

Tesis Doctoral

# Optimización de la expresión de un amplicón viral basado en PVX en plantas de tabaco. Caracterización funcional de la proteína de 15 kDa del Garlic mite-borne filamentous virus

Bey, Paula

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bey, Paula. (2010). Optimización de la expresión de un amplicón viral basado en PVX en plantas de tabaco. Caracterización funcional de la proteína de 15 kDa del Garlic mite-borne filamentous virus. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bey, Paula. "Optimización de la expresión de un amplicón viral basado en PVX en plantas de tabaco. Caracterización funcional de la proteína de 15 kDa del Garlic mite-borne filamentous virus". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Optimización de la expresión de un amplicón viral  
basado en PVX en plantas de tabaco**

**Caracterización funcional de la proteína de 15 kDa  
del *Garlic mite-borne filamentous virus***

**Tesis presentada para optar al título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Lic. Paula Bey**

Director: Dr. Alejandro N. Mentaberry  
Director asistente: Dra. Alicia M. Zelada  
Consejero de estudios: Dr. Jorge P. Muschietti

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular  
(INGEBI-CONICET).  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires  
(FCEyN-UBA)

Buenos Aires, 2010

Dedicado a mi familia. A mi papá, Jorge, a mi mamá, Norma, y a mis hermanas Ivanna y Andrea. ¡Gracias por su amor y apoyo incondicional!

<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>Summary</b>	<b>7</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>8</b>
<b>Introducción</b>	<b>10</b>
<b>Producción de proteínas de interés en sistemas vegetales</b>	<b>12</b>
<b>Ventajas particulares de los sistemas vegetales para la producción de vacunas</b>	<b>16</b>
<b>Vectores virales</b>	<b>18</b>
<b>Vectores de primera generación</b>	<b>21</b>
<b>Vectores de segunda generación</b>	<b>23</b>
<b><i>Potato virus X (PVX)</i></b>	<b>25</b>
<b>Vectores virales basados en el PVX</b>	<b>26</b>
<b>Silenciamiento génico post-transcripcional</b>	<b>28</b>
<b>Historia</b>	<b>28</b>
<b>Mecanismo molecular</b>	<b>30</b>
<b>Supresión del silenciamiento</b>	<b>35</b>
<b>Utilidad de los supresores del silenciamiento en <i>molecular farming</i></b>	<b>36</b>
<b>Expresión estable de vectores virales en plantas transgénicas</b>	<b>37</b>
<b>Sistemas de expresión inducibles</b>	<b>38</b>
<b>Objetivos</b>	<b>40</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>41</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>41</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>42</b>
<b>1. Cepas bacterianas</b>	<b>43</b>
<b>1.1. <i>Escherichia coli</i></b>	<b>43</b>
<b>1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	<b>44</b>
<b>2. Material vegetal</b>	<b>44</b>
<b>3. Aislamientos virales</b>	<b>45</b>
<b>3.1. <i>Potato virus X (PVX)</i></b>	<b>45</b>
<b>3.2. <i>Potato virus Y (PVY)</i></b>	<b>45</b>
<b>4. Plásmidos</b>	<b>45</b>
<b>5. Técnicas de ADN recombinante</b>	<b>47</b>
<b>5.1. Aislamiento de ADN plasmídico</b>	<b>47</b>
<b>5.2. Preparación de plásmidos e insertos de ADN</b>	<b>48</b>
<b>5.3. Reacciones de ligación de ADN</b>	<b>49</b>
<b>5.4. Recombinación mediante el sistema <i>Gateway</i></b>	<b>50</b>

<b>6. Infección controlada de plantas de <i>N. tabacum</i></b>	<b>51</b>
<b>6.1. Inoculación de plantas con extractos vegetales infectados por PVY o PVX</b>	<b>51</b>
<b>6.2. Ensayos de agroinfiltración</b>	<b>51</b>
<b>7. Transformación de plantas de tabaco mediada por <i>A. tumefaciens</i></b>	<b>51</b>
<b>7.1. Protocolo de transformación</b>	<b>52</b>
<b>7.2. Protocolo de rusticación</b>	<b>53</b>
<b>8. Esterilización y germinación de semillas de tabaco <i>in vitro</i></b>	<b>53</b>
<b>9. Análisis de ADN</b>	<b>53</b>
<b>9.1. Aislamiento de ADN de plantas de tabaco para análisis por PCR</b>	<b>53</b>
<b>9.2. Análisis por PCR de plantas transformadas</b>	<b>54</b>
<b>10. Análisis de ARN</b>	<b>56</b>
<b>10.1. Extracción del ARN total de plantas de tabaco</b>	<b>56</b>
<b>10.2. Ensayos de <i>Northern blot</i></b>	<b>56</b>
<b>11. Análisis de proteínas</b>	<b>59</b>
<b>11.1. Extracción de proteínas</b>	<b>59</b>
<b>12. Electroforesis de proteínas</b>	<b>60</b>
<b>12.1. Geles de poliacrilamida-SDS</b>	<b>60</b>
<b>12.2. Tinción con <i>Coomasie Brilliant Blue</i></b>	<b>60</b>
<b>12.3. Ensayo de <i>Western blot</i></b>	<b>60</b>
<b>13. Ensayos de band shift</b>	<b>61</b>
<b>13.1. Marcación de oligonucleótidos</b>	<b>61</b>
<b>13.2. Purificación de oligonucleótidos marcados con radioisótopos</b>	<b>62</b>
<b>13.3. Extracción de proteínas</b>	<b>62</b>
<b>13.4. Ensayos de unión entre proteínas y ácidos nucleicos</b>	<b>63</b>
<b>Resultados y discusión</b>	<b>64</b>
<b>Capítulo I</b>	<b>65</b>
<b>Obtención y caracterización de líneas de <i>N. tabacum</i> que expresan un amplicón basado en el <i>Potato virus X</i> en forma constitutiva</b>	<b>65</b>
<b>Desarrollo del amplicón viral inducible pX6-PVX</b>	<b>72</b>
<b>Desarrollo de los amplicones virales inducibles defectivos pX6-PVX-<math>\Delta</math>TB-GFP, pX6-PVX-CPd-GFP y pX6-PVX-<math>\Delta</math>TB-CPd-GFP</b>	<b>76</b>
<b>Discusión I</b>	<b>80</b>
<b>Capítulo II</b>	<b>84</b>
<b>Identificación de un nuevo supresor del PTGS codificado por un virus del género <i>Allexivirus</i></b>	<b>84</b>
<b>Discusión II</b>	<b>109</b>
<b>Capítulo III</b>	<b>112</b>
<b>Desarrollo de un sistema de expresión basado en la supresión del PTGS</b>	<b>112</b>

<b>Expresión transitoria del epítoto A del FMDV a partir de la construcción pX6-PVX-2aA</b>	<b>115</b>
<b>Caracterización de plantas de tabaco transformadas con el amplicón PVX-2aA</b>	<b>118</b>
<b>Discusión III</b>	<b>121</b>
<b>Referencias</b>	<b>126</b>

# Optimización de la expresión de un amplicón viral basado en PVX en plantas de tabaco

## Caracterización funcional de la proteína de 15 kDa del *Garlic mite-borne filamentous virus*

### Resumen

Con el objetivo de optimizar la producción de proteínas heterólogas en plantas se desarrolló un sistema de expresión basado en un amplicón derivado del genoma del PVX. Se diseñaron distintos amplicones virales que permiten la expresión, tanto constitutiva como inducible, de proteínas recombinantes. La utilización del amplicón constitutivo permitió obtener, por primera vez, plantas transgénicas que sobreexpresan altos niveles de proteínas virales. Además, se logró expresar exitosamente GFP a partir de un amplicón inducible, tanto en ensayos de expresión transitoria como en plantas transgénicas.

Uno de los problemas que dificultan la producción de proteínas de interés en plantas utilizando vectores virales es el establecimiento de respuestas de silenciamiento génico postraduccional (PTGS) en respuesta a la replicación viral. Para intentar superar esta dificultad, se propuso co-expresar un amplicón viral junto con una proteína supresora del PTGS.

Se caracterizó la actividad de una nueva proteína supresora del PTGS, la proteína 15K codificada en el genoma del *Garlic mite-borne filamentous virus* (GmbFV). Si bien esta proteína muestra una actividad supresora débil en plantas silenciadas por agroinfiltración con transgenes u horquillas de silenciamiento, presenta la ventaja de no producir fenotipos aberrantes en plantas transgénicas. Mediante la co-agroinfiltración con construcciones que expresan la proteína 15K y el amplicón PVX-2aA (amplicón que expresa el epítipo 2aA del virus de aftosa) se lograron obtener altos niveles de una fusión del epítipo de interés a la cápside viral en plantas de *Nicotiana benthamiana* en un corto período de tiempo. Este resultado sugiere que es posible generar sistemas estables que permitan obtener altos niveles de expresión mediante el cruzamiento entre plantas transgénicas que expresen la proteína supresora 15K y amplicones de interés.

**Palabras clave:** PTGS, plantas transgénicas, proteínas supresoras, amplicones, vectores virales, PVX, agroinfiltración.

# **Optimization of the expression of a PVX-based viral amplicon in tobacco plants**

## **Functional characterization of the 15 kDa protein from *Garlic mite-borne filamentous virus***

### **Summary**

In order to optimize the production of heterologous proteins in plants, an expression system based on the PVX genome has been developed. Several viral amplicons have been designed with the purpose of expressing recombinant proteins, either constitutively or in an inducible manner. The use of constitutive amplicons led, for the first time, to the generation of transgenic plants which over-express high levels of viral proteins. Moreover, GFP protein was successfully expressed from an inducible amplicon, both in transient expression assays and in transgenic plants.

One of the problems that hinder the production of heterologous proteins using plant viral vectors is the establishment of post-transcriptional gene silencing (PTGS) in response to viral replication. In an attempt to overcome this restriction, the co-expression of PTGS-suppressor proteins and viral amplicons was explored.

The 15K protein of *Garlic mite-borne filamentous virus* (GmbFV) has been characterized as a new PTGS-suppressor. Although this protein shows suppressor activity in agroinfiltration assays triggered by both transgenes or silencing hairpins, it has the advantage of avoiding the development of aberrant phenotypes in transformed plants. Co-agroinfiltration of the 15K protein and the PVX-2aA amplicon (harbouring the 2aA epitope of *Foot and mouth disease virus*) yielded high levels of a fusion comprising the epitope of interest and the PVX coat protein in *N. benthamiana*. This result suggest that stable expression systems could be developed by crossing of transgenic plants carrying the 15K suppressor protein and plant viral amplicons.

**Key words:** PTGS, transgenic plants, suppressor proteins, amplicons, viral vectors, PVX, agroinfiltration.



## Abreviaturas

μF	Microfaraday
μL	Microlitro
μM	Micrometro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Seroalbúmina bovina
c.p.s.	Cuentas por segundo
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
Ci	Curie
cm	Centímetro/s
CP	Proteína de la cápside
CSFV	<i>Classical swine fever virus</i>
CymRSV	<i>Cymbidium ringspot virus</i>
d	Día/s
D.O.	Densidad óptica
d.p.i.	Días post-infiltración / inoculación
dATP	Deoxiadenosina trifostato
dCTP	Deoxicitidina trifostato
dGTP	Deoxiguanosina trifostato
dNTPs	Desoxirribonucleóticos trifostato
dTTP	Deoxitimidina trifostato
dc	Doble cadena
DTT	Ditiotritol
EDTA	Ácido etilenediamintetra-acético
FMDV	<i>Foot and mouth disease virus</i>
g	Gramo/s
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GFP-IR	<i>Green fluorescent protein inverted repeats</i>
GmbFV	<i>Garlic mite-borne filamentous virus</i>
<i>gpf</i>	Gen que codifica la proteína de fluorescencia verde
h	Hora/s
HC-Pro	<i>Helper component-protease</i>
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus type 1</i>
IgG	Inmunoglobulina
IPTG	Isopropil-β-tio-galactopiranosido
kV	Kilovatio
L	Litro/s
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mg	Miligramo/s
miARN	Micro ARNs
min	Minuto/s
mL	Mililitro/s
mM	Milimolar
mmol	Milimol/es
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanesulfónico

mseg	Milisegundo/s
ng	Nanogramo/s
nm	Nanometro/s
nM	Nanomolar
nt	Nucleótido
nt	Nucleótidos
°C	Grados Celcius
ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pr sg	Promotor subgenómico
PTGS	<i>Post-transcriptional gene silencing</i> (silenciamiento génico post-transcripcional)
PVX	<i>Potato virus X</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
R.P.M.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
seg	Segundo/s
siARN	<i>Small interfering RNA</i> (ARN pequeño de interferencia)
sc	Simple cadena
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TGB	<i>Triple gene block</i>
U	Unidad
UV	Ultravioleta
V	Voltio
xg	x veces la gravedad
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
$\mu$ Ci	Microcurie

## **Introducción**

La creciente utilización de péptidos y proteínas terapéuticos en medicina humana y en medicina veterinaria, ha estimulado los esfuerzos para desarrollar nuevos sistemas de producción de moléculas recombinantes seguros y de bajo costo. La mayoría de las proteínas recombinantes comercializadas en la actualidad son producidas en células bacterianas o de mamíferos.

La fermentación bacteriana como sistema de producción presenta limitaciones asociadas con la expresión de proteínas animales en el entorno celular procariota. La ausencia de modificaciones post-traduccionales, el plegado incorrecto de las proteínas heterólogas y la formación de cuerpos de inclusión, limitan la obtención de productos biológicamente activos o cuyo costo de purificación y renaturalización sea económicamente viable (Twyman *et al.*, 2005).

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

Tanto la fermentación microbiana como los cultivos de células animales requieren de personal técnico especializado y, aún así, subsisten grandes riesgos de pérdidas económicas en caso de que ocurran contaminaciones en la línea de producción. En este contexto, la utilización de animales o plantas como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes se ha constituido en una alternativa prometedora frente a los sistemas de producción tradicionales (Chadd and Chamow, 2001; Larrick and Thomas, 2001).

La producción de proteínas terapéuticas en animales transgénicos permite obtener productos muy similares a los sintetizados en el organismo animal original. Sin embargo, la obtención de dichos animales requiere prolongado período de desarrollo y procedimientos muy costosos. 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 and Chamow, 2001;

Larrick and Thomas, 2001; Ma *et al.*, 2003). Es por ello que la producción de proteínas recombinantes en plantas se ha transformado en la opción más competitiva.

En particular, el uso de plantas como sistemas de expresión reduciría los costos de producción y permitiría aumentos de escala de manera más sencilla, dado que los procedimientos y la infraestructura utilizados para ello se basan en los manejos propios de la agricultura. Una ventaja adicional asociada a la producción de proteínas recombinantes en plantas, es la reducción de riesgos asociados a la contaminación por agentes virales, ya que los virus de plantas no son en general peligrosos para la salud humana o animal.

## **Producción de proteínas de interés en sistemas vegetales**

La hormona de crecimiento humana fue la primera proteína terapéutica producida en un sistema vegetal (Barta *et al.*, 1986). A partir de entonces, un gran número de proteínas con aplicaciones terapéuticas han sido producidas en distintos sistemas vegetales y actualmente están siendo evaluadas en ensayos clínicos (Tabla 1).

Los mecanismos de síntesis y secreción de proteínas y las modificaciones post-traduccionales en plantas son similares a los de las otras células eucariotas y permiten la producción y ensamblado de proteínas multiméricas como por ejemplo, anticuerpos. Algunos anticuerpos monoclonales producidos en plantas están siendo actualmente evaluados en ensayos clínicos (Tabla 1). En Cuba se aprobó la utilización de plantas como biorreactores para la producción a gran escala de un anticuerpo que reconoce específicamente al antígeno de superficie del virus de hepatitis B (Pujol *et al.*, 2005).

