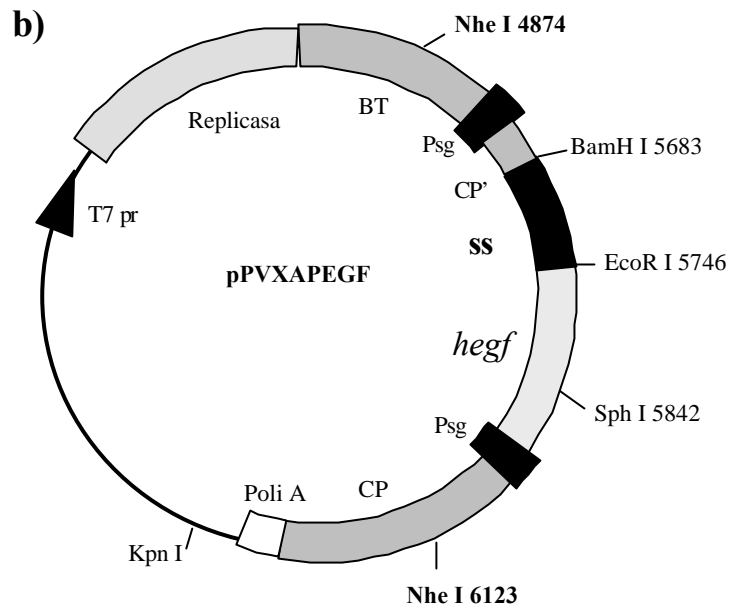


Figura 2.1. Construcción del plásmido pPVXAPEGF. a) Construcción del plásmido intermediario pNh-APEGF-67. La región 5' de la fusión *ss-hegf* obtenida del pGEMEGF, se clonó en los sitios BamH I y Sph I del plásmido pNh-EGF-67, reemplazando a la región 5' de *hegf*. b) Ensamblado y estructura del plásmido pPVXAPEGF. Se reemplazó el fragmento de ADN contenido entre los dos sitios Nhe I del plásmido pPVX3, por el fragmento obtenido con esta misma enzima del pNh-APEGF-67. BT: bloque triple de genes, CP: cápside de PVX, CP': secuencia codificante de los primeros 14 aa de la cápside de PVX, Psg: promotor subgenómico de la cápside viral. Replicasa: ARN polimerasa ARN dependiente viral, T7 pr: promotor del fago T7, poli A: secuencia de poliadeninas. Los números indican las posiciones respecto del genoma de PVX clonado en el vector pPVX3.

De esta forma la secuencia *ss-hegf*, queda fusionada a su vez a la secuencia que codifica los primeros 14 aminoácidos de la cápside de PVX (CP-*ss-hegf*, Figura 2.2).

En el vector viral apoplástico PVXAPEGF, la fusión CP-*ss-hegf* queda bajo el control transcripcional de una duplicación del promotor subgenómico de la cápside, insertada entre los genes del bloque triple y la cápside de PVX. La secuencia completa del PVXAPEGF está bajo el control del promotor del fago T7 para la producción *in vitro* de los transcriptos virales.

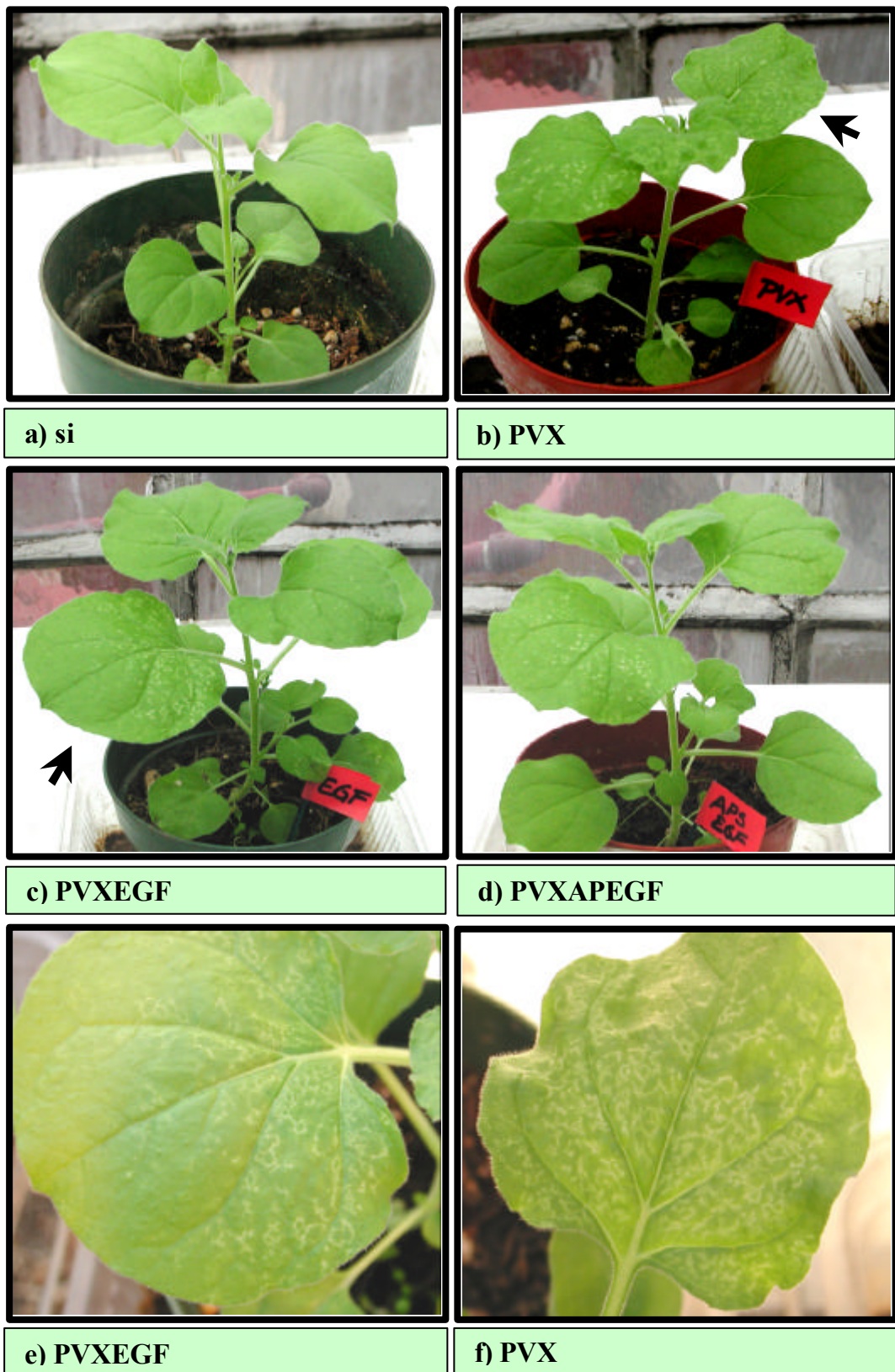


Figura 2.3. Infección de *N benthamiana* con los vectores virales derivados de PVX. a) Control sin infectar b), c) y d) Infección con PVX, PVXEGF y PVXAPEGF, respectivamente e) y f) Detalle de las hojas infectadas con PVXEGF y PVX, indicadas con las flechas en las figuras c) y b) respectivamente.



Figura 2.5 Infección de *N. tabacum* cv Xanthi D8. Detalle de una hoja sistémica en una planta inoculada con PVXAPEGF. Las flechas indican la localización de las lesiones ocasionadas por la infección viral.

La infección con los vectores virales tanto en *N. benthamiana* como en *N. tabacum*, se confirmó revelando la presencia de la cápside de PVX en ensayos de *Western blot* (Figura 2.6).

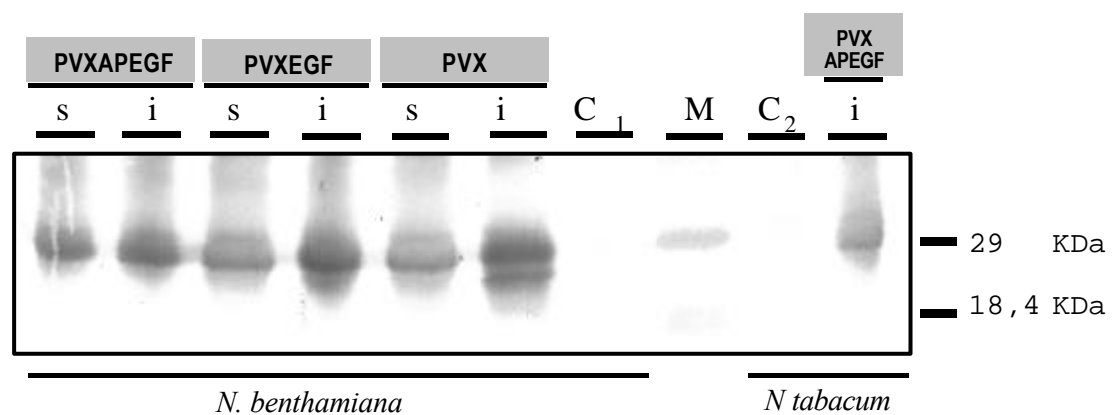


Figura 2.6 Ensayo de *Western blot* para la cápside de PVX. La infección con los vectores virales en las plantas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* cv Xanthi D8 se confirmó por inmunodetección de la cápside de PVX. Se muestra el ejemplo de una membrana con algunas plantas representativas. PVX, PVXEGF y PVXAPEGF: muestras de hojas inoculadas (i) y sistémicas (s) que presentaron síntomas visibles a los 10 d.p.i. con los vectores virales indicados. C₁ y C₂: muestras de *N. benthamiana* y *N. tabacum* cv Xanthi D8 sin infectar, respectivamente. M: marcador de peso molecular.

2.3 NIVELES DE EXPRESIÓN DE hEGF EN LAS PLANTAS INFECTADAS.

La expresión de hEGF a los 18 y 30 d.p.i. en las plantas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* cv Xanthi D8, infectadas con cada vector viral se cuantificó mediante el

ensayo de ELISA. En las plantas infectadas con el vector viral citoplasmático PVXEGF no se detectó la expresión de hEGF en ninguna de las plantas analizadas (límite de detección: 0,1 ng hEGF/g hoja). Sin embargo, en las plantas infectadas con el vector apoplástico PVXAPEGF, los niveles de expresión de hEGF alcanzaron el 0,015% TPS sin que se observen diferencias significativas entre las muestras tomadas a los 18 y 30 d.p.i., tanto en *N. benthamiana* como en *N. tabacum*. Por tanto el virus no sólo permanece infectivo luego del pasaje por *N. benthamiana* sino que conserva el transgén y la capacidad de expresarlo (Figura 2.7).

Vector Viral	Planta	d.p.i.	ng hEGF/g hoja	DS	N	% TPS
PVX	<i>N. benthamiana</i>	18	0	0	3	0
PVX	<i>N. benthamiana</i>	30	0	0	3	0
PVXEGF	<i>N. benthamiana</i>	18	0	0	3	0
PVXEGF	<i>N. benthamiana</i>	30	0	0	3	0
PVXAPEGF	<i>N. benthamiana</i>	18	3,5	0,1	3	0,012
PVXAPEGF	<i>N. benthamiana</i>	30	4,6	1,6	3	0,015
PVX	<i>N. tabacum</i>	18	0	0	3	0
PVX	<i>N. tabacum</i>	30	0	0	3	0
PVXEGF	<i>N. tabacum</i>	18	0	0	3	0
PVXEGF	<i>N. tabacum</i>	30	0	0	3	0
PVXAPEGF	<i>N. tabacum</i>	18	3,6	0,6	3	0,012
PVXAPEGF	<i>N. tabacum</i>	30	3,2	0,8	3	0,011

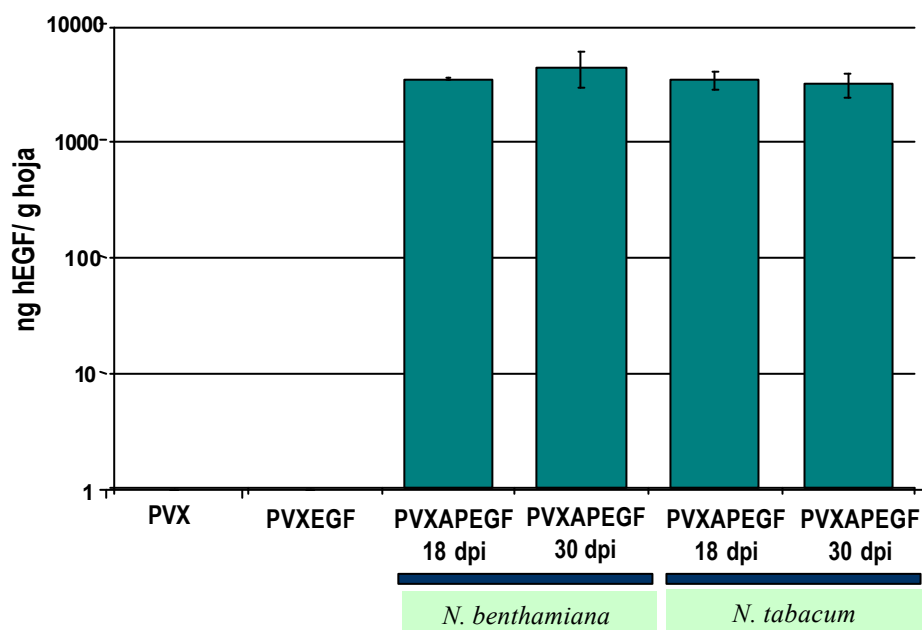


Figura 2.7. Niveles de expresión de hEGF en las plantas infectadas con los vectores virales. Se muestran los valores promedio de hEGF de 3 plantas infectadas con cada vector viral. % TPS: porcentaje de hEGF respecto del total de las proteínas solubles en hoja, dpi: días post inoculación, N: número de plantas analizadas, DS: desvío estándar.

Nuevamente se observó que la fusión al péptido señal de AP24 conduce a incrementos en los niveles de expresión de hEGF. Este parece deberse a la funcionalidad del péptido señal y no sólo a la protección del extremo amino terminal de la proteína recombinante por la fusión, puesto que en ambos vectores virales los péptidos codificados por la secuencia *hegf* o la fusión *ss-hegf* se sintetizan fusionados a los primeros 14 aminoácidos de la cápside de PVX, sin embargo sólo se detectó hEGF en las plantas infectadas con el vector viral apoplástico.

2.4 ENSAYOS DE CO-INFECCIÓN CON PVY

Muchos virus vegetales expresan proteínas que actúan inhibiendo distintos pasos del silenciamiento génico postranscripcional. Uno de ellos es el virus Y de la papa (PVY) que expresa la proteína supresora HC-Pro. Esta supresión del silenciamiento es inespecífica, de forma tal que influye no sólo en la tasa de replicación de PVY, sino que se extiende a otros virus que infecten a la misma planta. Este es el caso de la co-infección con PVX y PVY, en la cual los síntomas desarrollados son más severos que en las plantas infectadas con cada virus por separado. Se probó entonces, el efecto sobre los niveles de expresión de hEGF, al co-infectar plantas de *N. tabacum* cv Xanthi D8 con los vectores virales derivados de PVX y el virus PVY. En ambos casos se utilizaron extractos de hojas infectadas como fuente de inóculo. La presencia de los virus en cada una de las plantas analizadas se confirmó en ensayos de *squash blot* con anticuerpos contra la cápside de PVX o de PVY (Figura 2.8).

a) anti CPPVY				b) anti CPPVX			
PVY-PVX (i)			si	PVY-PVX (s)			
1	2	3	1	1	2	3	
PVY-PVX (s)			2	PVY-PVXEGF(s)		si	
1	2	3		1	2	1	2
PVY-PVXEGF(i)		PVY-PVXEGF(s)		PVY-PVXEGF(s)			
1	3	1	3	1	2	3	
PVY-PVXAPEGF(i)			PVXEGF (i)	PVX (i)		PVX (s)	
1	2	3	1	1	2	1	2
PVY-PVXAPEGF(s)			2	PVY (i)			
1	2	3		1	2		
PVX(i)		PVX(s)		PVXEGF (i)		PVXEGF (s)	
1	2	1	2	1	2	1	2
PVY(i)		PVY(s)		PVXAPEGF (i)		PVXAPEGF (s)	
1	2	1	2	1	2	1	2

Figura 2.8. Detección de PVX y PVY por Squash blot a los 15 d.p.i. Discos de hojas inoculadas (i) y sistémicas (s) de plantas infectadas y controles sin infectar se prensaron sobre membranas de nitrocelulosa y la infección viral se reveló utilizando anticuerpos específicos: a) anti cápside de PVY y b) anti cápside de PVX. si: control sin infectar; PVX y PVY: infecciones simples con PVX o PVY, respectivamente; PVXEGF y PVXAPEGF: infecciones simples con el vector viral citoplasmático y apoplástico, respectivamente; PVX-PVY, PVXEGF-PVY y PVXAPEGF-PVY: co-infección de PVY con PVX, PVXEGF y PVXAPEGF. Cada número representa una planta distinta.

A diferencia de lo que se esperaba, los niveles de expresión de hEGF cuantificados por ELISA en las plantas infectadas con sólo uno de los vectores virales no difirieron de los observados en las plantas co-infectadas con PVY, tanto en el caso de PVXEGF como de PVXAPEGF, en las hojas inoculadas o en las hojas sistémicas (Figura 2.9).

<i>N. tabacum</i> cv Xanthi D8				
Vector viral	n	hoja	% TPS	DS
-----	2		0	NC
PVX	2	s	0	NC
PVY	2	s	0	NC
PVX – PVY	2	i	0	NC
PVX – PVY	2	s	0	NC
PVXEGF	2	i	0,0012	0,0002
PVXEGF	2	s	0,0008	0,0005
PVXEGF – PVY	3	i	0,0014	0,0005
PVXEGF – PVY	3	s	0,0011	0,0005
PVXAPEGF	2	i	0,10	0,04
PVXAPEGF	2	s	0,12	0,01
PVXAPEGF – PVY	3	i	0,12	0,02
PVXAPEGF – PVY	3	s	0,14	0,02

Figura 2.9. Niveles de expresión de hEGF en las plantas co-infectadas. Se muestra la media del porcentaje de hEGF respecto del total de las proteínas solubles (% TPS), en hojas de las plantas co-infectadas o infectadas con sólo uno de los virus o vectores virales a los 15 d.p.i. i y s: hojas inoculadas y sistémicas, respectivamente; DS: desvío estándar, n: número de plantas inoculadas.

Una observación importante es que los niveles de expresión de hEGF en este grupo de plantas difieren de los informados previamente para las infecciones de *N. benthamiana* y *N. tabacum*. En las primeras infecciones con PVXEGF, los niveles de hEGF estuvieron por debajo del límite de detección y en las infecciones con PVXAPEGF se cuantificaron valores del 0,015% TPS. Sin embargo, en este nuevo grupo de plantas, se midió hasta un 0,001 % y un 0,15 % TPS en las plantas inoculadas con el vector viral citoplasmático y apoplástico, respectivamente. Como estos incrementos se observaron también en los controles de infección simple no pudieron adjudicarse a la co-infección con PVY. Debe destacarse que durante el transcurso de la infección, estas plantas sufrieron estrés por frío en condiciones no controladas. Esta situación puede explicar los aumentos en los niveles de hEGF, dado que se ha

informado que la baja temperatura es un factor inhibitor del silenciamiento (Szittyta *et al.*, 2003). Los intentos por inducir nuevamente esta situación fueron infructuosos, puesto que como el estrés se produjo en forma accidental no se registró la duración e intensidad del mismo ni el estado fisiológico de las plantas. Una consecuencia adicional de esta situación fue que el daño sufrido por el frío en el tejido aéreo se sumó al daño causado por las infecciones virales y enmascaró la comparación visual de la sintomatología, que se esperaba estuviera exacerbada en las plantas co-infectadas.

A fin de determinar si existe un efecto por la co-infección con PVY que hubiese sido enmascarado por la situación de estrés descrita, se repitió el ensayo, ahora en plantas de *N. benthamiana*. Los síntomas característicos de la infección con PVX se observaron a los 7 d.p.i. Sin embargo, en las plantas co-infectadas con PVY estos se agravaron con el tiempo, tanto que en las hojas jóvenes el alto número de lesiones impidió la expansión del área foliar, que quedaba curvada y enroscada sobre sí misma. A los 15 d.p.i., las plantas co-infectadas presentaban un tamaño muy reducido respecto a las infectadas con sólo uno de los virus y las hojas inoculadas se habían necrosado totalmente. A los 20 d.p.i. la mayor parte de las plantas co-infectadas había muerto, mientras que las plantas infectadas con sólo uno de los virus o vectores virales, continuaban creciendo. Nuevamente, las infecciones con cada virus se verificaron en ensayos de *squash blot*.

En este nuevo ensayo de co-infección, se detectó la expresión de hEGF en las plantas infectadas con el vector viral citoplasmático PVXEGF pero no se observaron diferencias con las plantas co-infectadas con PVY. En el caso de las plantas infectadas con el vector viral apoplástico se observó un leve incremento en los niveles de expresión de hEGF cuando se co-infectó con PVY, pero estos valores estuvieron aproximadamente un orden de magnitud por debajo de los previamente informados para las plantas que habían sufrido estrés por frío (Figura 2.10).

Estos resultados sugieren que los niveles de expresión de hEGF en las plantas infectadas con los vectores virales podrían incrementarse a través de la optimización de las condiciones de infección. Sin embargo, al utilizar vectores virales debe evaluarse con cuidado el compromiso entre el aumento en la tasa de expresión y en la tasa de replicación viral, puesto que un sistema con una menor expresión pero con una mejor supervivencia y mantenimiento de la infección puede ser más eficiente que un vector viral que, aunque genere altos niveles de expresión, destruya rápidamente al huésped.

<i>N. benthamiana</i>				
Vector viral	N	hoja	% TPS	DS
-----	2		0	0
PVX	2	s	0	0
PVX – PVY	2	s	0	0
PVXEGF	2	s	0,00005	0
PVXEGF – PVY	2	s	0,00005	0,00001
PVXAPEGF	2	s	0,012	0,007
PVXAPEGF – PVY	2	s	0,025	0,008

Figura 2.10. Segundo ensayo de co-infección con PVY. Se muestran los niveles promedio de expresión de hEGF cuantificado por ELISA en las plantas co-infectadas con los vectores virales y PVY y en controles infectados con sólo uno de los virus. en las hojas sistémicas a los 15 d.p.i.

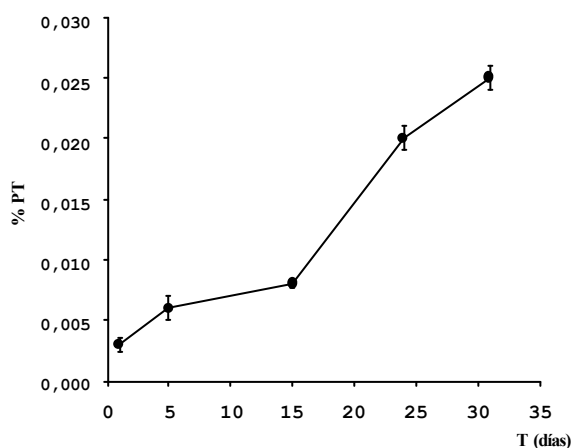
3. CARACTERIZACIÓN DEL hEGF EXPRESADO EN EL APOPLASTO DE TABACO

3.1 RIZOSECRECIÓN DE hEGF.

3.1.1 Producción de hEGF en un medio hidropónico

El fluido extracelular de las raíces está en contacto con el medio circundante, de manera tal que al crecer una planta en un medio líquido, es posible recuperar de éste las proteínas secretadas por el tejido radicular. Se probó entonces, la capacidad para rizosecretar hEGF de la planta 319, transformada con el plásmido p35(L)APEGF, que es la que mostró los mayores niveles de expresión de hEGF. Como controles se utilizaron plantas no transformadas y la planta 124 transformada con la versión citoplasmática p35(L)EGF. Cuatro clones de cada planta propagados *in vitro*, se cultivaron en un medio hidropónico, utilizando un sistema de inmersión temporal. Se tomaron muestras a las 24 horas y a los 5, 15, 24 y 31 días de establecido el sistema y se cuantificaron los valores de hEGF mediante la técnica de ELISA.

En tanto que no se detectó hEGF en ninguno de los controles; en la planta 319 los niveles de expresión de la proteína recombinante aumentaron con el tiempo de cultivo, alcanzando un máximo de 0,025 % del total de las proteínas presentes en el medio (35 ng de hEGF por ml de medio) a los 31 días de iniciado el cultivo. Este ensayo permitió evaluar en forma preliminar la posibilidad de utilizar un sistema hidropónico para la producción de hEGF. Además se pudo verificar que el péptido señal de AP24 está dirigiendo hEGF a la vía de secreción en esta planta (Figura 3.1).



Tiempo (días)	% PT	DS
1	0,003	0,0006
5	0,006	0,0010
15	0,008	0,0004
24	0,020	0,0010
31	0,025	0,0010

Figura 3.1. Rizo-secreción de hEGF. Se grafican los valores de hEGF cuantificados a lo largo del tiempo como porcentaje del total de las proteínas presentes en el medio hidropónico (%PT). Las barras representan el desvío estándar (DS) de dos mediciones independientes.

3.1.2 Ensayo de root blot

La secreción de hEGF se comprobó en un segundo ensayo en el que las semillas de la planta 319 se germinaron sobre una membrana de nitrocelulosa, que luego se incubó con el anticuerpo anti-hEGF. El hEGF rizosecretado se acumuló en el entorno de la raíz, de manera tal que el anticuerpo reveló la impronta dejada por el crecimiento de la misma. El hEGF secretado se distribuyó uniformemente a lo largo de la raíz, sin que se observen zonas con grandes diferencias de producción (Figura 3.2).

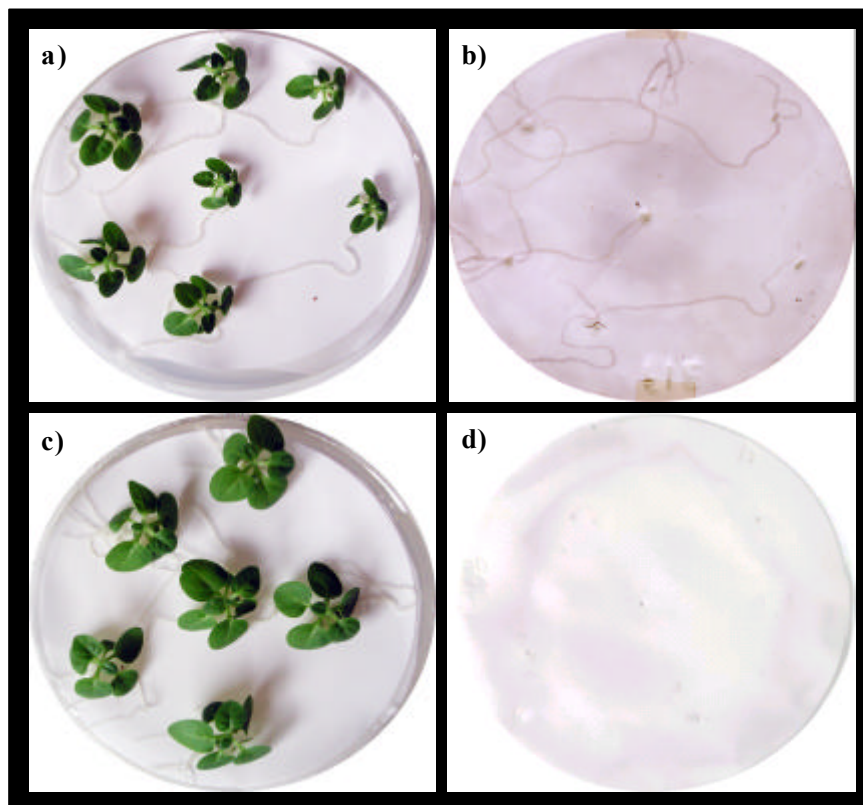


Figura 3.2. *Ensayo de root blot.* Se germinaron semillas de la planta 319, transformada con el vector p35(L)APEGF (a) y de la planta 408, transformada con el vector citoplasmático p35EGF (c) sobre una membrana de nitrocelulosa. Entre 15 y 20 días luego de la germinación, se quitaron las plantas y las membranas se revelaron con un anticuerpo monoclonal anti-hEGF. b y d) Membranas sobre las que crecieron las plantas 319 y 408 de las figuras a y c respectivamente. Se pueden observar las improntas de hEGF reveladas exactamente donde crecían las raíces de la planta 319.

3.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE hEGF A PARTIR DEL TEJIDO VEGETAL

La extracción de hEGF del tejido vegetal se realizó utilizando un protocolo para la purificación de péptidos pequeños a partir de las glándulas submaxilares de ratón (Roberts *et al.*, 1980). Este proceso se basa en la extracción del tejido en medio ácido (pH 1), en el que hEGF se mantiene estable. La extracción se realizó a partir de hojas de

las plantas 208 y 319 que fueron las que mostraron los mayores niveles de expresión de hEGF de las versiones apoplásticas fusionadas (208, p35AP_LEGF) y no fusionadas (319, p35(L)APEGF) a los primeros 17 aminoácidos de la proteína AP24 madura y de hojas de *N. benthamiana* infectadas con el vector viral apoplástico, PVXAPEGF. El tejido vegetal se extrajo con una solución de etanol y ácido clorhídrico. Las proteínas totales se precipitaron con etanol-éter y se resuspendieron en ácido acético. Una alícuota de esta extracción se separó y se llevó a pH 6 y el resto se dializó contra *buffer* PBS. Para cada uno de estos pasos se cuantificaron las proteínas totales y los niveles de hEGF. Como se observa en la figura 3.3 los rendimientos de la purificación luego del paso de diálisis final variaron entre el 11% y el 20%, mientras que el hEGF se logró purificar entre 4 y 15 veces respecto del total de las proteínas presentes en el tejido al inicio de la extracción.

Estos resultados muestran que el hEGF puede purificarse parcialmente a partir de las hojas de tabaco siguiendo un protocolo simple y sugieren que el mismo puede optimizarse para conseguir mejores rendimientos.