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 procesamiento de los cultivos. El capital de inversión inicial y los costos asociados a eventuales aumentos de escala son relativamente bajos. Más aún, el volumen de producción 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, hay bajo riesgo de contaminaciones con patógenos animales o secuencias oncogénicas de ADN, y pueden aprovecharse los sistemas ya establecidos de molienda y extracción en las primeras etapas del proceso de purificación. 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 ellos se demuestra que, a menos que los niveles de expresión sean excesivamente bajos, los costos de producción en plantas son inferiores a los de otros sistemas (Khouidi *et al.*, 1999; Evangelista *et al.*, 1998; Smith and Glick, 2000).

Más del 85% del costo de producción de una proteína recombinante depende del proceso de purificación. En este sentido, las plantas presentan ventajas que permitirían reducir considerablemente este porcentaje. Por ejemplo, dirigiendo la acumulación de proteínas recombinantes a tubérculos o semillas, se podría restringir el volumen inicial del tejido a extraer, con el consiguiente ahorro de costos operativos. Adicionalmente, esta estrategia facilitaría la conservación, transporte y distribución de la proteína de interés.

La posibilidad de incrementar los niveles de expresión, y el desarrollo de técnicas para simplificar los procesos de purificación sugieren que podrían alcanzarse costos entre 10 y 100 veces inferiores a los de los fermentadores bacterianos (Chadd and Chamow, 2001; Kusnadi *et al.*, 1997; Smith and Glick, 2000; Twyman *et al.*, 2003). Además, los sistemas vegetales gozarían de una mayor aceptación pública que la utilización de animales transgénicos (Daniell *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2004; Giddings, 2001; Ma *et al.*, 2003; Twyman *et al.*, 2003). Recientemente se han identificado más de 120 compañías pequeñas, universidades e institutos de investigación que están dedicados al desarrollo de sistemas de expresión basados en plantas. Asimismo, el número de patentes relacionadas con estos sistemas se ha triplicado entre 2002 y 2006 (Basaran and Rodríguez-Cerezo, 2008), lo que enfatiza el rápido desarrollo de esta tecnología a nivel mundial.

Producto	Tratamiento	Fuente recombinante	Estado del ensayo clínico	Compañía
<b>Proteínas terapéuticas</b>				
Lipasa gástrica	Fibrosis quística	Maíz transgénico, tabaco transgénico	Fase II	Meristem Therapeutics (UE)
Factor intrínseco humano	Deficiencia de vitamina B12	<i>Arabidopsis</i> transgénica	Fase II	Cobento Biotech AS (UE)
$\alpha$ -galactosidasa	Enfermedad de Fabry	Tabaco transgénico	Fase I	Planet Biotech (EEUU)
$\alpha$ -interferón	Hepatitis B y C	Lenteja de agua transgénica	Fase I	Biolex (EEUU)
Lactoferrina	Desordenes gastrointestinales	Maíz transgénico	Fase I	Meristem Therapeutics (UE)
		Arroz transgénico	Comercial	Ventria Biosciences (EEUU)
Interleuquina	Enfermedad de Crohn	Tabaco transgénico	Pruebas a campo	South. Crop Prot.&Food Res. Centre (Can)
Droga fibrinolítica (trombolítica)	Disolución de coágulos sanguíneos	Lenteja de agua transgénica	Fase I	Biolex (EEUU)
Glucocerebrosidasa	Enfermedad de Gaucher	Células vegetales	Fase III	Protalix (Israel)
Insulina	Diabetes	Cártamo transgénico	Fase I	Sembiosys (Canadá)
Apolipoproteína AI	Cardiovascular	Cártamo transgénico	Fase I en 2008	Sembiosys (Canadá)
<b>Anticuerpos</b>				
Avicidina	Cáncer colorectal	Maíz transgénico	Retirado de fase II	Monsanto Protein Technology (EEUU)
CaroRX	Caries dentales	Tabaco transgénico	Fase II	Planet Biotech (EEUU)
IgG (ICAM1)	Prevención del resfrío	Tabaco transgénico	Fase I	Planet Biotech (EEUU)
Anticuerpos Fv	Linfoma No-Hodgkin	Vector viral modificado en tabaco	Fase I	Large Scale Bio. Corp. (EEUU)
Rhino RX	Enfermedad respiratoria sinistial	Tabaco transgénico	Fase I	Planet Biotech (EEUU)
Anticuerpo	Cáncer colorectal	Maíz transgénico	Fase II	NeoRX/Monsanto (EEUU)

**Tabla 1.** Proteínas farmacéuticas derivadas de plantas con potencial uso en medicina que han alcanzado desarrollo clínico (Basaran and Cerezo, 2008).

Producto	Tratamiento	Fuente recombinante	Estado del ensayo clínico	Compañía
<b>Vacunas</b>				
Toxina sensible al calor de <i>E. coli</i>	Diarrea	Maíz transgénico	Fase I	ProdiGene (EEUU)
		Papa transgénica	Fase I	Arizona State University (EEUU)
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Papa transgénica	Fase I	Arizona State University (EEUU)
HBsAg	Hepatitis B	Lechuga transgénica	Fase I	Thomas Jefferson University (EEUU)
		Papa transgénica	FaseII	Arizona State University (EEUU)
Lt-B	Diarrea del viajante	Maíz transgénico	Fase I	ProdiGene (EEUU)
TGE	Gastroenteritis del cochinillo	Maíz transgénico	Fase I	ProdiGene (EEUU)
Cápside del <i>Norwalk virus</i>	Diarrea	Papa transgénica	Fase I	Arizona State University (EEUU)
		Tomate transgénico		
Vacuna contra <i>Newcastle virus</i>	Enfermedad de <i>Newcastle</i> en aves de corral	Cultivo de células transgénicas	Aprobado por USDA	Dow Agro (EEUU)
Mezcla de vacuna antiviral	Caballos, perros, y aves	Células transgénicas de tabaco	Fase I	Dow Agro (EEUU)
Vacuna contra cáncer	Linfoma No-Hodgkin	Tabaco transgénico	Fase II	Large Scale Biotech (EEUU)
Vacuna viral	Parvovirus felino	Tabaco transgénico	Fase I	Large Scale Biotech (EEUU)
Vacuna para aves de corral	Infeción por coccidios	Cánola transgénica	Fase II	Guardian Biosciences (Canadá)

**Tabla 1** (continuación). Proteínas farmacéuticas derivadas de plantas con potencial uso en medicina que han alcanzado desarrollo clínico (Basaran and Cerezo, 2008).



## **Ventajas particulares de los sistemas vegetales para la producción de vacunas**

La mayoría de las vacunas utilizadas actualmente consisten 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 inyectables. La utilización de agentes atenuados o de agentes relacionados que pueden mutar y volverse infecciosos implica riesgos particularmente importantes en los casos de inmunosupresión por malnutrición o de enfermedades como el SIDA.

El desarrollo de las vacunas a subunidades introdujo un margen de seguridad considerable, ya que involucra la utilización de sólo una parte del patógeno. Sin embargo, estas vacunas no son eficaces para generar una respuesta inmune por vía oral y deben ser inyectadas en todos los casos. Esta limitación incrementa los costos de distribución y administración, lo que restringe sus posibilidades de uso en los países en desarrollo, en los cuales las enfermedades infecciosas son posiblemente las de mayor importancia epidemiológica. En este sentido, una de las aplicaciones más prometedoras de las plantas como biorreactores es su potencial uso para producir antígenos en tejidos comestibles, lo que combinaría las ventajas de las vacunas orales con las de las vacunas recombinantes. La producción de proteínas antigénicas en el tejido vegetal permitiría protegerlas parcialmente de la degradación en el ambiente del tracto gastrointestinal, cuestión que resulta crítica para desarrollar una respuesta inmune exitosa.

La expresión en tejidos de almacenamiento como por ejemplo en semillas o tubérculos, 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 del mundo (Mason *et al.*, 2002; Mor *et al.*, 1998; Sala *et al.*, 2003; Streatfield and Howard, 2003; Walmsley and Arntzen, 2003).

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 vacunas potenciales contra los agentes causales de diarreas, como los rotavirus, cepas enterotóxicas de *E. coli* (Vieira da Silva *et al.*, 2002; Haq *et al.*, 1995), *Vibrio cholerae* (Wang *et al.*, 2001) y el virus Norwalk (Mason *et al.*, 1996). Asimismo, se han expresado antígenos de los virus de la hepatitis B y C (Thanavala *et al.*, 1995; Mason *et al.*, 1992), HIV (Yusinov *et al.*, 1997), *Human respiratory syncytial virus* (Korban *et al.*, 2002), *Human papilloma virus* (Morgenfeld *et al.*, 2010), virus de la rabia (Modelska *et al.*, 1998), el *Foot and mouth disease virus* (FMDV; Carrillo *et al.*, 1998; Dus Santos *et al.*, 2002), de las bacterias *Micobacterium bovis* (Zelada *et al.*, 2006) *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus anthracis*, así como del parásito responsable de la malaria, *Plasmodium falciparum* (Ghosh *et al.*, 2002) y de la toxoplasmosis (Clemente *et al.*, 2005; Ferraro *et al.*, 2008), entre otros.

Si bien hasta el momento no hay en el mercado productos farmacéuticos fabricados en plantas, dieciocho de ellos están siendo evaluados en ensayos clínicos (Tabla 1). Se han publicado resultados de once ensayos clínicos que involucran vacunas orales producidas en plantas. La expresión de las subunidades de las toxinas de *E. coli* y *V. cholerae* en plantas comestibles, como la papa (Arizona State University) o el maíz (Prodigene), han mostrados resultados promisorios en ensayos de Fase I (Tacket *et al.*, 2005). Por otro lado, se han observado respuestas inmunes en cobayos inyectados intramuscularmente con extractos foliares de tomate que contienen proteínas del FMDV (Pan *et al.*, 2008) y en ratones inyectados intraperitonealmente con partículas del *Alfalfa mosaic virus* recombinante que produce un epítotope de ántrax (Brodzik *et al.*, 2005).

En enero de 2006, Dow AgroSciences recibió la primera aprobación regulatoria a nivel mundial para una vacuna veterinaria hecha en células de tabaco que protege a aves de corral contra la enfermedad de Newcastle.

(<http://www.thepoultrysite.com/poultrynews/8909/vaccine-to-be-made-in-biotech-plant-cells>).

## Vectores virales

Se han desarrollado tres procedimientos posibles para expresar proteínas en plantas: a) transformación estable del genoma nuclear de la planta; b) transformación estable del genoma plastídico de la planta; y c) expresión transitoria mediante vectores virales.

En las estrategias que involucran transformación estable, una construcción que acarrea el gen de interés se integra en el genoma correspondiente mediante recombinación. De esta manera, el nuevo carácter es heredado a través de las generaciones y las plantas transgénicas obtenidas pueden ser fácilmente multiplicadas para la producción de la proteína de interés. Sin embargo, la obtención de plantas transgénicas tiene algunas desventajas. La obtención de líneas transgénicas es un procedimiento que insume mucho tiempo. Otra desventaja del uso de plantas modificadas genéticamente para la producción de proteínas de interés, reside en que muchas veces la transformación nuclear origina bajos niveles de expresión, principalmente debido a efectos posicionales sobre la expresión del transgén o al establecimiento de una respuesta de PTGS. En cuanto a la transformación de cloroplastos, si bien permitiría mayores niveles de expresión, la ausencia de modificaciones post-traduccionales sólo haría compatible este sistema con la producción de proteínas que no requieren ese tipo de procesamiento.

En los sistemas de expresión transitoria, el gen de interés es integrado a un genoma viral, y el virus así modificado es utilizado como vector para infectar plantas. Una vez en la célula vegetal, el genoma viral se replica en el citoplasma, dando como resultado altos niveles de expresión de la proteína de interés. Además del alto nivel de expresión, otras ventajas adicionales de los vectores virales son que resultan relativamente fáciles de manipular mediante ingeniería genética y que la infección de plantas con un virus recombinante es mucho más sencilla que la generación de plantas transgénicas.

El primer vector viral desarrollado utilizó como base al CaMV. El genoma de este virus es ADNdc, pero presenta la desventaja de su limitada capacidad de

encapsidación de material genético. Además, algunas modificaciones en su secuencia genómica afectan su funcionalidad como sistema de expresión (Fütterer *et al.*, 1989).

La mayoría de los virus vegetales poseen genomas de ARN (ARNg) Por esta razón, estos no fueron utilizados como vectores hasta el surgimiento de avances metodológicos que permitieron la conversión de grandes secuencias de ARN en ADNc. Los resultados más promisorios, se obtuvieron utilizando vectores basados en los genomas de TMV y PVX ambos con genoma de ARN (revisado en Bey *et al.*, 2010). En las Tablas 2 y 3 se detallan los epítopes expresados exitosamente a partir de vectores virales basados en estos dos virus.

Patógeno o enfermedad	Antígeno	Referencias
<b>Vectores de inserción</b>		
<i>Foot and mouth disease virus</i>	Proteína VP1	Wigdorovitz <i>et al.</i> , 1999
Hepatitis C virus	Región hipervariable I	Nemchinov <i>et al.</i> , 2000
<i>Bovine herpes virus</i>	Glicoproteína D	Perez Filgueira <i>et al.</i> , 2003
Cáncer colorectal	Antígeno Ga733-2	Verch <i>et al.</i> , 2004
<i>Human immunodeficiency virus-1</i>	Proteína Tat	Karasev <i>et al.</i> , 2005
<i>Human immunodeficiency virus-1</i>	Proteína p24	Perez Filgueira <i>et al.</i> , 2004
<i>Dengue virus</i>	Dominio III de la proteína E	Saejung <i>et al.</i> , 2007
<i>Mycobacterium bovis</i>	Antígeno ESAT6-Ag85	Dorokhov <i>et al.</i> , 2007
<b>Vectores de reemplazo</b>		
<i>Human papilloma virus</i>	Proteína E7	Massa <i>et al.</i> , 2007
<i>Yersinia pestis</i>	Proteínas F1 y V	Mett <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus anthracis</i>	Dominios PA y LF	Chichester <i>et al.</i> , 2007, 2009
<i>Influenza</i>	Hemoaglutinina	Shoji <i>et al.</i> , 2008, 2009
<b>Vectores modulares</b>		
<i>Yersinia pestis</i>	Proteínas F1 y V	Santi <i>et al.</i> , 2006
<i>Smallpox virus</i>	Dominio antigénico de pBS	Golovkin <i>et al.</i> , 2007
<b>Vectores de display de péptidos</b>		
<i>Human immunodeficiency virus-1</i>	Glicoproteína 41	Durrani <i>et al.</i> , 1998
<i>Influenza virus</i>	Epítotope HA	Sugiyama <i>et al.</i> , 1995
<i>Plasmodium falciparum</i>	Varios epítotope	Turpen <i>et al.</i> , 1995
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Epítotope de la proteína F	Staczek <i>et al.</i> , 2000
<i>Canine oral papilloma virus</i>	Proteína L2	Smith <i>et al.</i> , 2006
Melanoma	Epítotope p15-Trp2	Mc Cormick <i>et al.</i> , 2006a, 2006b
<i>Mycobacterium bovis</i>	Antígeno ESAT6-Ag85	Dorokhov <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Epítotope de la proteína F	Gilleland <i>et al.</i> , 2000

**Tabla 2.** Antígenos expresados a partir de vectores basados en TMV.

Patógeno o enfermedad	Antígeno	Referencias
<b>Vectores de inserción</b>		
<i>Human papilloma virus</i>	Proteína E7	Franconi <i>et al.</i> , 2002
<i>Avian Influenza A virus</i>	Ectodominio de la proteína M2	Nemchinov and Natilla, 2007
<i>Toxoplasma gondii</i>	Proteína SAG1	Clemente <i>et al.</i> , 2005
<i>Toxoplasma gondii</i>	Péptido Gra4	Ferraro <i>et al.</i> , 2008
<i>Hepatitis B virus</i>	Proteína de la nucleocápside	Mechtcheriakova <i>et al.</i> , 2006
<i>Transmissible gastroenteritis virus</i>	Anticuerpo derivado	Monger <i>et al.</i> , 2006
<b>Vectores de display de péptidos</b>		
<i>Human inmunodeficiency virus-1</i>	Epítopes de la cápside	Marusic <i>et al.</i> , 2001
<i>Plasmodium falciparum</i>	Varios epítopes	Turpen <i>et al.</i> , 1995
<i>Human papilloma virus</i>	Proteína E7	Franconi <i>et al.</i> , 2002
<i>Classical Swine Fever virus</i>	Péptidos de la glicoproteína E2	Marconi <i>et al.</i> , 2006
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Antígeno ESAT6	Zelada <i>et al.</i> , 2006
<i>Human papilloma virus-16</i>	Epítopes E7 y L2	Cerovská <i>et al.</i> , 2008
<i>Newcastle disease virus</i>	Epítope de la proteína F	Natilla <i>et al.</i> , 2006
<i>Murine rotavirus</i>	Proteína VP6	O' Brien <i>et al.</i> , 2000

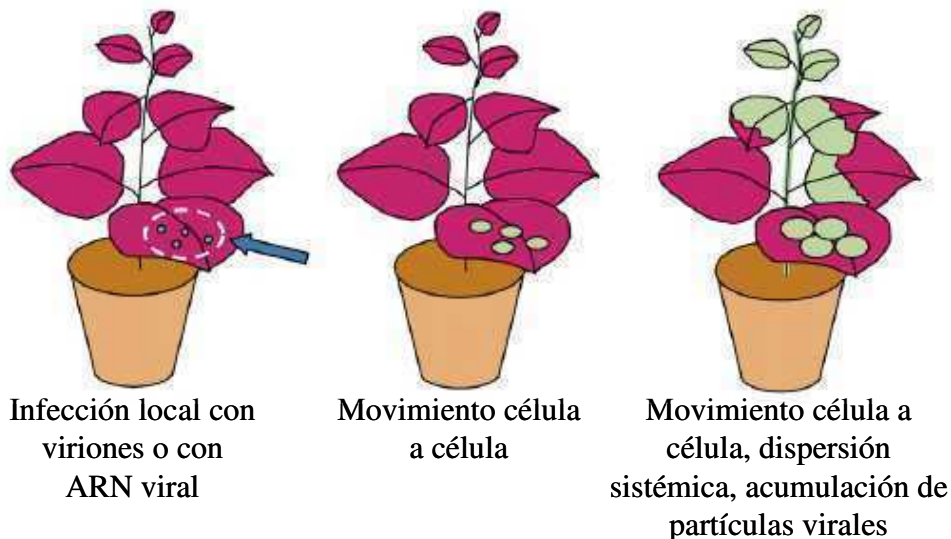
**Tabla 3.** Antígenos y anticuerpos expresados a partir de vectores basados en PVX.

### Vectores de primera generación

Los vectores de primera generación son virus funcionales, conteniendo todos sus genes, a los que se les integra el gen de interés (vectores de inserción). Debido a que disponen de todas las funciones virales normales, estos vectores son capaces de causar una infección sistémica en la planta. La inoculación de los mismos se puede hacer mecánicamente mediante viriones maduros o copias infectivas del genoma viral, o mediante infiltración del tejido vegetal con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con la construcción de interés (Figura 1). Esta última técnica es conocida como “agroinfiltración”. A partir del punto inicial de infección, las partículas virales que acarrean el gen de interés se esparcen a través de la planta para provocar una infección sistémica, asegurando así altos niveles de expresión. En los vectores virales de primera generación la inserción del gen de interés no debe interferir con la expresión de las funciones virales, dado que todas ellas son requeridas para una infección exitosa.

Las proteínas recombinantes producidas a partir de vectores de primera generación pueden expresarse a partir de un promotor independiente fuerte (usualmente un promotor subgenómico viral), o como fusiones a la proteína de la cápside viral. En el primer caso, se produce proteína heteróloga soluble, que puede ser extraída y purificada en forma similar a lo que ocurre con las proteínas producidas en plantas transgénicas.

En el caso de proteínas de fusión, las partículas virales quiméricas son purificadas a partir del tejido infectado y utilizadas como tales o como fuente de proteína recombinante. Si la secuencia aminoacídica fusionada es un epítipo que será utilizado como antígeno, la presentación de la misma en la superficie de la partícula viral pueden utilizarse para incrementar una respuesta inmune específica.



**Figura 1.** Descripción esquemática de la infección y diseminación de vectores virales de primera generación. Adaptado de Gleba *et al.*, 2007.

Los vectores de inserción han sido utilizados exitosamente para expresar numerosos antígenos. Sin embargo, una de sus mayores limitaciones radica en el tamaño de la secuencia transgénica que pueden albergar sin comprometer la estabilidad de la partícula viral. Otra restricción para su uso se relaciona con el promotor que dirige la expresión, ya que la presencia de un promotor viral duplicado puede conducir a recombinaciones del vector, con la consiguiente reversión a virus no recombinante y a la pérdida de la secuencia de interés.

Los vectores de fusión no tienen estas restricciones y resultan muy útiles a condición de que la proteína de fusión sea compatible con el ensamblado correcto del virus. Distintos trabajos realizados en varios laboratorios muestran que sólo los epítopos pequeños (de menos de 25 aminoácidos) pueden ser exitosamente expresados como proteínas de fusión a la cápside viral (Durrani *et al.*, 1998; Lico *et al.*, 2006; Cerovská *et al.*, 2008).

Para superar las restricciones en el ensamblado, se han establecido varias estrategias. Una de ellas consiste en producir proteínas de la cápside viral fusionadas y no fusionadas en distintas proporciones, de manera de permitir el correcto ensamblado del virión. Una forma de lograr esta combinación es utilizar un codón de terminación que funcione de una manera “leaky” en la proteína de fusión (Borovsky *et al.*, 2006). Otra manera de conseguir lo mismo es mediante la inserción del péptido 2a del *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV) entre el epítipo de interés y el extremo 5' del gen de la cápside. La secuencia del sitio 2a codifica 16 aminoácidos y puede funcionar como un elemento autónomo, independiente de la poliproteína del FMDV de la cual proviene. La misma causa que el ribosoma continúe la traducción después de haber “salteado” la formación de una unión peptídica (Funston *et al.*, 2008). Originalmente se denominó a este proceso “clivaje” por analogía con lo que ocurría en otros sitios de la poliproteína. Sin embargo, tiempo después se confirmó que se trataba de una “falla” en la formación de la unión peptídica (Ryan and Drew, 1994). El “salto” del ribosoma inducido por la secuencia 2a resulta en una expresión aproximadamente equitativa de las proteínas que se encuentran río arriba y río debajo de la misma (Santa Cruz *et al.*, 1996; Donnelly *et al.*, 2001; de Felipe *et al.*, 2006). Las secuencias del tipo 2a han sido previamente utilizadas en otras aplicaciones biotecnológicas (de Felipe *et al.*, 2006).

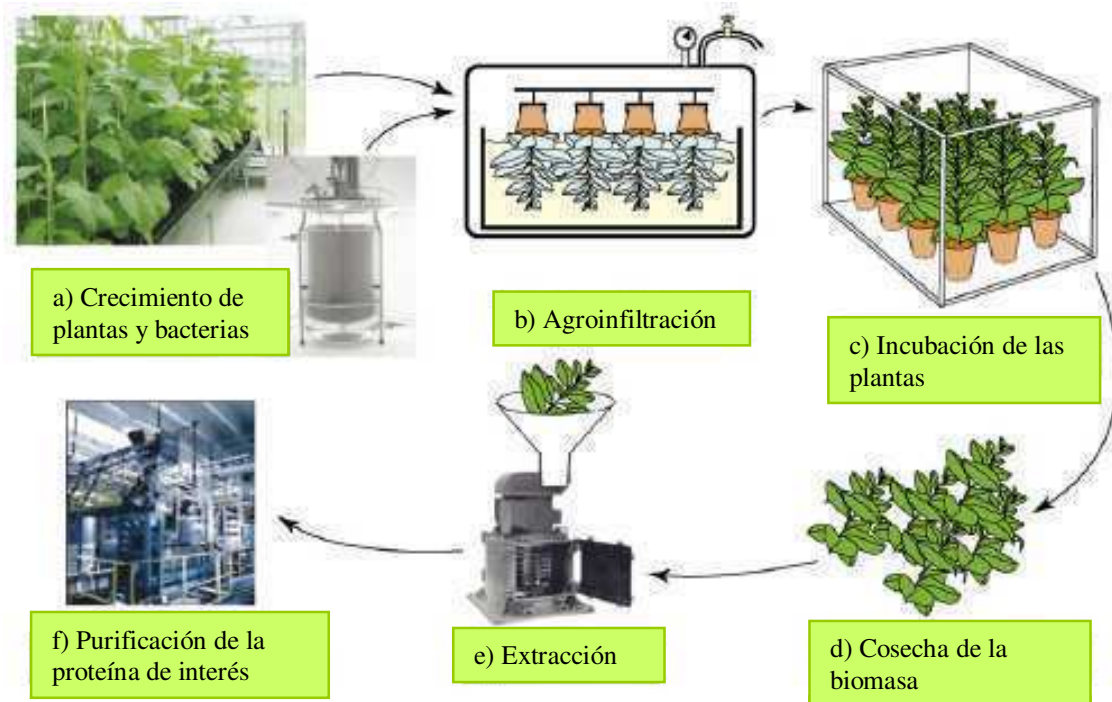
### **Vectores de segunda generación**

Un problema asociado con el uso de vectores de primera generación radica en que los viriones producidos son funcionales y podrían propagarse hacia otras plantas, generando riesgos desde el punto de vista de la contención biológica. Para evitar esta dificultad, se diseñaron los vectores de segunda generación. Estos, en lugar de poseer un genoma viral completo, utilizan sólo las secuencias indispensables para replicarse en forma eficiente (vectores de reemplazo o vectores modulares).

En los vectores de reemplazo, los genes virales no esenciales son sustituidos por el gen de interés, lo que en algunos casos evita que el virus genere una infección sistémica. El uso de este sistema es posible gracias al desarrollo de la técnica de “*magniffection*”, que utiliza la infiltración por vacío con *A. tumefaciens* para lograr la infección en toda la planta (Figura 2; Marillonnet *et al.*, 2005). En este proceso, un



cultivo líquido de la bacteria que alberga el vector viral es infiltrado en las plantas, causando en principio la infección primaria y luego la infección sistémica, superando la necesidad de utilizar vectores capaces de movilizarse por sí mismos. Dependiendo de la proteína de interés, este sistema podría producir hasta 0,5-5 g de proteína recombinantes por kg de biomasa de hojas. El tiempo de expresión ronda los 6-10 d. Hasta el momento, el vector más exitoso desarrollado para implementar esta estrategia es un vector basado en el virus TMV que expresa la proteína de interés a partir del promotor subgenómico de la cápside (Marillonnet *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Esquema general para la producción de proteínas recombinantes en plantas utilizando “magnifectión”. Los componentes a), e), y f) son procesos industriales estándar que existen actualmente. Los componentes b), c), y d) son elementos nuevos, dado que la infiltración a gran escala requiere equipamiento especial, y el uso de bacterias genéticamente modificadas requiere contención adecuada para evitar su liberación al ambiente externo. Adaptado de Gleba *et al.*, 2007.

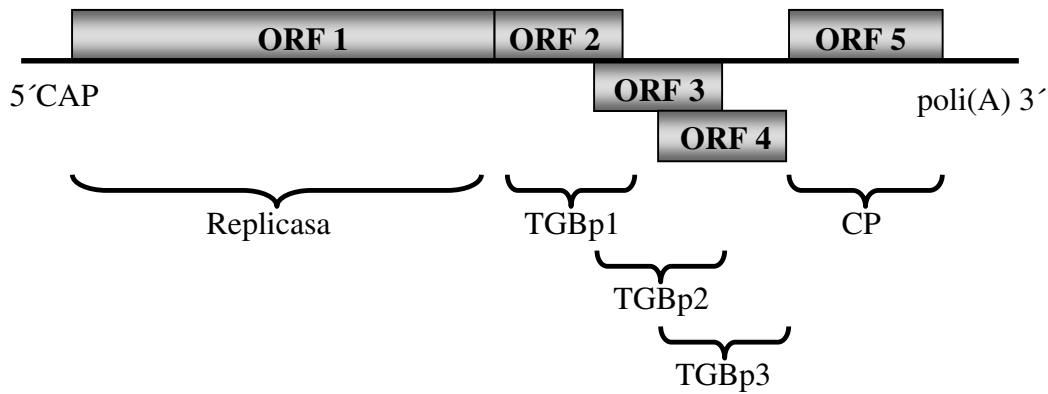
En los vectores modulares es posible insertar el gen de interés en un vector que carece de las funciones esenciales para el movimiento de célula a célula y para la infección sistémica. No obstante, las funciones faltantes pueden ser administradas *trans* mediante co-infiltración con una cepa de *A. tumefaciens*, o utilizando plantas transgénicas que las provean. La complementación de funciones virales permite desarrollar infecciones sistémicas, pero la probabilidad de generar viriones que puedan transmitirse a otras plantas se reduce notablemente. Esta estrategia es posible gracias al

hecho de que no todos los componentes virales necesitan estar presentes en la misma molécula de ácido nucleico, tal como ocurre naturalmente en los virus con genomas multipartitos. De hecho, virus como el AIMV, cuyo genoma es multipartito, han sido utilizados como vectores modulares siguiendo esta estrategia. El ARN3 del AIMV fue modificado para ser usado como vector de expresión de GFP. Cuando se inocularon plantas de tabaco transgénicas, que expresan los ARN1 y 2 del AIMV se observó producción de la proteína de interés (Sanchez-Navarro *et al.*, 2001). Una estrategia similar fue utilizada para producir dos péptidos del *Human respiratory syncytial virus* como fusiones con la cápside de AIMV (Belanger *et al.*, 2000).

### ***Potato virus X (PVX)***

El PVX es el miembro tipo del género *Potexvirus*. Está constituido por partículas filamentosas y levemente flexuosas. Cada partícula viral contiene una molécula de ARNg de 6435 pb, de simple cadena de polaridad positiva, cuyo extremo 5' se encuentra modificado con un nucleótido 7-metil guanosina (cap) y su extremo 3' se encuentra poliadenilado. La secuencia del ARNg de la cepa CP de PVX reveló la existencia de cinco marcos de lectura abiertos (ORFs) (Orman *et al.*, 1991). El producto del ORF 1 codifica la replicasa viral y el ORF5 codifica la proteína de la cápside viral (CP). Los ORFs 2, 3 y 4 comprendidos en el denominado bloque triple de genes (TGB) codifican proteínas involucradas en el movimiento viral (TGBp1, de 24 kDa; TGBp2, de 12 KDa; y TGBp3, de 8 KDa) y tienen la característica de hallarse parcialmente superpuestos (Figura 3).