	Volumen (ml)	Proteínas totales (mg)	hEGF total (mg)	% TPS	Factor de purificación	Rendimiento (%)
319						
1	180	855	0,969	0,11	1	100
2	30	63	0,333	0,53	4,8	34
3	30	24	0,189	0,78	7,1	19,5
208						
1	60	321	0,223	0,07	1	100
2	5	24	0,030	0,12	1,7	13
3	5	9,8	0,025	0,25	3,6	11
VV						
1	50	384	0,320	0,08	1	100
2	15	ND	ND	ND	ND	ND
3	15	5,1	0,063	1,2	15	20

Figura 3.3. Purificación de hEGF por el método de extracción etanol-ácida. Se cuantificaron los niveles de hEGF en tres etapas de la purificación etanol-ácida. Paso 1: Extracto crudo procesado en *buffer* etanol-ácido clorhídrico. Los valores se estiman a partir de las cuantificaciones hechas sobre las hojas antes de la extracción. Paso 2: Extracto previo a la diálisis llevado a pH 6. Paso 3: Extracto dializado. El factor de purificación se calculó como la actividad específica de hEGF (porcentaje de las proteínas totales solubles) en el paso n, respecto del paso 1. El rendimiento se estimó como el hEGF total del paso n respecto del hEGF total inicial por 100. VV: extractos de las plantas infectadas con el PVXAPEGF. 208 y 319: extractos de las plantas 208 y 319, respectivamente. ND: no determinado.

3.3 ENSAYOS DE *WESTERN BLOT* PARA hEGF

Los extractos proteicos dializados de las plantas transgénicas 208 y 319, así como de controles sin transformar y de plantas infectadas con el virus PVX y el vector viral PVXAPEGF se separaron en geles de poliacrilamida y se analizaron por *Western blot*, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-hEGF. Tanto en los extractos de las plantas transgénicas como de las plantas infectadas con el vector viral se reveló la presencia de bandas específicas que no están presentes en las plantas control y de las cuales la de mayor intensidad muestra un peso molecular superior al control del hEGF comercial (Figura 3.4). Aunque esta banda podría corresponder a la fusión del péptido señal de AP24 a hEGF, esto no concuerda para lo observado para los extractos de la planta 319 y las plantas infectadas con el vector viral. Si el péptido señal fuera procesado correctamente, el tamaño del hEGF expresado en la planta 319 y en la planta infectada con PVXAPEGF debería ser el mismo (6,2 KDa). Si en las plantas infectadas el péptido señal no fuera reconocido, hEGF quedaría fusionado además, a los 14 aminoácidos de la cápside (aproximadamente 1,5 KDa). Sin embargo, la banda superior parece tener el mismo peso en los dos casos (Figura 3.4).

Otra hipótesis es que la banda de mayor peso corresponde a la proteína madura y las inferiores a productos de degradación generados durante el proceso de extracción. Por otra parte, y aunque el hEGF nativo no posee potenciales sitios de N-glicosilación, ni sufre modificaciones postraduccionales distintas de la formación de los puentes disulfuro, no puede descartarse que el producto de mayor peso corresponda a alguna modificación postraducciona, de las múltiples presentes en plantas, incorporada durante el pasaje a través del RE y el aparato de Golgi (Gomord y Faye, 2004).

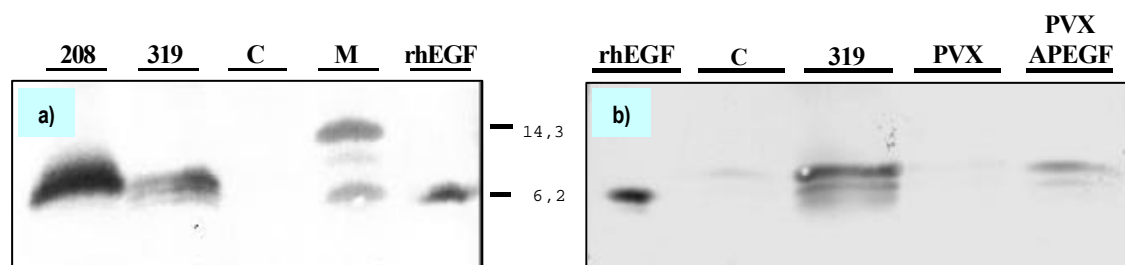


Figura 3.4 *Ensayo de Western blot.* a) Extractos dializados de las plantas 208 y 319, transformadas con las versiones apoplásticas p35AP_LEGF y p35(L)APEGF, respectivamente se separaron en un gel de poliacrilamida 16% en condiciones no reductoras y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. C: extracto de una planta control no transformada, rhEGF: 50 ng de hEGF comercial, M: marcador de peso

molecular. La presencia de hEGF se reveló con un anticuerpo monoclonal anti-hEGF. b) Extractos dializados de la planta 319 y de plantas infectadas con PVXAPEGF conteniendo 45 μg de proteínas totales se separaron en un gel de poliacrilamida en las mismas condiciones que en a). rhEGF: 20 ng de hEGF recombinante de origen comercial, C: Extracto de una planta control sin infectar. PVX: extracto de *N benthamiana* infectada con PVX. PVXAPEGF: extracto de *N benthamiana* infectada con PVXAPEGF.

3.4 ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La actividad biológica del hEGF expresado en plantas de tabaco se evaluó mediante dos ensayos distintos realizados en colaboración con el Dr. Leonardo Bussmann (ensayo de radioreceptor) y con el Lic. Mariano Lattanzi (ensayo de expansión de células del *cumulus*), en el Instituto de Investigaciones en Biología y Medicina Experimental, IByME - CONICET.

3.1.2 Ensayo de radioreceptor.

Las propiedades de unión a los receptores presentes en membranas de placenta humana del hEGF expresado en plantas se compararon con las del hEGF comercial. Distintas concentraciones de hEGF contenido en los extractos dializados de la planta 319 y de plantas de *N. benthamiana* infectadas con el vector viral PVXAPEGF así como hEGF comercial, se utilizaron para obtener las curvas de unión al receptor y calcular las K_d asociadas a las mismas. Los valores de K_d calculados fueron de $0,70 \pm 0,03$ nM y $0,69 \pm 0,07$ nM, para los extractos de la planta 319 y de las plantas infectadas con PVXAPEGF, respectivamente. Como los ensayos con ambos extractos se hicieron a distintos tiempos, se obtuvo una curva de unión control con hEGF comercial para cada uno de ellos. Los valores de K_d calculados para los controles fueron de $0,77 \pm 0,06$ nM y $0,73 \pm 0,13$ nM, para el ensayo con el extracto de la planta 319 y de las plantas infectadas con PVXAPEGF, respectivamente. Estos resultados indican que el hEGF expresado en plantas tiene una afinidad por los receptores de membranas de placenta similar a la observada para el hEGF de origen comercial (Figura 3.5).

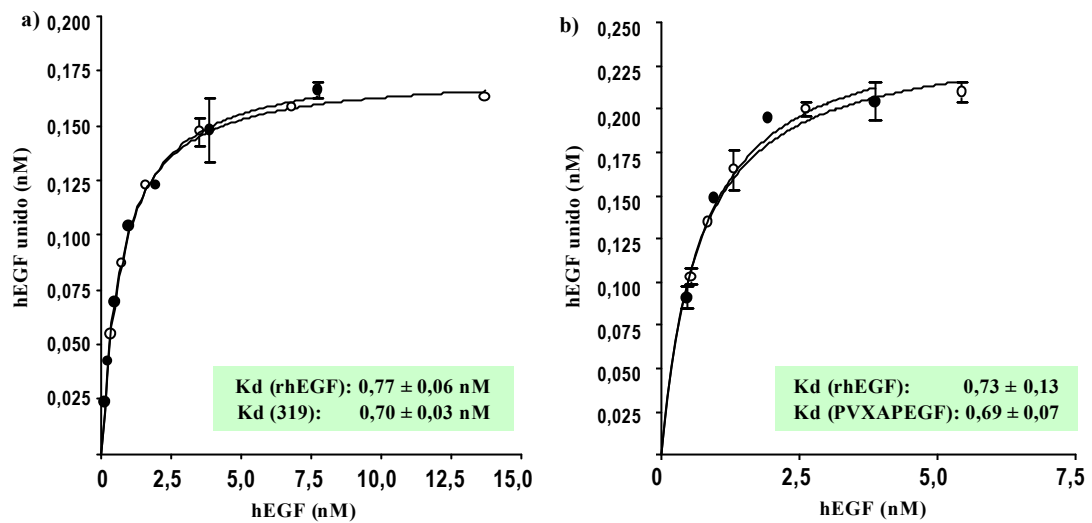


Figura 3.5. *Ensayo de radioreceptor.* Se muestran las curvas de saturación de los receptores de membrana de placenta humana para distintas concentraciones de hEGF comercial y del hEGF en los extractos dializados de la planta 319 y de plantas de *N. benthamiana* infectadas con el vector PVXAPEGF. a) hEGF comercial (○) y extracto de la planta 319 (●), b) hEGF comercial (○) y extracto de una planta infectada con PVXAPEGF (●). Las curvas se calcularon por regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism versión 3.02.

3.1.3 Ensayo de expansión de células del cumulus de ovocitos bovinos

Las células del *cumulus* que rodean a los ovocitos inmaduros, se expanden durante el proceso de maduración de la célula germinal en respuesta a distintos factores, entre ellos, hEGF. Este proceso puede visualizarse *in vitro* en ovocitos aislados incubados en un medio de maduración suplementado con estos factores. Se ensayó entonces la capacidad del hEGF expresado en tabaco de inducir la expansión *in vitro* de las células del *cumulus* de ovocitos bovinos aislados. Los ovocitos bovinos inmaduros se incubaron con extractos dializados de las plantas 208 y 319 y con extractos dializados de *N. benthamiana* infectadas con PVXAPEGF, conteniendo todos ellos, el equivalente a 10 ng/ml de hEGF cuantificado por ELISA. Mientras que en los ovocitos incubados con los extractos de una planta sin transformar o plantas infectadas con PVX, no se observó expansión, en todos los ovocitos incubados con los extractos de las plantas que expresan hEGF, hubo expansión de las células del *cumulus*, comparable a la observada en los controles incubados con 10 ng/ml del hEGF comercial o con 20 ng/ml de FSH, la hormona estimulante del folículo (Figura 3.6).

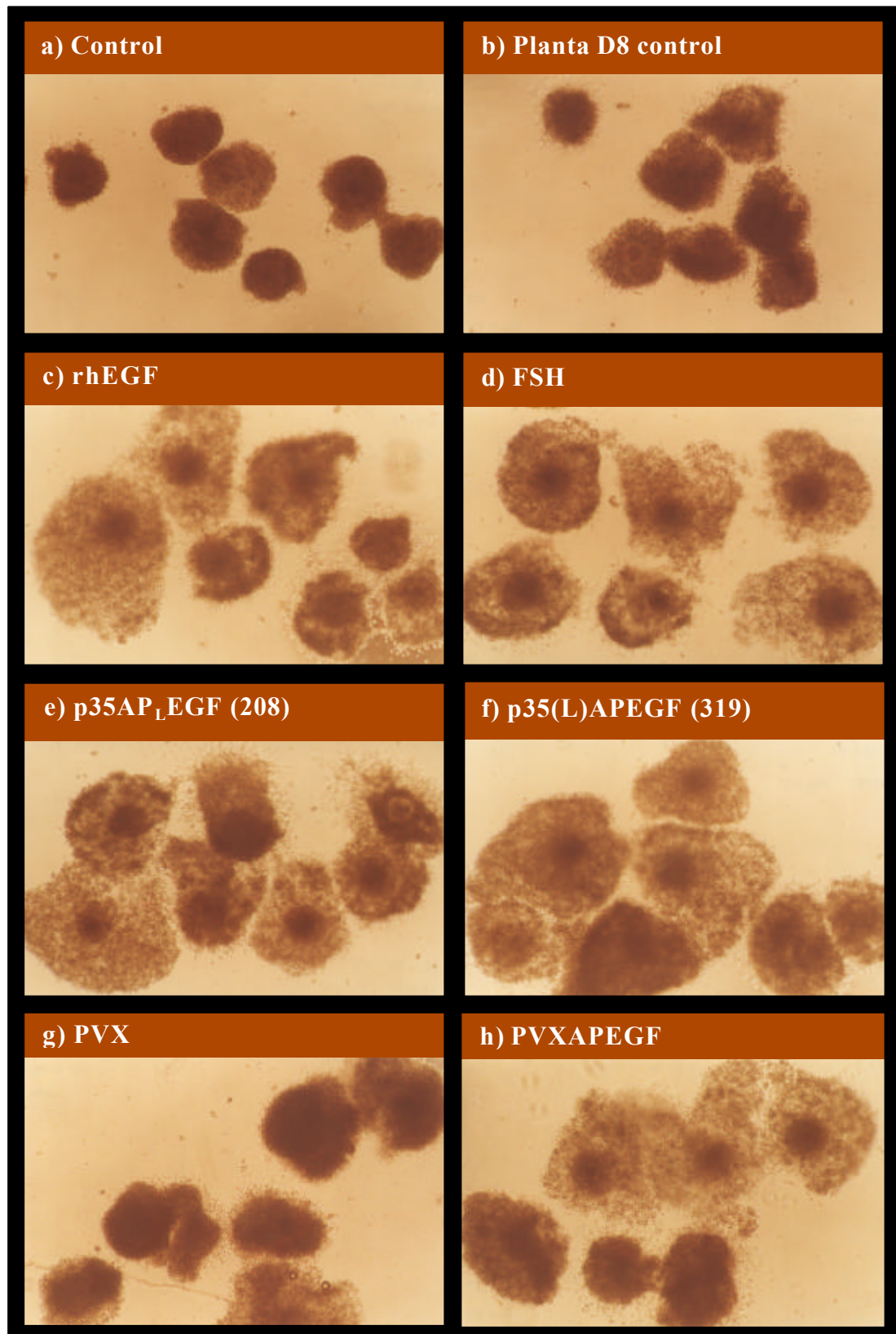


Figura 3.6. *Ensayo de expansión de células del cumulus.* Se ensayó la capacidad del hEGF extraído de plantas para inducir la expansión de células del *cumulus* de ovocitos bovinos. El medio de maduración de los ovocitos se suplementó con a) control sin agregados, b) extracto de una planta control no transformada, c) 10 ng/ml de hEGF comercial, d) 20 ng/ml de FSH, e) y f) extractos dializados de las

plantas 208 y 319 respectivamente, conteniendo el equivalente a 10 ng/ml de hEGF, g) extracto de una planta infectada con PVX h) el extracto dializado de plantas de infectadas con el vector viral apoplástico PVXAPEGF, conteniendo el equivalente a 10 ng/ml de hEGF.

Estos dos ensayos demuestran que el hEGF expresado en plantas de tabaco posee actividad biológica similar a la observada para el hEGF comercial, validando la posibilidad de utilizar de estas plantas como un potencial sistema de producción de hEGF.

4. EXPRESIÓN DE hEGF EN CLOROPLASTOS DE TABACO

Los resultados obtenidos en la primera etapa de este trabajo demostraron la posibilidad de expresar de hEGF utilizando dos sistemas de producción: vectores virales y plantas transgénicas. A pesar de que en ambos casos el producto obtenido posee actividad biológica comparable a la de la proteína de origen comercial, los niveles de expresión fueron relativamente bajos. Con el fin de incrementar estos valores se exploró la transformación de cloroplastos de tabaco. La elección de este sistema de expresión alternativo se realizó en base a trabajos publicados que muestran altos niveles de producción para diversas proteínas recombinantes (Birch-Machin *et al.*, 2004; Daniell *et al.*, 2004; De Cosa *et al.*, 2001; Fernández-San Millán *et al.*, 2003; Staub *et al.*, 2000; Tregoning *et al.*, 2003). Además, se había observado la formación de los puentes disulfuro en la somatotropina humana expresada en el estroma plastídico (Staub *et al.*, 2000), que es la única modificación postraduccional que sufre el hEGF maduro. Esto convertía a los cloroplastos en un sistema de expresión interesante para la producción de hEGF.

Como esta técnica no se encontraba establecida en el laboratorio y tampoco se disponía de los vectores de transformación, se decidió construir dos plásmidos para la puesta a punto de la transformación de cloroplastos de tabaco: pBSWGUS y su versión optimizada pBSWUTRGUS. Tanto la construcción de estos dos plásmidos como la puesta a punto de la transformación se realizó en forma conjunta con la Lic. María Eugenia Segretin.

4.1 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pBSWGUS.

Para la transformación de cloroplastos es necesaria la recombinación entre el ADN plastídico y secuencias homólogas que flanquean la construcción genética a introducir. La posición en el plastoma de estas secuencias determina entonces el sitio de integración y en principio, cualquier región no codificante puede utilizarse para este fin. En la construcción del plásmido pBSWGUS se eligió como sitio de integración la región intergénica contenida entre los genes del ARN ribosomal 16S y del ARN de transferencia para isoleucina (trnI) del operón de ARN ribosomales, ubicado en las regiones repetidas invertidas (RIA y RIB) del genoma plastídico de tabaco.

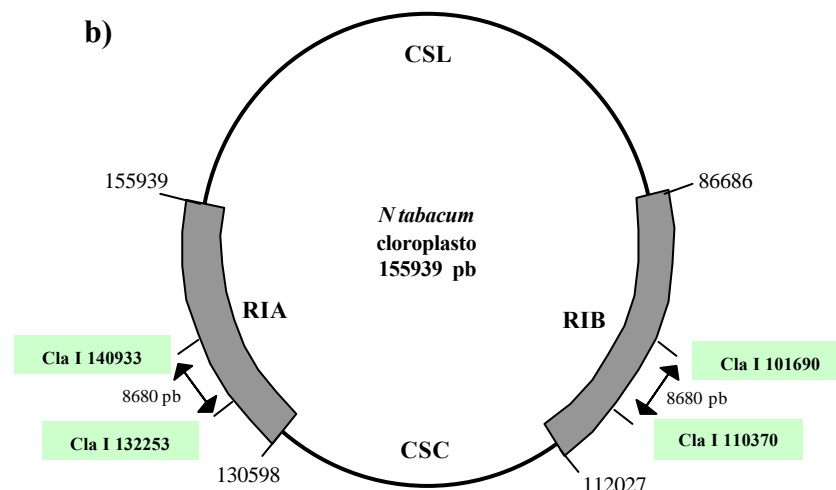
La construcción del plásmido pBSWGUS incluyó además el clonado de un promotor y un terminador plásticos así como de las secuencias codificantes de la enzima aminoglucósido 3' adeniltransferasa (*aadA*) y β -glucuronidasa (*uidA*) para su utilización como marcador de selección y reportero, respectivamente. El clonado de estas secuencias y la construcción final del plásmido pBSWGUS se detallan en las siguientes secciones.

4.1.1 Clonado de las secuencias flanqueantes

Existen en el plastoma de *N. tabacum* (número de acceso del genbank: NC_001879), 76 sitios de reconocimiento para la enzima Cla I. El corte con esta enzima, en las posiciones 101690 y 110370 de la región repetida invertida A y en los sitios correspondientes de la región B (140933 y 141145), determina dos fragmentos idénticos de 8680 pb que incluyen las secuencias del ARN ribosomal 16S, los ARN de transferencia para isoleucina y alanina (*trnI* y *trnA*) y el ARN ribosomal 23S completos (Figura 4.1).

a)

Sitios reconocidos por la enzima Cla I en el genoma plastídico de <i>N. tabacum</i>							
13013	17411	19345	20355	20509	21402	22353	24261
46431	49676	50893	53601	54295	55336	57175	60646
62424	62916	67166	68530	70262	71440	77860	78462
80655	85690	87772	88043	88537	89100	90172	91098
91404	93245	93902	93962	94453	99116	99469	99945
101478	101690	110370	111251	111942	119615	120906	125544
125769	125994	126124	127201	127460	128122	129665	130389
130425	130681	131372	132253	140933	141145	142678	143154
143507	148170	148661	148721	149378	151219	151525	152451
153523	154086	154580	154851				



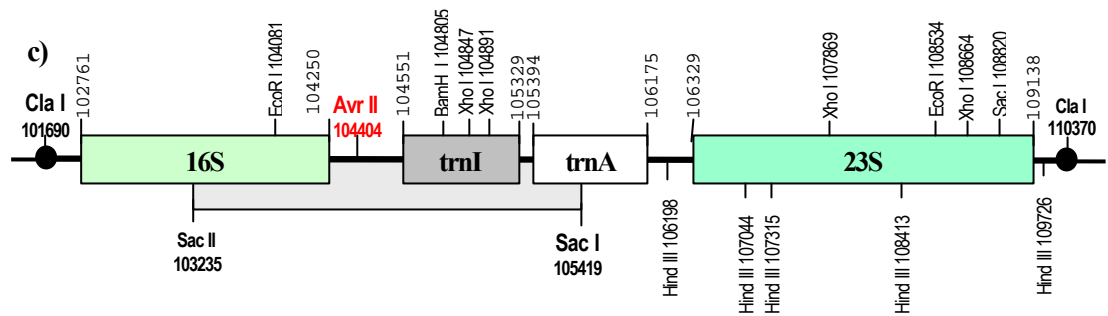


Figura 4.1 a) Posición de los 76 sitios reconocidos por la enzima Cla I en el genoma plásmido de tabaco. Los sitios sombreados corresponden a las posiciones que flanquean los genes 16S a 23S del operón de ARN ribosomales. b) Mapa del genoma plásmido donde se destacan las regiones repetidas A y B y dentro de ellas los fragmentos de 8680 pb delimitados por los sitios Cla I, que contienen al operón de genes ribosomales. CSL y CSC: regiones de copia simple larga y corta, respectivamente. c) Mapa del fragmento de 8680 pb. 16S y 23S: secuencia de los ARN ribosomales 16S y 23S, respectivamente. trnI y trnA: secuencia de los ARN de transferencia para isoleucina y alanina, respectivamente.

De los 76 fragmentos generados al cortar el ADN plásmido con Cla I, 19 son duplicaciones del mismo, es decir pertenecen a las regiones repetidas invertidas, sólo 6 tienen tamaños superiores a 5000 pb y ninguno de ellos menos de 1000 pb de diferencia con el fragmento de 8680 pb, lo que permite su sencilla identificación en un gel de agarosa (Figura 4.2). El ADN cortado con las enzimas Cla I y Nde I se incorporó como marcador interno de peso molecular. La enzima Nde I no corta dentro del fragmento de 8680 pb, pero reduce el tamaño de los fragmentos más cercanos y, aunque se superpone un fragmento de 8668 pb, la preparación es más limpia y permite confirmar la identidad del fragmento a purificar.

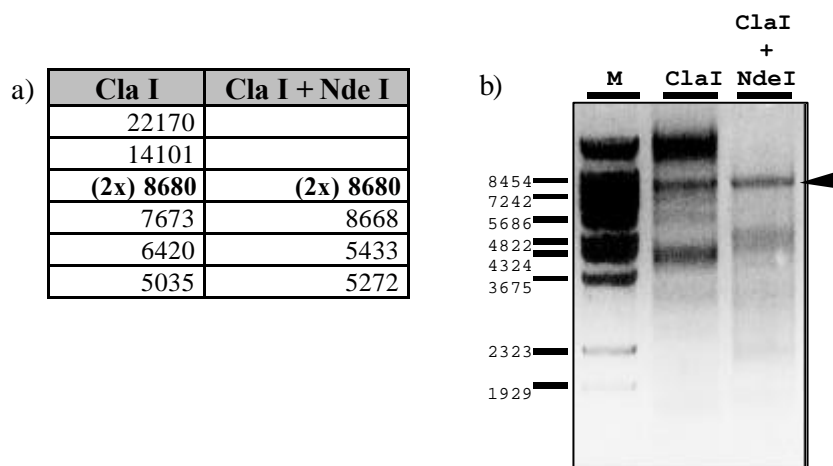


Figura 4.2. Corte del ADN plásmido de tabaco. a) Fragmentos esperados de peso molecular superior a 5000 pb al digerir el ADN plásmido de *N. tabacum* con Cla I o Cla I y Nde I. b) corte del ADN plásmido extraído de tabaco. La punta de flecha indica la posición del fragmento de 8680 pb al cortar con la enzima Cla I y la superposición de este mismo fragmento con el de 8668 pb al cortar con las enzimas Cla I y Nde I. M: marcador de peso molecular (λ BstE II, New England Biolabs).

El fragmento Cla I de 8680 pb se purificó y clonó en un vector pBlueScript para obtener el plásmido pBS16S-23S (Figura 4.3). La identidad del fragmento clonado se confirmó por mapeo de restricción y secuenciación.

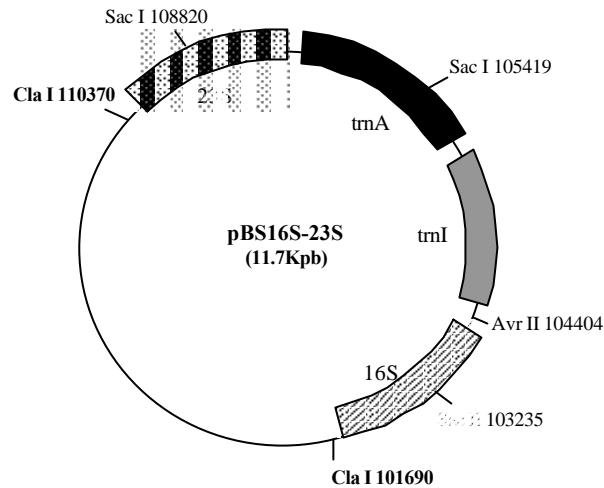


Figura 4.3. Estructura del plásmido intermediario pBS16S-23S. El fragmento que contiene las secuencias del ARN ribosomal 16S, los ARN de transferencia trnI y trnA y el ARN ribosomal 23S completas se clonó en el sitio Cla I del pBlueScript. Los números corresponden a las posiciones en el genoma plastídico de *N. tabacum*. Un mapa de restricción más detallado se muestra en la figura 4.1.

Para restringir el tamaño de las regiones flanqueantes a aproximadamente 1000 pb, se clonó la región contenida entre los sitios Sac I y Sac II del pBS16S-23S, que incluye parte del ARN ribosomal 16S, el trnI completo y una pequeña porción del trnA, en el vector pGEM-T-easy, para generar el plásmido pGEM16S-trnA, que se utilizó luego como base para el ensamblado final del plásmido pBSWGUS (Figura 4.4).

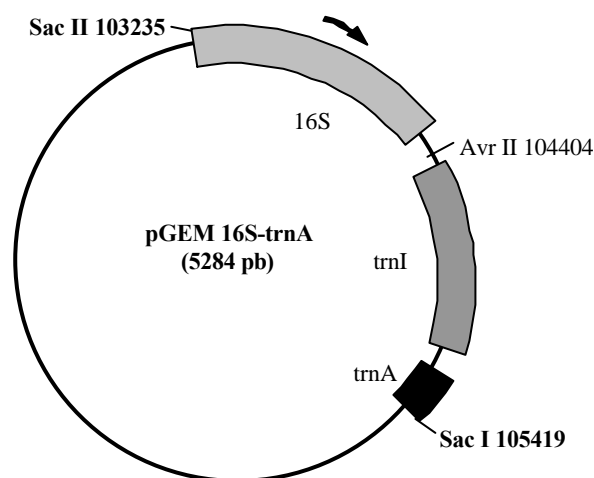


Figura 4.4 Mapa del plásmido intermediario pGEM16S-trnA. Los números corresponden a las posiciones en el genoma plastídico de *N. tabacum*.

4.1.2 Clonado del promotor *Prrn*

El promotor *Prrn*, del operón de genes de los ARN ribosomales plastídicos, se obtuvo por PCR a partir del ADN de cloroplastos de tabaco. Se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores *prn5* y *prn3*, que incorporan un sitio *Spe I* en la región 5' y un sitio *Sac II* en la región 3', respectivamente (Figura 4.5). El fragmento amplificado, que incluye los sitios de unión de las dos ARN polimerasas presentes en los cloroplastos, se clonó en el vector pZeRO-2 para obtener el plásmido pZeRO *Prrn* y su identidad se confirmó por secuenciación.

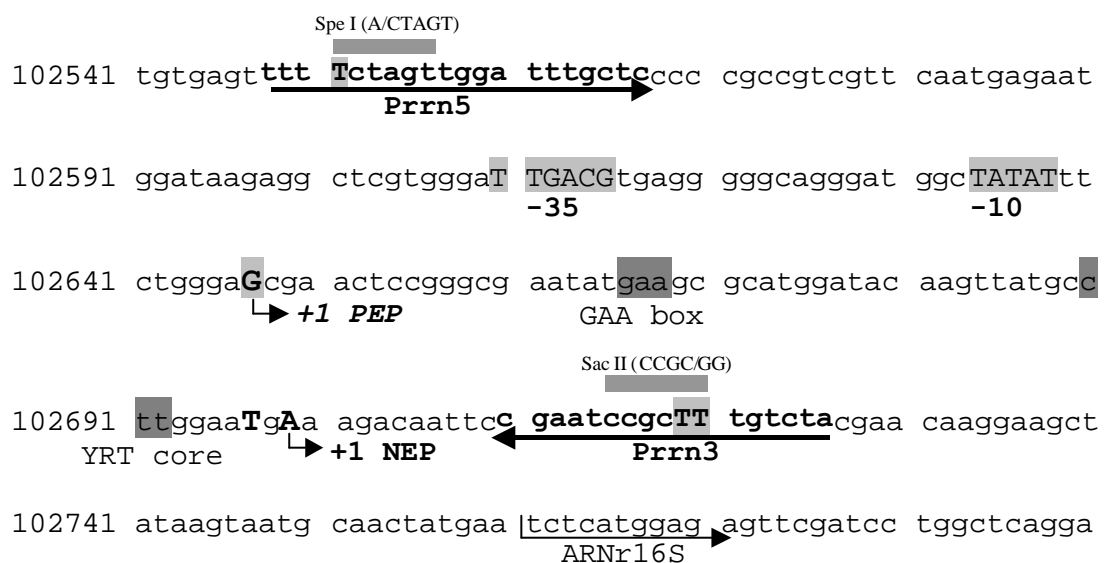


Figura 4.5 *Secuencia del promotor Prrn*. Se indican las zonas de hibridación de los oligonucleótidos *prn5* y *prn3*, y las bases mutadas para generar los sitios de restricción *Spe I* y *Sac II*. Las secuencias marcadas como -35 y -10 corresponden al consenso de reconocimiento de la ARN polimerasa de origen plastídico (PEP). Las secuencias *GAA box* e *YRT core* corresponden a las zonas consenso de reconocimiento de la polimerasa de origen nuclear (NEP). Se indican los sitios de inicio de la transcripción para cada polimerasa (+1 PEP y +1 NEP), así como el inicio del ARN ribosomal 16S. Los números corresponden a las posiciones en el genoma plastídico de *N. tabacum*.