Este virus es capaz de infectar plantas como *Brassica campestris ssp. rapa*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana tabacum*, y *Solanum tuberosum*. Es transmitido por inoculación mecánica y por contacto entre plantas, pero no es transmisible a través de semillas o polen.



**Figura 3.** Representación esquemática del genoma de PVX.

Las infecciones de *Potexvirus* inducen la formación de mosaicos, moteado, manchas en forma de anillos y necrosis, habiéndose observado también blanqueo y bandeo de nervaduras. Los síntomas que produce PVX en papa y tabaco varían desde una completa latencia hasta un bandeo necrótico severo de acuerdo con la cepa viral, el genotipo y el estado fisiológico del hospedador.

### Vectores virales basados en el PVX

Los primeros vectores basados en PVX se desarrollaron utilizando estrategias similares a las de los vectores basados en TMV. Dado que la cápside de PVX es esencial para el movimiento de célula a célula y para la infección sistémica, el desarrollo de vectores de reemplazo no tuvo éxito (Chapman *et al.*, 1992). Por otro lado, los vectores de inserción basados en este virus resultaron de utilidad para la expresión de antígenos y anticuerpos, como la proteína E7 del *Human papillomavirus* (HPV) (Franconi *et al.*, 2002), la proteína de nucleocápside del *Hepatitis B virus* (HBV) (Mechtcheriakova *et al.*, 2006), y un anticuerpo derivado del *Transmissible gastroenteritis virus* (TGEV) (Monger *et al.*, 2006). Este anticuerpo contra el TGEV porcino se expresó fusionado a un dominio de la IgE humana, y fue capaz de provocar una respuesta inmune en cerdos inoculados oralmente (Monger *et al.*, 2006).

En nuestro laboratorio se han desarrollado una serie de vectores basados en PVX a partir del clon obtenido del aislamiento latinoamericano CP (Orman *et al.*, 1991). Utilizando dichos vectores de inserción, se han logrado expresar el antígeno SAG1 y

una versión truncada de la proteína granulada densa (Gra4<sub>163-345</sub>) de *Toxoplasma gondii* en hojas de tabaco (Clemente *et al.*, 2005; Ferraro *et al.*, 2008). Ambos antígenos fueron reconocidos por anticuerpos presentes en suero humano seropositivo para *Toxoplasma*. Además, se logró obtener una respuesta inmune protectora en ratones vacunados con extractos de hojas que expresan SAG1 (Clemente *et al.*, 2005).

Se han desarrollado diversas estrategias para utilizar PVX como vector presentador de péptidos. Una de ellas consiste en expresar la proteína de interés fusionada a la secuencia 2a del FMDV y al N-terminal de la cápside (Santa Cruz *et al.*, 1996). Como se mencionó anteriormente, el péptido 2a produce un “salto” de un codón al siguiente, evitando la formación de la unión peptídica y admitiendo la traducción de la secuencia río abajo (Donnelly *et al.*, 2001). Como resultado, se obtiene proteína de la cápside libre y proteína de la cápside fusionada al péptido de interés. De esta manera se permite el correcto ensamblado de viriones quiméricos. Algunos de los antígenos producidos utilizando esta estrategia son la glicoproteína E2 del CSFV (Marconi *et al.*, 2006) y el antígeno del rotavirus murino VP6 (O'Brien *et al.*, 2000). En nuestro laboratorio se han expresado de esta forma altos niveles del antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium bovis* (Zelada *et al.*, 2006).

Cuando se expresan péptidos pequeños como proteínas de fusión a la cápside viral se obtienen resultados variables. Un ejemplo exitoso de expresión en la superficie de PVX es la producción de altos niveles del epítipo neutralizante del HIV-1 (Marusic *et al.*, 2001). Al inmunizar ratones por diferentes vías con las partículas quiméricas, se detectaron altos niveles de inmunoglobulinas específicas (IgG a IgA) con capacidad neutralizante. Otro ejemplo exitoso es el caso de Lico *et al.* (2009), quienes modificaron mediante ingeniería genética el genoma de PVX para expresar un péptido del virus de la influenza A. Al inmunizar ratones con las partículas quiméricas obtenidas, observaron la activación específica del tipo CD8+ células T.

## Silenciamiento génico post-transcripcional

El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) es un mecanismo que implica la degradación selectiva de secuencias de ARN residentes en el citoplasma celular (Ding, 2000). Este fenómeno se observa frecuentemente ante la sobreexpresión de un transgén o ante la replicación viral (Baulcombe, 1999). Aunque muchos aspectos no han sido aún develados, se sabe que este mecanismo es comúnmente activado en plantas por infecciones virales, por lo que se asume que este fenómeno forma parte de un sistema natural de defensa.

En los últimos años, se ha resaltado la importancia de mecanismos relacionados con el PTGS en distintos organismos en la regulación del desarrollo, el mantenimiento de la integridad del genoma, y en la defensa contra virus. Por otro lado, debido a las características únicas del PTGS, se lo ha comenzado a utilizar como herramienta para la caracterización de la función de distintos genes.

### Historia

El fenómeno de PTGS fue descrito por primera vez en petunias transgénicas, en las que se pretendía incrementar el color de las flores. Para eso, se introdujeron copias adicionales del gen de la chalcona sintasa, enzima clave en la producción de antocianinas en los pétalos. Sorprendentemente, muchas de las plantas que expresaban múltiples copias del transgén no mostraron flores violetas o rojas, sino que, por el contrario, dieron flores completamente blancas o variegadas (Napoli *et al.*, 1990). Se demostró que ese fenotipo se debía a la reducción de los niveles de ARNm de la chalcona sintasa, proveniente tanto del gen endógeno como del transgén, y se denominó a este fenómeno “co-supresión de la expresión génica”. De esta manera, se mostró que las interacciones de múltiples copias del transgén, y entre transgenes y genes homólogos en la planta huésped conducía a la degradación específica de secuencia de los ARNm correspondientes (Napoli *et al.*, 1990; Van der Krol *et al.*, 1990; Meyer and Saedler 1996).

Poco tiempo después, se observaron fenómenos similares en plantas transformadas con secuencias virales. Las plantas transformadas con secuencias de la cápside viral o de un fragmento de la misma resultaban resistentes al virus del cual provenía dicha secuencia. Lindbo *et al.* (1993) transformaron plantas de tabaco con la secuencia de la cápside de TEV con el propósito de conferir resistencia. Notaron que el virus iniciaba su replicación en las plantas transformadas, produciendo los síntomas típicos de infección, pero estas plantas eran capaces de recuperarse de la infección 3 a 5 semanas luego de la inoculación. Las hojas recuperadas resultaron protegidas frente a una segunda infección. Sin embargo, fue posible infectar dichas plantas con un potyvirus relacionado, PVY.

Paralelamente, se observó que al infectar plantas de *N. benthamiana* con un vector basado en PVX que expresaba insertos del gen de la fitoeno desaturasa (PDS) se silenciaba el gen de la PDS endógena (Ruiz *et al.*, 1998). De forma similar, al infectar plantas transgénicas que expresaban el gen *gfp* con un vector basado en PVX que portaba la secuencia homóloga, se silenciaba el transgén en la planta (Ruiz *et al.*, 1998). Este fenómeno se denominó silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) y se propuso que el silenciamiento génico forma parte de un mecanismo de defensa antiviral naturalmente presente en plantas (Ruiz *et al.*, 1998). Posteriormente, el VIGS ha sido también descrito en células animales (Li *et al.*, 2002; Gitlin and Andino 2003; Li and Ding, 2005; Saumet *et al.*, 2006; Obbard *et al.*, 2009).

En 1998, Waterhouse *et al.* demostraron que cuando se cruzaban plantas que expresaban secuencias sentido y antisentido del virus PVY, se observaba que las plantas resultantes eran resistentes a nuevas infecciones por este virus mediante un mecanismo basado en el PTGS. Sin embargo, las líneas parentales que sólo expresaban el transgén sentido o antisentido eran susceptibles a la infección. Asimismo, la expresión de una horquilla de ARN proveniente de un transgén con repeticiones invertidas (IRs) resultó ser un iniciador mucho más eficiente del PTGS que la expresión de un transgén sentido o antisentido individuales. Una construcción conteniendo IRs de una versión truncada del gen *gfp* fue capaz de silenciar la secuencia homóloga en plantas transformadas con este transgén (Waterhouse *et al.*, 1998; Wang and Waterhouse, 2000).

Simultáneamente con estos reportes se demostró que el ARNdc induce el PTGS en nematodos (Fire *et al.*, 1998), plantas (Waterhouse *et al.*, 1998), protozoos (Ngô *et al.*, 1998), e insectos (Kennerdell and Carthew, 1998). El siguiente descubrimiento importante relacionado con este fenómeno fue la identificación de los ARNs pequeños (sARNs) en plantas que experimentaban PTGS. Hamilton y Baulcombe (1999) buscaron especies de sARNs en cuatro sistemas diferentes de PTGS: a) tomates (*Solanum lycopersicum*) que experimentaban co-supresión de un gen endógeno mediante la inserción de un transgén; b) plantas de tabaco que exhibían PTGS de un transgén que codificaba la enzima  $\beta$ -glucuronidasa; c) plantas de *N. benthamiana* en las que se silenció sistémicamente la secuencia codificante de GFP mediante la inoculación con agrobacterias transformadas con una construcción que expresaba GFP y; d) plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PVX. Se identificaron así ARNs de aproximadamente 25 nt, cuyas secuencias se correspondían con las secuencias que resultaron silenciadas. Además, estos autores demostraron que existía una correlación entre los niveles de acumulación de sARNs y la eficiencia del silenciamiento en cada uno de los sistemas mencionados. Estos sARNs, típicamente de 21 a 26 nt, se denominaron ARNs pequeños de interferencia (siARNs).

### **Mecanismo molecular**

Experimentos realizados *in vitro* con embriones de *Drosophila melanogaster* demostraron que Dicer, una ribonucleasa tipo III (RNasa tipo III), es la endonucleasa responsable del procesamiento de ARNdc en siARNs (Bernstein *et al.*, 2001). Jacobsen *et al.* (1999) identificaron una línea mutante de *Arabidopsis thaliana* (*caf*), caracterizada por defectos en la determinación del meristema floral y por otras anomalías en la morfogénesis de sus órganos. La caracterización molecular de dicha mutante reveló que el gen *caf* codifica una proteína similar a las RNA helicasas y RNasas tipo III. Más tarde, se encontró que *caf* es uno de los cuatro genes DICER-LIKE (*DCL1*, *DCL2*, *DCL3* y *DCL4*) codificados por el genoma de *Arabidopsis* (Finnegan *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2004; Margis *et al.*, 2006). Asimismo se halló que los defectos florales asociados con el fenotipo *caf* derivan de la incapacidad de las mutantes de procesar siARNs endógenos a partir de su precursor de ARNdc (Golden *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002).

Actualmente, *caf* es conocido como DCL1, y se lo agrupa dentro de la familia de endonucleasas RNasa III-like de plantas que clivan ARNdc para producir sARNs.

La ruta del silenciamiento génico en plantas comprendería tres vías que utilizan varios componentes comunes: a) la vía de los micro ARNs (miARNs), los que se transcriben a partir del genoma nuclear y regulan la expresión de genes endógenos mediante la degradación de ARNm blanco o mediante la represión de la traducción; b) la vía activada por transgenes, horquillas, o virus (VIGS), la que es mediada por una señal móvil y conduce a la degradación de ARNm “extraños” y a la represión de la traducción; y c) la vía relacionada con el silenciamiento transcripcional, la que involucra la modificación de la cromatina inhibiendo la transcripción de los genes en forma específica (Meins *et al.*, 2005). El silenciamiento de ARN desencadenado por un transgén, una horquilla, o por VIGS converge en la formación de ADNdc (Meins, 2000; Beclin *et al.* 2002). La vía por la que se genera este intermediario clave depende de la naturaleza del transgén o del tipo de virus. Los transgenes en orientación sentido forman el ARNdc indirectamente mediante un mecanismo desconocido. Se postula que este mecanismo involucra ARNs “aberrantes”, como por ejemplo ARNs sin *cap* (Gazzani *et al.*, 2004), y la participación de una ARN polimerasa dependiente de ARN (RDR6), una helicasa de ARN (SDE3), una endonucleasa (WEX), y de las proteínas AGO1 y SGS3 (Beclin *et al.*, 2002; Himber *et al.*, 2003; Glazov *et al.*, 2003). Dado que el silenciamiento de los *geminivirus* involucra a RDR6, SDE3, AGO1, y SGS3, es probable que estos virus (cuyo genoma está compuesto por ADNsc) promuevan el PTGS de manera similar a los transgenes en orientación sentido (Muangsan *et al.*, 2004). Aparentemente, las repeticiones invertidas u horquillas, los transgenes antisentido y los ARNs virales dependientes de RDRs, ingresan en la vía del silenciamiento a partir de la formación ARNdc intermediario (Waterhouse *et al.*, 2001; Baulcombe, 2004). El procesamiento de dicho intermediario en sARNs depende de distintas DCLs (Tang *et al.*, 2003). DCL1 es responsable de la biogénesis de los miARNs y DCL3 está involucrada en la biogénesis de los sARNs de 24 nt asociados con la modificación (metilación) de la cromatina (Reinhart *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2004). Al parecer, DCL4 es más versátil, y es requerida para la producción de sARNs de 21 nt derivados del ARNdc generado por la RDR6 y de sARNs de 21 nt derivados de repeticiones invertidas en forma independiente de RDR6 (Gascioli *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2005; Dunoyer *et al.*, 2005;



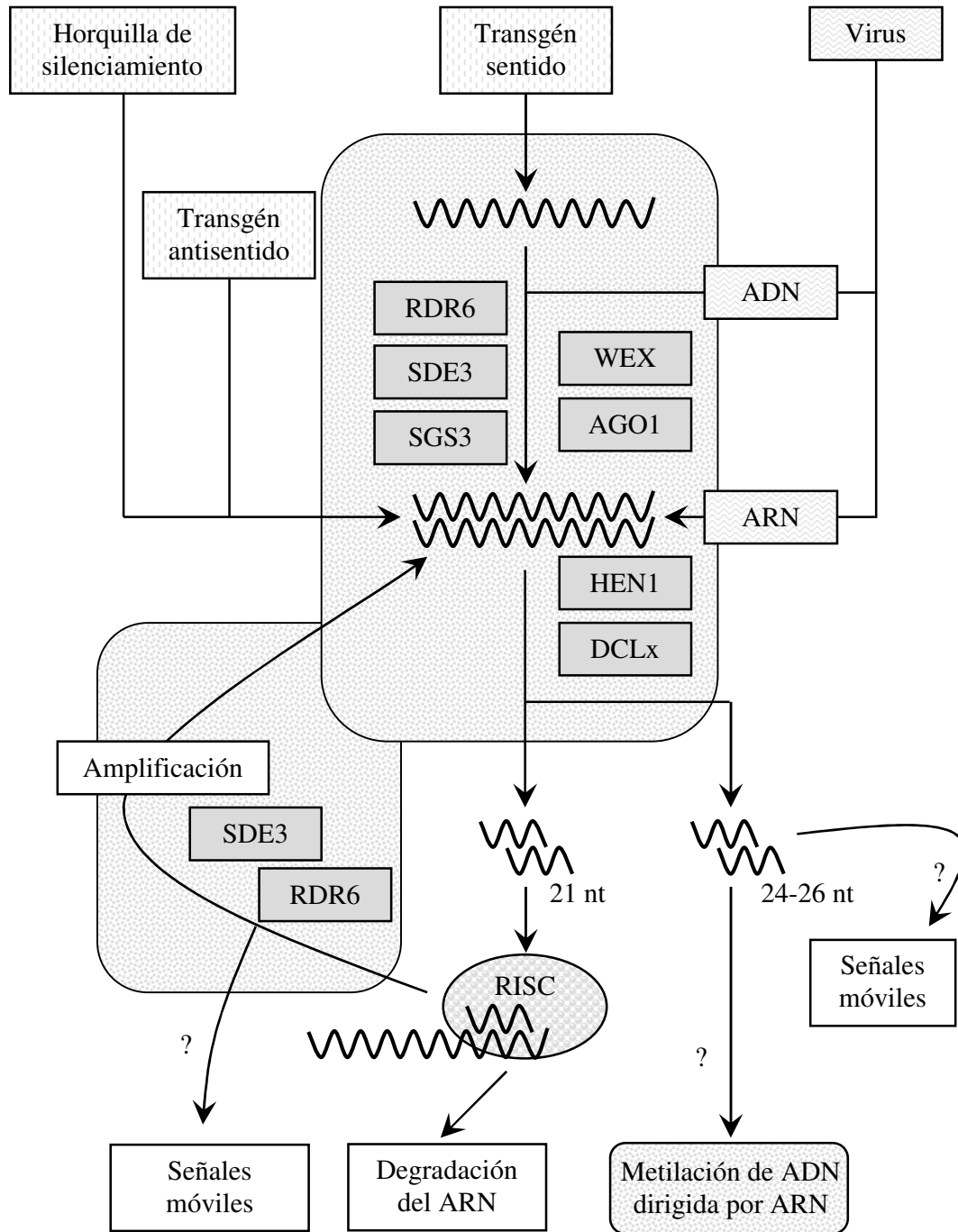
Fusaro *et al.*, 2006). Además, DCL4 juega un rol principal en la producción de sARNs derivados de virus y DCL2 actúa como sustituto en el caso que DCL4 haya sido inactivada (Fusaro *et al.*, 2006; Blevins *et al.*, 2006; Bouche *et al.*, 2006; Deleris *et al.*, 2006). En un trabajo reciente, Mlotshwa *et al.* (2008) demostraron que DCL2 juega un rol esencial en el silenciamiento de transgenes. Los autores encontraron que la vía de PTGS desencadenada por transgenes en orientación sentido se encuentra bloqueada y no se acumulan los siARNs dependientes de RDR en plantas de *Arabidopsis* con mutaciones en el gen *dcl2*. Por otro lado, cuando en estas plantas se induce el silenciamiento con una horquilla, se elimina la acumulación de siARNs dependientes de RDR, pero no se bloquea el PTGS mediado por los siARNs primarios. Esta evidencia sugiere que DCL2 juega un rol esencial en el PTGS y podría ser parte importante en la defensa antiviral. También se ha descrito en *Arabidopsis* una metilasa denominada HEN1 que actúa río abajo del ARNdc y estabiliza los siARNs (Li *et al.*, 2005).

Bohmert *et al.* (1998) aislaron una mutante de desarrollo temprano de *Arabidopsis* que denominaron *ago-1*. Esta mutante se caracterizó por poseer cotiledones sin expandir, hojas en roseta muy angostas, y un engrosamiento en su inflorescencia. Cuando se realizaron búsquedas de homología en las bases de datos, se identificaron otras nueve proteínas AGO codificadas en el genoma de *Arabidopsis*. Más aún, se encontró también homología significativa entre AGO-1 y la proteína *RNAi-deficient 1* (RDE-1) de *C. elegans*. Esta proteína, al igual que AGO-1, fue identificada en *C. elegans* en ensayos orientados a la búsqueda de proteínas involucradas en el fenómeno de ARNi; las mutantes *rde-1* son incapaces de generar una respuesta de ARNi cuando son expuestas a ARNdc (Tabara *et al.*, 1999). AGO-1 es un componente crucial en las vías del PTGS en plantas y es uno de los componentes centrales del complejo efector de la degradación de ARN (complejo de silenciamiento inducido por ARN o RISC). Utilizando como guía a los *duplex* de siARNs, RISC se une a los ARNm complementarios y dirige el clivaje de los mismos (Baumberger and Baulcombe, 2005).

Una conclusión general de los ensayos mencionados anteriormente es que el PTGS es promovido por la introducción de un ácido nucleico foráneo (ya sea un transgén o una secuencia derivada de un virus) en la planta. A continuación, se produce un ARNdc que es subsecuentemente reconocido por una proteína del tipo DCL y procesado en siARNs de entre 21 y 25 nt. Una de las cadenas de estos pequeños *duplex*

de ARN es utilizada por el complejo RISC como guía para reprimir la expresión del ARNm blanco. La composición bioquímica de dicho complejo aún no se conoce por completo (Omarov *et al.*, 2007), pero involucra la participación de una o más proteínas AGO (Baumberger and Baulcombe, 2005). El siARN incorporado al complejo otorga la especificidad a RISC para detectar ARNs complementarios. Una vez que se ha identificado la complementariedad perfecta, la actividad catalítica de RISC causa el clivaje del ARN blanco (Figura 4). Si el apareamiento es imperfecto, en lugar de la degradación del ARN, la acción de RISC reprimiría la traducción por un mecanismo alternativo (Voinnet, 2005; Brodersen *et al.*, 2008).

Además de los 4 miembros de la familia de proteínas DCL y de los 10 de la familia AGO, se encontraron en *Arabidopsis* otras 2 familias de proteínas relacionadas con el mecanismo del PTGS: RDRs, con 6 miembros; y proteínas con dominios de unión a ARNdc (dsRBP), con 5 miembros. Una de las funciones de las RDR sería la amplificación de los ARNdc utilizando siARNs como iniciadores (Deleris *et al.*, 2006; Moissiard and Voinnet, 2006; Diaz-Pendon *et al.*, 2007; Moissiard *et al.*, 2007).



**Figura 4.** Representación esquemática de un modelo para explicar el mecanismo del PTGS en plantas. Adaptado de Meins *et al.*, 2005.

## Supresión del silenciamiento

Independientemente del tipo de vector y de la estrategia utilizada, la expresión de proteínas de interés mediante vectores virales debe superar los mecanismos de defensa por parte de la planta. Como se mencionó anteriormente, el VIGS protege a la planta de las infecciones virales, desencadenando la degradación de ARN extraño en las células vegetales (Ruiz *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2003). Cuando el VIGS es desencadenado por la presencia de un vector viral, se produce una significativa reducción de la acumulación del mismo, con la consecuente disminución de los niveles de producción de la proteína de interés.

Para evadir este mecanismo de defensa, la mayoría de los virus de plantas codifica proteínas supresoras del PTGS capaces de inhibir el VIGS. A fines de 1990, se encontró que la proteína Hc-Pro, codificada por miembros de la familia *Potyviridae*, suprime el PTGS de manera altamente efectiva (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau and Carrington, 1998). Dado que Hc-Pro es un determinante de patogenicidad, una hipótesis razonable era pensar que otros factores de patogenicidad podían también tener funciones supresoras del PTGS. La primera evidencia en apoyo de esta hipótesis fue publicada en 1999 (Voinnet *et al.*, 1999). Desde entonces, se han descrito numerosas proteínas supresoras en virus vegetales a ARN y ADN (Voinnet, 2005; Bisaro, 2006; Li and Ding, 2006). Muchas de estas proteínas pueden considerarse como multifuncionales, dado que cumplen roles adicionales durante el ciclo viral, ya sea como parte del complejo de replicación o como proteínas de cápside, de movimiento, o de transmisión por insectos (Scholthof, 2005). Takeda *et al.* (2005) han reportado que el *Red clover necrotic mosaic virus* suprime el PTGS utilizando múltiples componentes virales normalmente requeridos para la replicación viral (p27, p88, y ARNs virales).

El estudio de los mecanismos de acción de las proteínas supresoras del PTGS es un área de investigación de creciente desarrollo. Hasta el momento, se sabe que estas proteínas pueden interferir en distintos niveles de las vías del silenciamiento. Por ejemplo, la proteína p19 del *Carnation Italian ringspot virus* (CIRV) secuestra siARNs de 21 nt (Vargason *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003), mientras que otras proteínas, como la 2b del *Cucumber mosaic virus* (CMV; que interactúa con ARNdc y Ago1) pueden interferir en

más de un evento (Anandalakshmi *et al.*, 2000; Lakatos *et al.*, 2006; Merai *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Diaz-Pendon *et al.*, 2007). Se observó también que las proteínas supresoras pueden obstruir pasos claves de metilación de los siARNs (Vogler *et al.*, 2007). Independientemente de los mecanismos específicos, todos los supresores del PTGS parecen compartir la habilidad de limitar la degradación de los ARNs virales (Scholthof, 2005; Voinnet, 2005; Bisaro, 2006; Li and Ding, 2006).

La regulación de la expresión de las proteínas supresoras del PTGS durante el ciclo viral estaría relacionada con el mecanismo de acción de cada una de las mismas. Esto aseguraría la correcta sincronización y los niveles de proteína necesarios para inhibir los distintos pasos del PTGS. Por ejemplo, algunas proteínas supresoras inhiben la generación de los siARNs o impiden su incorporación al complejo RISC (Lakatos *et al.*, 2006; Merai *et al.*, 2006). Otros operan río arriba o río debajo de este paso, comprometiendo la actividad efectora de complejos como DICER o RISC (Deleris *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006). Algunos supresores inactivan el silenciamiento después de su inicio, mientras que otros sólo pueden evitar que se desencadene el mismo y no son efectivos una vez iniciado el proceso, (Li and Ding, 2006).

### **Utilidad de los supresores del silenciamiento en *molecular farming***

Dado que las proteínas supresoras del PTGS generalmente actúan a nivel intracelular y de forma no específica, se ha propuesto utilizarlas como herramienta para acrecentar la expresión de las proteínas de interés a partir de vectores virales (Scholthof, 2007). Algunos trabajos pioneros corroboraron que las proteínas supresoras permiten obtener mayores niveles de expresión de proteínas reporteras, tanto en ensayos de expresión transitoria como en plantas transgénicas (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau and Carrington, 1998; Voinnet *et al.*, 1999, 2003).

Voinnet *et al.* (2003) describieron un sistema basado en la co-expresión de un vector viral y de un transgén que codifica la proteína p19 del *Tomato bushy stunt virus* (TBSV). En ese trabajo se muestra que la expresión simultánea del vector y de p19 impide que se establezca el PTGS en el tejido infiltrado, permitiendo obtener altos niveles de expresión de la proteína de interés. Dorokhov *et al.* (2007) aplicaron este

método para aumentar la expresión de un vector viral basado en el virus TMV que porta varios antígenos de *Mycobacterium*. Asimismo, el grupo de Atabekov desarrolló un vector viral basado en PVX para la producción transitoria de proteínas heterólogas (Komarova *et al.*, 2006). Este sistema utiliza Hc-Pro del *Potato virus A* (PVA) para mejorar la eficiencia de expresión. Recientemente, se han reportado varias estrategias para la expresión transitoria de proteínas utilizando distintas proteínas supresoras (Azhakanandam *et al.*, 2007; Lindbo, 2007).

## **Expresión estable de vectores virales en plantas transgénicas**

El uso de vectores virales para expresar proteínas de forma transitoria en plantas provee una herramienta particularmente rápida y eficiente para el desarrollo y ensayo de construcciones genéticas. Sin embargo, su aplicación a escala industrial mediante técnicas como la “*magniffection*” se encuentra limitada por complicaciones relacionadas con los grandes volúmenes de cultivo bacteriano requeridos para infiltrar una cantidad adecuada de biomasa.

Una alternativa para superar esta dificultad podría ser el desarrollo de plantas transgénicas que expresen amplicones virales de forma constitutiva o inducible. Un sistema de amplicones virales se basa en la integración del genoma viral en el genoma nuclear de la planta transformada. Sistemas de este tipo permitirían obtener incrementos en los niveles de expresión en proporción directa con el grado de amplificación viral. En esta dirección, Angell *et al.* (1997) desarrollaron plantas transgénicas de *N. tabacum* que expresaban versiones modificadas del genoma de PVX bajo el control del promotor 35S del CaMV. Sin embargo, este primer intento no fue exitoso, ya que el desencadenamiento del VIGS resultó en muy bajos niveles de expresión de secuencias virales.

A medida que se fueron comprendiendo mejor los mecanismos involucrados en el PTGS y se fueron describiendo proteínas supresoras de dicho fenómeno, se propusieron alternativas que procuraban eludir estas restricciones. Un ejemplo es el sistema “*Amplicon Plus*”, basado en el desarrollo de plantas transgénicas que expresan

simultáneamente un genoma viral derivado de PVX y la secuencia que codifica la proteína HC-Pro del *Tobacco etch virus helper* (Mallory *et al.*, 2002b). Usando esta estrategia, fue posible obtener hasta 3% de  $\beta$ -glucuronidasa bacteriana a partir de vectores de reemplazo. Sin embargo, no se reportaron aplicaciones prácticas con este sistema y el reporte referido es el único publicado sobre el mismo. Una limitación importante de este enfoque radica en que la expresión constitutiva de las proteínas que suprimen fuertemente el PTGS, producen también severos problemas durante el desarrollo de las plantas, tales como infertilidad, enanismo y tumores al ser expresadas en forma estable (Dunoyer *et al.*, 2004; Chapman *et al.*, 2004). Debido a ello, el desarrollo de esta técnica debería apelar al uso de versiones mutantes de las proteínas supresoras que originen efectos menos deletéreos.

## Sistemas de expresión inducibles

Una manera más sencilla de evitar los efectos negativos de la expresión de las proteínas supresoras en plantas transgénicas consistiría en expresarlas bajo un promotor que fuera inducido una vez que éstas hayan completado su desarrollo. En este caso, el principal desafío consiste en desarrollar sistemas de expresión inducible que resulten altamente controlables. Zuo *et al.* (2000) diseñaron una estrategia basada en la inducción de la expresión génica por análogos de estradiol. Los autores crearon un factor de transcripción quimérico (XVE) que contiene el dominio de unión al ADN de la proteína bacteriana LexA, el dominio de activación de la proteína viral VP16, y el dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos de mamíferos. El factor quimérico XVE se expresa a partir de un promotor constitutivo, pero su acción transactivadora depende de la presencia de análogos de estrógenos, como el estradiol. De este modo, se logró expresar la proteína GFP de manera inducible. Dohi *et al.* (2006) generaron un amplicón viral basado en el *Tomato mosaic virus* bajo el control del promotor inducible por estrógenos y lo utilizaron para expresar la proteína GFP en la línea celular de tabaco BY-12. Se obtuvieron niveles extremadamente altos de expresión, cercanos al 10% de la proteína soluble total, y con niveles indetectables en las células sin inducir. En principio, este sistema podría ser utilizado para regular la

expresión de otros amplicones virales en plantas transgénicas para la producción de antígenos.