4.1.3 Clonado de la secuencia *aadA*

La secuencia *aadA*, que codifica la enzima aminoglucósido 3' adeniltransferasa que otorga resistencia a los antibióticos espectinomicina y estreptomycin, se amplificó por PCR a partir del plásmido pPZP200. Se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores *aadA5* y *aadArev*, que incorporan un sitio *Sac II* en la región 5' y un sitio *BamH I* en la región 3', respectivamente. El *aadA5* incluye además la secuencia de unión al ribosoma

GGAGG en las posiciones – 14 a – 10 respecto del ATG inicial de *aadA*. El fragmento amplificado se clonó en el vector pZeRO-2 para obtener el plásmido pZeRO *aadA*.

4.1.4 Clonado del terminador *Trps16*

La secuencia del terminador del gen de la proteína ribosomal plastídica S16 (*Trps16*), se amplificó por PCR a partir del ADN de cloroplastos de tabaco. (Figura 4.6). Se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores *Trps165* y *Trps163* que incorporan un sitio *Xba* I en la región 5' y un sitio *Bam*H I en la región 3', respectivamente. El fragmento amplificado se clonó en el vector pZeRO-2 para obtener el plásmido pZeRO *Trps16* y su identidad se verificó por secuenciación.

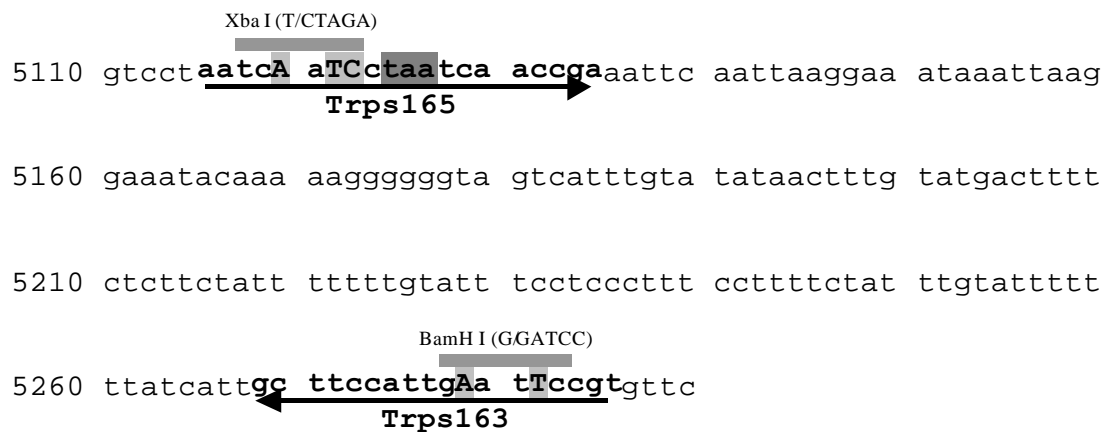


Figura 4.6. Secuencia del terminador *Trps16*. Se indican las zonas de hibridación de los oligonucleótidos *Trps165* y *Trps163* y las bases mutadas para generar los sitios de restricción *Xba* I y *Bam*H I. El triplete *taa* (sombreado), corresponde al codón de terminación de la traducción de la secuencia codificante de la proteína ribosomal S16 (*rps16*). Los números corresponden a las posiciones en el genoma plastídico de *N. tabacum*.

4.1.5 Clonado de la secuencia *uidA*

La secuencia *uidA*, que codifica la enzima bacteriana β -glucuronidasa (GUS), se obtuvo por amplificación a partir del plásmido pBI121 utilizando los oligonucleótidos iniciadores GUS5 y GUS3 que incorporan sitios *Sac* I en la región 5' y *Xba* I en la región 3' respectivamente. El oligonucleótido GUS5, incluye además un sitio *Nde* I y la secuencia de unión al ribosoma GGAGG, en las posiciones –15 a –11 respecto del ATG inicial de *uidA*. El fragmento amplificado se clonó en el vector pZeRO-2 para obtener el plásmido pZeRO GUS.

4.1.6 Ensamblado del plásmido pBSWGUS

El fragmento de ADN que contiene la secuencia *aadA*, obtenido del plásmido pZeRO *aadA* con las enzimas Sac I y Sac II, se clonó en el plásmido pZeRO Prrn para dar el plásmido pZeRO PA (Figura 4.7). Como el promotor Prrn es reconocido por la ADN polimerasa de *E. coli*, las colonias bacterianas transformadas con el pZeRO PA, se seleccionaron con los antibióticos espectinomicina y estreptomycinina para corroborar la funcionalidad del promotor Prrn y la secuencia *aadA*.

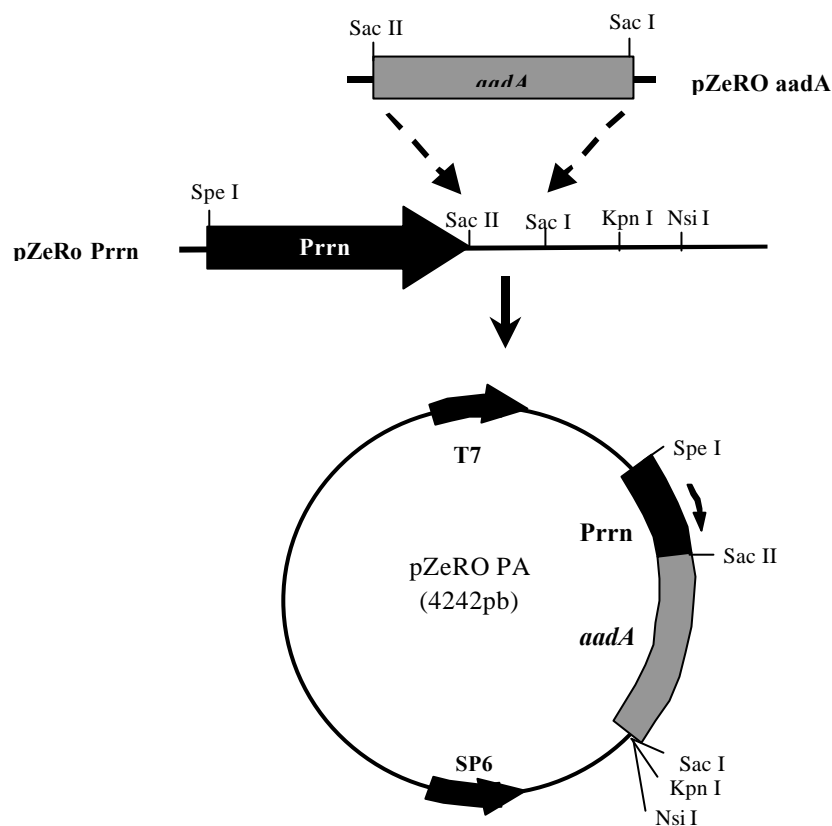


Figura 4.7. Construcción del plásmido intermediario pZeRO PA. La secuencia *aadA* se clonó en los sitios Sac I y Sac II del pZeRO Prrn para obtener el plásmido pZeRO PA. T7 y SP6: promotores de los fagos T7 y SP6, respectivamente. Por simplicidad sólo se muestran algunos de los sitios de restricción.

El plásmido intermediario pZeRO GT16 se construyó clonando el fragmento que contiene la secuencia *uidA*, obtenido del plásmido pZeRO GUS con las enzimas Sac I y Xba I, y el fragmento que incluye el Trps16, obtenido del plásmido pZeRO Trps16 con las enzimas Xba I y BamH I, en el plásmido pZeRO Prrn, previamente cortado con las enzimas Sac I y BamH I (Figura 4.8).

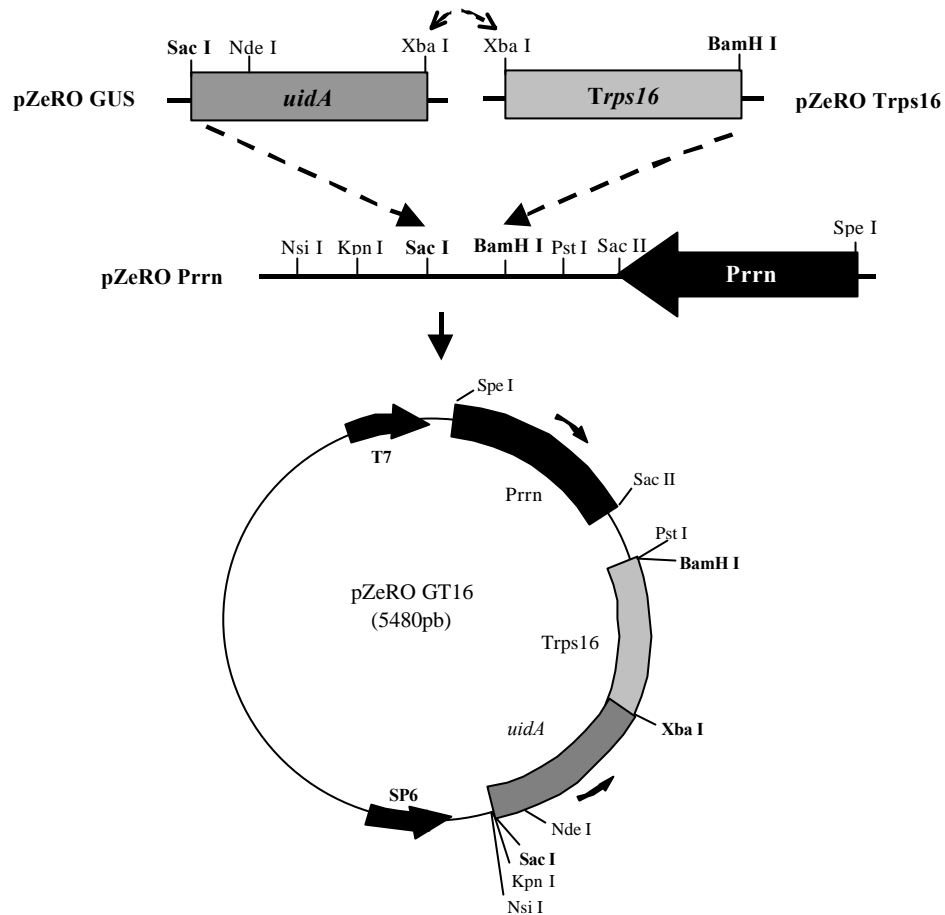


Figura 4.8 Construcción del plásmido intermediario pZeRO GT16. Las secuencias *uidA* y del terminador *Trps16* se clonaron en los sitios Sac I y BamH I del plásmido pZeRO Prnr para obtener el plásmido pZeRO GT16. T7 y SP6: promotores de los fagos T7 y SP6 respectivamente. Por simplicidad sólo se muestran algunos de los sitios de restricción.

El fragmento que contiene la secuencia *uidA* y el terminador *Trps16* se liberó del pZeRO GT16 con las enzimas Nsi I y Pst I y se clonó en el sitio Nsi I del plásmido pZeRO PA, para obtener el plásmido intermediario pZeRO BSW. La verificación de la identidad y orientación de los clones obtenidos se hizo por mapeo de restricción. El ensamblado final del plásmido de transformación de cloroplastos pBSWGUS se hizo clonando en el sitio Avr II del pGEM16S-trnA, el fragmento liberado del pZeRO BSW con la enzima Spe I. Este fragmento contiene las secuencias *aadA* y *uidA* formando una unidad transcripcional bajo el control del promotor Prnr y el terminador *Trps16*. En este plásmido, *uidA* puede reemplazarse por la secuencia de interés utilizando los sitios únicos de clonado Nde I en 5', que aporta el ATG inicial y Xba I en 3', que genera extremos compatibles con los producidos por las enzimas Nhe I, Spe I y Avr II, flexibilizando así las opciones de clonado (Figura 4.9).

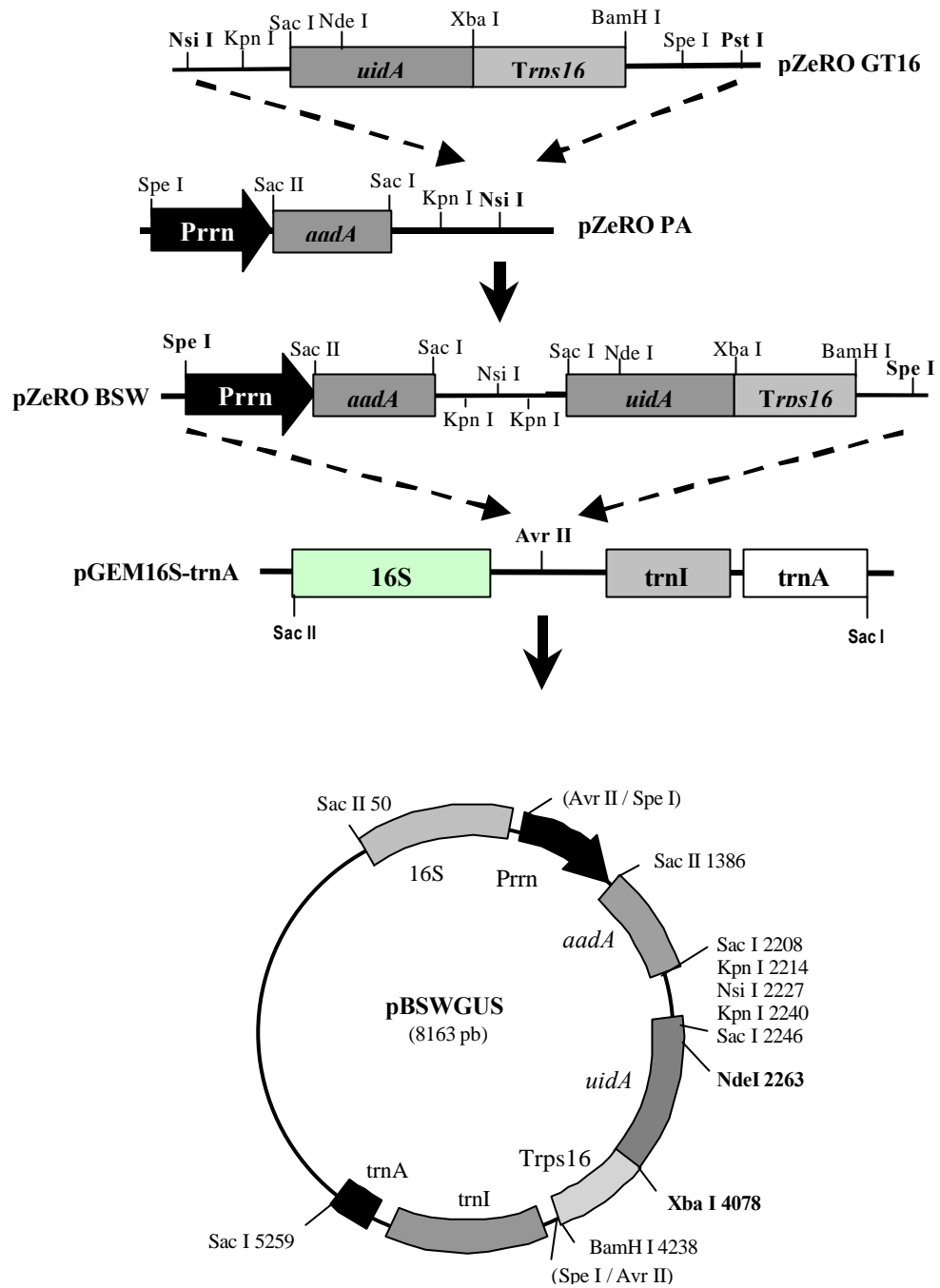


Figura 4.9. Ensamblado del plásmido *pBSWGUS*. La secuencia *uidA* y el terminador *Trps16* del pZeRO GT16 se clonaron en el sitio *Nsi* I del pZeRO PA, para obtener el plásmido intermediario pZeRO BSW. El operón conteniendo el promotor *Prn*, las secuencias *aadA* y *uidA* y el terminador *Trps16* se clonó en el sitio *Avr* II del pGEM16S-trnA para obtener el plásmido de transformación de cloroplastos pBSWGUS. Por simplicidad sólo se muestran algunos de los sitios de restricción. Las posiciones en el pBSWGUS están indicadas respecto al sitio *Sac* II del sitio múltiple de clonado del pGEM-T-easy, plásmido base del pGEM16S-trnA.

4.2 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PBSWUTRGUS

Utilizando como base el plásmido pBSWGUS, se construyó una versión mejorada del mismo, en la que se incorporó entre las secuencias *aadA* y *uidA* la secuencia 5' no traducida del gen plástidico *psbA* (5'UTR). Esta secuencia incluye el promotor del gen *psbA* y secuencias que son reconocidas por proteínas efectoras que regulan la transcripción y traducción. Estas incluyen una horquilla en la región 5', que actúa estabilizando el ARNm (Zou *et al.*, 2003), y las secuencias AU box, RBS1 y RBS2, que funcionan en forma coordinada incrementando la tasa de traducción (Eibl *et al.*, 1999; Hirose y Sugiura, 1996, Figura 4.10). El fragmento que contiene esta secuencia 5'UTR, se amplificó por PCR a partir del ADN de cloroplastos de tabaco utilizando los oligonucleótidos iniciadores UpsbA5 y UpsbA3, que incorporan un sitio Kpn I en la región 5' y un sitio Nde I en la región 3', respectivamente. El producto amplificado se clonó en el vector pZeRO-2 para obtener el plásmido pZeRO 5UTR y su identidad se verificó por secuenciación.

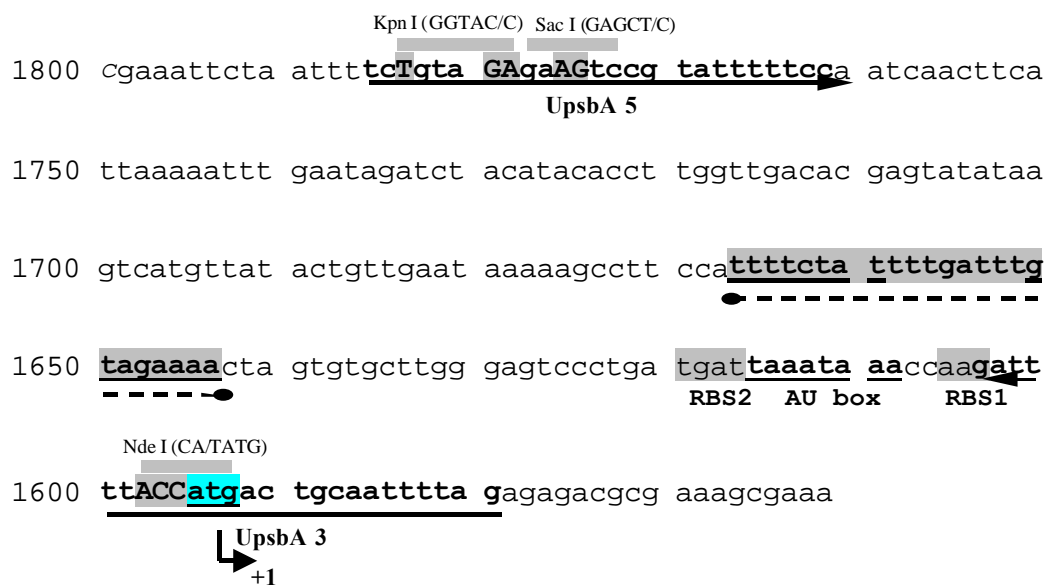


Figura 4.10. Secuencia 5'UTR del gen *psbA*. Se indican los sitios de unión al ribosoma (RBS1, RBS2, sombreados) y la secuencia AU box (subrayada). La horquilla estabilizadora del ARNm se forma en la región indicada por la línea punteada. Los números corresponden a las posiciones en el genoma plástidico de tabaco.

El plásmido pBSWUTRGUS se ensambló clonando la secuencia 5'UTR, obtenida del pZeRO 5UTR, en los sitios Kpn I y Nde I del plásmido pBSWGUS (Figura 4.11).

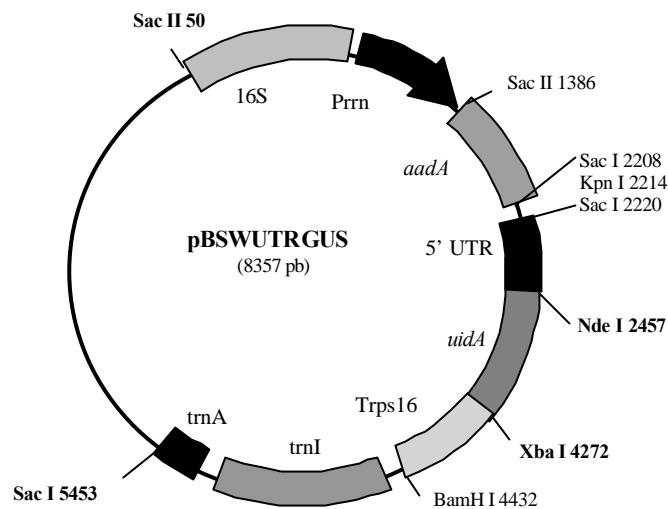
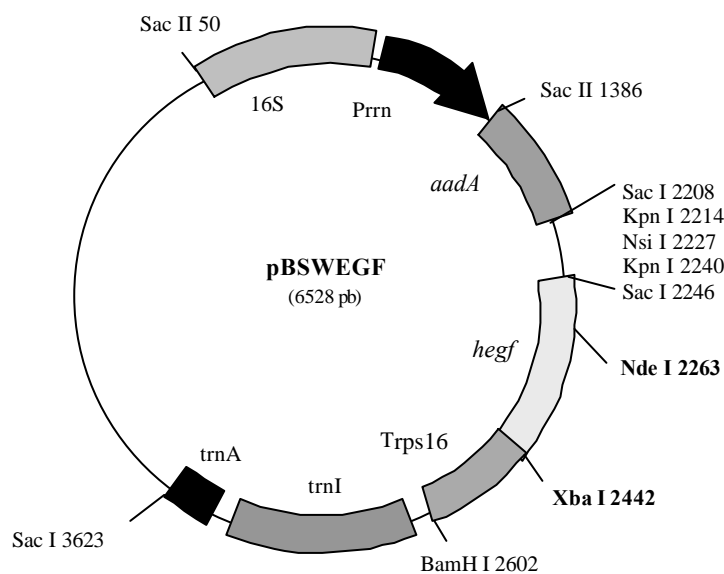


Figura 4.11 Mapa del plásmido *pBSWUTRGUS*. El plásmido de transformación de cloroplastos *pBSWUTRGUS*, se ensambló clonando la secuencia 5'UTR en los sitios Kpn I y Nde I del *pBSWGUS*. Los números indican las posiciones respecto del sitio de clonado múltiple del *pGEM-T-easy*.

4.3 CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS *pBSWEGF* Y *pBSWUTREGF*

A fin de evaluar la expresión de *hegf* en los cloroplastos de tabaco se construyeron los plásmidos *pBSWEGF* y *pBSWUTREGF* reemplazando la secuencia *uidA* por *hegf* en los sitios Nde I y Xba I, de los plásmidos *pBSWGUS* y *pBSWUTRGUS*, respectivamente (Figura 4.12).



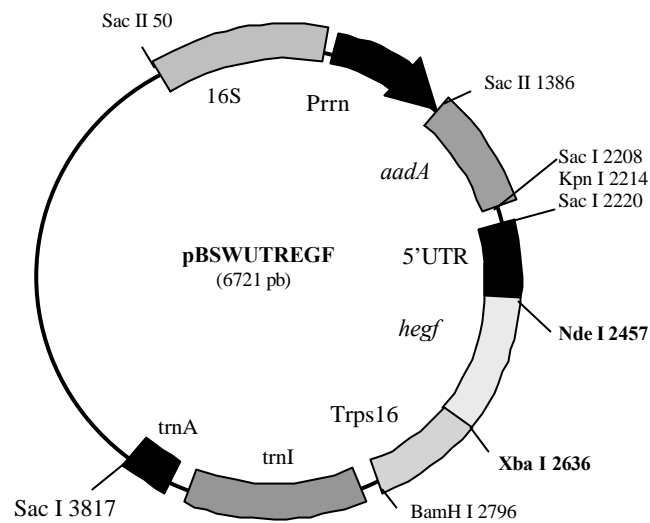


Figura 4.12. Estructura de los plásmidos *pBSWEGF* y *pBSWUTREGF*. Los plásmidos *pBSWEGF* y *pBSWUTREGF* se obtuvieron reemplazando la secuencia *uidA* por *hegf* en los sitios Nde I y Xba I de los plásmidos *pBSWGUS* y *pBSWUTRGUS*, respectivamente. Los sitios de restricción se numeran de acuerdo a la posición de Sac II en el sitio de clonado múltiple del pGEM-T-easy.

Los vectores *pBSWEGF* y *pBSWUTREGF* se utilizaron para transformar cloroplastos de *N. tabacum* cv Petit Havana por biobalística. Aunque, como se verá más adelante, las plantas transplastómicas obtenidas con ambos vectores expresan los ARN mensajeros para hEGF, los primeros intentos para detectar la proteína recombinante fueron infructuosos. Como la regulación de la expresión en cloroplastos se produce principalmente a nivel traduccional y postraduccional, se consideraron dos hipótesis para explicar la ausencia de la expresión de hEGF. Primero, que el extremo 5' de *hegf* podría estar adquiriendo una conformación tal que inhiba el acceso del ribosoma al codón de iniciación y segundo, que hEGF sería sintetizado para luego ser degradado por la acción de proteasas plastídicas. Por ello se diseñaron dos nuevas construcciones en las que *hegf* se fusionó a una secuencia que codifica un tracto de seis histidinas (*pBSWHISE*) o a los primeros 558 nucleótidos de la secuencia *uidA*, que codifican los primeros 186 aminoácidos de GUS (*pBSWGEKE*).

La fusión al tracto de histidinas se hizo sobre la base de la observación de que en plantas transplastómicas transformadas con dos construcciones distintas, en las que la proteína GRA4 de *T. gondii* se sintetizaba fusionada o no a este tracto de histidinas, sólo se detectó la expresión de la fusión (Estos resultados se detallan en el anexo B).

La región 5' de *uidA* se eligió porque en las plantas transformadas con el plásmido pBSWUTRGUS se observó una alta expresión de GUS. Estas plantas fueron caracterizadas por la Lic. María Eugenia Segretin y forman parte de su proyecto de Tesis Doctoral.

4.4 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pBSWHISE

La secuencia HISXa que codifica un tracto de seis histidinas y el tetrapéptido IDGR se sintetizó mediante amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos HIS5 y HIS3 que se superponen parcialmente y que incorporan un sitio Nde I, junto con el ATG inicial, en el extremo 5' y un sitio Stu I en el extremo 3', respectivamente. El péptido IDGR (isoleucina, ácido aspártico, glicina y arginina) es reconocido por el factor Xa, una proteasa que corta la unión peptídica formada entre el grupo carboxilo del aminoácido R y el grupo amino del aminoácido siguiente (posición +1 respecto al sitio de corte), cualquiera sea este (FIGURA 4.13).

El producto de amplificación se purificó y clonó en el vector pZeRO-2 para generar el vector pZeROHIS. La identidad del fragmento clonado se verificó por secuenciación.

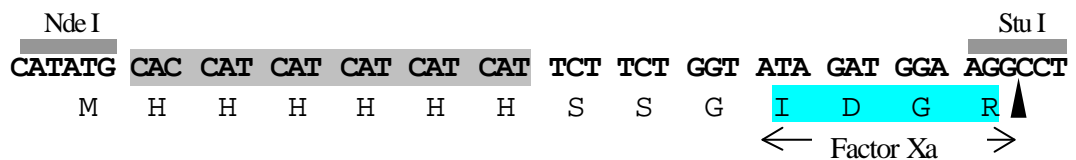


Figura 4.13. *Secuencia HISXa.* Se muestra la secuencia sintetizada (línea superior) y el péptido codificado (línea inferior), destacándose el tracto de seis histidinas y la secuencia de reconocimiento del factor Xa. La punta de flecha indica el sitio de corte del factor Xa en la secuencia peptídica y de la enzima Stu I en la secuencia nucleotídica.

La secuencia *hegf* se liberó del pGEMAPEGF por corte secuencial con EcoR I, seguido del rellenado del extremo 5' para generar un extremo romo y Sma I, y se fusionó a la secuencia HISXa en el sitio Stu I del pZeROHIS, para obtener el plásmido pZeROHISE (fusión HISXa-*hegf*). De esta manera, luego del sitio de corte del factor Xa, hEGF se inicia con el residuo N (asparagina), primer aminoácido del péptido maduro. En los clones que poseían el inserto en la orientación correcta, la fusión HISXa-*hegf* se confirmó por secuenciación (Figura 4.14).

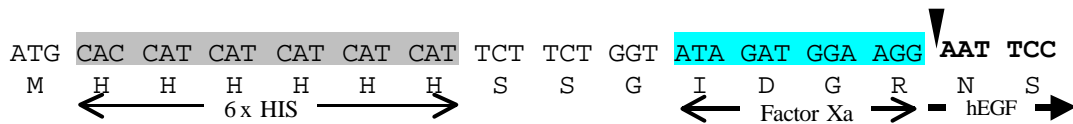
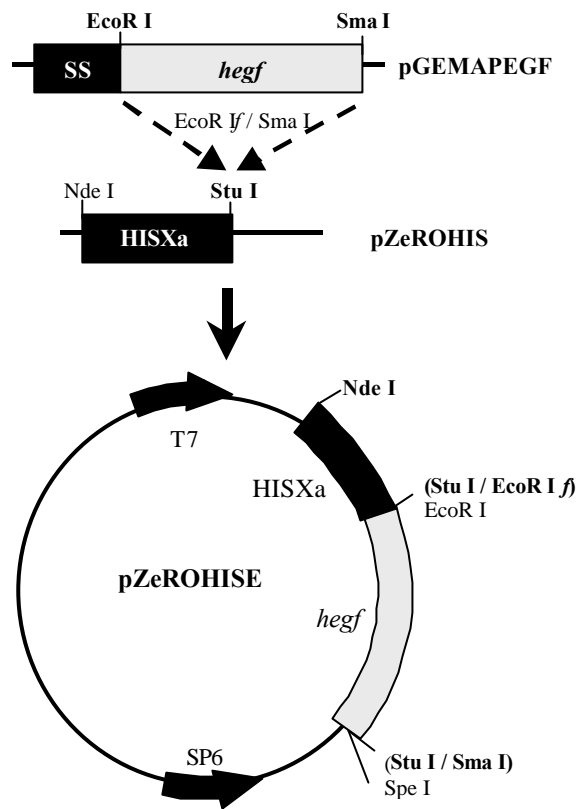


Figura 4.14 Construcción del plásmido *pZeROHISE*. La secuencia *hegf*, obtenida del plásmido *pGEMAPEGF*, se clonó en el *pZeROHIS* cortado con la enzima *Stu I* para dar el plásmido intermediario *pZeROHISE*. Se muestra la secuencia la fusión *HISXa-hegf* y su traducción a partir del ATG inicial de *HISXa*. La flecha indica el sitio de corte del factor Xa. El sitio *EcoR I* se regenera a partir de la fusión del extremo romo con *Stu I*.