Con el objetivo de aumentar el control de los sistemas inducibles, el siguiente paso fue utilizar un doble “seguro”. Un sistema de este tipo se describió en el trabajo de Guo *et al.* (2003), quienes emplearon un sistema altamente regulado para expresar una “horquilla” de silenciamiento. Con anterioridad, la expresión constitutiva de la misma había resultado eficiente para silenciar genes blanco en plantas transgénicas. Sin embargo, esta técnica no podría aplicarse a genes cuyo silenciamiento pudiese bloquear el desarrollo de la planta o resultase letal para el embrión. Por otro lado, algunos sistemas de expresión que involucran pasos posteriores de amplificación (como es el caso de los amplicones) no resultan fácilmente controlables mediante los promotores inducibles convencionales, ya que mínimos niveles de transcripción pueden inducir la expresión total del sistema. Para evadir este potencial problema, el grupo de Guo desarrolló el sistema de recombinación Cre/loxP (CLX). En este caso, una horquilla de silenciamiento (otro elemento cuya actividad está mediada por un mecanismo de amplificación) fue separada de su promotor constitutivo por un fragmento de ADN flanqueado por sitios *loxP*. La recombinasa Cre, cuyo promotor se activa por análogos de estrógenos, es capaz de escindir el fragmento que se interpone entre la horquilla y su promotor, activando la expresión de la misma. Así, sólo cuando la planta se expone a estradiol, la recombinasa Cre se expresa, liberando el fragmento flanqueado por los sitios *loxP* y permitiendo la expresión del transgén. La caracterización detallada de este sistema en plantas transgénicas de *A. thaliana* y *N. benthamiana* demostró un riguroso nivel de control del mismo. A partir de estos resultados, surgió la posibilidad de utilizar el sistema CLX para expresar de manera inducible sistemas complejos y autoamplificables, como los amplicones virales.



## **Objetivos**

## **Objetivo general**

El objetivo general de este trabajo consistió en explorar nuevas alternativas para suprimir la respuesta de silenciamiento génico en plantas transgénicas con el fin de optimizar la utilización de amplicones virales como sistemas de expresión.

## **Objetivos específicos**

- a) Desarrollar un amplicón viral inducible basado en el genoma de PVX.
- b) Caracterizar nuevas proteínas virales supresoras del PTGS.
- c) Desarrollar sistemas eficientes de expresión, combinando distintas versiones de amplicones basados en PVX con la expresión de proteínas supresoras del PTGS.

## **Materiales y métodos**

# 1. Cepas bacterianas

## 1.1. *Escherichia coli*

### 1.1.1. Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizaron las cepas DH10B y BL21. Los cultivos líquidos se realizaron 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 efectuaron en placas de Petri a 37°C en medio LB suplementado con agar 1,5 %. De acuerdo con la resistencia conferida por cada construcción, el medio se suplementó con ampicilina 100 mg/L, kanamicina 50 mg/L, espectinomicina 100 mg/L o estreptomycinina 100 mg/L.

### 1.1.2. Preparación de células competentes

Se repicó una colonia aislada de un cultivo sólido en 10 mL de medio LB líquido y se creció el cultivo durante toda una noche. El mismo se inoculó en 1 L de medio LB líquido fresco y se dejó crecer nuevamente hasta alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,5-1. El cultivo se enfrió en hielo durante 15-30 min y se centrifugó a 4.000 xg durante 15 min a 4°C. El precipitado de bacterias se resuspendió por agitación suave en 1 L de H<sub>2</sub>O destilada estéril y fría. La suspensión se centrifugó nuevamente a 4.000 xg durante 15 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril y fría. Todos los pasos se realizaron manteniendo las células en hielo. Se volvió a centrifugar a 4.000 xg durante 15 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en 20 mL de solución de glicerol al 10%, estéril y frío. Se centrifugó a 4.000 xg durante 15 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en 2-3 mL de glicerol al 10%, estéril y frío, y se alicuotó en fracciones de 60 µL. Las mismas se guardaron a -70°C.

### 1.1.3. Transformación de células competentes

Se agregaron 100-500 ng del ADN de interés a 60 µL de células competentes mantenidas en hielo. La transformación se efectuó por electroporación (capacitancia 25 µF; resistencia 200 ohms; voltaje 1,5 kV; 4-5 mseg). Para recuperar las células, se agregó 1 mL de medio LB líquido y se incubó la suspensión a 37°C durante 30 min. Para seleccionar las células transformadas, se sembraron 100 µL de la suspensión bacteriana en medio sólido suplementado con los antibióticos correspondientes.

## **1.2. *Agrobacterium tumefaciens***

### **1.2.1. Cepas y condiciones de cultivo**

Se utilizó la cepa GV3101, que posee resistencia genómica a rifampicina (100 mg/L) y resistencia plasmídica (pTiC58) a gentamicina (100 mg/L). Los cultivos de *A. tumefaciens* se realizaron en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes a cada plásmido. El cultivo se incubó con agitación a 200 R.P.M. a 28°C.

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

Se sembró una colonia aislada de *A. tumefaciens* en 5 mL de medio LB y se incubó con agitación durante una noche a 28°C con agitación. Este cultivo se utilizó para inocular 200 mL de medio fresco, los que se incubaron con agitación a 28°C hasta alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,5-1. El medio de cultivo se suplementó con rifampicina y gentamicina. Para la preparación de células competentes, se utilizó el mismo protocolo que en el caso de *E. coli*. Las bacterias competentes se separaron en alícuotas y se conservaron a -70°C.

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

Se agregaron 100-500 ng del ADN de interés a 70 µL de células competentes mantenidas en hielo. La transformación se hizo por electroporación (capacitancia 25 µF; resistencia 200 ohms; voltaje 1,8 kV; 4-5 mseg). Para recuperar las células, se les agregó 500 µL de medio LB líquido y se las incubó a 28°C durante 45 min. Para seleccionar las transformantes, se sembraron 150 µL de suspensión bacteriana en medio sólido suplementado con los antibióticos correspondientes.

## **2. Material vegetal**

Las transformaciones mediadas por *A. tumefaciens* fueron realizadas en plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Samsun y *N. tabacum* cv. D8. Las agroinfiltraciones se realizaron en plantas de *N. tabacum* cv. Samsun, *N. benthamiana* y *N. benthamiana*

16C. Esta última línea expresa la proteína GFP en forma constitutiva y fue amablemente cedida por el Dr. D. Baulcombe (Ruiz *et al.*, 1998).

### **3. Aislamientos virales**

#### **3.1. *Potato virus X* (PVX)**

Se utilizó la cepa CP del *Potato virus X* (PVX<sub>CP</sub>; Orman *et al.*, 1991).

#### **3.2. *Potato virus Y* (PVY)**

Se utilizó la cepa ordinaria del *Potato virus Y* (PVY<sub>O</sub>) aislada en el Centro Internacional de la Papa (Lima-Perú) y caracterizada parcialmente en nuestro laboratorio (Bravo-Almonacid and Mentaberry, 1989).

### **4. Plásmidos**

A continuación, se presenta un listado de los plásmidos utilizados en este trabajo de Tesis.

#### **4.1. Plásmidos comerciales**

pGEM-T-easy (Promega): vector de clonado para productos de amplificación por PCR utilizando la enzima *Taq* ADN polimerasa.

pTOPO (Invitrogen Life Technologies): vector de clonado para productos de amplificación por PCR utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa.

pET28 (Novagen): vector de expresión en bacterias que permite obtener productos de fusión con 6XHis.

pDONR (Invitrogen Life Technologies): vector de clonado del sistema GateWay, utilizado para clonar fragmentos de ADN obtenidos mediante amplificación por PCR y transferirlos luego a los vectores de expresión del mismo sistema.

pK7WG2: vector con tecnología Gateway, para la expresión de proteínas en plantas (Karimi *et al.*, 2002).

pB7FWG2: vector del sistema Gateway utilizado para la expresión de proteínas en plantas bajo la forma de fusiones C-terminales a la proteína GFP (Karimi *et al.*, 2002).

## 4.2. Plásmidos cedidos por otros laboratorios

pBIN61: vector binario utilizado como base para el clonado de transgenes. Su *cassette* incluye al promotor 35S y al terminador 35S del CaMV (Bendahmane *et al.*, 2002).

pBIN61-GFP: plásmido recombinante que expresa la secuencia del ADNc de mGFP5 (Haseloff *et al.*, 1997).

pBIN61-HC-Pro: plásmido recombinante que expresa la proteína HC-Pro del PVY (Dr. D. Baulcombe, John Innes Institute, Reino Unido).

pBIN61-p19: plásmido recombinante que expresa la proteína p19 del *Tomato Bushy Stunt Virus* (Dr. D. Baulcombe, John Innes Institute, Reino Unido).

pBIN-p19: plásmido recombinante que expresa la proteína p19 del *Cymbidium ringspot virus* (Dr. J. Burgyán, Agricultural Biotechnology Center, Hungría).

pBIN-GFP-IR: plásmido recombinante que expresa repeticiones invertidas de la secuencia de GFP (Dr. J. Burgyán, Agricultural Biotechnology Center, Hungría).

pX6: vector de expresión en plantas. Su *cassette* de expresión contiene un promotor inducible por estradiol regulado por un activador transcripcional quimérico (Dr. Nam-Hai Chua, Rockefeller University, Estados Unidos).

## 4.3. Plásmidos construidos en nuestro laboratorio

pGEM-T-GFP5: plásmido recombinante que expresa la secuencia del gen *gfp5*.

pTOPO-CP: plásmido recombinante que expresa la secuencia de la CP de PVX.

pZPPVX: plásmido recombinante que permite la expresión constitutiva del amplicón PVX, constituido por el esqueleto del vector comercial pZP200 y la secuencia de ADNc del genoma de PVX insertada en el sitio *Sma*I.

pZPPVX-2aA: plásmido recombinante que permite la expresión constitutiva del amplicón PVX-2aA, constituido por el esqueleto del vector comercial pZP200 y la secuencia de ADNc del genoma quimérico de PVX-2aA.

pK7WG2-15K: plásmido recombinante obtenido mediante el sistema Gateway que expresa la secuencia codificante de la proteína 15K del GMbFV bajo el promotor constitutivo 35S del CaMV.

pK7WG2-15K-RRR: plásmido recombinante obtenido mediante el sistema Gateway que expresa la secuencia codificante de la proteína 15K-RRR del GMbFV bajo el promotor constitutivo 35S del CaMV utilizando la tecnología Gateway.

pB7FWG2-15K: plásmido recombinante obtenido mediante el sistema Gateway que expresa la secuencia codificante de la proteína 15K del GMbFV bajo el promotor constitutivo 35S del CaMV fusionada río arriba de la secuencia de gfp.

pB7FWG2-15K-RRR: plásmido recombinante obtenido mediante el sistema Gateway que expresa la secuencia de la proteína 15K-RRR del GMbFV bajo el promotor constitutivo 35S del CaMV fusionada río arriba de la secuencia de gfp.

pX6-PVX: plásmido recombinante que permite expresar en forma inducible por estradiol al amplicón PVX.

pX6-PVX-2aA: plásmido recombinante que permite expresar en forma inducible por estradiol al amplicón PVX-2aA.

**Nota:** Sólo se enumeran las versiones finales de los plásmidos utilizados en los ensayos presentados en la sección de Resultados y Discusión. No se incluyen las versiones intermediarias obtenidas en el proceso de obtención de los mismos.

## 5. Técnicas de ADN recombinante

### 5.1. Aislamiento de ADN plasmídico



### 5.1.1. 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. Las células se cosecharon por centrifugación 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 3-5 min. 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 min. Transcurrida la incubación, se centrifugaron las muestras a 13.000 xg durante 10 min 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 13.000 xg durante 10 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µL de etanol 70%, se secó y se resuspendió en 50 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada.

### 5.1.2. Purificación mediante matrices comerciales de fibra de vidrio

Las preparaciones de ADN plasmídico utilizadas para secuenciación se obtuvieron utilizando el sistema de purificación *Wizard plus SV minipreps DNA Purification System* (Promega), siguiendo el protocolo suministrado con el mismo. El sistema consiste 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 50-100 µL de H<sub>2</sub>O, según a la concentración final de ADN deseada.

## 5.2. Preparación de plásmidos e insertos de ADN

### 5.2.1. Amplificación de insertos por PCR

La amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR se efectuó utilizando las enzimas *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies) o *Pfu* ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies), de acuerdo al protocolo sugerido y con los *buffers* suministrados por la empresa proveedora. En cada reacción se utilizaron 10 ng de ADN molde y 100-150 ng de cada oligonucleótido iniciador.

### 5.2.2. Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones de plásmidos e insertos de ADN para clonado, así como para los mapeos de restricción, se realizaron con enzimas comerciales, de acuerdo con 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, y 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 h a la temperatura correspondiente utilizando 5 unidades de enzima por cada  $\mu\text{g}$  de ADN. Los productos de digestión se separaron por electroforesis en geles de agarosa de 1-2% 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 *Multi Genius Bio Imaging System* (Syngene).

### 5.2.3. Purificación de plásmidos y 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 de 1-2% en *buffer* TAE 1x. Las bandas de interés se cortaron del gel y el ADN se purificaron utilizando sistemas comerciales basados en la unión 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).

## 5.3. Reacciones de ligación de ADN

### 5.3.1. Ligación con T4 ADN ligasa

Las reacciones de ligación de plásmidos e insertos se efectuaron utilizando la enzima ADN ligasa del fago T4 (Gibco BRL; Invitrogen Life Technologies). Se usaron 25-50 ng de plásmido y relaciones molares plásmido:inserto que variaban entre 1:1 y 1:10. En cada caso, se utilizó el *buffer* suministrado junto con la enzima en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  de reacción. La cantidad de T4 ADN ligasa utilizada varió de acuerdo con las características de los extremos a ligar. Se utilizaron 0,1 unidad de enzima por reacción cuando se intentaban ligar extremos cohesivos o 1 unidad cuando de intentaban

ligar extremos romos. Cuando ambos tipos de extremos estaban presentes se utilizaron 0,5 unidades. Las reacciones se incubaron a 16°C durante 4-16 h.

### 5.3.2. Condiciones de ligación de productos de amplificación por 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 durante 1 h a temperatura ambiente. Las bacterias transformadas con el producto de la ligación se sembraron en placas suplementadas con 30 µL de IPTG 100 mM y 30 µL de X-gal 2% en dimetilformamida, lo que permite diferenciar los posibles clones positivos (colonias de coloración blanca) de los que contienen vector religado o sin cortar (colonias de coloración azul). 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 h a 16°C.

### 5.4. Recombinación mediante el sistema *Gateway*

Los vectores de expresión en plantas para la proteína 15K y su versión mutante fueron ensamblados utilizando el sistema *Gateway*. En un primer paso, se amplificó la secuencia que codifica la proteína 15K mediante la técnica de PCR utilizando la enzima *Pfu*. Los iniciadores utilizados contienen parte de la secuencia de 15K y una secuencia de recombinación adicional, attB. El producto resultante está flanqueado por secuencias attB, las que permiten realizar el clonado del fragmento en el vector intermediario pDONR, utilizando la recombinasa BP (Invitrogen Life Technologies). En un segundo paso, se realizó la reacción de recombinación entre el plásmido recombinante pDONR-15K con los vectores de expresión pK7WG2 o pB7WG2, utilizando la recombinasa LR (Invitrogen Life Technologies).

## **6. Infección controlada de plantas de *N. tabacum***

### **6.1. Inoculación de plantas con extractos vegetales infectados por PVY o PVX**

La inoculación de plantas de tabaco con PVY o PVX se realizó sobre hojas levemente lesionadas mediante el raspado suave con *carborundum*. En el caso de la infección con PVY, se utilizó como inóculo un extracto de hojas colectadas y liofilizadas luego de una infección primaria con dicho virus. La infección de plantas de tabaco con PVX se realizó utilizando extractos de hojas frescas infiltradas con el amplicón pZP-PVX.

### **6.2. Ensayos de agroinfiltración**

Se efectuaron agroinfiltraciones con agrobacterias transformadas con los distintos vectores y construcciones genéticas (pBIN, pBIN-GFP, pBIN-GFP-IR, pBIN-HCPro, pBIN-p19, pK7WG2-15K, pK7WG2-15K-RRR). Se realizaron diluciones 1/10 de cultivos de *A. tumefaciens* incubados durante una noche en medio LB suplementado con los antibióticos apropiados. Se incubó a 28°C con agitación hasta alcanzar la D.O.<sub>600nm</sub> de 0,6-1,2. Se centrifugó 10 min a 3.500 xg y se resuspendió en H<sub>2</sub>O destilada hasta alcanzar la D.O. deseada (0,1 para pBIN-GFP y pBIN; 1 para los distintos plasmidos recombinantes expresando supresores del silenciamiento; 0,4 para pBIN-GFP-IR; 0,4 para amplicones virales). Se agroinfiltraron las hojas de *N. benthamiana* o *N. tabacum* en la cara abaxial con una jeringa de 1 mL sin aguja.

## **7. Transformación de plantas de tabaco mediada por *A. tumefaciens***

## 7.1. Protocolo de transformación

La transformación de plantas de *N. tabacum* cv Samsun mediante *A. tumefaciens* se efectuó siguiendo el protocolo descrito por Horsch *et al.* (1985). Brevemente, se cortaron discos de 1-3 cm<sup>2</sup> de hojas de plantas cultivadas *in vitro* en los que se realizaron pequeños cortes en los bordes. Los discos se incubaron 5 min en 20 mL de medio MS líquido (Murashige and Skoog, 1962) inoculado con 200 µL de un cultivo saturado de células de *A. tumefaciens* transformadas con la construcción de interés. Los discos se secaron sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de bacterias y se transfirieron a frascos conteniendo medio MS sólido (MS adicionado con 0,8 % de agar), suplementado con las hormonas ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA) 0,1 mg/L y 6-bencilaminopurina (BAP) 1 mg/L (Sigma-Aldrich). Como controles de regeneración y de eficacia de selección, se utilizaron grupos de discos de hojas sometidos al mismo tratamiento, pero omitiendo el agregado del cultivo de *A. tumefaciens*. Los frascos se incubaron durante 48 h a 26°C con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad.

Transcurridas las 48 h de co-cultivo, los discos se transfirieron a frascos conteniendo medio MS sólido suplementado con hormonas (ANA 0,1 mg/L; BAP 1 mg/L), kanamicina 50 mg/L o glufosinato 3 mg/L y cefotaxime 200 mg/L. De los discos utilizados como control, un grupo fue transferido a medio conteniendo ambos antibióticos para verificar la efectividad de la selección y otro grupo fue transferido a medio sin agentes selectores como control de regeneración. La incubación se hizo a 26°C con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad y los discos se repicaron a medio fresco con hormonas y antibióticos cada 3 semanas.

Los brotes, que se desarrollaron 90-120 d más tarde, se separaron del disco original y se repicaron a medio MS sólido sin hormonas suplementado con antibióticos (kanamicina 50 mg/L o glufosinato 3 mg/L y cefotaxime 200 mg/L) para promover el desarrollo de raíces. Para evitar la recolección de plantas originadas a partir de un mismo evento de transformación, sólo se eligieron aquellos brotes que pudieron ser bien discriminados de los adyacentes. Cuando se obtuvieron múltiples tallos de un mismo callo, sólo se transfirió uno de ellos al medio de enraizamiento y el resto se descartó. Las plantas se mantuvieron *in vitro* realizando repiques a medio MS sólido conteniendo antibióticos cada 4 semanas.

## **7.2. Protocolo de rusticación**

Antes de pasar a tierra las plántulas obtenidas, las raíces se lavaron cuidadosamente con agua corriente para eliminar los restos de medio. Las plántulas se transfirieron luego a macetas conteniendo una mezcla 3:1:1 de humus, turba y perlita. Durante la primera semana, las plantas se mantuvieron cubiertas con un film de polietileno para evitar su deshidratación y facilitar su adaptación a las nuevas condiciones de humedad. El desarrollo de las plantas se llevó a cabo en condiciones de invernadero con un fotoperíodo controlado de 14/10 h luz/oscuridad y a una temperatura de entre 24 y 27°C.

## **8. Esterilización y germinación de semillas de tabaco *in vitro***

Las semillas se sumergieron en etanol 70 % y luego se traspasaron a una solución de lavandina comercial al 9%, en la que se las mantuvo durante 15 min. A continuación, se hicieron 3 pasajes sucesivos por agua estéril para eliminar los restos de lavandina, se secaron y se sembraron en medio MS sólido. Las semillas se hicieron germinar y las plántulas obtenidas se cultivaron a 26°C con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad.

## **9. Análisis de ADN**

### **9.1. Aislamiento de ADN de plantas de tabaco para análisis por PCR**

Se molieron 50 mg de tejido foliar en un tubo de microcentrífuga utilizando un vástago plástico de punta cónica y se agregaron 350 µL 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 min. Se agregaron 150 µL de acetato de potasio 3 M, 5,5 frío; se agitó por inversión y se incubó en hielo durante 20 min. Transcurrida la incubación, se centrifugó a 13.000 xg

durante 10 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregó 1 µL de ribonucleasa A 100 µg/mL y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. El ADN se precipitó con 1 volumen de isopropanol y se centrifugó a 13.000 xg durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado se lavó con etanol 80%, se dejó secar y finalmente se resuspendió en 25 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada.

## 9.2. Análisis por PCR de plantas transformadas

La evaluación preliminar de las plantas transformadas con *A. tumefaciens* se realizó mediante la amplificación por PCR de secuencias específicas.

### 9.2.1. Plantas transformadas con el amplicón pZP-PVX

Para la detección del amplicón pZP-PVX se utilizaron los siguientes iniciadores: 3C (AAAgggCCCggCgCgCCCgggATCAAaggCTCTggCTAATCT). 3D (ggTAgTgAAACAActgCTTCTgCAACAgtCgT).

Los mismos permiten amplificar específicamente la CP viral. Para realizar la amplificación en el ciclador térmico, se utilizaron 35 ciclos de las siguientes condiciones: 1 min a 94°C; 1 min a 55°C; 1 min a 72°C.

### 9.2.2. Plantas transformadas con el amplicón inducible pX6-PVX

Para la detección del amplicón pX6-PVX se utilizaron los siguientes iniciadores: PVX-Kpn up (ggTACCgAAAActAAACCAAACACCAC). 52 (ggCAAgAgggAgCCTAgCACCTCCAAAgtTTATTC).

Los mismos permiten amplificar específicamente la CP viral. Para efectuar la amplificación en el ciclador térmico, se utilizaron 35 ciclos de las siguientes condiciones: 45 seg 94°C; 45 seg 55°C; 1 min 72°C.

### 9.2.3. Plantas transformadas con el amplicón PVX-2aA

Para la detección del amplicón pZP-PVX-2aA se utilizaron los siguientes iniciadores: 3C (AAAgggCCCggCgCgCCCgggATCAAaggCTCTggCTAATCT).

3D (ggTAgTgAAACAACAgCTTCTgCAACAgtCgT).

Los mismos permiten amplificar específicamente la CP viral (en este caso fusionada al epítoto A del FMDV). Para realizar la amplificación en el ciclador térmico, se utilizaron 35 ciclos de las siguientes condiciones: 45 seg 94°C; 45 seg 53°C; 1:10 min 72°C.

#### **9.2.4. Plantas transformadas con el gen 15K**

Para la detección del vector pK7WG2-15K se utilizaron los siguientes iniciadores:

Car15KGW-up

(ggggACAAgTTTgTACAAAAAAgCAggCTTAATgATTCCTCAAgACTTC).

Car15KGW-down

(ggggACCACTTTgTACAAgAAAgCTgggTCTATAATTTTAAAATTTTAAAA).

Los mismos permiten amplificar específicamente la secuencia completa del transgén. Para realizar la amplificación en el ciclador térmico, se utilizaron 35 ciclos de las siguientes condiciones: 45 seg 94°C; 45 seg 50°C; 45 seg 72°C.

#### **9.2.5. Plantas transformadas con el gen 15K-RRR**

Para la detección del vector pK7WG2-15K-RRR se utilizaron los siguientes iniciadores:

Car15KGW-up

(ggggACAAgTTTgTACAAAAAAgCAggCTTAATgATTCCTCAAgACTTC).

Car15KGW-down

(ggggACCACTTTgTACAAgAAAgCTgggTCTATAATTTTAAAATTTTAAAA).

Los mismos permiten amplificar específicamente la secuencia completa del transgén. Para realizar la amplificación en el ciclador térmico, se utilizaron 35 ciclos de las siguientes condiciones: 45 seg 94°C; 45 seg 50°C; 45 seg 72°C.

Se mezclaron aproximadamente 100 ng del ADN purificado con 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 5 µL de buffer 10X suministrado con la enzima, 0,4 µL de dNTPs 25 mM, 2 µL de cada iniciador 50 µM, 2,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies) y H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 50 µL. Se desnaturizó durante 5 min a 95°C y



se efectuaron los ciclos de amplificación según se indica para cada caso en un termociclador Mastercycler (Eppendorf), realizando una incubación previa de 4 min a 95°C y una final de 10 min a 72°C para completar la polimerización.

## **10. Análisis de ARN**

### **10.1. Extracción del ARN total de plantas de tabaco**

El ARN total de las plantas transformadas, de plantas agroinfiltradas, y de los controles sin transformar o sin agroinfiltrar se purificó por extracción con TRIzol (Invitrogen Life Technologies). Brevemente, se molieron 5 discos de hojas de tabaco en un mortero previamente lavado con una solución de SDS 1%. Se agregaron 0,75 mL de TRIzol (Invitrogen Life Technologies) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min un tubo de microcentrífuga. Se agregaron 0,2 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 seg y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se centrifugó a 13.000 xg durante 15 min a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. El ARN se precipitó agregando 0,3 mL de isopropanol e incubando a temperatura ambiente durante 10 min, seguidos por una centrifugación a 13.000 xg durante 20 min a 4°C. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol 75%, se dejó secar y se resuspendió en 35 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas.

### **10.2. Ensayos de *Northern blot***

#### **10.2.1. Detección de ARNm**

**Electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes:** se sembraron 5-20 µg de ARN en geles de agarosa 1,5% en condiciones desnaturalizantes. Las muestras se prepararon incubando 15 µL de la extracción de ARN con 15 µL de mezcla de siembra libre de ribonucleasas (formamida 400 µL; MOPS 10X 80 µL; formaldehído 122 µL; azul de bromofenol 0,25%; bromuro de etidio 8 µL) a 65°C durante 15 min. Para el armado del gel desnaturalizante, se fundieron 2,4 g de agarosa en 115 mL de H<sub>2</sub>O, se dejó enfriar, y antes de que comenzara a gelificar, se agregaron 16 mL de MOPS 10X y 28 mL de formaldehído 37%. La electroforesis se realizó a 50 V constantes en MOPS

1X (MOPS 10X: MOPS 0,2 M; acetato de sodio 0,05 M; EDTA disódico 0,01 M, pH 7).

**Transferencia a membranas de nylon:** una vez finalizada la electroforesis, el ARN se transfirió por capilaridad a membranas de nylon Hybond N+ (Amersham Biosciences), utilizando como *buffer* de transferencia SSC 10X (NaCl 1,5 M; citrato de sodio 0,15 M, pH 7).

#### **Preparación de los moldes para sondas de ADN:**

**Sonda PVX:** la secuencia de la cápside viral (CP) se liberó del plásmido pTOPO-CP por digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. Los productos de reacción se corrieron en un gel de agarosa 1% y se purificó el fragmento de 700 pb.

**Sonda GFP:** la secuencia de GFP se liberó del plásmido pGEM-T-GFP5 por digestión con las enzimas de restricción *ApaI* y *SmaI*. Los productos de reacción se corrieron en un gel de agarosa 1% y se purificó el fragmento de 650 pb.

**Sonda 15K:** la secuencia de 15K se amplificó por PCR con iniciadores específicos. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa 1% y se purificó el fragmento de 450 pb.

**Hibridación y marcación de sondas:** se pre-hibridaron las membranas con *buffer* CHURCH (SDS 7%, BSA -fracción V- 1%, NaHPO<sub>4</sub> 0,5 M, pH 7,2; EDTA 1 mM, pH 8) a 65°C en un horno de hibridación. Luego de 2 h, se agregó la sonda marcada con radioisótopos y se incubó a 65°C durante toda la noche.

Las sondas utilizadas en los ensayos de *Northern blot* se prepararon mediante el sistema de iniciación al azar *Prime-a-gene* (Promega). Se desnaturalizaron 25 ng de fragmento molde por incubación a 95°C durante 5 min y se mezclaron con 2 µL de seroalbúmina bovina 400 µg/mL, 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 1 h a temperatura ambiente. La reacción se detuvo incubando a 95°C por 2 min y agregando EDTA hasta obtener una concentración final de 20 mM.

#### **10.2.2. Detección de ARNs pequeños**

**Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes:** se sembraron entre 15 y 30 µg de ARN en geles de poliacrilamida de 8% en condiciones desnaturalizantes. Las muestras se prepararon incubando 15 µL de la extracción de

ARN con 15  $\mu\text{L}$  de mezcla de siembra libre de ribonucleasas (10 mL de formamida; 200  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,5 M, pH 8; 10 mg de xylene cyanol FF; 10 mg de azul de bromofenol) a 65°C durante 15 min. Para armar el gel desnaturizante se disolvieron 25 g de urea con 10 mL de TBE 5X (54 g Tris base; 27,5 g ácido bórico, 20 mL EDTA 0,5 M, pH 8) y 10 mL acrilamida 40% (38:2 acrilamida:bis-acrilamida). Una vez disuelta la urea, se agregó H<sub>2</sub>O estéril (cantidad suficiente para 50 mL); 450  $\mu\text{L}$  de APS 10% y 20  $\mu\text{L}$  de TEMED. La electroforesis se realizó a 30 mA constantes en TBE 1X.

**Transferencia a membranas de nylon:** una vez finalizada la electroforesis, el ARN se transfirió por capilaridad a membranas de nylon Hybond N+ (Amersham Biosciences), utilizando como *buffer* de transferencia SSC 10X (NaCl 1,5 M; citrato de sodio 0,15 M, pH 7).

**Preparación de los moldes para sondas de ARN:**

**Sonda GFP:** se linealizó el plásmido pGEM-T-GFP5 con *ClaI*. Se agregó 1  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (Fermentas) y se incubó 30 min a 37°C. Se agregaron 350  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O destilada y se realizaron 2 extracciones con fenol/cloroformo. Luego se agregaron 0,3 volúmenes de NH<sub>4</sub>AcO 6 M y 2,5 volúmenes de etanol. Se incubó toda la noche a -20°C y se centrifugó 15 min a 13.000 xg. Finalmente, se lavó el precipitado con 1 mL de etanol 70% y se resuspendió en H<sub>2</sub>O destilada.

**Hibridación y marcación de sondas:** se pre-hibridaron las membranas con *buffer* para ARNs pequeños (50 mL de formamida; 10 mL de Denhardt's 50X; 5 mL de SDS 10%; 25 mL de SSPE 20X; 200  $\mu\text{L}$  de ADN de esperma de salmón 10 mg/mL desnaturizado; 9 mL de H<sub>2</sub>O destilada libre de ribonucleasas) a 42°C en un horno de hibridación. Luego de 2 h se renovó el *buffer*, se agregó la sonda radioactiva y se incubó a 65°C durante toda la noche.