El plásmido *pBSWHISE* se ensambló reemplazando la secuencia *uidA* por la fusión *HISXa-hegf* obtenida del *pZeROHISE* con las enzimas *Nde I* y *Spe I* en los sitios *Nde I* y *Xba I* del *pBSWUTRGUS* (Figura 4.15).

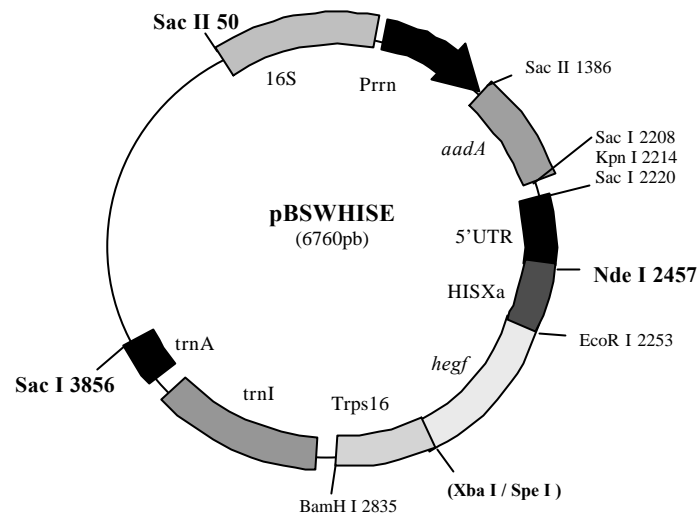


Figura 4.15. Mapa del plásmido *pBSWHISE*. La fusión *HISXa-hegf* se clonó en los sitios *Nde I* y *Xba I* del vector *pBSWUTRGUS* reemplazando al gen *uidA*. Los números indican las posiciones respecto del sitio *Sac II* en el sitio de clonado múltiple del *pGEM-T-easy*. Por simplicidad sólo se muestran algunos de los sitios de restricción

4.5 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO *pBSWGEKE*

La secuencia *hegf* se amplificó por PCR a partir del plásmido *pET EGF*, utilizando los oligonucleótidos iniciadores *ENKEGF* y *EGF3*. El oligonucleótido *ENKEGF* incorpora un sitio *EcoR V* en el extremo 5' y entre este y el *ATG* inicial de *hegf*, la secuencia codificante del pentapéptido *DDDDK* (*EK*), reconocido por la enzima enterokinasa. El fragmento amplificado (*EK-hegf*), se clonó en el vector *pZeRO-2*, para obtener el plásmido *pZeROEK*.

El plásmido *pZeROGEKE* se construyó clonando la fusión *EK-hegf* obtenida del *pZeROEK* con las enzimas *EcoR V* y *Xho I*, en el plásmido *pZeROGUS* cortado con estas mismas enzimas. De esta forma quedan fusionadas en marco de lectura continuo, las primeras 558 pb de la secuencia *uidA* (*uidA* 5'), la secuencia reconocida por la enterokinasa (*EK*) y el gen *hegf* (fusión *GEKE*). La fusión *GEKE* completa fue corroborada por secuenciación (Figura 4.16).

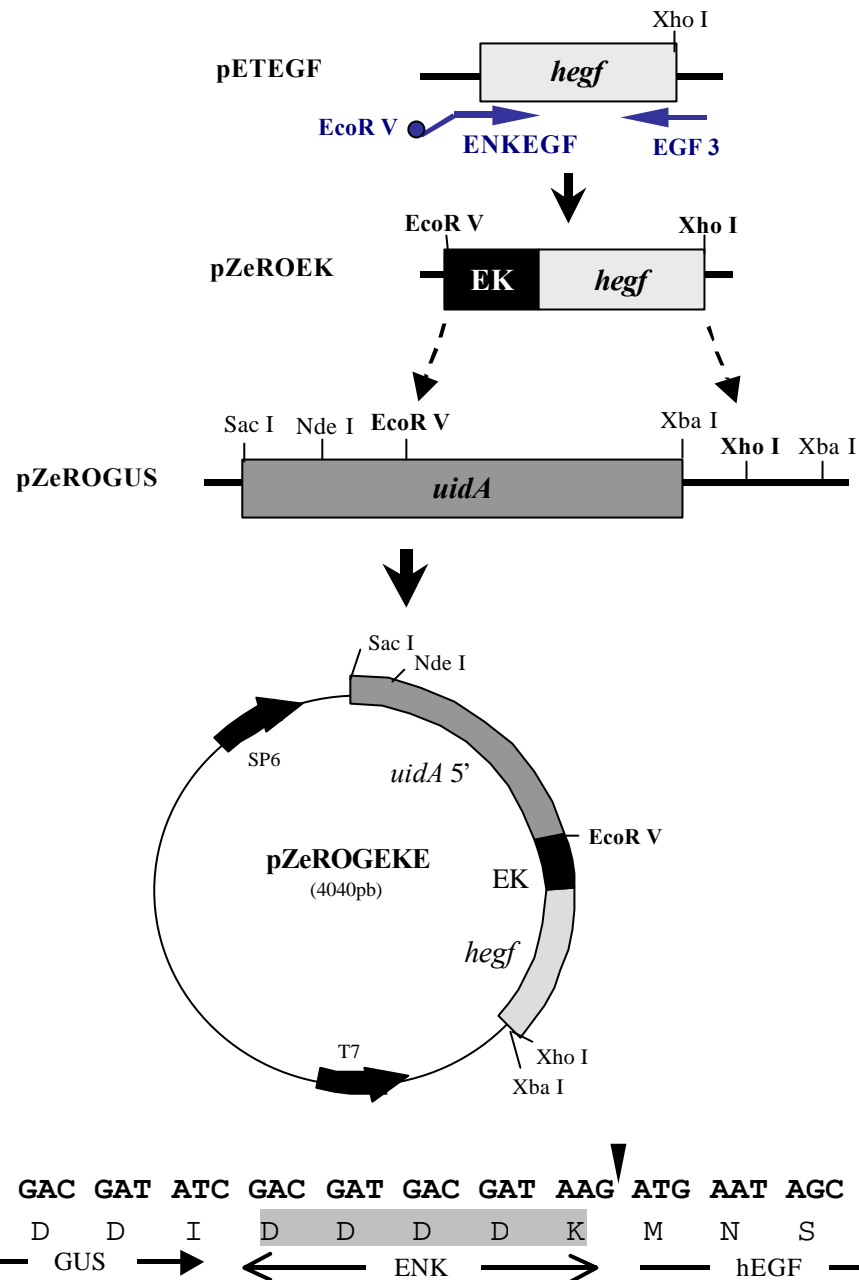


Figura 4.16. Construcción del plásmido pZeROGEKE. La fusión EK-hegf obtenida del pZeROEK se clonó en los sitios EcoR V y Xho I del pZeROGUS reemplazando al extremo 3' de uidA, para obtener el plásmido pZeROGEKE. Se muestran la secuencia nucleotídica y aminoacídica, de la región de la fusión GEKE que comprende el péptido reconocido por la enterokinasa. Por simplicidad sólo se muestran algunos de los sitios de restricción.

El plásmido pBSWGEKE se obtuvo clonando la fusión GEKE completa en los sitios Nde I y Xba I del plásmido pBSWUTRGUS reemplazando al gen uidA (Figura 4.17).

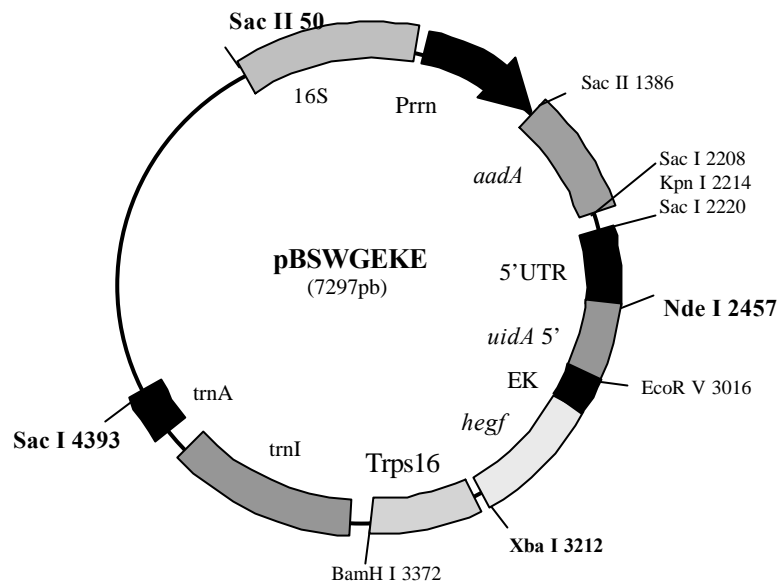


Figura 4.17 Mapa del plásmido *pBSWGEKE*. La fusión GEKE obtenida del *pZeROGEKE* se clonó en los sitios Nde I y Xba I del *pBSWUTRGUS* reemplazando la secuencia *uidA* completa. Los números indican las posiciones respecto al sitio de clonado múltiple del *pGEM-T-easy*.

4.6 CHEQUEO PREVIO DE LAS CONSTRUCCIONES EN *E. COLI*

El promotor Prn posee sitios de reconocimiento para las dos ARN polimerasas presentes en los cloroplastos. De éstas, la ARN polimerasa codificada por el genoma plástido (PEP), es de tipo bacteriano y sus sitios de unión al promotor son reconocidos por la ARN polimerasa de *E. coli*. Aunque no puede utilizarse como una estimación de lo que sucederá en la planta, la expresión de la proteína recombinante en bacterias permite verificar la integridad de las construcciones diseñadas. Los niveles de expresión de hEGF en extractos sonicados de *E. coli*, transformadas con cada uno de los plásmidos descritos y en controles transformados con el *pBSWUTRGUS* se cuantificaron en un ensayo de ELISA. Mientras que en los extractos bacterianos transformados con el *pBSWEGF* no se detectó expresión de hEGF, en los extractos de bacterias transformadas con los plásmidos *pBSWUTREGF*, *pBSWHISE* y *pBSWGEKE* los niveles de expresión de hEGF fueron de 0,005, 0,004 y 0,006 % TPS, respectivamente (Figura 4.18).

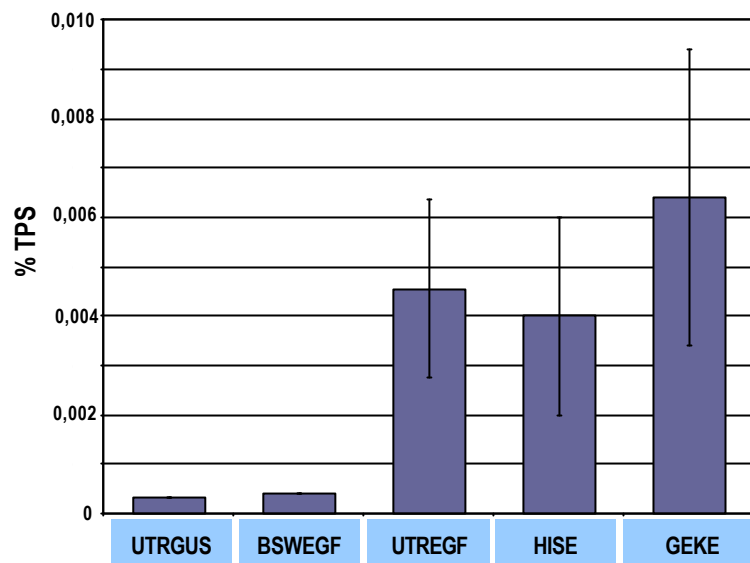


Figura 4.18. Niveles de expresión de hEGF en *E. coli*. Los niveles de expresión de hEGF en extractos sonicados de *E. coli*, transformadas con los plásmidos pBSWUTRGUS (UTRGUS), pBSWEGF (BSWEGF), pBSWUTREGF (UTREGF), pBSWHISE (HISE) y pBSWGEKE (GEKE), se cuantificaron mediante un ensayo de ELISA. Se grafica el promedio de al menos tres mediciones como porcentaje de hEGF respecto de las proteínas totales del extracto. Las barras de error representan el desvío estándar de la muestra.

Los mismos extractos se analizaron en ensayos de *Western blot* revelando la presencia de hEGF o las fusiones (Figura 4.19).

En ambos casos se demuestra que los plásmidos pBSWUTREGF, pBSWHISE y pBSWGEKE son capaces de dirigir la expresión de hEGF o de las fusiones HISE y GEKE en *E. coli*.

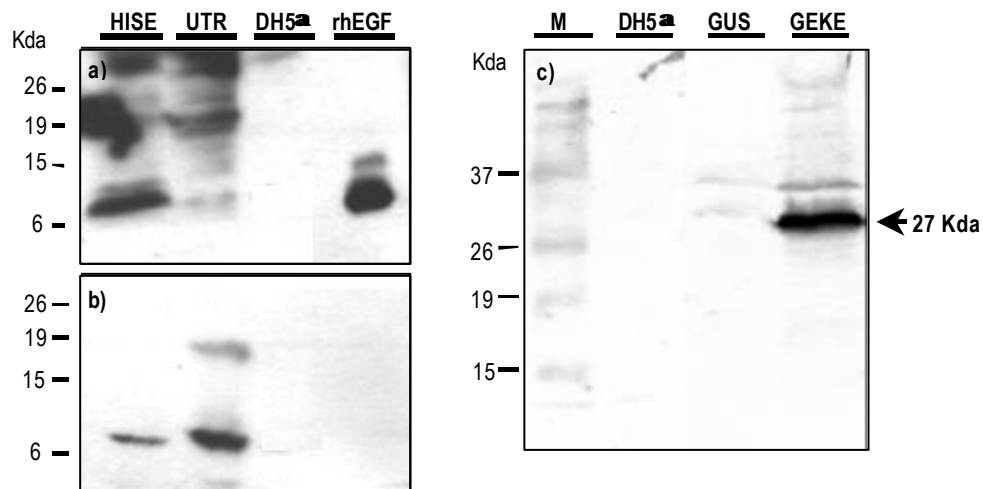


Figura 4.19. *Western blot* de los extractos de *E. coli*. a) 150 µg de proteínas totales de extractos sonicados de *E. coli* transformadas con los plásmidos pBSWHISE o pBSWUTREGF (HISE y UTR

respectivamente) y controles sin transformar (DH5 α) se separaron en un gel de poliacrilamida 15% en condiciones no reductoras. rhEGF: 40 ng del hEGF comercial. b) Segunda membrana de la transferencia del gel descrito en a) que evidencia la retención diferencial del hEGF fusionado o no al tracto de histidinas. c) 50 μ g de proteínas totales de extractos sonicados de *E. coli* transformadas con los plásmidos pBSWUTRGUS o pBSWGEKE (GUS y GEKE respectivamente) y controles sin transformar (DH5 α) se separaron en un gel de poliacrilamida 12%.

Las tres membranas se revelaron con un anticuerpo monoclonal anti-hEGF y se detectaron por quimioluminiscencia (a y b) o mediante una reacción colorimétrica (c).

4.7 TRANSFORMACIÓN DE CLOROPLASTOS DE TABACO POR BOMBARDEO

La transformación de cloroplastos de tabaco se llevó a cabo mediante bombardeo de hojas de *N. tabacum* cv Petit Havana con micropartículas de oro recubiertas con los plásmidos construidos. Se bombardearon cinco hojas con cada construcción, y los discos cortados a partir de ellas, se regeneraron en medio RMOP suplementado con hormonas y espectinomicina a una concentración de 500 mg/l. Esta alta concentración del agente de selección permite discriminar los transformantes plástidicos de las posibles inserciones incorrectas en el genoma nuclear, puesto que sólo eventos de transformación plástidica darían lugar a altos niveles de resistencia. Los brotes, que comenzaron a aparecer a los 30 días del bombardeo, se separaron de los discos y se pusieron a enraizar en medio selectivo sin hormonas (Figura 4.20).

Hojas de las plantas obtenidas, se sometieron al menos a dos rondas de regeneración en medio con espectinomicina para segregar los plástidos no transformados. Aunque los discos de hoja regeneran en medio selectivo, las plantas puestas a enraizar *in vitro* presentaron algunas deformaciones en el tejido aéreo, que desaparecen cuando son transferidas a tierra. La aparición de parches cloróticos, esperables en las quimeras con cloroplastos transformados y no transformados fueron poco frecuentes y en cambio se observaron hojas con las nervaduras alteradas y bordes deformes, con sólo una mitad de la superficie foliar expandida y a veces bilobuladas. Estas alteraciones no se producen en la totalidad de las plantas regeneradas y tampoco se observan en las plantas transplastómicas germinadas en medio selectivo lo que sugiere que se deben al proceso de selección de los cloroplastos transformados y no a un efecto causado por la inserción de las construcciones en el plastoma. En un trabajo publicado recientemente (Alhert *et al.*, 2003), se demuestra que estas deformaciones se deben a un arresto selectivo del desarrollo en aquellas células cuyos cloroplastos no poseen actividad traduccional. De esta forma, cuando las plantas heteroplásticas crecen

en medio con espectinomicina, un antibiótico que inhibe la traducción en plástidos, sólo se desarrollan aquellas células cuyos cloroplastos poseen el gen de resistencia *aadA*. Como este antibiótico no es letal, cuando se libera la selección al pasar la planta a tierra, las células con cloroplastos no transformados retoman el desarrollo y las nuevas hojas presentan una morfología normal (Figura 4.21).



Figura 4.20. Transformación de cloroplastos de tabaco por bombardeo. Los discos de las hojas bombardeadas de *N. tabacum* cv Petit Havana se incubaron en medio MS sólido suplementado con hormonas y espectinomicina (500 mg/l) como agente selectivo. a) control de selección en una hoja no bombardeada b) Control de regeneración de una hoja no bombardeada en medio sin espectinomicina, c) y d) Regenerantes de hojas bombardeadas a los 30 días de cultivo.

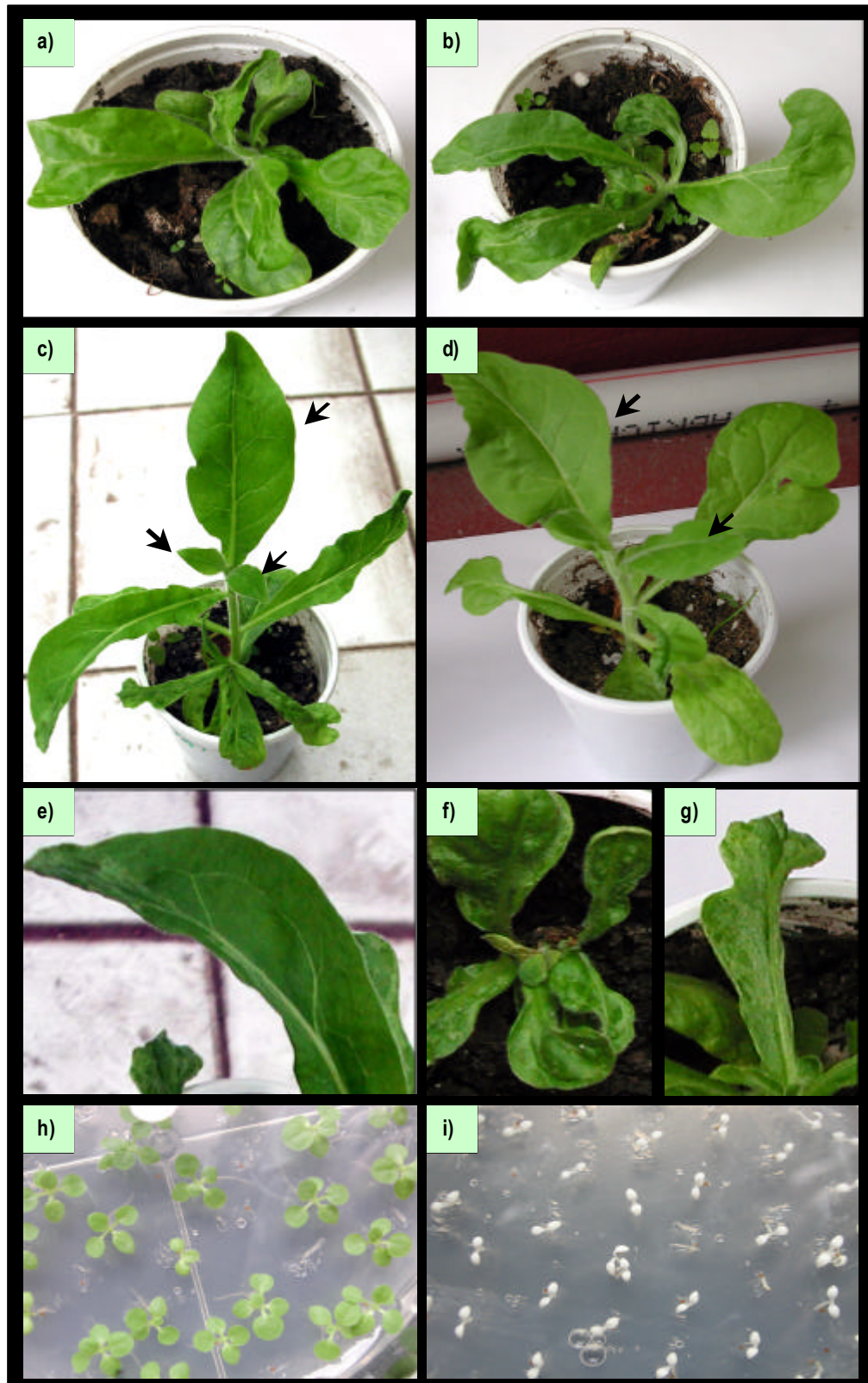
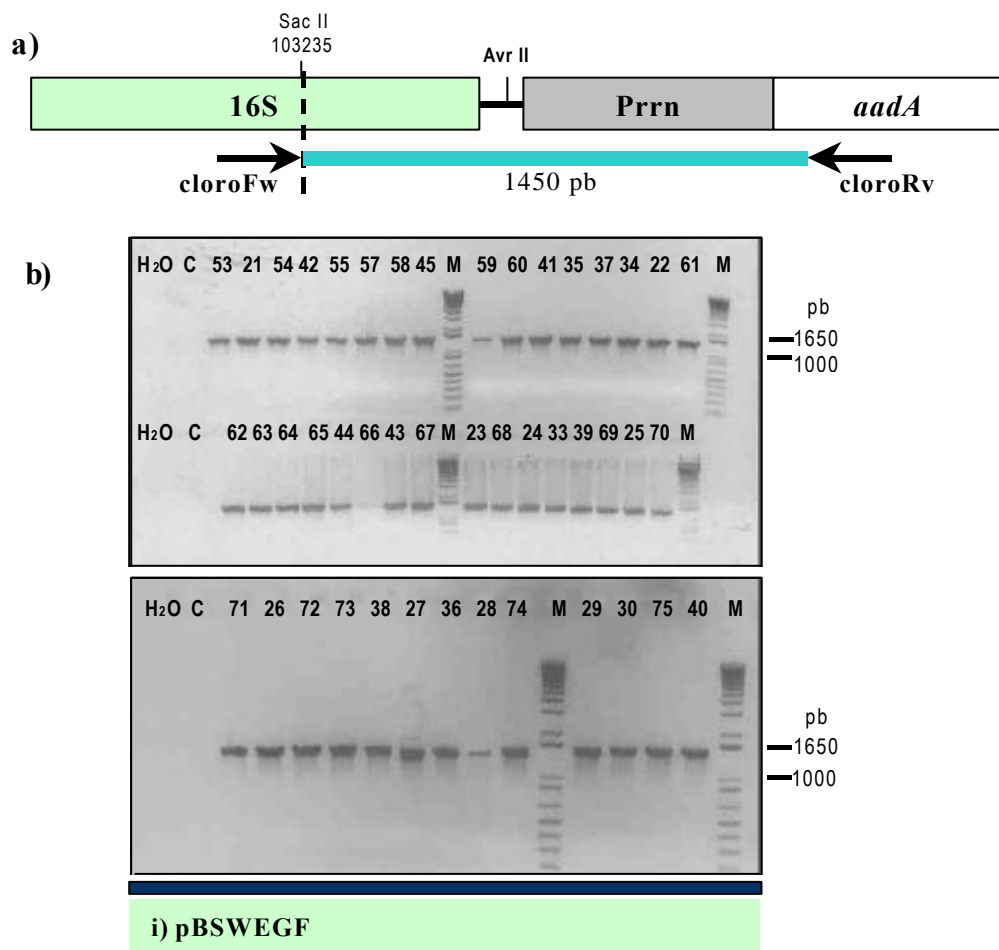


Figura 4.21. Deformaciones en las hojas de plantas heteroplásticas. a) y b) plantas a las 48 horas de pasadas a tierra. Se observan las deformaciones en las hojas, descritas para las plantas heteroplásticas. c) y d) Plantas a las dos semanas de pasadas a tierra. Se pueden ver las hojas inferiores deformes y la recuperación de las hojas nuevas (indicadas por las flechas), que desarrollaron sin la presión de selección. e), f) y g) Detalle de las hojas deformes. h) e i) Semillas germinadas en medio selectivo de una planta transplasmática y de un control sin transformar, respectivamente.

4.8 CARACTERIZACIÓN DE LAS PLANTAS TRANSFORMADAS

4.8.1 Análisis preliminar por PCR

La integración en el genoma plastídico de las construcciones descritas se analizó en forma preliminar mediante la técnica de PCR, amplificando un fragmento de 1450 pb, determinado por los oligonucleótidos cloroFw y cloroRv. El oligonucleótido cloroFw aparece en el genoma plastídico, sobre la secuencia del ARN ribosomal 16S por fuera de las secuencias flanqueantes contenidas en los plásmidos de transformación. Como el oligonucleótido cloroRv aparece en antisentido sobre la región 5' de *aadA*, dentro de la construcción, sólo habrá amplificación si hubo inserción (Figura 4.22a). Todas las plantas que desarrollaron raíces en medio selectivo fueron positivas para este ensayo (Figura 4.22b).



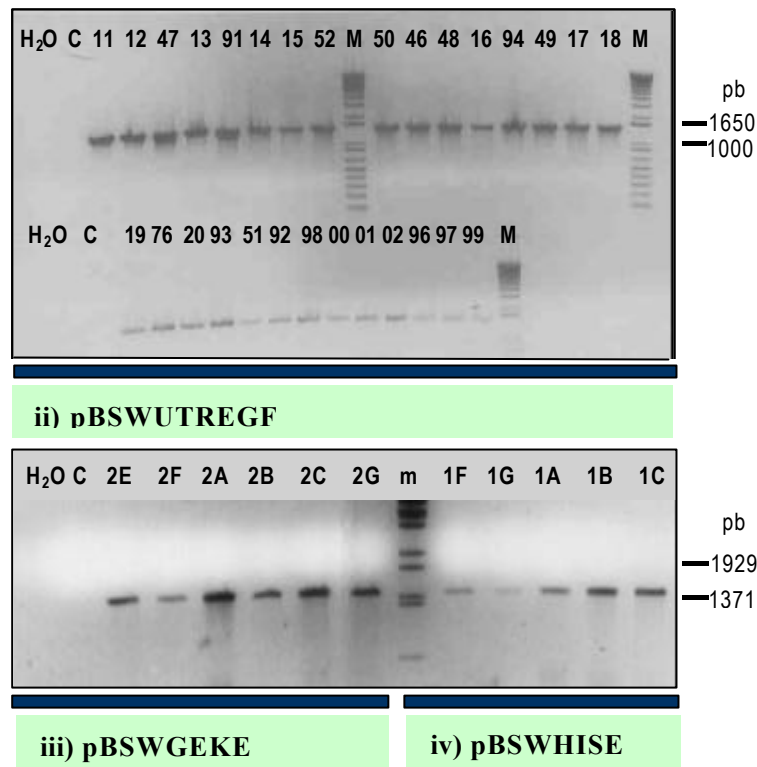


Figura 4.22. Análisis de integración en el genoma plastídico por PCR. a) Esquema de la región de recombinación de las construcciones descritas en el genoma plastídico mostrando las posiciones donde hibridan los oligonucleótidos cloroFw y cloroRv. b) Una banda de 1450 pb se amplificó a partir de extractos de ADN total de las plantas transformadas con los plásmidos pBSWEGF(i) , pBSWUTREGF (ii) , pBSWGEKE (iii) y pBSWHISE (iv). C: amplificación sobre un extracto de ADN total de una planta no transformada. H₂O: reacción sin agregado de ADN, M y m: marcadores de peso molecular (1Kb, Gibco BRL o λ -BstE II, NEB, respectivamente). Cada número o código indica una planta distinta.

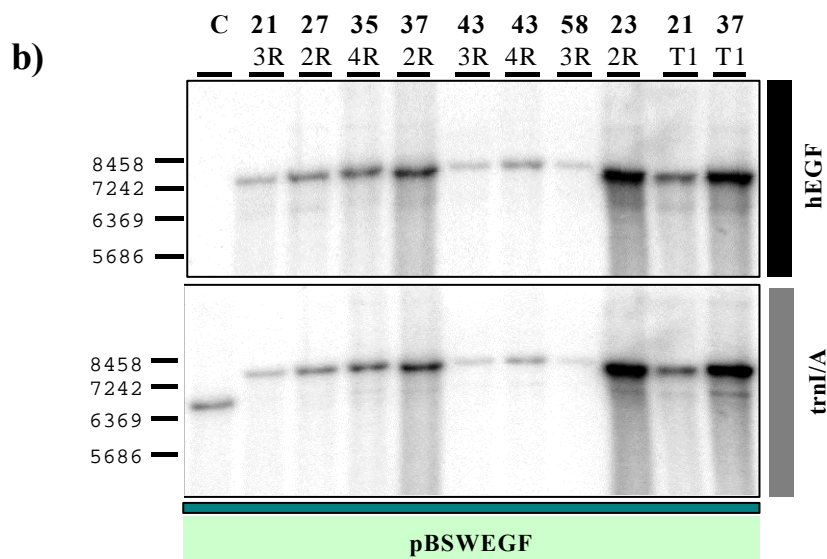
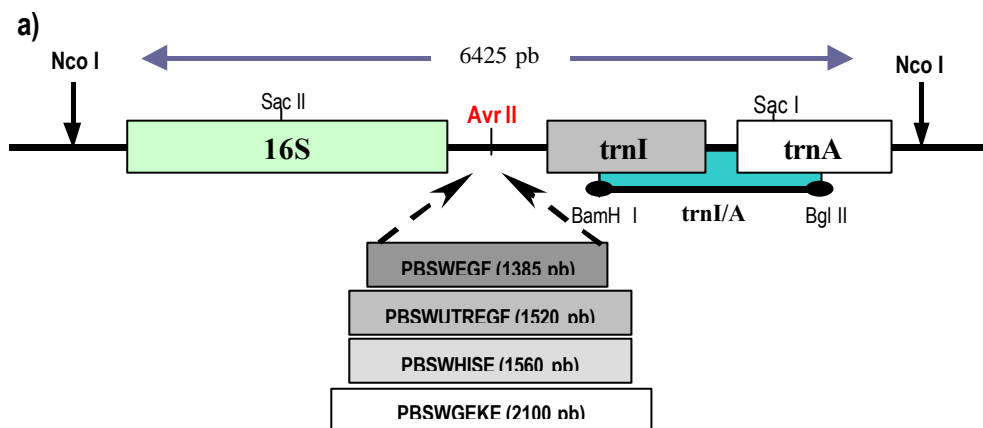
4.8.2 Análisis de integración y homoplasia por Southern blot

Extractos de ADN total de las plantas transformadas y controles sin transformar se cortaron con la enzima Nco I, y se analizaron por la técnica de *Southern blot*. Esta enzima reconoce, entre otras, las posiciones 99365 y 105790 del genoma plastídico que flanquean el sitio de integración en la región intergénica de los genes 16S y trnI. Estos sitios están por fuera de las secuencias de recombinación utilizadas en los plásmidos de transformación, de manera tal que limitan un fragmento de ADN de 6425 pb en los plastomas no transformados y fragmentos de 7810 pb, 7945 pb, 7985 pb y 8525 pb en las plantas transformadas con las construcciones pBSWEGF, pBSWUTREGF, pBSWHISE y pBSWGEKE, respectivamente (Figura 4.23a).

La integración de la secuencia *hegf* en el genoma plastídico se confirmó por hibridación con una sonda específica. En casi la totalidad de las plantas analizadas se

reveló una banda del tamaño esperado de acuerdo a la construcción con la que fueron transformadas (Figura 4.23b).

La homoplastía se corroboró utilizando la sonda *trnI/A*, que hibrida entre los sitios *BamH I* y *Bgl II* en las posiciones 104805 y 105605 del genoma plastídico. La presencia de cloroplastos no transformados se reveló por la detección de la banda de 6425 pb. Las plantas en las que sólo se detectó la banda superior, correspondiente al ADN de los plástidos transformados, fueron consideradas homoplásticas. La planta 51 resultó no estar transformada, a pesar de que desarrolla normalmente en medio selectivo. Esto indica que se trata de un escape que adquirió la resistencia por mutación del gen 16S. Un ejemplo de la forma en que los plástidos transformados son seleccionados por sucesivas rondas de regeneración en medio selectivo se muestra en la figura 4.23c en la que un clon heteroplástico de la segunda ronda de regeneración de la planta 14 (14 2R), pierde los cloroplastos no transformados en una ronda de regeneración inmediatamente posterior (14 3R).



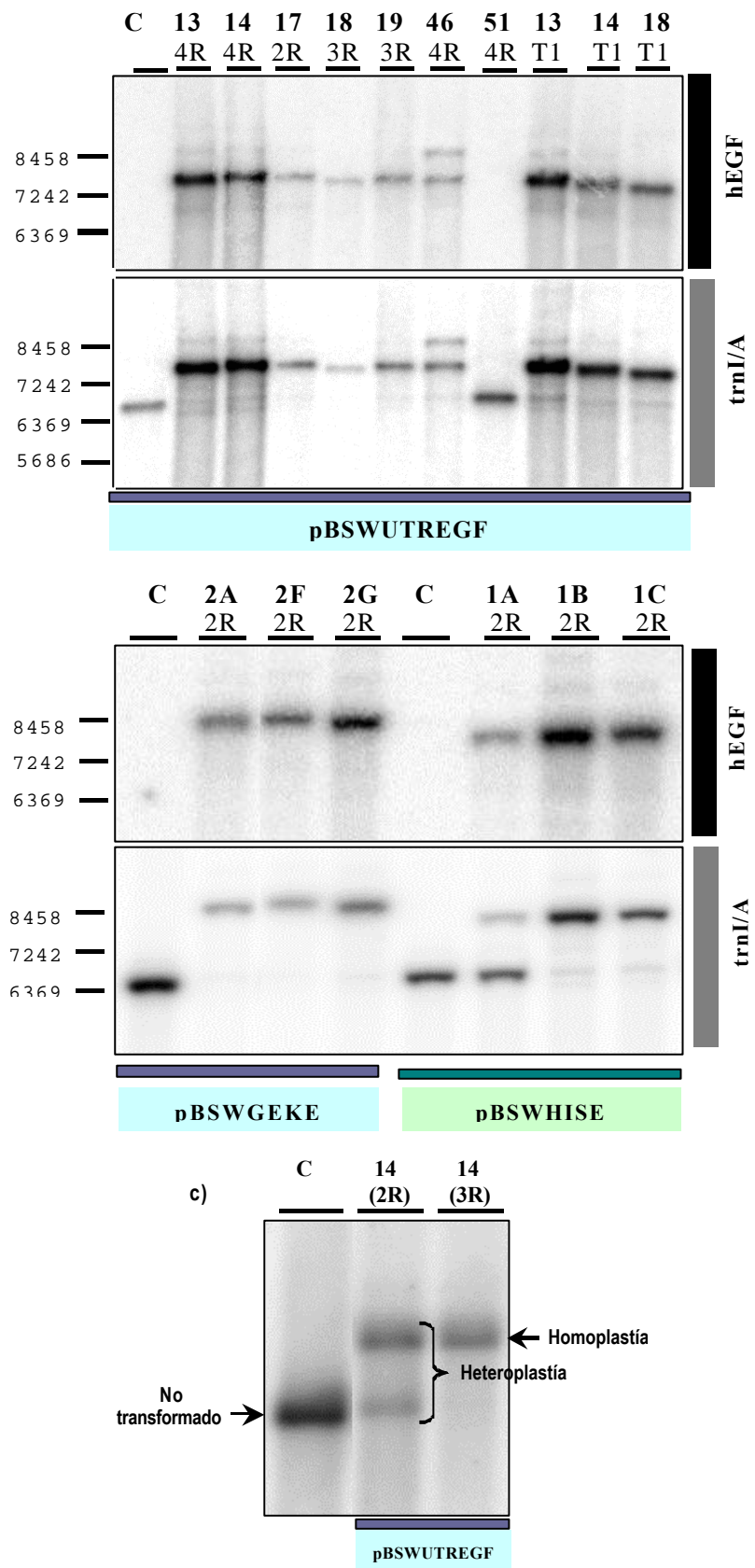
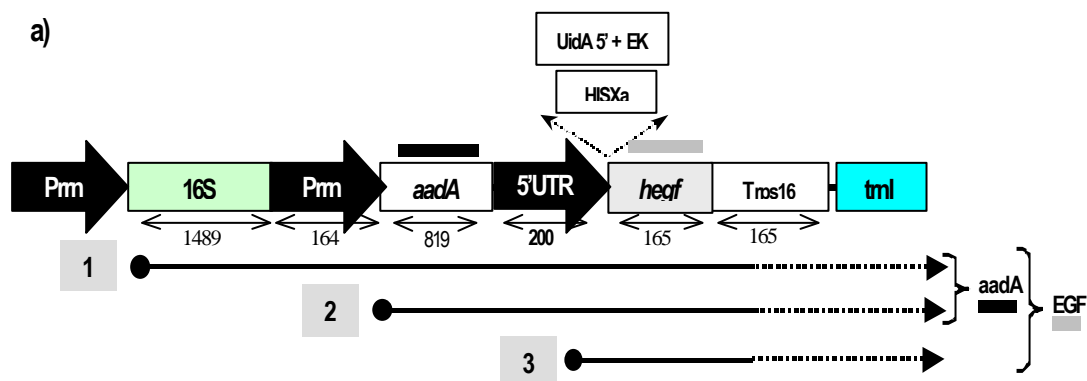


Figura 4.23. Ensayo de Southern blot. a) Mapa de la región de integración en el genoma plástmico. Se indica la posición de los sitios Nco I y la zona de hibridación de la sonda trnI/A b) Se cortaron 4 µg de extractos de ADN total de las plantas transformadas con cada construcción y controles sin transformar

(C), con la enzima Nco I y se separaron en geles de agarosa 0,8% que se transfirieron a membranas de *nylon*. Las membranas se hibridaron primero con la sonda hEGF y luego con la sonda trnI/A. T1: plantas de la generación T1. Marcador de peso molecular: λ BstE II (New England Biolabs). c) 4 μ g de los extractos de ADN de la planta 14 luego de la segunda (2R) y tercera (3R) rondas de regeneración en medio selectivo y de un control sin transformar (C), se cortaron con Nco I y se separaron por electroforesis y se transfirieron como en b). La membrana se reveló con la sonda trnI/A.

4.8.3 Análisis de ARN

La presencia de los ARNm para *aadA* y *hegf*, en las plantas transformadas con los plásmidos pBSWEGF y pBSWUTREGF se analizó en ensayos de *Northern blot*. Extractos de ARN total de las plantas transformadas y controles sin transformar se separaron por electroforesis en condiciones desnaturizantes y se transfirieron a membranas de *nylon*. Al revelar con una sonda que hibrida con la secuencia *aadA* se confirmó la presencia de dos ARN mensajeros que se producen a partir del promotor Prm incorporado con la construcción y del promotor Prm del operón de genes ribosomales en donde se insertan las construcciones. Cuando estas membranas se revelaron con la sonda que hibrida con la secuencia *hegf*, se observaron los mismos dos mensajeros policistrónicos que contienen a *aadA* y en las plantas transformadas con el pBSWUTREGF, una tercera banda adicional que corresponde a los transcritos sintetizados a partir del promotor del gen *psbA*, que forma parte de la secuencia 5'UTR (Figura 4.24). En el caso de las plantas transformadas con los plásmidos pBSWHISE y pBSWGEKE, las membranas conteniendo los extractos de ARN se revelaron sólo con la sonda que hibrida con *hegf*, observándose nuevamente la presencia de los tres ARNm esperados (Figura 4.24d).



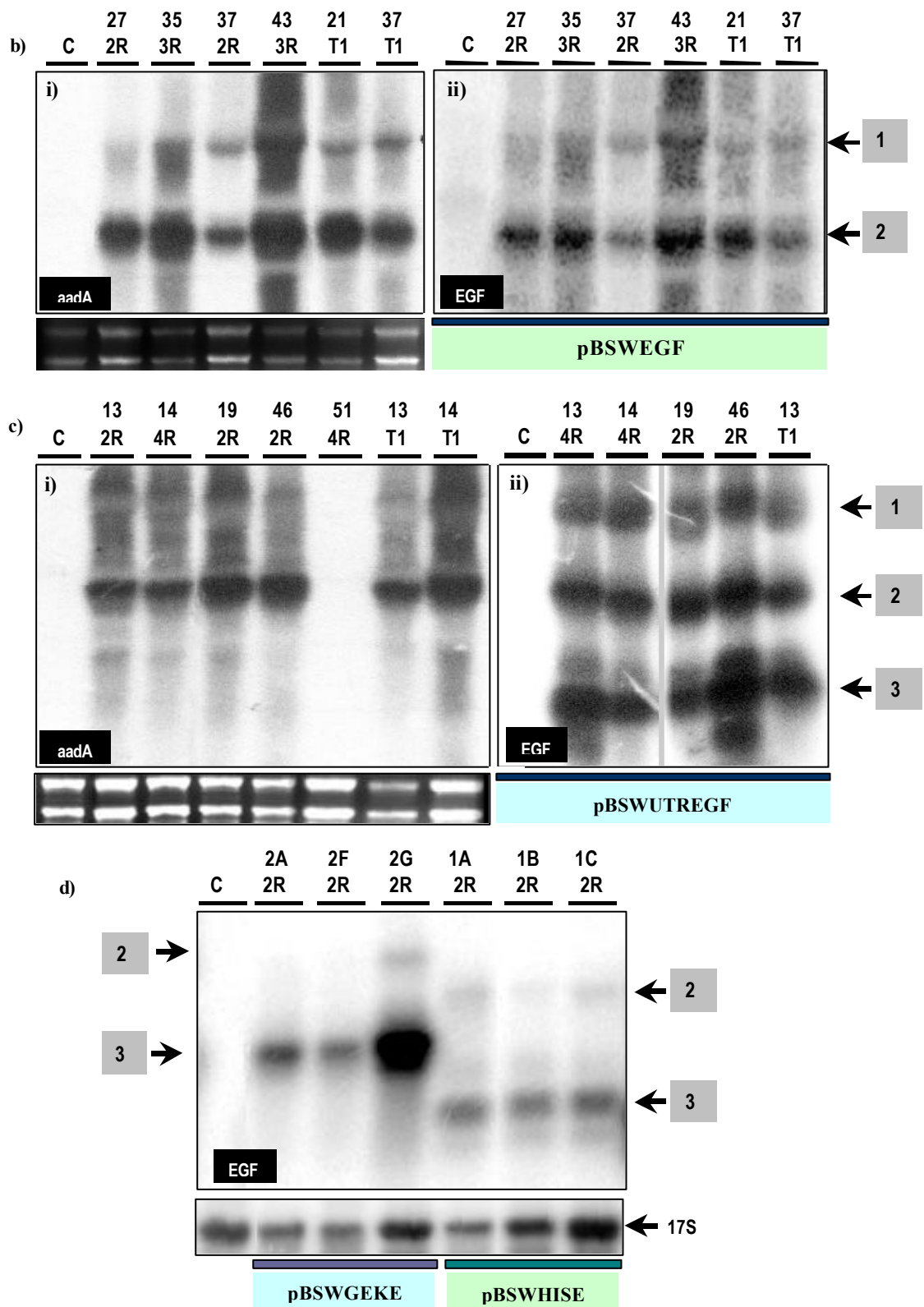


Figura 4.24. Análisis de ARN. Extractos de ARN total de plantas transformadas y controles sin transformar (C) se separaron en geles de agarosa 1,5% en condiciones desnaturalizantes y se transfirieron a membranas de nylon. a) Esquema de los transcritos esperados para cada construcción. Los ARNm policistrónicos 1 y 2 son generados a partir del promotor Prn del operón de genes ribosomales y la duplicación insertada con las construcciones, respectivamente y el ARNm 3, se transcribe a partir del promotor del gen *psbA* incorporado con la secuencia 5'UTR. b), c) y d) Análisis de ARN de las plantas

transformadas con los plásmidos pBSWEGF, pBSWUTREGF, y pBSWHISE o pBSWGEKE, respectivamente. Las membranas b y c se revelaron con sondas específicas para las secuencias *aadA* (i, *aadA*) o *hegf* (ii, EGF). Como control de la masa de ARN sembrada se muestran los ARN ribosomales en los geles previos a la transferencia. La membrana d se reveló con la sonda EGF y con una sonda que hibrida con el ARN ribosomal 17S (17S) como control de masa del ARN sembrado.

A fin de verificar si el ARNm para hEGF era editado en los cloroplastos, se obtuvo el fragmento copia de ADN por RT-PCR. El ADN copia de *hegf* de las plantas 14 y 46, transformadas con el plásmido pBSWUTREGF, se clonó en el vector pGEM-T-easy y se secuenció. El análisis de estas secuencias permitió determinar que el ARNm para hEGF no es editado en los cloroplastos de tabaco.

4.9 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE hEGF

4.9.1 Cuantificación inicial de los niveles de expresión de hEGF en las plantas transplastómicas

A pesar de que en todas las plantas transplastómicas analizadas se confirmó la presencia de ARNm para hEGF, en ninguna de las plantas transformadas con los plásmidos pBSWEGF, pBSWUTREGF o pBSWHISE se detectó la expresión de hEGF. En las plantas transformadas con el plásmido pBSWGEKE, los niveles de expresión de la fusión GEKE, cuantificados mediante el ensayo de ELISA, alcanzaron el $0,0010 \pm 0,0006$ % TPS y en ensayos de *Western blot* se observó una banda del tamaño esperado para la fusión (Figura 4.25). Estos resultados indican que la fusión amino terminal de GUS, estabiliza a hEGF protegiéndolo de la degradación o incrementando su tasa de traducción.

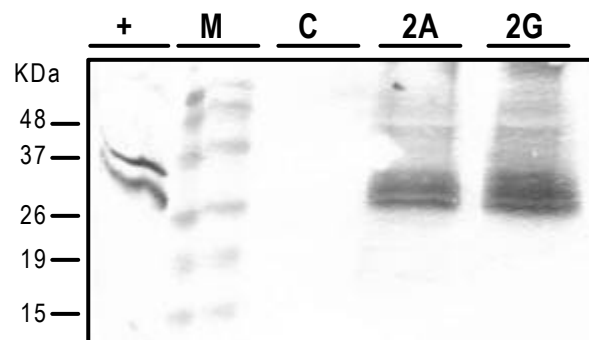


Figura 4.25 Expresión de la fusión GEKE en las plantas transformadas con el plásmido pBSWGEKE. Extractos de hojas conteniendo 150 μ g de proteínas totales de las plantas 2A y 2G, transformadas con el plásmido pBSWGEKE y de un control sin transformar (C) se separaron en un gel de poliácridamida 15%

en condiciones reductoras. Las membranas de nitrocelulosa se revelaron con el anticuerpo monoclonal anti-hEGF. +: extracto de *E coli* transformadas con el pBSWGEKE, M: Marcador de peso molecular.

4.9.2 Ensayos de degradación in vitro de hEGF.

La regulación de la expresión genética en los cloroplastos se produce principalmente mediante mecanismos de control traduccional y postraduccional. Uno de estos mecanismos consiste en la degradación proteolítica de subunidades no ensambladas en complejos proteicos, proteínas que han sufrido daño oxidativo y polipéptidos plegados incorrectamente. Como una primera aproximación para estudiar si esta actividad proteolítica era responsable de la degradación de hEGF en las plantas transplastómicas, se evaluó la estabilidad de la proteína recombinante comercial incubada con extractos de cloroplastos a 26°C y en distintas condiciones (oscuridad, luz, con y sin ATP). Los niveles de hEGF se cuantificaron mediante el ensayo de ELISA, tomando muestras a distintos tiempos. En los extractos plásticos incubados en luz, los niveles de hEGF comercial decaen rápidamente, hasta llegar a valores del 18 % respecto de la masa inicial a las dos horas de incubación. Este efecto no se observa cuando los extractos son incubados en oscuridad, ya que el 86 % de hEGF inicial se detectó a las dos horas de incubación (Figura 4.26).

Una de las proteasas plásticas mejor caracterizada es la Clp, una serina proteasa dependiente de ATP, que estaría asociada al reciclado general de proteínas en el estroma de los cloroplastos (Halperin *et al.*, 2001; Peltier *et al.*, 2004; Porankiewicz *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2002). Se probó entonces el efecto de agregar Mg-ATP a los ensayos *in vitro*. Los resultados mostrados en la figura 4.26 indican que el agregado de ATP, no sólo no estimuló una potencial acción proteolítica, sino que por el contrario, generó un efecto protector frente a la degradación de hEGF, tanto en luz como en oscuridad (73% y 100% del hEGF inicial luego de 2 horas de incubación), indicando que existen otros mecanismos involucrados en la degradación de hEGF.

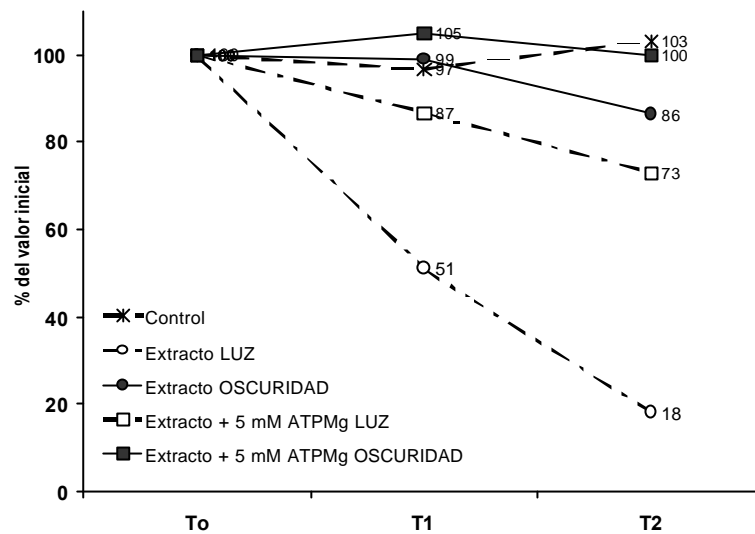


Figura 4.26. Ensayos de degradación *in vitro* de hEGF. Se agregaron 200 ng/ml de hEGF comercial a un *buffer* STM pH 8 conteniendo 5 mM Mg (control) y a los extractos de cloroplastos preparados en el mismo *buffer* (extracto), o con el agregado de 5 mM ATP y se incubaron a 26°C en luz u oscuridad. Se tomaron muestras al inicio del ensayo (To), y luego de una hora (T1) y dos horas (T2) de incubación y se cuantificaron los niveles de hEGF por ELISA. Los valores graficados se normalizaron respecto de las mediciones a To y constituyen la media de entre dos y cuatro ensayos independientes para cada condición.

Se probó también el efecto de estos extractos plásticos sobre la estabilidad de la fusión GEKE. Extractos de *E. coli* transformadas con el pBSWGEKE se incubaron con los extractos plásticos a 26°C en luz, con y sin el agregado de ATP. Las muestras tomadas a distintos tiempos se visualizaron en un ensayo de *Western blot*. Al igual que para el hEGF comercial, la fusión GEKE decae a medida que aumenta el tiempo de incubación en los extractos plásticos y el agregado de ATP, ejerció nuevamente un efecto protector (Figura 4.27).

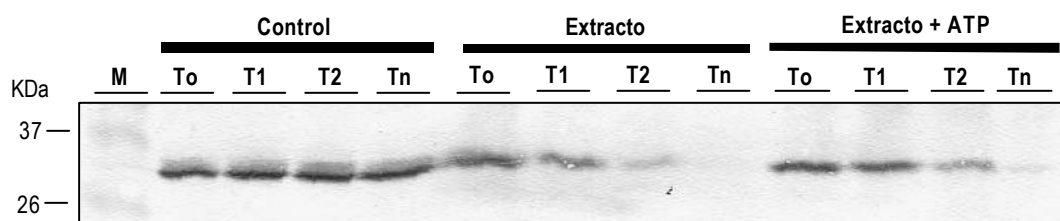


Figura 4.27. Ensayos de degradación *in vitro* de la fusión GEKE. Alicuotas idénticas de extractos de *E. coli* transformadas con el plásmido pBSWGEKE se incubaron a 26°C en luz en un *buffer* STM pH 8 conteniendo 5 mM Mg (control) y en los extractos de cloroplastos preparados en el mismo *buffer* (extracto), o con el agregado de 5 mM ATP (Extracto + ATP). Se tomaron muestras al inicio del ensayo (To), luego de una hora (T1), dos horas (T2) y toda la noche (Tn) de incubación. Volúmenes idénticos de cada muestra se separaron en un gel de poliácridamida 15% en condiciones no reductoras y la membrana transferida se reveló con un anticuerpo monoclonal anti-hEGF.

Aunque la preparación de los extractos plastídicos no se hizo pensando en purificar membranas tilacoides con fotosistemas activos, se observó que los extractos incubados en oscuridad conservan un color verde brillante característico, mientras que los extractos iluminados se tornan amarronados evidenciando indirectamente una actividad de óxido-reducción. Además, los resultados obtenidos indican que estos extractos poseen un efecto diferencial sobre la estabilidad de hEGF cuando son expuestos o no a la luz. Es posible entonces que el poder reductor generado por la actividad fotosintética (especialmente del fotosistema I) sea responsable en forma directa o indirecta de la inestabilidad de hEGF. Este efecto podría deberse a múltiples causas como la activación directa de una proteasa o la reducción de los puentes disulfuro de hEGF incrementando su susceptibilidad a la degradación. En este entorno el ATP, podría estar activando una chaperona que proteja a hEGF de la degradación. La verificación de estas hipótesis implica realizar una serie de ensayos, que se detallan en la discusión, que permitirían profundizar el estudio de los sistemas de control de la expresión plastídicos, pero cuyo alcance escapa a los objetivos iniciales de esta tesis.

4.9.3 Expresión hEGF en oscuridad.

Sobre la base de los resultados observados en los ensayos de degradación *in vitro* se comparó la expresión de hEGF en las plantas transplastómicas incubadas en luz y luego de 48 horas de oscuridad. Aunque en las plantas transformadas con los plásmidos pBSWUTREGF y pBSWHISE los niveles de hEGF continuaron por debajo del límite de detección del ELISA, en las plantas transformadas con el plásmido pBSWEGF incubadas en oscuridad, se cuantificaron valores del $0,00004 \pm 0,00002$ %TPS. Asimismo, los niveles de expresión de la fusión GEKE en las plantas transformadas con el plásmido pBSWGEKE, se incrementaron de un $0,0010 \pm 0,0006$ %TPS (Luz) a un $0,0030 \pm 0,0008$ %TPS (Oscuridad).

Las discrepancias en los niveles de expresión entre cada grupo de plantas pueden deberse al efecto antagónico de la inhibición de la degradación de hEGF en oscuridad y la inhibición de la traducción a partir de la secuencia 5' no traducida del gen *psbA*, cuya activación por luz está bien estudiada.

Estos resultados confirman las observaciones de los ensayos de degradación *in vitro* y apoyan la hipótesis de que el estado oxidativo de los cloroplastos es en parte responsable de la baja expresión de hEGF en las plantas transplastómicas.

5 (ANEXO A) EXPRESIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINO (bGH) EN CLOROPLASTOS DE TABACO

5.1 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pBSWUTR bGH

La secuencia que codifica la hormona de crecimiento bovina, bGH, se amplificó por PCR a partir del plásmido pBGHVL utilizando los oligonucleótidos iniciadores bGH *sense* y bGH *antisense* que incorporan un sitio Nde I en el extremo 5' y Xba I en el extremo 3' respectivamente. El fragmento amplificado se clonó en un vector pZeRO-2 y se verificó por secuenciación. El plásmido pBSWUTRbGH se construyó reemplazando la secuencia *uidA* del pBSWUTRGUS por la secuencia de la bGH en los sitios Nde I y Xba I (Figura 5.1).

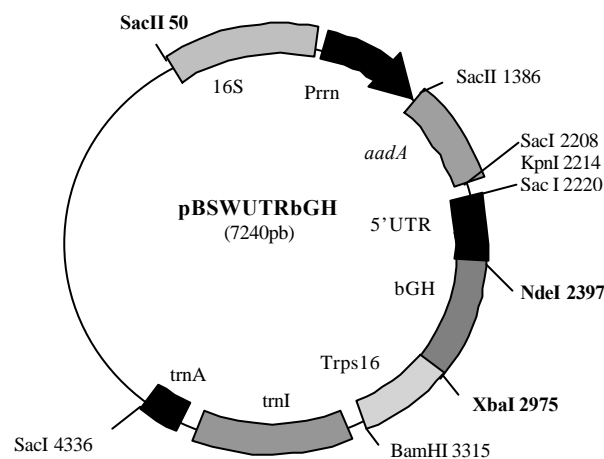


Figura 5.1 Mapa del plásmido pBSWUTRbGH. La secuencia de la bGH se clonó en el vector pBSWUTRGUS, reemplazando al gen *uidA* en los sitios Nde I y Xba I. Las posiciones se numeran respecto del sitio de clonado múltiple del pGEM-T-easy.

5.2. EXPRESIÓN DE bGH EN *E. COLI*

La expresión de bGH en *E. coli* transformadas con el plásmido pBSWUTRbGH se analizó en un ensayo de *Western blot*. La figura 5.2 muestra que la bGH sintetizada en bacterias a partir del vector de transformación de cloroplastos es reconocida por un anticuerpo monoclonal anti-bGH y posee el mismo peso molecular que la hormona

sintetizada a partir del un plásmido de expresión bacteriano pETbGH. (control +, Figura 5.2).

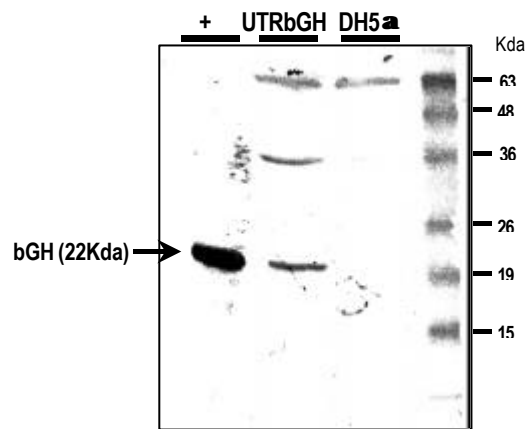


Figura 5.2. Expresión de bGH en *E. coli*. 50 µg de proteínas totales de extractos de *E. coli* transformadas con el plásmido pBSWUTRbGH (UTRbGH) y controles sin transformar (DH5α) se separaron en un gel de poliacrilamida 12%. Como control positivo (+) se sembraron 50 µg de proteínas totales de un extracto de *E coli* BL21DE transformadas con un vector de expresión bacteriano (pETbGH, inducido con IPTG). La banda de 22 Kda correspondiente a la bGH se reveló con un anticuerpo monoclonal anti-bGH.

5.3. TRANSFORMACIÓN DE CLOROPLASTOS Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN EN PLANTAS DE TABACO

El plásmido pBSWUTRbGH se utilizó para transformar cloroplastos de *N. tabacum* cv. Petit Havana en las mismas condiciones que para los plásmidos de expresión de hEGF.

5.3.1 Caracterización por PCR de las plantas transformadas

La integración en el genoma plastídico de la construcción que lleva la secuencia de la bGH se verificó amplificando un fragmento de 1450 pb, utilizando los oligonucleótidos cloroFw y cloroRv (Figura 5.3).

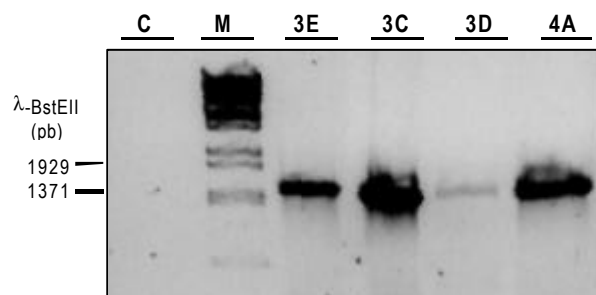


Figura 5.3. Análisis de integración en el genoma plastídico por PCR. Una banda de 1450 pb, presente sólo en las plantas transformadas, se amplificó a partir de extractos de ADN total. C: amplificación sobre

el ADN total de una planta no transformada. M: marcador de peso molecular, λ -BstE II (New England Biolabs). Cada código indica una planta distinta.

5.3.2 Análisis de la expresión de bGH en las plantas transplastómicas

La expresión de bGH en las plantas positivas por PCR se evaluó en un ensayo de *Western blot*. En ninguna de las plantas analizadas se detectó la presencia de bGH. Como bGH posee dos puentes disulfuro, se probó la expresión cuando las plantas se incubaron en oscuridad, sin embargo tampoco se detectó la proteína recombinante en estas condiciones.

6 (ANEXO B) EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE *T. GONDII* EN CLOROPLASTOS DE TABACO.

La expresión de las proteínas antigénicas SAG1 y Gra4 de *T. gondii* en cloroplastos de tabaco forma parte de una colaboración con el Dr. Sergio Angel del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, del Instituto Tecnológico de Chascomús, IIB-INTECH CONICET/UNSAM, Chascomús, Argentina y con el Dr. Henry Daniell del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Florida Central, Orlando, EEUU. La construcción de los vectores para la expresión de los antígenos de *T. gondii* en cloroplastos se hizo a partir de las secuencias de SAG1 y Gra4 cedidas por el Dr. Angel y sobre la base del vector de transformación pLDctV como parte de mi estadía en el laboratorio del Dr. Daniell.

6.1 CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DERIVADOS DEL pLDctV PARA LA EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS DE *T. GONDII*.

6.1.1 Construcción de los plásmidos pLDP30 y pLDGRA4

Las secuencias que codifican las porciones carboxilo terminales de las proteínas de P30 (SAG1, 500 pb) y GRA4 (490 pb), se amplificaron por PCR a partir de los plásmidos pQE32-SAG1 y pQE30-Gra4 respectivamente. Se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores 5'P30NdeI y 3'P30XbaI para P30, y los oligonucleótidos 5'GraNdeI y 3'Gra4XbaI para Gra4. En ambos casos se incorporan un sitio Nde I en la región 5' y un sitio Xba I en la región 3'. Los fragmentos obtenidos se clonaron en sendos vectores pCRblunt (Invitrogen Life Technologies), y se verificaron por secuenciación. Ambas secuencias se liberaron por corte con las enzimas Nde I y Xba I y se clonaron en el plásmido intermediario pCR2.1 que contiene la secuencia 5'UTR del gen *psbA*, para dar los plásmidos pCRP30 y pCRGra4. Los plásmidos definitivos pLDP30 y pLDGra4 se obtuvieron clonando los fragmentos cortados con las enzimas EcoR I y Xba I de los plásmidos pCRP30 y pCRGra4 en el vector pLDctV, cuyo sitio de integración comprende la región intergénica entre las secuencias del trnI y el trnA del plastoma de tabaco (Figura 6.1)

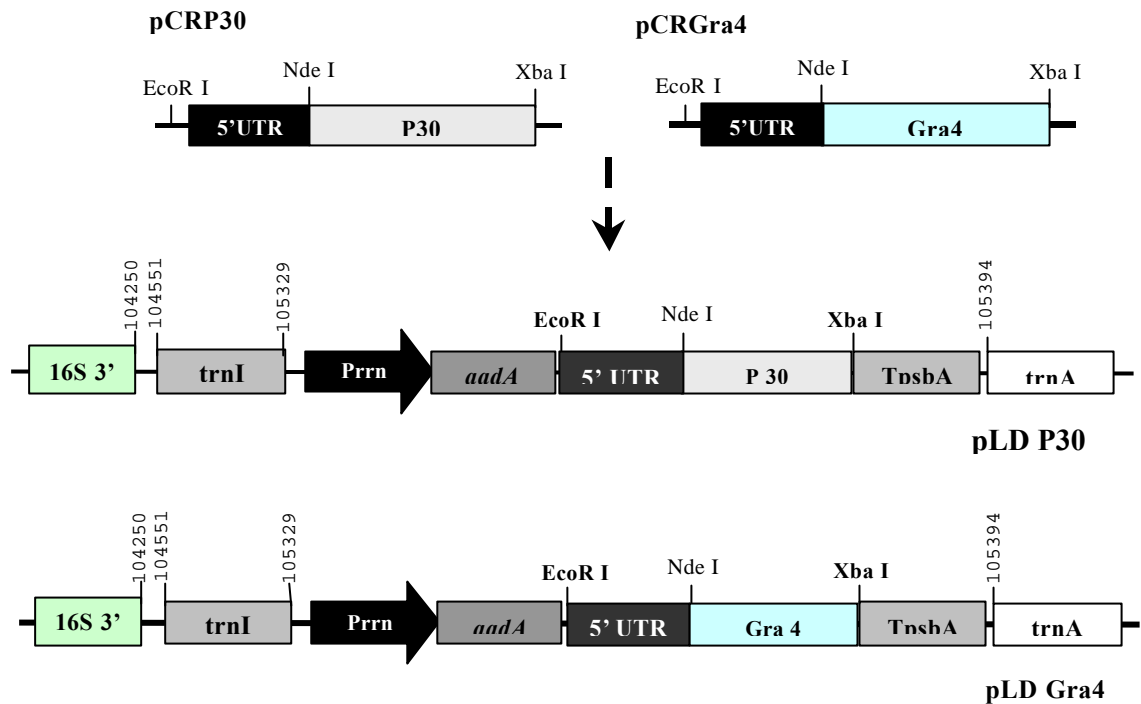


Figura 6.1 Construcción de los vectores *pLDP30* y *pLDGra4*. Los productos amplificados por PCR y clonados en el vector pCR2.1 y la secuencia 5'UTR del gen *psbA* se clonaron en los sitios EcoR I y Xba I del vector pLDctV. TpsbA: Terminador del gen *psbA* plastídico.

6.1.2 Construcción de los plásmidos *pLDHIS P30* y *pLDHIS GRA4*

Las mismas porciones terminales de las secuencias codificantes de P30 y Gra4 descritas en 6.1.1, se amplificaron con los mismos oligonucleótidos en 3' (3'P30XbaI y 3'Gra4XbaI) pero variando los oligonucleótidos 5', para generar extremos romos en marco de lectura continuo con una secuencia de seis histidinas y un sitio de reconocimiento para el factor Xa (HIS). Para P30 se utilizó el 5'P30blunt y para Gra4 el 5'Grablunt. Los fragmentos amplificados se clonaron en un vector de extremos romos similar al pZeROHIS y se verificaron por secuenciación. Las fusiones entre el tracto de histidinas y las secuencias de P30 o Gra4 se clonaron en los sitios Nde I y Xba I del plásmidos intermediario pCR2.1. Los plásmidos de transformación de cloroplastos pLDHISP30 y pLDHISGra4 se obtuvieron clonando los fragmentos conteniendo la secuencia 5' no traducida del gen *psbA* y la fusión entre el tracto de histidinas y los antígenos de *T. gondii* en los sitios EcoR I y Xba I del vector pLDctV (Figura 6.2).

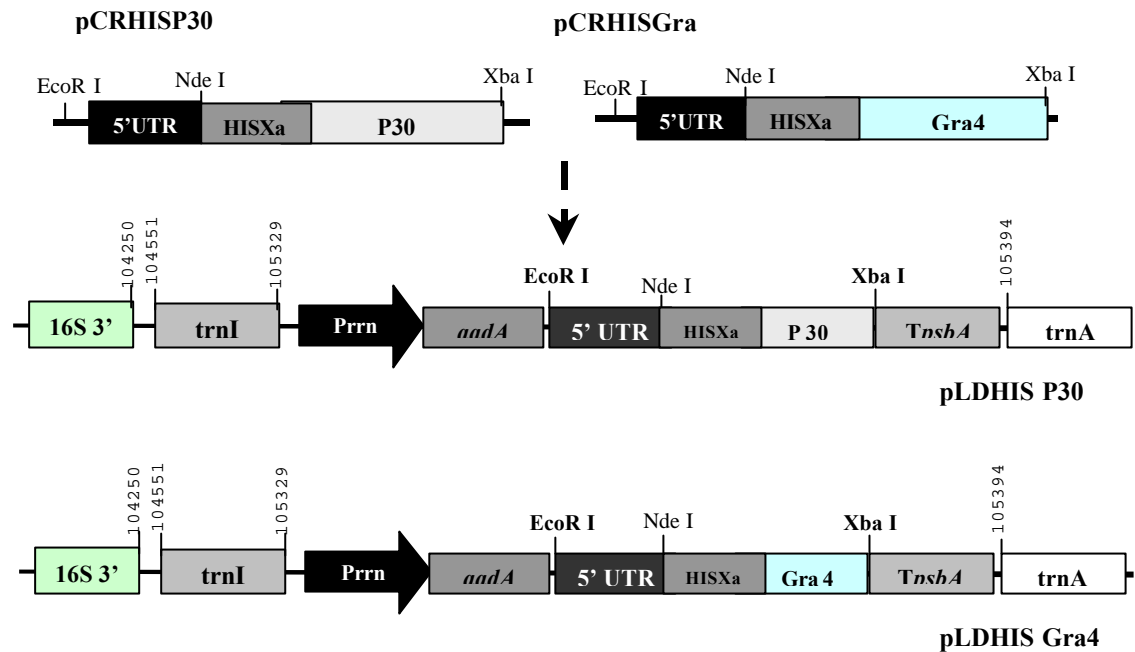


Figura 6.2 Construcción de los plásmidos *pLDHISP30* y *pLDHISGra4*. Los productos de PCR clonados en el plásmido pCR2.1 y la secuencia 5' no traducida del gen *psbA* se clonaron en los sitios EcoR I y Xba I del vector pLDctV. TpsbA: secuencia terminadora del gen *psbA* plástido, HISXa: tracto de seis histidinas y sitio de reconocimiento para el factor Xa.

6.2 TRANSFORMACIÓN DE CLOROPLASTOS Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN EN PLANTAS DE TABACO

Las cuatro construcciones descritas se utilizaron para transformar cloroplastos de *N. tabacum* cv Petit Havana que fueron regeneradas en el laboratorio del Dr. Daniell, de la Universidad de Florida Central. Los análisis posteriores se hicieron sobre muestras congeladas de tejido foliar de plantas transformadas con el vector pLDP30 (6-0 y 6-3), pLDHISP30 (55.5b y 55.5c), pLDGra4 (10-1) y pLDHISGra4 (7-5) enviadas por el Dr. Daniell. El ADN total extraído de una porción de estas muestras se utilizó para verificar la integración de las construcciones en el genoma plástido por amplificación con el oligonucleótido *cloroRv* que hibrida sobre el gen *aadA* y el oligonucleótido 4P que hibrida por fuera de las regiones de recombinación del pLDctV. En todas las plantas se obtuvo un fragmento de 1600 pb, ausente en los controles sin transformar (Figura 6.3).

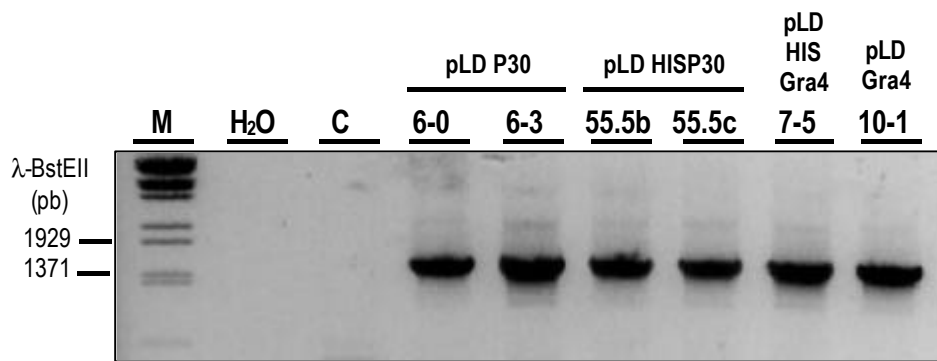


Figura 6.3. Análisis de integración en el genoma plastídico por PCR. Una banda de 1600 pb, presente sólo en las plantas transformadas, se amplificó a partir de extractos de ADN total (Plantas 6-0 y 6-3: transformadas con pLDP30, plantas 55.5b y 55.5c: transformadas con pLDHISP30, planta 7-5: transformada con pLDHISGra4 y planta 10-1, transformada con pLDGra4). C: amplificación sobre el ADN total de una planta no transformada. H₂O: reacción sin agregado de ADN, M: marcador de peso molecular, λ-BstE II (New England Biolabs).

El resto del tejido vegetal se procesó para la extracción de proteínas y se evaluó en ensayos de *Western blot* revelando la presencia de los antígenos de *T. gondii* con anticuerpos específicos contra P30 y Gra4. En ninguna de las plantas transformadas con los vectores pLDP30 o pLDHISP30 se detectó la proteína SAG1. De las plantas transformadas con los vectores pLDGra4 y pLDHISGra4, sólo se reveló la presencia de bandas específicas en los extractos la planta 7-5 (pLDHISGra4). Como en la construcción utilizada para transformar esta planta, Gra4 se fusionó a un tracto de histidinas, se hizo una purificación utilizando una columna de níquel. En la figura 6.4 puede observarse que de las dos bandas reveladas con el anticuerpo anti Gra4 en el extracto total de hojas (indicadas por las flechas), sólo la superior es retenida por la columna y posteriormente eluída, mientras que la inferior y más abundante parece ser una forma truncada que perdió el tracto de histidinas.

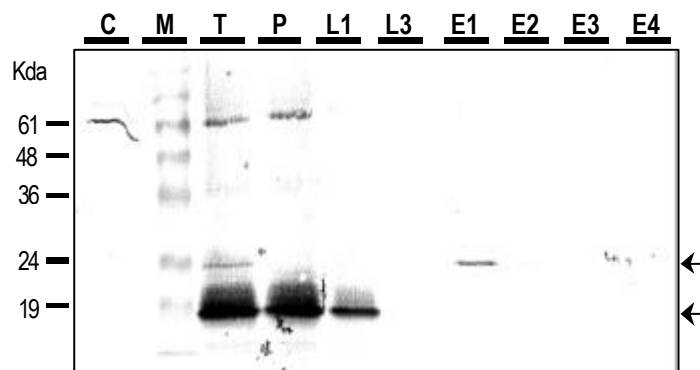


Figura 6.4. Purificación de la fusión HIS-Gra4 por afinidad con una columna de níquel. El extracto proteico total (T) de la planta 7-5 en *buffer* tris-urea pH 8 se pasó por una columna de níquel y se tomó una muestra del percolado (P) a los 5 minutos. La columna se lavó tres veces con una solución a pH 6,5 y

se eluyó con *buffer* pH 5. Se sembraron alícuotas del primer y tercer lavados (L1 y L3) y de los extractos eluidos (E1, E2, E3 y E4), así como del extracto total T y del percolado P. C: extracto control de una planta no transformada.

La capacidad de unión a sueros humanos de la proteína Gra4 sintetizada en cloroplastos, se evaluó en un ensayo de *Western blot*. La figura 6.5 muestra que las dos bandas reconocidas por el anticuerpo anti-Gra 4, en los extractos totales (T) son también reveladas es forma específica por un suero humano positivo para *T gondii* y ninguna de ellas es reconocida por un suero humano control. La banda del extracto eluido 1 (E1) no es revelada por el suero positivo, posiblemente debido a la baja concentración de Gra4 presente.

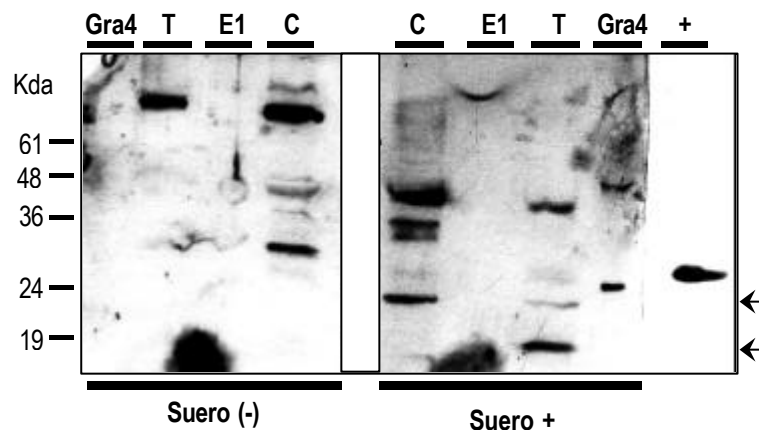


Figura 6.5 Reconocimiento de la proteína Gra4 por sueros humanos. Alícuotas del extracto total (T) de la planta 7-5 transformada con el pLDHISGra4 y del primer eluido de la columna de níquel (E1) se sembraron por duplicado en un gel de poliacrilamida y las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Uno de los duplicados se reveló con un suero humano positivo para *T gondii* y el otro con un suero negativo. Gra4: 5 ng de la proteína recombinante producida en *E. coli*. +: 10 ng de Gra4 recombinante revelada con el anticuerpo anti-Gra4 producido en ratón. C: controles de plantas de *N. tabacum* cv Xanthi D8.

DISCUSIÓN

EXPRESIÓN DE hEGF EN EL CITOPLASMA Y APOPLASTO DE PLANTAS DE TABACO.

PLANTAS TRANSGÉNICAS

En el transcurso de este trabajo se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco, transformadas con cinco construcciones genéticas distintas para la expresión de hEGF en el citoplasma o el apoplasto celular.

Mientras que en las versiones citoplasmáticas, los niveles de expresión de hEGF no superaron el 0,00001% respecto del total de las proteínas solubles (TPS), en las versiones apoplásticas se obtuvieron niveles de expresión entre 4 y 5 órdenes de magnitud superiores, con un máximo de 0,11% TPS para la planta 319, transformada con el plásmido p35(L)APEGF. A diferencia de lo esperado, la utilización del promotor 35S(L)CaMV y la secuencia potenciadora de la traducción Ω , del TMV, no generaron incrementos en los niveles de expresión de hEGF, a pesar de que se han reportado incrementos de hasta 6 veces en la expresión de la β -glucuronidasa, respecto de los obtenidos al utilizar el promotor 35SCaMV (Coego *et al.*, 1996).

En las plantas analizadas, el número de copias del transgén osciló entre 1 y 6, independientemente de la construcción utilizada para la transformación. Esto indica que las diferencias en los niveles de expresión de hEGF entre las versiones citoplasmáticas y apoplásticas, no se deben a una variación en el número de copias insertadas en el genoma. Asimismo, los niveles de ARNm para hEGF no mostraron las mismas diferencias observadas en los niveles de expresión de la proteína recombinante entre versiones. Esto sugiere que el incremento en la expresión de hEGF en las plantas transformadas con las versiones apoplásticas se debe a efectos postranscripcionales.

Los resultados obtenidos muestran que sería el envío a la vía de secreción, mediante la fusión del péptido señal de AP24, el factor responsable de las diferencias observadas en los niveles de expresión de hEGF. Las proteínas que son dirigidas a la vía de secreción deben atravesar el lumen del retículo endoplasmático (RE), que provee el entorno oxidativo y las enzimas necesarias para la formación de los puentes disulfuro y el plegamiento correcto de muchos polipéptidos (Kleizen y Braakman, 2004; Tu y Weissman, 2004). El hEGF maduro posee seis cisteínas que forman tres puentes disulfuro necesarios para el plegado correcto de la proteína. Así, el pasaje a través del

lumen del RE estabilizaría a la proteína nativa, mientras que en el citoplasma, el hEGF plegado incorrectamente sería degradado.

La funcionalidad del péptido señal fusionado a hEGF, se verificó en dos ensayos en los que se detectó la proteína rizosecretada por la planta 319. En el primer ensayo, se evaluó la rizosecreción de hEGF en un sistema de cultivo hidropónico. A pesar de que sólo se alcanzó un máximo de producción de 35 ng de hEGF por ml de medio a los 30 días de iniciado el cultivo (0,025% TPS en el medio de cultivo), este ensayo permitió verificar que el péptido señal de AP24 está dirigiendo a hEGF a la vía de secreción. Por otra parte, estos resultados abren la posibilidad de optimizar este sistema de producción, por ejemplo, mediante la adición al medio de polímeros, como el polietilenglicol (PEG), la polivinilpirrolidona (PVP) o la gelatina, que se han empleado con éxito para estabilizar la producción del hGM-CSF en suspensiones celulares (Lee *et al*, 2002) y de anticuerpos rizosecretados en plantas de tabaco y cultivos de raíces (Drake *et al*, 2003; Wongsamuth y Doran, 1997).

La rizosecreción de hEGF se verificó en un segundo ensayo, en el que se germinaron semillas de la planta 319 sobre una membrana de nitrocelulosa. Al revelar esta membrana con un anticuerpo monoclonal anti-hEGF, se detectó la proteína recombinante secretada, sobre la impronta dejada por las raíces. Estas observaciones demuestran que el hEGF detectado en el medio hidropónico se produce efectivamente por rizosecreción y no por daños en el tejido radicular.

VECTORES VIRALES

Se disponía de un vector viral derivado de PVX para la expresión de hEGF en el citoplasma (PVXEGF), que se había probado era capaz de infectar plantas de *N. clevalandii* (Calamante, 1998). En base a los resultados obtenidos con las plantas transgénicas, se construyó una versión apoplástica del vector viral. En este nuevo vector viral, la misma fusión de *hegf* a la secuencia codificante del péptido señal de AP24 (*ss-hegf*) utilizada en la construcción del plásmido binario p35(L)APEGF, se clonó bajo el control de una duplicación del promotor subgenómico de la cápside de PVX, reemplazando a la secuencia de *hegf*, en el vector viral citoplasmático PVXEGF. Los transcritos obtenidos por síntesis *in vitro* del ARN viral, se utilizaron para infectar plantas de *N. benthamiana*, demostrando que ambos vectores virales son capaces de

establecer la infección local y sistémica generando síntomas similares a los provocados por PVX.

En tanto que en las plantas infectadas con el vector viral citoplasmático, los niveles de expresión de hEGF estuvieron por debajo del límite de detección del ensayo de ELISA (0,1 ng/g hoja), en las plantas infectadas con el vector viral apoplástico éstos alcanzaron el 0,015% TPS. Aunque estos niveles son inferiores al máximo alcanzado en las plantas transgénicas nucleares, nuevamente se observó el efecto positivo de enviar a hEGF a la vía de secreción.

El material infectado de esta primera inoculación de *N. benthamiana*, se utilizó para infectar plantas de *N. tabacum* cv Xanthi D8. Nuevamente ambos vectores fueron capaces de establecer la infección sistémica. Los niveles de expresión de hEGF en las plantas de *N. tabacum* infectadas con el vector viral apoplástico fueron similares a los observados en *N. benthamiana* (0,01 %TPS) y en las plantas infectadas con el vector viral citoplasmático continuaron debajo del límite de detección. Estos resultados permiten demostrar que el virus permanece infectivo y conserva la capacidad de expresar hEGF luego de este pasaje.

Una característica de las infecciones virales es su capacidad para desencadenar el mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional, una respuesta defensiva de la planta que termina por degradar los ARNm virales en forma específica, restringiendo así la infección. Por otra parte, muchos virus vegetales codifican proteínas que actúan inhibiendo este mecanismo, independientemente de que virus o secuencias lo hayan activado. La infección con estos virus permite prevenir esta respuesta o reactivar la expresión de secuencias previamente silenciadas. A fin de determinar si la ausencia de expresión en las plantas infectadas con el vector viral citoplasmático se debía al silenciamiento, se co-infectaron plantas de *N. tabacum* con los vectores virales y el virus PVY, que expresa la proteína supresora HC-Pro. No se observaron diferencias en los niveles de expresión entre las plantas infectadas sólo con los vectores virales y las co-infectadas con PVY. Sin embargo, los valores de hEGF cuantificados para estas plantas difirieron notoriamente de los observados en las primeras infecciones. En las plantas inoculadas con los vectores virales PVXAPEGF y PVXEGF, los niveles de expresión de hEGF alcanzaron un promedio de 0,12 % y 0,0011% TPS, respectivamente. Una explicación es que este aumento podría deberse a que en el transcurso de la infección, éstas plantas sufrieron accidentalmente estrés por frío.

Diversos trabajos publicados indican que existe una conexión entre el grado de infección viral y las respuestas al estrés abiótico en plantas. En particular, se ha observado la aparición de brotes epidémicos de enfermedades virales asociados a las bajas temperaturas, mientras que a altas temperaturas los síntomas virales suelen atenuarse. Dos trabajos recientes sugieren que estos mecanismos estarían asociados a una inhibición del silenciamiento a bajas temperaturas (Szittyá *et al*, 2003; Taliansky *et al*, 2004). En un segundo ensayo de co-infección con PVY, realizado en plantas de *N. benthamiana*, tampoco se observaron diferencias importantes entre las plantas infectadas con los vectores virales y las co-infectadas. No obstante, en las plantas co-infectadas los síntomas fueron claramente más severos (demostrando un efecto sobre la tasa de replicación viral), tanto que a los 20 d.p.i. éstas plantas habían muerto, mientras que las infectadas con uno sólo de los virus o vectores virales continuaban creciendo. Si los aumentos en los niveles de expresión de hEGF en las plantas que sufrieron estrés por frío se debieron a la supresión del silenciamiento, también deberían haberse observado en las co-infecciones con PVY. La resolución de esta discrepancia, implicaría la determinación fehaciente de las condiciones de estrés y un estudio completo de la producción de los ARN pequeños en estas plantas, lo cual está fuera del alcance de los objetivos de esta tesis. No obstante, estos resultados sugieren que los niveles de expresión hEGF en las plantas infectadas con los vectores virales, podrían incrementarse mediante la optimización de las condiciones de infección.

CARACTERIZACIÓN DEL hEGF EXPRESADO EN EL APOPLASTO DE PLANTAS DE TABACO.

El hEGF expresado en las plantas de *N. benthamiana* infectadas con el vector viral apoplástico PVXAPEGF y en las plantas transgénicas nucleares 208 y 319, transformadas con las versiones apoplásticas p35AP_LEGF y p35(L)APEGF respectivamente, se purificó parcialmente utilizando un protocolo para la extracción de péptidos pequeños a partir de las glándulas submaxilares de ratón. Este consistió en un paso inicial de extracción en *buffer* a pH 1, en el que hEGF es estable, un segundo paso de precipitación con una mezcla de etanol y eter etílico y un paso final de diálisis. En los extractos de las plantas 208 y 319, los rendimientos de la purificación fueron del 11

y 19 %, respectivamente. Aunque la mayor proporción del hEGF expresado se pierde durante el paso de precipitación, también lo hacen las proteínas totales, de modo tal que en los extractos dializados finales de las plantas 208 y 319, se logró purificar a hEGF 3,6 y 7 veces respectivamente, con relación al porcentaje de proteínas totales solubles inicial en las hojas procesadas. En las extracciones de hEGF a partir de hojas de *N. benthamiana* infectadas con el vector viral PVXAPEGF, el rendimiento final fue del 20 %, similar al obtenido para la planta 319, aunque la proteína recombinante se logró purificar hasta 15 veces respecto de los valores iniciales en el tejido infectado. Estos resultados indican que este protocolo de purificación puede optimizarse para lograr mejores rendimientos.

Los extractos dializados de las plantas transgénicas 208 y 319 y de las plantas infectadas con el vector viral PVXAPEGF, se utilizaron para evaluar la actividad biológica del hEGF expresado, mediante dos ensayos distintos.

En el primer ensayo, se estudiaron las propiedades de unión del hEGF expresado en la planta 319 y en las plantas infectadas con el PVXAPEGF, a los receptores presentes en membranas de placenta humana. En ambos casos, las Kd calculadas a partir de las curvas de unión al receptor, obtenidas con el hEGF expresado en plantas, fueron similares a las calculadas con los controles de hEGF de origen comercial.

En el segundo ensayo, se evaluó la capacidad del hEGF expresado en plantas, de inducir la expansión *in vitro* de las células del *cumulus* de ovocitos bovinos aislados. Tanto los extractos de las plantas 208 y 319 como de las plantas infectadas con PVXAPEGF estimularon la expansión de forma comparable al hEGF de origen comercial y a la hormona FSH. Este efecto es específico de hEGF, puesto que la incubación con extractos de plantas no transformadas y plantas infectadas con el virus PVX no mostraron ningún efecto.

Estos dos ensayos demuestran que el hEGF expresado en las plantas transgénicas de tabaco y en las plantas infectadas con el vector viral apoplástico posee actividad biológica comparable a la del hEGF recombinante de origen comercial.

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN CLOROPLASTOS DE TABACO

En la segunda etapa de este trabajo se exploró la transformación de cloroplastos como un sistema alternativo para la expresión de proteínas recombinantes en tabaco. Una de las características de los plástidos vegetales es que poseen un genoma reducido con una organización genética conservada y con regiones intergénicas bien definidas en las que pueden insertarse las secuencias de interés por recombinación homóloga. Como cada célula fotosintética posee cientos de cloroplastos, cada uno de ellos altamente poliploide, una vez alcanzada la homoplastía, es decir el estado en el cual virtualmente todos los cloroplastos están transformados, cada célula tendrá múltiples copias del transgén, que pueden conducir a altos niveles de expresión de la proteína recombinante. La técnica de transformación por recombinación homóloga permite además introducir, modificar o eliminar genes endógenos a fin de realizar estudios sobre el funcionamiento, fisiología y regulación genética en estas organelas.

Con la idea de implementar esta técnica en el laboratorio, se construyeron dos plásmidos para la transformación de cloroplastos de tabaco, pBSWGUS y pBSWUTRGUS, en los que el gen *uidA* puede reemplazarse por el gen de interés utilizando los sitios únicos de clonado Nde I y Xba I. Estos plásmidos se diseñaron de forma tal que la construcción se integre por recombinación homóloga, en la región intergénica de las secuencias del ARN ribosomal 16S y el ARN de transferencia para isoleucina, en las regiones repetidas invertidas del genoma plástidico de tabaco. En el pBSWGUS, las secuencias *aadA* y *uidA*, forman un operón bajo el control transcripcional del promotor Prn y el terminador del gen *rps16* plástidicos. El pBSWUTRGUS es una versión modificada del pBSWGUS, en la cual se incorporó la secuencia 5' UTR y el promotor del gen *psbA*, entre *aadA* y *uidA*. La introducción de secuencias 5' UTR, que facilitan el acceso del ribosoma al codón de iniciación en forma directa o indirectamente a través de la unión a distintos factores reguladores, es una estrategia ampliamente utilizada para incrementar los niveles de expresión en cloroplastos (Stern *et al.*, 1997; Maliga, 2003; Monde *et al.*, 2000; Somanchi y Mayfield, 1999; Zerges, 2000). La secuencia 5' UTR de *psbA*, posee elementos que se ha demostrado estabilizan el ARNm y aumentan la tasa de traducción de la secuencia clonada hacia río abajo (Eibl *et al.*, 1999; Hirose y Sugiura, 1996; Zou *et al.*, 2003).

Ambos plásmidos se utilizaron para la puesta a punto de la técnica de transformación de cloroplastos de tabaco por biobalística. La construcción de estos plásmidos y la puesta a punto de la transformación, se realizó en forma conjunta con la Lic. María Eugenia Segretín. En cambio la caracterización de las plantas transformadas y el análisis de la expresión de la β -glucuronidasa (GUS) fue realizada totalmente por María Eugenia y forma parte de su trabajo de doctorado. Brevemente, las plantas transformadas con ambos vectores se analizaron por PCR y *Southern blot* y se detectó la expresión de la β -glucuronidasa, siendo ésta mayor en las plantas transformadas con el pBSWUTRGUS.

Los plásmidos pBSWEGF y pBSWUTREGF se construyeron reemplazando la secuencia *uidA* por *hegf* en los plásmidos pBSWGUS y pBSWUTRGUS, respectivamente. Como al momento del bombardeo con estos plásmidos, aún no habíamos establecido los parámetros para la transformación de cloroplastos, los primeros análisis se hicieron con un elevado número de plantas, a pesar de que la inserción ocurre por recombinación homóloga y teóricamente todas las plantas transformadas con el mismo plásmido son similares una vez alcanzada la homoplastía. La integración de la construcción en el genoma plastídico se analizó por PCR en 45 y 29 plantas transformadas con los plásmidos pBSWEGF y pBSWUTREGF, respectivamente. Todas las plantas analizadas mostraron la presencia e integración de la construcción en el genoma plastídico. Algunas de estas plantas se sometieron a nuevas rondas de regeneración en medio selectivo para segregar los cloroplastos no transformados y tras 2 a 4 rondas de regeneración *in vitro* se transfirieron a tierra. La integración de *hegf* y la homoplastía, se demostraron en 7 plantas seleccionadas al azar, transformadas con el plásmido pBSWEGF y en 6 de las 7 transformadas con el plásmido pBSWUTREGF. La séptima planta (51) resultó no estar transformada a pesar de que regeneró en hasta cuatro rondas sucesivas en medio selectivo y que sus semillas germinaron normalmente en medio con espectinomicina, lo que indica que se trata de un mutante del gen 16S.

Aunque en general las plantas regeneradas en medio selectivo presentaban un fenotipo normal, algunas de ellas mostraron alteraciones morfológicas muy particulares, caracterizadas por hojas con nervaduras y bordes deformes o con sólo una mitad de la superficie foliar expandida. Estas deformaciones, que eran más frecuentes en las primeras rondas de regeneración, desaparecían cuando las plantas se pasaban a tierra y estaban ausentes en las plantas obtenidas al germinar semillas transplastómicas en

medio selectivo. Como este fenotipo se presentó en todas las plantas independientemente de la construcción utilizada en la transformación, en un principio se pensó que podía deberse a un efecto deletéreo de la inserción de las secuencias heterólogas sobre la expresión de los genes del operón de ARN ribosomales. Sin embargo, un trabajo publicado recientemente, demuestra que estas deformaciones se deben a la inhibición del desarrollo en aquellas células cuyos cloroplastos no poseen actividad traduccional (Alhert *et al.*, 2003). Los autores plantean la existencia de una señal dependiente de la actividad traduccional plastídica, que controla el desarrollo de la hoja. Como la espectinomicina actúa inhibiendo la traducción, en las plantas heteroplásticas que crecen en medio selectivo sólo se desarrollan aquellas células que poseen cloroplastos transformados dando lugar a las deformaciones observadas. Al transferir estas plantas a tierra, se quita la presión de selección y como este antibiótico no es letal, las células con cloroplastos no transformados pueden retomar el desarrollo, de modo tal que las hojas nuevas presentan un fenotipo normal. Las plantas obtenidas al germinar semillas transplastómicas y las plantas que han pasado por varias rondas de regeneración son virtualmente homoplásticas y por ello no presentan estas deformaciones.

En ninguna de las plantas transformadas con los plásmidos pBSWEGF o pBSWUTREGF se detectó expresión de hEGF, a pesar de que al menos pBSWUTREGF es capaz de dirigir la síntesis de esta proteína en *E. coli*. Esto no es sorprendente, puesto que, aunque algunos de los promotores plastídicos son reconocidos por la ADN polimerasa bacteriana, los sistemas de regulación de la expresión genética no son los mismos en estos sistemas.

A fin de estudiar las causas de la falta de expresión de hEGF, se evaluó en primer lugar, la presencia de los ARNm para esta proteína, en las plantas transformadas. Los ensayos de *Northern blot* demostraron que la secuencia *hegf* se transcribe a partir de los promotores PpsbA, y Prn, generando los ARNm esperados en todas las plantas analizadas. Además, la edición de los ARNm para hEGF se descartó al secuenciar el ADN copia, obtenido por RT-PCR a partir de extracciones del ARN total de dos plantas distintas (14 y 46), transformadas con el plásmido pBSWUTREGF. Estos resultados coinciden con los observados para la expresión de las subunidades α y β de la hemoglobina humana (Hb) en cloroplastos de tabaco (Magee *et al.*, 2004). Al igual que en el caso de hEGF, el plásmido de transformación dirigió la síntesis de la Hb en *E. coli*

y se detectaron los ARNm en las plantas transformadas. Sin embargo, no se observó la expresión de la proteína recombinante en los cloroplastos.

La regulación de la expresión genética en los cloroplastos, se produce principalmente en la etapa de iniciación de la traducción y por degradación proteolítica de subunidades no ensambladas y proteínas fotodañadas (Choquet y Wollman, 2002; Rochaix, 2001). La iniciación de la traducción del gen *psbA* en cloroplastos está regulada positivamente por la luz, mediante la unión a la secuencia 5' UTR de al menos un factor activador de la traducción. El mecanismo de activación en *C. reinhardtii* y aparentemente también en tabaco, implica la transferencia de electrones desde el fotosistema I, a través de una cadena de óxido-reducción, a la proteína activadora cPABP, (un homólogo plastídico de la proteína citoplasmática de unión a las secuencias de poliadeninas), que en su estado reducido se une a un tracto de adeninas (*AU box*) en la región 5' UTR del gen *psbA*, facilitando el acceso del ribosoma a la secuencia RBS. (Figura D1, Kim y Mayfield, 1997). De acuerdo a este mecanismo, se observó que la expresión de la seroalbúmina humana (HSA) al utilizar esta secuencia 5'UTR, se incrementó con el tiempo de incubación de las plantas en condiciones de luz (Fernández-San Millán *et al*, 2003). Teniendo en cuenta estas observaciones, se analizó la presencia de hEGF en hojas de las plantas transformadas con el plásmido pBSWUTREGF luego de 16 horas de iluminación continua. Sin embargo, tampoco se detectó la producción de hEGF en estas condiciones.

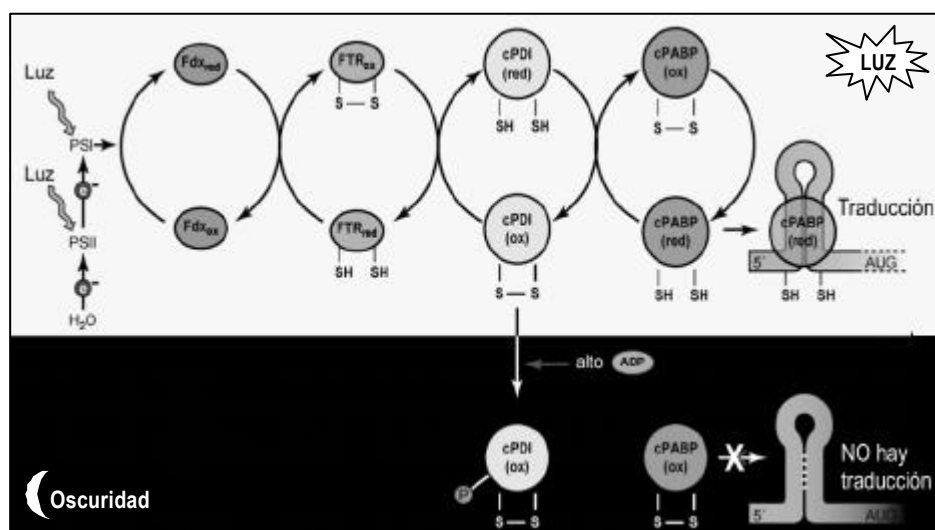


Figura D1. Mecanismo de activación de la traducción del gen *psbA* en *C. reinhardtii*. La traducción se activa por la unión de la proteína cPABP reducida, a la secuencia 5' UTR de *psbA*. La regulación de cPABP se produce por el estado oxidativo del cloroplasto y por la concentración de ADP, a través de la

fosforilación de la cPDI. PSI y PSII: fotosistemas I y II respectivamente; Fdx: ferredoxina; FTR: ferredoxina-tioredoxina reductasa; cPDI: homólogo plastídico de la disulfuro isomerasa del RE; cPABP: homólogo plastídico de la proteína de unión a secuencias de poliadeninas citoplasmática; ox: oxidado; red: reducido. Tomado de Spremulli, 2000.

Sobre la base de trabajos publicados, en los que se demostró que la fusión de la proteína recombinante a los primeros 14 aminoácidos de GFP (Ye *et al*, 2001) o a las proteínas plastídicas codificadas por los genes *rcbL* y *atpB* (Kuroda y Maliga, 2001) producen aumentos en los niveles de expresión, se decidió ensayar la fusión de hEGF a distintas secuencias. Se construyeron dos nuevos plásmidos, derivados del pBSWUTRGUS, en los que *uidA* se reemplazó por la fusión de *hegf* a la secuencia HISXa, que codifica un tracto de seis histidinas y el tetrapéptido reconocido por el factor Xa (pBSWHISE), o por la fusión de *hegf* a las secuencias que codifican los primeros 186 aminoácidos de la β -glucuronidasa y el pentapéptido reconocido por la enteroquinasa (pBSWGEKE). Estas secuencias se eligieron porque, en primer lugar, en las plantas transformadas con los plásmidos pLDGra4 y pLDHISGra4, la proteína Gra4 de *T. gondii* sólo se detectó cuando se fusionó al tracto de histidinas, y porque la expresión de la β -glucuronidasa en cloroplastos, ya se había probado con el plásmido pBSWUTRGUS. Por tanto, el entorno 5' de *uidA*, parecería ser el adecuado para el inicio de la traducción.

Aunque nuevamente se detectó la expresión de las fusiones en *E. coli*, no se detectó hEGF en ninguna de las plantas transformadas con el plásmido pBSWHISE, y en las plantas transformadas con el plásmido pBSWGEKE, los niveles de expresión de la fusión alcanzaron apenas el 0,001% TPS, a pesar de que en ambos casos los niveles de transcripción fueron altos.

Aunque una inhibición del inicio de la traducción en las plantas analizadas no puede descartarse completamente, ésta no parece ser la causa principal de la ausencia de expresión de hEGF puesto que, en primer lugar, la secuencia 5' UTR del gen *psbA* fue utilizada con éxito para la expresión de otras proteínas en cloroplastos, y segundo, porque los cambios en las secuencias 5' fusionadas a *hegf* no implicaron cambios significativos en los niveles de expresión.

Se planteó entonces una nueva hipótesis que sugiere que el hEGF es sintetizado, pero rápidamente degradado en el estroma plastídico. Existen en los cloroplastos al menos cinco tipos de proteasas diferentes con homólogos en *E.coli*, de las cuales las

mejor caracterizadas son Clp, FtsH y DegP. Cada una posee múltiples isómeros cuyas funciones aún no se han establecido totalmente. En particular, el estudio de la Clp plastídica, sugiere que esta serina proteasa estaría implicada en el reciclado general de proteínas en el estroma (Halperin *et al*, 2001; Peltier *et al*, 2004; Porankiewicz *et al*, 1999; Zheng *et al*, 2002), lo que la transforma en una buena candidata responsable de la degradación de hEGF. Para una primera aproximación al análisis de la actividad proteolítica plastídica, se realizaron una serie de ensayos de degradación *in vitro* de hEGF incubándolo con extractos de cloroplastos, en distintas condiciones.

Las primeras observaciones demostraron que el hEGF recombinante comercial es estable cuando se lo incubaba a 26°C, en un *buffer* a pH 8. Sin embargo, cuando se incubó hEGF en un extracto de cloroplastos lisados, sólo el 18 % del hEGF inicial se detectó luego de 2 horas en luz, demostrando que existe un efecto de estos extractos sobre hEGF. Como Clp está compuesta por una subunidad reguladora cuya función es desplegar las proteínas en forma dependiente de la hidrólisis de ATP para que estas sean degradadas por la subunidad proteolítica, se estudió el efecto de agregar Mg-ATP en los ensayos *in vitro*. A diferencia de lo esperado, más del 70 % del hEGF inicial se detectó luego de dos horas de incubación en los extractos de cloroplastos que contenían ATP, lo que indica que éste no sólo no activó la degradación, sino que al contrario, ejerció un efecto protector. Estos mismos resultados se observaron en un ensayo con la fusión GEKE sintetizada en *E. coli*. Estas observaciones sugieren que, en principio, Clp no estaría implicada directamente en la degradación de hEGF, aunque no puede descartarse que ejerza una acción conjunta con otros factores. Otra opción es que hEGF sea degradado por alguna proteasa no dependiente de ATP. De éstas, la mejor caracterizada es DegP, cuyos isómeros se encuentran asociados a las membranas tilacoides del lado luminal y del estroma. La única función caracterizada del isómero DegP2, que se ubica del lado del estroma, es iniciar la degradación de la proteína D1 fotodañada (Adam y Clarke, 2002). Se observó que las proteínas de los complejos fotosintéticos son traducidas por ribosomas asociados a las membranas tilacoides y se sugiere que esta asociación esta determinada por las características de las secuencias 5'UTR, como la del gen *psbA*, utilizada en los plásmidos derivados del pBSWUTRGUS y que precisamente codifica la proteína D1. Si DegP2 estuviera implicada en la degradación del hEGF apenas este se sintetizara en las cercanías de las membranas tilacoides, esta hipótesis no permitiría explicar los bajos niveles de expresión en las plantas transformadas con

pBSWEGF, que no posee la secuencia 5' UTR de *psbA*, o la degradación del hEGF incorporado en los ensayos *in vitro*, sugiriendo nuevamente la presencia de otro mecanismo o combinación de mecanismos responsables de la baja expresión de hEGF.

Dado que la fotosíntesis es la función preponderante de los cloroplastos, no es sorprendente que la luz ejerza un fuerte efecto sobre la regulación general de la expresión genética en estas organelas, a través de los cambios en el estado oxidativo y de la relación ATP/ADP. Aunque los extractos de cloroplastos no se prepararon con la idea de conservar fotosistemas activos, la observación de que éstos pasaban de un color verde brillante al inicio de los ensayos *in vitro* a un tono amarronado luego de las dos horas de incubación en luz, sugirió un cambio en el estado oxidativo del extracto. Se probó entonces repetir los mismos ensayos, pero ahora comparando la incubación en luz y oscuridad. Así, en los extractos incubados en oscuridad, se observó que la degradación era inhibida, independientemente del agregado de ATP. Estos resultados sugieren que en los extractos de cloroplastos se conservan parte o la totalidad de las membranas tilacoides y que la exposición a la luz está generando poder reductor que afectaría, en forma directa o indirecta, la estabilidad de hEGF. La degradación de hEGF podría deberse a la acción de una proteasa activada por la luz, a la reducción de los puentes disulfuro presentes en hEGF (lo que provocaría un cambio conformacional que lo haría susceptible a la degradación proteolítica) o bien a una combinación de ambos mecanismos. De acuerdo con estos resultados, se cuantificó la expresión de hEGF en las plantas transplastómicas incubadas en oscuridad durante 48 horas. Aunque en las plantas transformadas con los plásmidos pBSWUTREGF y pBSWHISE, hEGF continuó debajo del límite de detección del ELISA, en las plantas transformadas con el plásmido pBSWEGF, se detectaron niveles de hasta un 0,00004 % TPS, que aunque bajos, muestran claramente un efecto positivo de la incubación en oscuridad. En las plantas transformadas con pBSWGEKE, los niveles de hEGF se incrementaron de un 0,001% (luz) a un 0,003% (oscuridad).

Estos resultados fueron inesperados, puesto que, como se mencionó, la secuencia 5' UTR de *psbA* inactiva la traducción en oscuridad. Una observación importante es que la proteína que reduce a cPABP (el factor activador de la traducción de *psbA*, Figura D1), es un homólogo plastídico (cDPI) de la disulfuro isomerasa responsable de la formación de los puentes disulfuro en el RE y por tanto un factor crucial en la estabilización del hEGF secretado en las plantas transgénicas nucleares. Una hipótesis

es que en condiciones de luz, la cDPI o alguna de las tiorredoxinas plastídicas (que funcionan como activadoras de otras proteínas por cambios en su estado oxidativo), podrían ser las responsables de la reducción de hEGF que lo haría susceptible a la degradación proteolítica.

La acción protectora del ATP podría explicarse porque podría activar alguna chaperona, o por cambios en la actividad de la cDPI que, se ha observado, es inhibida en oscuridad por fosforilación mediada por ADP y por fosforilación *in vitro* en extractos proteicos de *C. reinhardtii*, por el agregado de Mg-ATP (Kim y Mayfield, 1997).

Es probable entonces que la regulación de la expresión de hEGF en los cloroplastos sea el resultado de la interacción compleja entre el nivel de activación de la traducción dado por la secuencia 5' UTR de *psbA* en luz y el efecto del estado oxidativo del cloroplasto sobre la estructura de hEGF, que podría o no estar asociado a la acción de proteasas y chaperonas. Estos efectos antagónicos explicarían las diferencias observadas entre las plantas transformadas con cada plásmido. Así en las plantas transformadas con el pBSWEGF, que no posee la secuencia 5' UTR, los niveles de traducción basal son de por sí bajos. Esto coincide con las observaciones hechas en *E. coli* y en las plantas transformadas con el plásmido pBSWGUS. Cuando estas plantas son puestas en oscuridad, se atenúa el efecto del poder reductor sobre la estabilidad del hEGF sintetizado. En las plantas transformadas con los plásmidos pBSWUTREGF y pBSWHISE, aunque en oscuridad hEGF sería más estable, se inhibe la traducción a partir del 5'UTR y este efecto antagónico termina por dar una tasa de expresión nula. Sin embargo, es probable que este equilibrio pueda modificarse si se varían los tiempos entre los pasajes de luz a oscuridad, puesto que en algunas plantas individuales, especialmente en una de las transformadas con el plásmido pBSWHISE, se observó una baja expresión de hEGF luego del período de oscuridad.

Asimismo, es evidente que la fusión GEKE es más estable, tanto en luz como en oscuridad. Nuevamente no puede descartarse un posible efecto conjunto de la estabilización de la proteína por la fusión y una mayor tasa de traducción a partir del entorno del codón de iniciación de *uidA*.

Estas hipótesis podrían explicar en parte los resultados observados con bGH y los antígenos de *Toxoplasma gondii*, ya que de estas proteínas, sólo se logró expresar Gra 4, que es la única que no forma puentes disulfuro. Sin embargo, se ha documentado la expresión en cloroplastos de tabaco de la hormona de crecimiento humana (hGH),

que es muy similar en estructura a la bGH y que también forma puentes disulfuro (Staub *et al*, 2000).

La verificación de estas hipótesis requiere de un análisis exhaustivo de los posibles mecanismos implicados en la regulación de la expresión de hEGF en estas plantas. Aunque estos estudios superan los objetivos iniciales de esta tesis, se planea continuar los análisis probando la acción de inhibidores de proteasas, y agentes reductores y oxidativos en los ensayos *in vitro*, inhibidores de las cadenas de transporte de electrones (como el herbicida paraquat, que inhibe la reducción de la ferredoxina por el fotosistema I), en plantas y en los ensayos *in vitro*, así como el posible rol del ATP a través del uso de análogos no hidrolizables.

Los cloroplastos son organelas complejas que constituyen el eje fundamental del funcionamiento de los vegetales y son los principales responsables del continuo aporte de energía a los ecosistemas, a través de la transformación de la luz en energía química. Los complejos multiproteicos responsables de estas funciones son codificados por genes nucleares y plastídicos cuyas subunidades deben ensamblarse en una relación estequiométrica precisa. No es extraño entonces que los plástidos posean múltiples sistemas de regulación para conseguir la expresión coordinada de estas subunidades. La comprensión de estos mecanismos de regulación permitiría la optimización de la expresión de proteínas heterólogas en este sistema.

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran la dificultad para predecir el comportamiento de una proteína expresada en un sistema heterólogo. Aunque los vectores virales son teóricamente óptimos para la expresión de proteínas pequeñas como hEGF, los resultados de la infección con PVXEGF y PVXAPEGF, mostraron niveles de expresión por debajo de los obtenidos en las plantas transgénicas. Asimismo la expresión en cloroplastos resultó ser extremadamente baja, a pesar de que hEGF se expresa de rutina en sistemas procariotas, y no posee otras modificaciones postraduccionales aparte de la formación de puentes disulfuro, lo que lo transformaba en un candidato ideal para su expresión en un sistema plastídico.

La elección del sistema de expresión para una proteína recombinante, dependerá entonces de las necesidades de producción, de las facilidades para su purificación así como del estudio de las características de la proteína en sí y su posible interacción con los mecanismos reguladores del sistema elegido. Aún así, la optimización de la

producción en plantas, así como en cualquier otro sistema de producción, requerirá de la evaluación de múltiples variables.

DR FERNANDO BRAVO ALMONACID
DIRECTOR

SONIA ALEJANDRA WIRTH
TESISTA

BIBLIOGRAFÍA

1. **Adam Z. (1996).** Protein stability and degradation in chloroplasts. *Plant Molecular Biology*, 32: 773-783.
2. **Adam Z., & Clarke A. (2002).** Cutting edge of chloroplast proteolysis. *Trends in Plant Science*, 7: 451-456.
3. **Adam Z., & Oestersetzer, O. (2001).** Degradation of unassembled and damaged thylakoid proteins *Biochemical Society Transactions*, 4: 427-430.
4. **Alhert, D., Ruf, S., & Bock, R. (2003).** Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 100: 15730-15735.
5. **Arcalis, E., Marcel, S., Altmann, F., Kolarich, D., Drakakaki G., Fischer, R., Christou, P & Stoger E. (2004).** Unexpected deposition patterns of recombinant proteins in post-endoplasmic reticulum compartments of wheat endosperm. *Plant Physiology*, 136: 1-10.
6. **Artsaenko, O., Kettig, B., Fiedler, U., Conrad, U., & Düring, K. (1998).** Potato tubers as a biofactory for recombinant antibodies. *Molecular Breeding*, 4: 313-319.
7. **Azzoni A., Kusnadi A., Miranda E., & Nikolov Z. (2002).** Recombinant aprotinin produced in transgenic corn seed: extraction and purification studies. *Biotechnology and Bioengineering*, 80: 263-276.
8. **Bakker H, Bardor M, Molthoff JW., Gomord V, Elbers I, Stevens LH, Jordi W, Lommen A, Faye L, Lerouge P, & Bosch D. (2001).** Galactose extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 98: 2899-2904.
9. **Barkam, A., & Goldschmidt-Clermont, M. (2000).** Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie*, 82: 559-572.
10. **Baulcombe, D. (2002).** Viral suppression of systemic silencing. *Trends in Microbiology*, 10: 306-308.
11. **Baulcombe, D. (2004).** RNA silencing in plants. *Nature*, 431: 356-363.
12. **Berlanga Acosta J., & Mella Lizama C. (1998)** Some considerations on the physiological role of epidermal growth factor in relation to its pharmacological applications. *Biotechnología Aplicada*, 15: 141-148.
13. **Birch-Machin, I., Newell, C., Hibberd, J., & Gray, J. (2004).** Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability. *Plant Biotechnology Journal*, 2: 261-270.
14. **Bohmert, K., Balbo, I., Kopka, J., Mittendorf, V., Nawrath, C., Poirier, Y., Tischendorf, G., Trethewey, R. and Willmitzer, L. (2000).** Transgenic *Arabidopsis thaliana* plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up 4% of their fresh weight. *Planta*, 211: 841-845.
15. **Bock, R. (2000).** Sense from nonsense: How the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing *Biochimie*, 82: 549-557.
16. **Bock, R., & Khan, M. (2004).** Taming plastids for a green future. *Trends in Biotechnology*, 22: 311-318
17. **Borisjuk, N., Borisjuk, L., Logendra, S., Petersen, F., Gleba, Y. & Raskin, I. (1999).** Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nature Biotechnology*, 17: 466-469.
18. **Bravo-Almonacid, F. & Mentaberry, A. (1989).** Nucleotide cDNA sequence coding for the PVY^o coat protein. *Nucleic Acids Research*, 17: 4401.

19. **Bruick R., & Mayfield, S. (1999)** Light-activated translation of chloroplast mRNAs. *Trends in Plant Science*, 4:190-195.
20. **Bussmann L.E., Bussmann I.M., & Charreau E.H. (1996)**. Role of receptors for epidermal growth factor and insulin-like growth factors I and II in the differentiation of rat mammary glands from lactogenesis I to lactogenesis II. *Journal of Reproduction and Fertility*, 107: 307-314.
21. **Calamante G. (1998)**. Utilización del virus X de la papa como vector de expresión transitoria en plantas. *Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires*.
22. **Carpenter G. & Cohen S. (1979)**. Epidermal growth factor. *Annual Review of Biochemistry*, 48: 193-216.
23. **Carrillo C., Wigdorovitz A., Oliveros J., Zamorano P., Sadir A., Gómez N., Salinas J., Escribano J. & Borca M. (1998)**. Protective Immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *Journal of Virology*, 72: 1688-1690.
24. **Chadd H., & Chamow S. (2001)**. Therapeutic antibody expression technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 12:188-194.
25. **Chan, M., Lee, T., Chang, H. (1992)** Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Physiology*, 33: 577-580.
26. **Chargelegue D., Vine N. van Dolleweerd C., Drake P. & Ma J. (2000)** A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice. *Transgenic Research*, 9: 187-194.
27. **Chen X., Xu Z., Chen P., & Wong W. (2004)**. A novel two-stage continuous process for excretive expression of hEGF by recombinant *E. coli* JM101. *Process Biochemistry*, en prensa.
28. **Chikwamba R., Scott M., Mejía L., Mason H. & Wang K. (2003)** Localization of a bacterial protein in starch granules of transgenic maize kernels. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 100: 11127-11132.
29. **Choquet Y., Stern D., Wostrikoff K., Kuras R., Girard-Bascou J., & Wollman F. (1998)** Translation of cytochrome *f* is autoregulated through the 5' untranslated region of *petA* mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 95: 4380-4385.
30. **Choquet, Y., & Wollman F. (2002)** Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression. *FEBS Letters*, 529: 39-42
31. **Coego A., Vázquez R., Alfonso J., Coll Y., Pujol M., Menéndez E., López M., Molina P., Hernández L., Bencomo B., de la Riva G., & Selman G. (1996)**. Effect of promoter-stimulatory element combination on transient reporter gene expression in tobacco protoplast using PEG-treatment. *Biotecnología Aplicada*, 13: 147-152.
32. **Daniell, H., Streatfield, S. & Wycoff, K. (2001 a)**. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, 6: 219-226.
33. **Daniell, H., Muthukumar, B., & Lee, S. (2001 b)**. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Current Genetics*, 39: 109-116.
34. **Daniell H., Lee S., Panchal T., & Wiebe P. (2001 c)**. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly of functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *Journal of Molecular Biology*, 311: 1001-1009.
35. **Daniell, H., Khan, M., & Allison, L. (2002)** Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends in Plant Science*, 7: 84-91.

36. Daniell, H., Watson, J., Koya, V., & Leppla, S. (2004). Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop. *Vaccine*, 22: 4374-4384.
37. De Cosa, B., Moar, W., Lee, S-B., Miller, M., & Daniell, H. (2001). Overexpression of the *Bt cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnology*, 19: 71-74.
38. De Jaeger, G., Scheffer, S., Jacobs, A., Zambre, M., Zobell, O., Goossens, A., Depicker, A. & Angenon, G. (2002). Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nature Biotechnology*, 12: 1265-1268.
39. Decker E. & Reski R. (2004) The moss bioreactor. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 166-170.
40. Dellaporta S.L., Wood J., & Hicks J.B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reports*, 1: 19-21.
41. Desolme, B., Mévélec, M., Buzoni-Gatel D., & Bout, D. (2000) Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. *Vaccine*, 18: 2512-2521.
42. De Wilde, C., Peeters, K., Jacobs, A., Peck, I., & Depicker, A. (2002) Expression of antibodies and Fab fragments in transgenic potato plants: a case study for bulk production in crop plants. *Molecular Breeding*, 9: 271-282.
43. Diehn, S., De Rocher, J., & Green, P. (1996). Problems that can limit the expression of foreign genes in plants: lessons to be learned from B.t. toxin genes. *Genetic Engineering*, 18: 83-99.
44. Doran P. (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 199-204.
45. Drake, P., Chargelegue, D., Vine, N., Dolleweerd, C., Obregon, P., & Ma J. (2003). Rizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots. *Plant Molecular Biology*, 52: 233-241.
46. Dry, L. (2002). The Case for plant-made pharmaceuticals. *Bio News*, Biotechnology Industry Organization www.bio.org/pmp/index.asp
47. Duncanson, P., Terry, R., Smith J., & Hide G. (2001) High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *International Journal for Parasitology*, 31: 1699-1703.
48. Dus Santos M., Wigdorovitz A., Trono K., Ríos R., Franzone P., Gil F., Moreno J., Carrillo C., Escribano J., & Borca M. (2002). A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants. *Vaccine*, 20: 1141-1147.
49. Eibl C., Zou Z., Beck A., Kim M., Mullet J. & Koop H. (1999). *In vivo* analysis of plastid *psbA*, *rbcL* and *rpl32* UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. *Plant Journal*, 19: 333-345.
50. Emanuelsson O. & von Heijne G. (2001) Prediction of organellar targeting signals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1541: 114-119.
51. Evangelista, R., Kusnadi, A., Howard, J. & Nikolov, Z. (1998). Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant β -glucuronidase from transgenic corn. *Biotechnology Progress*, 14: 607-614.
52. Felsot, A. (2002). "Pharm farming" It's not your father's agriculture. *Agrochemical and Environmental News* Número 195 Washington State University, <http://aenews.wsu.edu>

53. **Fernández-San Millán, A., Mingo-Castel, A., Miller, M., & Daniell, H. (2003)** A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnology Journal*, 1: 71-79.
54. **Firek S., Draper J., Owen M., Gandecha A., Cockburn B., & Whitelam G. (1993)** Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures. *Plant Molecular Biology*, 23: 861-870.
55. **Fischer, R., Emans, N., Schuster, F., Hellwig, S. & Drossard, J. (1999b)**. Towards molecular farming in the future: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30: 109-112.
56. **Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. and Twyman R. (2004)**. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:152-158.
57. **Fischer, R., Twyman, R. & Schillberg, S. (2003)**. Production of antibodies in plants and their use for global health. *Vaccine*, 21:820-825.
58. **Fischer, R., Vaquero-Martin, C., Sack, M., Drossard, J., Emans, N. & Commandeur, U (1999 a)**. Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30: 113-116.
59. **Franklin S., & Mayfield S. (2004)**. Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 159-165.
60. **Gasdaska J., Spencer D., & Dickey L. (2003)**. Advantages of therapeutic protein production in the aquatic plant *Lemna*. *Bioprocessing Journal* www.bioprocessingjournal.com
61. **Gallie, D. (1998)**. Controlling gene expression in transgenics. *Current Opinion in Plant Biology*, 1:166-172.
62. **Ghosh S., Malhotra P., Lalitha P., Guha-Mukherjee S., & Chauhan V. (2002)** Expression of *Plasmodium falciparum* C-terminal region of merozoite surface protein (PfMSP1₁₉), a potential malaria vaccine candidate, in tobacco. *Plant Science*, 162: 335-343.
63. **Giddings, G (2001)**. Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 450-454.
64. **Giddings, G., Allison, G., Brooks, D. & Carter, A. (2000)** Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*, 18: 1151-1155.
65. **Gleba Y., Marillonnet S. & Klimyuk V. (2004)** Engineering viral expression vectors for plants: the “full virus” and the “deconstructed virus” strategies. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 182-188.
66. **Gomord V. & Faye L. (2004)**. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 171-181.
67. **Gruber V., Berna, P., Arnaud T., Bournat P., Clément C., Mison D., Olganier B., Philippe L., Theisen M., Baudino S., Bénicourt C., Cudrey C., Bloës C., Duchateau N., Dufour S., Gueguen C., Jacquet S., Ollivo C., Poncetta C., Zorn N., Ludevid D., Van Dorsselaer A., Verger R., Doherty A., Mérot B., & Danzin C. (2001)**. Large-scale production of therapeutic protein in transgenic tobacco plants: effect of subcellular targeting on quality of a recombinant dog gastric lipase. *Molecular Breeding*, 7: 329-340.
68. **Hager, M., & Bock, R. (2000)**. Enslaved bacteria as a new hope for plant biotechnologists *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 302-310.

69. **Halperin T., Oestersetzer O., & Adam Z. (2001).** ATP-dependent association between subunits of Clp protease in pea chloroplasts. *Planta*, 213: 614-619.
70. **Hamsa P., Kachroo P. & Chattoo B. (1998).** Production and secretion of biologically active human epidermal growth factor in *Yarrowia lipolytica*. *Current Genetics*, 33: 231-237.
71. **Hanahan D. (1985).** DNA Cloning. A practical approach Capítulo 1 Ed: Glover, D. IRL Press
72. **Haq, T., Mason, H., Clements, J. & Arntzen, C. (1995).** Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*, 268: 714-716.
73. **Hayes, R., Kudla, J., & Gruissem W. (1999).** Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation. *Trends in Biochemical Sciences*, 24: 199-202.
74. **Heifetz, P. (2000).** Genetic engineering of the chloroplast. *Biochimie*, 82: 655-666.
75. **Heo J-H., Won H., Kang H., Rhee S-K. & Chung B. (2002)** Purification of recombinant human epidermal growth factor secreted from the metalotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Protein Expression and Purification*, 24: 117-122.
76. **Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. (1994).** Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, 6: 271-277.
77. **Higo K-I., Saito Y., & Higo H. (1993).** Expression of a chemically synthesized gene for human epidermal growth factor under the control of cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic tobacco. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57: 1477-1481.
78. **Hirose T. & Sugiura M. (1996).** *Cis*-acting elements and *trans*-acting factors for accurate translation of chloroplast psbA mRNAs: development of an in vitro translation system from tobacco chloroplasts. *EMBO Journal*, 15: 1687-1695.
79. **Hood, E. (2002).** From green plants to industrial enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 279-283.
80. **Hondred D., Walker J., Mathews D., & Vierstra R. (1999).** Use of ubiquitin fusions to augment protein expression in transgenic plants. *Plant Physiology*, 119: 713-723.
81. **Hong S-Y., Kwon T-H., Lee J-H., Jang Y-S., & Yang M-S. (2002).** Production of biologically active hGM-CSF by transgenic plant cell suspension culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 763-767.
82. **Holsters M., de Waele D., Depicker A., Messer E., van Montagu M., & Schell J. (1978).** Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Molecular and General Genetics*, 163: 181-187.
83. **Hood E. (2004).** Where, oh where has my protein gone? *Trends in Biotechnology*, 22: 53-55.
84. **Hood, E., Witcher, D., Maddok, S., Meyer, T., Baszczynski, C., Bailey, M., Flynn, P., Register, J., Marshall, L., Bond, D., Kulisek, E., Kusnadi, A., Evangelista, R., Nikolov, Z., Wooge, C., Mehig, R., Hernan, R., Kappel, W., Ritland, D., Ping Li, C. & Howard, J. (1997).** Commercial production of avidin from transgenic maize: Characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molecular Breeding*, 3: 291-306.
85. **Hood, E., Woodard, S. & Horn, M (2002).** Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants-myths and realities. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 630-635.
86. **Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., & Fraley R.T. (1985).** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229-1231.

87. **Hou, B-K., Zhou, Y-H., Wan, L-H., Zhang Z-L., Shen, G-F., Chen, Z-H., & Hu, Z-M. (2002)** Chloroplast transformation in oilseed rape. *Transgenic Research*, 12: 111-114.
88. **Howarth G. & Shoubridge C. (2001)**. Enhancement of intestinal growth and repair by growth factors. *Current Opinion in Pharmacology*, 1: 568-574.
89. **Huang R., Lam E., Chen Y., Hackett J., Lam T., Liu D., Ma M., Siu K., Sivakesava S., Xu Z., Wong R. & Wong W. (1999)**. Human epidermal growth factor excreted by recombinant *Escherichia coli* K-12 has the correct N-terminus and is fully bioactive. *Process Biochemistry*, 35: 1-5.
90. **James E., Wang C., Wang Z., Reeves R., Shin J., Magnuson N., & Lee J. (2000)** Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein Expression and Purification*, 19: 131-138.
91. **Jiang L. & Sun S. (2002)** Membrane anchors for vacuolar targeting: application in plant bioreactors. *Trends in Biotechnology*, 20: 99-102.
92. **Jobling S., Jarman C., Teh M-M., Holmberg N., Blake C., & Verhoeven M. (2003)** Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nature Biotechnology*, 21: 77-80.
93. **Kapusta, J., Modelska, A., Figlerowicz, M., Pniewski T., Letellier, M., Lisowa, O., Yusibov, V., Koprowski, H., Plucienniczak, A. & Legocki, A. (1999)**. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus *FASEB Journal*, 13: 1796-1799.
94. **Kavanagh, T., Thanh, N., Lao, N., McGrath, N., Peter, S., Horváth, E., Dix, P., & Medgyesy, P. (1999)**. Homologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics*, 152: 1111-1122.
95. **Khoudi, H., Laberge, S., Ferrullo, J., Bazin, R., Darveau, A., Castonguay, Y., Allard, G., Lemieux, R., & Vézina, L. (1999)**. Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnology and Bioengineering*, 64: 135-143.
96. **Kim K-Y., Kwon S-Y., Lee H-S., Hur Y., Bang J-W. & Kwak S-S. (2003)**. A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweet potato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells. *Plant Molecular Biology*, 51: 831-838.
97. **Kim, J., & Mayfield, S. (1997)**. Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science*, 278: 1954-1957.
98. **Kleizen B., & Braakman, I. (2004)**. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology*, 16: 343-349.
99. **Korban S., Krasnyanski S., & Buetow D. (2002)**. Foods as production and delivery vehicles for human vaccines. *Journal of the American College of Nutrition*, 21: 212S-217S.
100. **Kuroda, H., & Maliga, P. (2001)** Sequences downstream of the translation initiation codon are important determinants of translation efficiency in chloroplasts. *Plant Physiology*, 125: 430-436.
101. **Kusnadi, A., Hood, E., Witcher, D., Howard J. & Nikolov, Z (1998)**. Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn. *Biotechnology Progress*, 14: 149-155.
102. **Kusnadi, A., Nikolov, Z. & Howard, J. (1997)**. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering*, 56: 473-484.
103. **Larrick, J. & Thomas, D. (2001)** Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 411-418.

104. **Larrick, J., Yu, L., Naftzger, C., Jaiswal, S., & Wycoff, K. (2001)** Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomolecular Engineering*, 18: 87-94.
105. **Lee J., Yoon C., Chung I., Lee Y., & Lee E. (2000)**. Scale-up process for expression and renaturation of recombinant human epidermal growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31:245-248.
106. **Lee J-H., Kim N-S., Kwon T-H., Jang Y-S., & Yang M-S. (2002)**. Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures. *Journal of Biotechnology*, 26: 205-211.
107. **Leister, D. (2003)**. Chloroplast research in genomic age. *Trends in Genetics*, 19: 47-56.
108. **Leite A., Kemper E., da Silva M., Luchessi A., Siloto R., Bonaccrosi E., El-Dorry H., & Arruda P. (2000)**. Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. *Molecular Breeding*, 6: 47-53.
109. **Lutz KA, Knapp JE, & Maliga P. (2001)**. Expression of *bar* in the plastid genome confers herbicide resistance. *Plant Physiology*, 125: 1585-1590.
110. **Ma J., Drake P., & Christou P., (2003)**. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, 4: 794-805.
111. **Ma, J., Hiatt, A., Hein, M., Vine, N., Wang, F., Stabila, P., van Dolleweerd, C., Mostov, K. & Lehner, T (1995)**. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*, 268: 716-719.
112. **Ma, J., Hikmat, B., Wycoff, K., Vine, N., Chargelegue, D., Yu, L., Hein, M. & Lehner, T. (1998)**. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nature Medicine*, 4: 601-606.
113. **Magee, A., Horvath, E., & Kavanagh, T. (2004)**. Pre-screening plastid transgene expression in *Escherichia coli* may be unreliable as a predictor of expression levels in chloroplast-transformed plants. *Plant Science*, 166: 1605-1611.
114. **Maliga, P. (2003)** Progress toward commercialization of plastid transformation technology. *Trends in Biotechnology*, 21: 20-28.
115. **Maliga, P. (2004)** Plastid transformation in higher plants. *Annual Review in Plant Biology*, 55: 289-313.
116. **Mascia P., & Flavell, R. (2004)**. Safe and acceptable strategies for producing foreign molecules in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 189-195.
117. **Mason, H., Ball, J., Shi, J., Jiang, X., Estes, M. & Arntzen, C. (1996)**. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 93: 5335-5340.
118. **Mason, H., Man-Kit Lam, D. & Arntzen, C. (1992)**. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 89: 11745-11749.
119. **Mason, H., Warzecha, H., Mor, T. & Arntzen, C (2002)**. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 324-329.
120. **Mc Cormick, A., Kumagai, M., Hanley, K., Turpen, T., Hakim, I., Grill, L., Tuse, D., Levy, S. & Levy R. (1999)**. Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 96: 703-708.

121. **Menassa R., Kennette W., Nguyen V., Rymerson R., Jevnikar A. & Brandle J. (2004)** Subcellular targeting of human interleukin-10 in plants. *Journal of Biotechnology*, 108: 179-183.
122. **Mévélec, M., Mercereau-Puijalon, O., Buzoni-Gatel D., Bourguin I., Chardes T., Dubremetz, J., Bout D. (1998)** Mapping of B epitopes in GRA4, a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* and protection studies using recombinant proteins administered by the oral route. *Parasitology and Immunology*, 20: 183-195.
123. **Miele, L. (1997)** Plant as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. *Trends in Biotechnology*, 15: 45-50.
124. **Miller, E., & Anderson M. (1999)** Uncoating the mechanisms of vacuolar protein transport. *Trends in plant Science*, 4: 46-48.
125. **Miller, W., Martial, J., & Baxter, J. (1980)** Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 255: 7521-7524.
126. **Modelska, A., Dietzschold, B., Sleysh, N., Fu, Z., Steplewsky, K., Hooper, D., Koprowsky, H. & Yusinov, V. (1998)**. Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 95: 2481-2485.
127. **Monde, R., Schuster, G., & Stern, D. (2000)** Processing and degradation of chloroplast mRNA *Biochimie*, 82: 573-582.
128. **Moon H., Kim H., Rhee S., Choi E. Kim I., & Hong S (2002)** Optimal strategy of pH control in the production of recombinant human epidermal growth factor by *Hansenula polymorpha* *Process Biochemistry*, 38: 487-495.
129. **Mor, T., Gomez-Lim, M. & Palmer, K. (1998)**. Perspective: edible vaccines a concept coming of age. *Trends in Microbiology*, 6: 449-453.
130. **Murashige, T. & Skoog F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 431
131. **Nadel J. & Burgel P. (2001)** The role of epidermal growth factor in mucus production. *Current Opinion in Pharmacology*, 1:254-258.
132. **Nigro, M., Gutierrez, A., Hoffer, A., Clemente, M., Kaufer, F., Carral, L., Martin V., Guarnera, E., & Angel, S. (2003)**. Evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. *Diagnostic in Microbiology and Infectious Diseases*, 47: 609-613.
133. **Nielsen, H., Lauemoller, S., Christiansen, L., Buus, S., Fomsgaard, A., & Petersen, E. (1999)**. Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. *Infection and Immunity*, 67: 6358-6363.
134. **Oh, K., Cheon, B., Cho, S., Truong, H., Ok, S., Jeung, J., Choi, J., Shin, J. (2003)** Expression of the bovine growth hormone alters the root morphology in transgenic tobacco plants. *Transgenic Research*, 12: 363-367.
135. **Orman B.O., Celnik R.M., Mandel A.M., Torres H.N., Mentaberry A.N. (1990)**. Complete cDNA sequence of a South American isolate of potato virus X. *Virus Research*, 16: 293-306.
136. **Outchkourov N., Peters J., de Jong J., Rademakers W. & Jongsma M. (2003)** The promoter-terminator of chrysanthemum *rbcS1* directs very high expression levels in plants. *Planta*, 216: 1003-1012.
137. **Padidam M. (2003)** Chemically regulated gene expression in plants *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 169-177.

138. **Parmenter, D., Boothe, J., van Rooijen, G., Yeung, E. & Moloney, M (1995).** Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Molecular Biology*, 29: 1167-1180.
139. **Peeters, K., De Wilde, C., De Jaeger, G., Angenon, G. & Depicker, A. (2001)** Production of antibodies and antibodies fragments in plants. *Vaccine*, 19: 2756-2761.
140. **Peltier J-B., Ripoll D., Friso G., Rudella A., Cai Y., Ytterberg J., Giacomelli L., Pillardy J., & van Wijk K. (2004).** Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 4768-4781.
141. **Pen, J., Verwoerd, T., van Paridon, P., Beudeker, R., van den Elzen, P., Geerse, K., Van der Klis, J., Versteegh, H., van Ooyen, A. & Hoekema, A. (1990).** Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Bio/Technology*, 11: 811-814, 1990.
142. **Peterson, R., & Arntzen C. (2004)** On risk and plant-based biopharmaceuticals *Trends in Biotechnology*, 22: 64-66.
143. **Ponstein, A., Bade, J., Verwoerd, T., Molendijk, L., Storms, J., Beudeker, R. & Pen, J. (2002)** Stable expression of phytase (phyA) in canola (*Brassica napus*) seeds: towards a commercial product. *Molecular Breeding*, 10: 31-44.
144. **Porankiewicz J., Wang J., & Clarke A. (1999)** New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Molecular Microbiology*, 32: 449-458.
145. **Raikhel N. & Chrispeels, M. (2000).** Protein sorting and vesicle traffic In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones, R.(eds.), American Society of Plant Physiologists.
146. **Rancé, I., Norre, F., Gruber V., & Theisen, M. (2002)** Combination of viral promoter sequences to generate highly active promoters for heterologous therapeutic protein over-expression in plants. *Plant Science*, 162: 833-842.
147. **Ramírez N., Ayala M., Lorenzo D., Palenzuela D., Herrera L., Doreste V., Pérez M., Gavilondo J., & Oramas P. (2002)** Expression of a single-chain Fv antibody fragment specific for the Hepatitis B surface antigen in transgenic tobacco plants. *Transgenic Research*, 11:61-64.
148. **Reddy VS, Leelavathi S, Selvapandiyan A, Raman R, Giovanni F, Shukla, V., Bhatnagar R. (2002).** Analysis of chloroplast transformed tobacco plants with cry1Ia5 under rice psbA transcriptional elements reveal high level expression of Bt toxin without imposing yield penalty and stable inheritance of transplastome. *Molecular Breeding*, 9: 259-269
149. **Richter, L., Thanavala, Y., Arntzen, C., & Mason, H (2000).** Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnology*, 18: 1167-1171.
150. **Rochaix J-D. (2001)** Posttranscriptional control of chloroplast gene expression. From RNA to photosynthetic complex. *Plant Physiology*, 125: 142-144.
151. **Roberts A.B., Lamb L.C., Newton D.L., Sporn M.B., De Larco J.E., & Todaro G.J. (1980)** Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences U S A.*, 77: 3494-3498.
152. **Roth, B., Pruss, G., & Vance, V. (2004)** Plant viral suppressors of RNA silencing *Virus Research*, 102: 97-108.

153. **Rougeot C., Rosinski-Chupin I., Mathison R., & Rougeon F. (2000)** Rodent submandibular gland peptide hormones and other biologically active peptides. *Peptides*, 21: 443-455.
154. **Ruf, S., Hermann, M., Berger, I., Carrer, H., & Bock, R. (2001).** Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature Biotechnology*, 19: 870-875.
155. **Ruggiero F., Exposito J., Bournat P., Gruber V., Perret S., Comte J., Olagnier B., Garrone R. & Theisen M. (2000)** Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Letters*, 469: 132-136.
156. **Sala, F., Rigano, M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A. & Castiglione, S (2003).** Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine*, 21: 803-808,
157. **Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning. A Laboratory manual, 2nd edition. Ed: Nolan, C. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
158. **Sardana, R., Zaman, A., Dudani, A., Tackaberry, E., Panahi, M., Narayanan, M., Ganz, P. & Altosaar, I. (2002).** Biological activity of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor is maintained in a fusion with seed glutelin peptide. *Transgenic Research*, 11: 521-531.
159. **Sidorov V., Kasten, D., Pang, S-Z., Hajdukiewicz, P., Staub, J., & Nehra, N. (1999).** Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker *The Plant Journal*, 19: 209-216.
160. **Scheller J., Gührs K-H., Grosse F., & Conrad U. (2001)** Production of Spider silk proteins in tobacco and potato. *Nature Biotechnology*, 19: 573-577.
161. **Schünmann P., Coia G., & Waterhouse P., (2002)** Biopharming the SimpliRED HIV diagnostic reagent in barley, potato and tobacco. *Molecular Breeding*, 2: 113-121.
162. **Sharp J., & Doran P. (2001)** Characterization of monoclonal antibody fragments produced by plant cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 73: 338-346.
163. **Sijmons, P., Dekker, B., Schrammeijer, B., Verwoerd, T., van den Elzen, P., & Hoekema, A. (1990).** Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology*, 8: 217-221.
164. **Simpson R., Smith J., Moritz R., O'Hare M., Rudland P., Morrison J., Lloyd C., Greco B., Burgess A., & Nice E. (1985)** Rat epidermal growth factor: complete amino acid sequence *European Journal of Biochemistry*, 153: 629-637.
165. **Sikdar, S., Serino, G., Chaudhuri, S., & Maliga, P. (1998)** Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* *Plant Cell Reports*, 18: 20-24.
166. **Sivakesava S., Xu Z., Chen Y., Hackett J., Huang R., Lam E., Lam T., Siu K., Wong R., & Wong W (1999).** Production of excreted human epidermal growth factor (hEGF) by an efficient recombinant *Escherichia coli* system. *Process Biochemistry*, 34: 893-900.
167. **Skarjinskaia, M., Svab, Z., & Maliga, P. (2003).** Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed Brassicacea *Transgenic Research*, 12: 115-122.
168. **Smith, M. & Glick, B. (2000).** The Production of antibodies in plants: An idea whose time has come? *Biotechnology Advances*, 18: 85-89.
169. **Somanchi, A., & Mayfield, S. (1999)** Nuclear-chloroplast signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 404-409.

170. **Spremluli, L.(2000)**. Protein synthesis, assembly and degradation. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones, R.(eds). American Society of Plant Physiologists.
171. **Stachelin, L., & Newcomb E.(2000)** Membrane structure and membranous organelles In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones, R.(eds.), American Society of Plant Physiologists.
172. **Staub J., Garcia B., Graves J., Hajdukiewicz P., Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schlittler M., Carroll J., Spatola, L., Ward, D., Ye, G., & Russell, D. (2000)**. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnology*, 18: 333-338.
173. **Stein. K., & Webber K. (2001)** The regulation of biologic products derived from bioengineered plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 308-311.
174. **Stern D., Higgs, D., & Yang, J. (1997)** Transcription and translation in chloroplasts *Trends in Plant Science*, 2:308-315
175. **Stöger, E., Sack, M., Fischer, R. &Christou, P. (2002)**. Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:161-166.
176. **Stöger, E., Vaquero, C., Torres, E., Sack, M., Nicholson L., Drossard, J., Williams, S., Keen, D., Perrin, Y., Christou, P., &Fischer, R. (2000)**. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFV antibodies. *Plant Molecular Biology*, 42: 583-590.
177. **Streatfield, S. & Howard, J. (2003)**. Plant-based vaccines. *International Journal of Parasitology*, 33:479-93.
178. **Sugiura M, & Takeda Y. (2000)**. Nucleic acid. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones, R.(eds), American Society of Plant Physiologists.
179. **Suzuki, Y. (2002)** Immunopathogenesis of Cerebral Toxoplasmosis *The Journal of Infectious Diseases*, 186:S234–S240.
180. **Szittyá, G., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Bánfalvi, Z., & Burgyán, J. (2003)**. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defense by the control of siRNA generation. *The EMBO Journal*, 22: 633-640.
181. **Tacket C & Mason H. (1999)** A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microbes and Infection*, 1:777-783.
182. **Tacket, C., Mason, H., Losonsky, G., Estes, M., Levine, M & Arntzen, C. (2000)**. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *Journal of Infectious Diseases*, 182: 302-305.
183. **Tacket, C., Mason, H., Losonsky, G., Clements, J., Levine, M. & Arntzen, C. (1998)**. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nature Medicine*, 4: 607-609.
184. **Taliansky, M., Kim, S., Mayo, M., Kalinina, N., Fraser, G., McGeachy, K., & Barker, H. (2004)**. Escape of a plant virus from amplicon-mediated RNA silencing is associated with biotic or abiotic stress. *The Plant Journal*, 39: 194-205.
185. **Tenter, A., Heckerötha A., & Weiss L. (2000)** *Toxoplasma gondii*: from animals to humans *International Journal of Parasitology*, 30: 1217-1258.
186. **Tewari K. (1986)** Purification and properties of chloroplast DNA polymerase. *Methods in Enzymology*, 118: 186-201.

187. **Thanavala, Y., Yang, Y-F., Lyons, P., Mason, H. & Arntzen, C (1995).** Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 92: 3358-3361.
188. **Thomas, B., van Deynze, A. & Bradford, K (2002).** Production of therapeutic proteins in plants. Publicación No 8078 de la Division of Agriculture and Natural Resources, University of California. <http://anrcatalog.ucdavis.edu>
189. **Tregoning J., Nixon, P., Kuroda, H., Svab, Z., Clare S., Bowe F., Fairweather N., Ytterberg J., van Wijk K., Dougan G., & Maliga P. (2003)** Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts *Nucleic Acid Research*, 31: 1174-1179.
190. **Triboush S.O., Danilenko N.G., & Davydenko O.G. (1998)** A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. *Plant Molecular Biology Reports*, 16: 183-189.
191. **Tu B. & Weissman J. (2004)** Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *The Journal of Cell Biology*, 164: 341-346.
192. **Twyman, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. & Fischer, R (2003).** Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*, 21: 570-578.
193. **Van Rooijen, G. & Moloney, M. (1995).** Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. *Biotechnology*, 13: 72-66.
194. **Velge-Roussel, F., Chardès, T., Mévélec, P., Brillard, M., Hoebeke, J., & Bout, D. (1994)** Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 66: 31-38.
195. **Velge-Roussel, F., Dimier-Poisson I, Buzoni-Gatel, D., & Bout, D. (2001)** Anti-SAG1 peptide antibodies inhibit the penetration of *Toxoplasma gondii* tachyzoites into enterocyte cell lines. *Parasitology*, 123: 225-233.
196. **Verwoerd T., Dekker B., & Hoekema A. (1989).** A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acid Research*, 17: 2362.
197. **Vieira da Silva, J., Garcia, A., Quintana Flores, V., Souza de Macedo, Z. & Medina-Acosta, E (2002).** Phytosecretion of enteropathogenic *Escherichia coli* pilin subunit A in transgenic tobacco and its suitability for early life vaccinology. *Vaccine*, 20: 2091-2101.
198. **Von Heijne, G. (1983)** Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites *European Journal of Biochemistry*, 133: 17-21.
199. **Von Heijne, G., & Abrahmsen, L. (1989)** Species-specific variation in signal peptide design *FEBS Letters*, 244: 439-446.
200. **Walmsley, A. & Arntzen, C. (2003).** Plant cell factories and mucosal vaccines. *Current Opinion in Biotechnology*, 14:145-150.
201. **Wang, X-G., Zhang, G-H., Liu, C-X., Zhang, Y-H., Xiao, C-Z. & Fang, R-X (2001).** Purified cholera toxin B subunit from transgenic tobacco plants possesses authentic antigenicity. *Biotechnology and Bioengineering*, 72: 490-494.
202. **Weihe, A., & Börner, T. (1999)** Transcription and the architecture of promoter in chloroplasts *Trends in Plant Science*, 4: 169-170.
203. **Wirth, S. (1999)** Producción del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) en plantas transgénicas de tabaco. Seminario de Licenciatura, *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*.

204. **Wirth, S., Calamante, G., Mentaberry, A., Bussmann, L., Lattanzi, M., Baraña, L. & Bravo-Almonacid F. (2004).** Expression of active human epidermal growth factor (hEGF) in tobacco plants by integrative and non-integrative systems *Molecular Breeding*, 13: 23-35.
205. **Wongsamuth R., & Doran, P. (1997).** Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotechnology and Bioengineering*, 54: 401-415.
206. **Woodard S., Mayor J., Bailey M., Barker D., Love R., Lane J., Delaney D., McComas-Wagner J., Mallubhotia H., Hood E., Dangott L., Tichy S & Howard J. (2003)** Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 38: 123-130.
207. **Ye G-N., Hajdukiewicz P., Broyles D., Rodriguez D., Xu C., Nehra N., & Staub J. (2001)** Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. *The Plant Journal*, 25: 261-270.
208. **Yoshida, K. & Shinmyo A. (2000).** Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90: 353-362.
209. **Yusibov, V., Hooper, D., Spitsin, S., Fleysh, N., Kean, R., Mikheeva, T., Deka, D., Karasev, A., Cox, S., Randall, J., & Koprowski, H (2002).** Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine*, 20: 3155-3164.
210. **Yusinov V., Modelska A., Steplewski K., Agadjahyan M., Weiner D., Hooper D., & Koprowski H. (1997)** Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 5784-5788.
211. **Zeitlin L., Olmsted S., Moench T., Sung Co M., Martinell B., Paradkar V., Russell D., Queen C., Cone R., & Whaley K. (1998)** A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nature Biotechnology*, 16: 1361-1364.
212. **Zerges, W. (2000)** Translation in chloroplasts *Biochimie*, 82: 583-601.
213. **Zheng B., Halperin T., Hruskova-Heidingsfeldova O., Adam Z., & Clarke A. (2002)** Characterization of chloroplast Clp proteins in *Arabidopsis*: localization, tissue specificity and stress responses. *Physiologia Plantarum*, 114: 92-101.
214. **Zhong G-Y., Peterson D., Delaney D., Bailey M., Witcher D., Register J., Bond D., Li C-P., Marshall L., Kulisek E., Ritland D., Meyer T., Hood E., & Howard J. (1999)** Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. *Molecular Breeding*, 5:345-356.
215. **Zou Z., Eibl C. & Koop H. (2003).** The stem-loop region of the tobacco psbA 5'UTR is an important determinant of mRNA stability and translation efficiency. *Molecular Genetics and Genomics*, 269: 340-349.