Las sondas utilizadas para la detección de ARNs pequeños se prepararon mediante transcripción *in vitro* con la enzima ARN polimerasa del fago T7 (*Riboprobe in vitro transcription systems*; Promega). Se mezcló 0,2-1 mg de fragmento molde con 4  $\mu\text{L}$  de *buffer* 5X; 2  $\mu\text{L}$  de DTT 100 mM; 1  $\mu\text{L}$  de RNAsin 40 U/ $\mu\text{L}$ ; 3  $\mu\text{L}$  de una solución de rATP-rCTP-rGTP de 2,5 mM cada uno; 1  $\mu\text{L}$  de rUTP 240  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{L}$  5' [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]rUTP (10 mCi/mL) 150  $\mu\text{Ci}$  con actividad específica de 3.000 Ci/mmol; 1,5  $\mu\text{L}$  T7 ARN polimerasa 18 U/ $\mu\text{L}$ ; en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . Esta mezcla se incubó durante 1 h a 37°C y se utilizó en la hibridación.

## 11. Análisis de proteínas

### 11.1. Extracción de proteínas

#### 11.1.1. Extracción de proteínas totales de hojas de tabaco

Se homogeneizaron 3 discos de tejido vegetal con 150  $\mu$ L de *buffer* de siembra (4,8 mL de H<sub>2</sub>O; 1,2 mL de Tris – HCl 0,5 M, pH 6,8; 2 mL de SDS 10 %; 1 mL de glicerol; 0,5 mL de azul de bromofenol 0,5%; 0,05 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol). Para los ensayos de *Western blot*, se centrifugó el extracto a 13.000 xg por 2 min y se sembraron 5-20  $\mu$ L de la muestra en el gel de poliacrilamida 12 – 17%.

#### 11.1.2. Purificación de proteínas en columnas de Ni<sup>2+</sup>

Se inocularon 800 mL de LB conteniendo kanamicina con 8 mL de un cultivo a de células de *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido pET-28a-15K. El cultivo se desarrolló a 37°C con agitación hasta una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,6-0,8. En estas condiciones, se realizó una inducción de 4 h con IPTG 1 mM final. Se cosecharon las células mediante una centrifugación de 15 min a 4.000 xg y 4°C y se resuspendió el precipitado en 60 mL de buffer TN (50 mM Tris-HCl, pH 8; 20 mM NaCl). Se sonicó la suspensión 2 veces por 30 seg y se congeló en N<sub>2</sub> líquido para luego descongelar a 37°C. El ciclo de sonicado, congelación y descongelación se repitió 5 veces, y luego se centrifugó a 13.000 xg por 30 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 10 mL de TNU (*buffer* TN, urea 8 M) con agitación a temperatura ambiente por 20 min. Se volvió a sonicar 4 veces por 30 seg Se centrifugó a 13.000 xg por 30 min a 10°C. Se reservó el sobrenadante (SN1) y el precipitado se resuspendió en 10 mL de TNU. Se sonicó nuevamente 3 veces por 30 seg. Se centrifugó a 13.000 xg por 30 min a 14°C y se reservó el sobrenadante (SN2).

Se equilibraron 300  $\mu$ L de resina HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) en 1 mL de buffer TNU. Se sembraron los sobrenadantes SN1 y SN2 y, tras una incubación de 2 h con agitación a 4°C, se centrifugó durante 3 min a 3.500 xg a 4°C y se guardó el percolado a 4°C. La columna se lavó 3 veces con 3 mL de TNU (1 vez con TNU y 2 veces con TNU + 5 mM de imidazol). Se centrifugó 3 min a 4.000 xg y se guardaron los lavados (L1, L2, L3). Se eluyó con 300  $\mu$ L de TNU + 600 mM de imidazol (concentración final 300 mM) durante toda la noche a 4°C. Se centrifugó

durante 4 min a 4.000 xg a 10°C y se realizó una segunda elución con 300 µL de TNU + 600 mM de imidazol (concentración final 300 mM) toda la noche a 4°C.

## **12. Electroforesis de proteínas**

### **12.1. Geles de poliacrilamida-SDS**

Se prepararon geles desnaturalizantes de poliacrilamida de 10 x 10 cm y de 1 ó 1,5 mm de espesor, utilizando el sistema armador SE 260 *Mini Vertical Unit* (Hoeffer) o *Mini Protean III* (BioRad) siguiendo los protocolos publicados en Sambrook *et al.*, 1989. Las muestras se prepararon en *buffer* de siembra y se calentaron a 100°C durante 5 min para desnaturalizar totalmente las proteínas. La electroforesis se realizó a 100-150 V constantes en *buffer* Tris-Glicina (25 mM Tris-HCl, pH 8,8; 190 mM glicina; 0,1% SDS).

### **12.2. Tinción con Coomasie Brilliant Blue**

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

### **12.3. Ensayo de *Western blot***

#### **12.3.1. Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa**

Se utilizó el sistema de transferencia *Trans blot SD - Semi Dry Transfer Cell* (BioRad) y membranas de nitrocelulosa *Hybond C* (Amersham Biosciences). La transferencia se llevó a cabo a 25 V constantes, durante 60 min. Como *buffer* de transferencia se utilizó 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 196 mM glicina; 20 % metanol.

### 12.3.2. 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 (50 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 0,1% v/v Tween 20)] durante 30-45 min a temperatura ambiente y con agitación suave. Transcurrida la incubación, se cambió la solución por el primer anticuerpo, diluido en solución de bloqueo, y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con TTBS y se agregó el segundo anticuerpo diluido en solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h adicional y se hicieron 2 lavados de 5 min cada uno con TTBS y 1 con TBS.

### 12.3.3. Revelado con NBT/BCIP

Los anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina se revelaron utilizando como sustrato cromogénico una mezcla de NBT (Nitroblue tetrazolium; Sigma-Aldrich) y BCIP (5 bromo-4 cloro-3 indoil fosfato; Sigma-Aldrich). Luego del último lavado con TBS se hizo un enjuague con *buffer* fosfatasa (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Transcurrida la incubación, cada membrana se reveló en oscuridad, con 10 mL de *buffer* fosfatasa conteniendo 75 µL de BCIP (20 mg/mL en H<sub>2</sub>O) y 75 µL de NBT (40 mg/mL, en dimetilformamida 70%). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: a) IgG de conejo anti-CP de PVX 1/500; b) IgG de conejo anti-CP de PVY 1/1.000; c) IgG de ratón anti-sitio A del FMDV 1/500; d) IgG de conejo anti-p24 de PVX 1/500; e) IgG de conejo anti-GFP 1/3000. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: a) anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina 1/4.000 (Gibco BRL); b) anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina 1/4.000 (Gibco BRL).

## 13. Ensayos de *band shift*

### 13.1. Marcación de oligonucleótidos

Se marcaron 100 ng de las cadenas sentido y anti-sentido de ARN sintéticos de 21, 24, o 26 nt. Para ello se incubó cada cadena de ARN por separado con 10 U de polinucleótido quinasa (PNK; Fermentas), 1  $\mu$ L de *buffer* PNK (Fermentas), 1  $\mu$ L [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP 100mM, H<sub>2</sub>O destilada c.s.p. 10  $\mu$ L. Cada mezcla de reacción se incubó 1 h a 37°C. Para obtener ARN de doble cadena, se combinó ARN sentido con su contraparte anti-sentido, y se realizó el *annealing* incubando en agua a 95°C durante 3-4 h hasta que la temperatura descendió a 25°C.

### 13.2. Purificación de oligonucleótidos marcados con radioisótopos

Los oligonucleótidos marcados se separaron en un gel de poliacrilamida de 15% (3,75 mL acrilamida 40%; 1 mL de TBE 10X; 5,25 mL de H<sub>2</sub>O destilada; 7,5  $\mu$ L de TEMED; 75  $\mu$ L de persulfato de amonio 10%). El gel se pre-corrió durante 30 min con TBE 1x en la cámara fría (10 V/cm<sup>2</sup> – 80 V) y la corrida se realizó durante 3 h en las mismas condiciones. Se agregó a las muestras *buffer* de siembra de ADN 10X (glicerol 25%; EDTA 0,2 mM; Azul de bromofenol 0,25%).

Al finalizar la corrida, se realizó una autorradiografía para localizar los oligonucleótidos en el gel. Luego, se cortaron las bandas correspondientes y se incubaron en 0,5 mL de *buffer* de extracción (2% SDS; 300 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA) durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación. Se tomó el sobrenadante de cada tubo, se agregó 1 mL de etanol, y se incubó en hielo durante 30 min. Se centrifugó durante 30 min a 13.000 RPM a 4°C. El precipitado se lavó con etanol 70%, se dejó secar al aire y se resuspendió en 40  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada libre de ARNasas. Finalmente, se tomó 1  $\mu$ L de ARN marcado y se diluyó la marca radioactiva hasta obtener 1 c.p.s./ $\mu$ L.

### 13.3. Extracción de proteínas

Se tomó una hoja de *N. benthamiana* agroinfiltrada con la proteína a evaluar (15K ó p19 como control) a los 3 d.p.i. y se machacó en un mortero. Se agregaron 500  $\mu$ L de *buffer* BS (83 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,8 mM MgCl<sub>2</sub>; 66 mM KCl; 100 mM

NaCl, 1 mM DTT. Se centrifugó 3 min a 4°C y el sobrenadante se volvió a centrifugar 10 min a 4°C. Se separan alícuotas de 10 µL que se guardaron a -80°C.

### **13.4. Ensayos de unión entre proteínas y ácidos nucleicos**

Se incubó 0,2 µL de ARN marcado radioactivamente con 1 µL de proteína en 9 µL de *master mix* [52,5 µL BS 4X; 2 µL DTT; 121 µL H<sub>2</sub>O destilada; 2,5 µL RNAsin (Promega); 21 µL Tween 20 0,2%] durante 30-40 min a temperatura ambiente. Luego, se sembraron las mezclas de reacción en un gel de poliacrilamida 6% (9 mL de acrilamida 40%; 3 mL de TBE 10X; 48 mL de H<sub>2</sub>O destilada; 45 µL de TEMED; 450 µL de persulfato de amonio 10%) pre-corrido durante 30 min a 130 V con TBE 0,5X. Se corrieron las muestras con *buffer* de siembra de ADN 10X (glicerol 25%; EDTA 0,2 mM; Azul de bromofenol 0,25%) en la cámara fría durante 2,5 h a (10 V/cm<sup>2</sup>). Luego, se secó el gel durante 30 min a 80°C sobre papel Whatmann. Finalmente, se realizó la exposición en el lector *Phosphoimager Storm* (GE Healthcare).

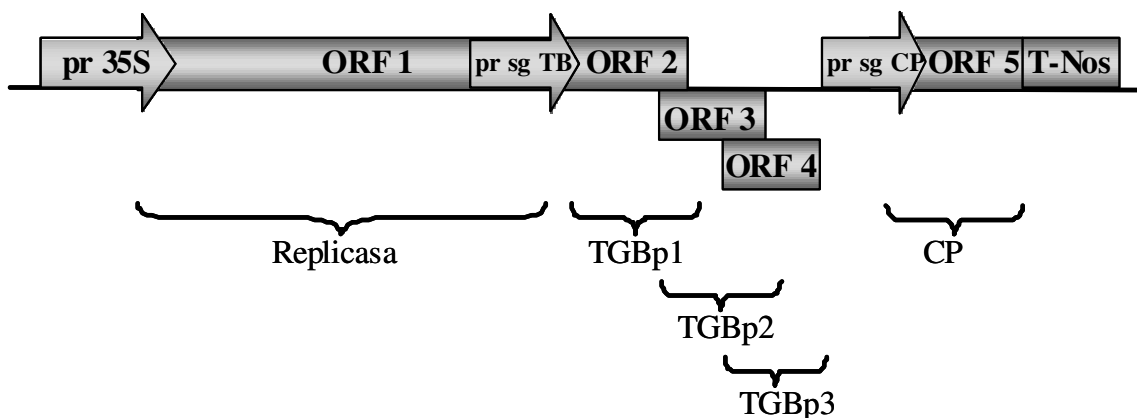


## **Resultados y discusión**

## Capítulo I

### Obtención y caracterización de líneas de *N. tabacum* que expresan un amplicón basado en el *Potato virus X* en forma constitutiva

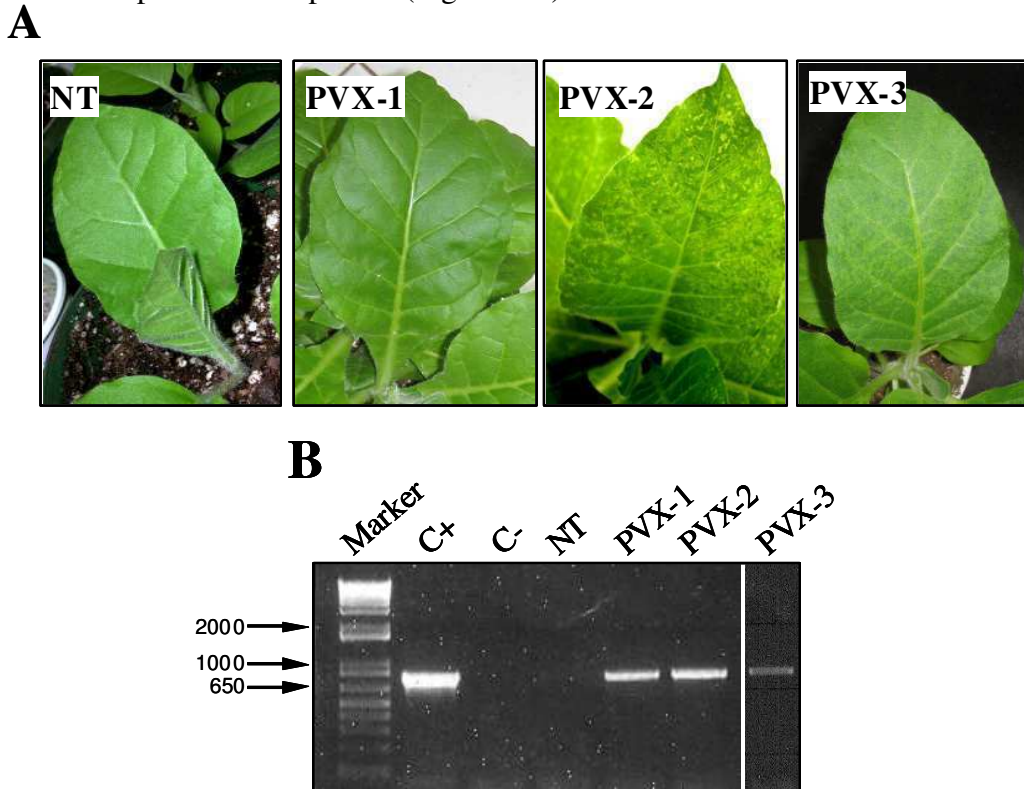
En nuestro laboratorio se aisló una cepa de PVX (Orman *et al.*, 1990), a partir del cual se desarrolló una copia infectiva viral basada en su ADNc genómico (Calamante, 1998). A partir de dicha copia infectiva se obtuvo un amplicón viral, denominado pZP-PVX, el cual posee todos los ORFs virales y cuya expresión está dirigida por el promotor 35S del CaMV (Figura 5). Este amplicón ha sido utilizado con éxito para la expresión transitoria de antígenos de *Toxoplasma gondii* y *Mycobacterium bovis* (Clemente *et al.*, 2005; Zelada *et al.*, 2006; Ferraro *et al.*, 2008).



**Figura 5.** Esquema del amplicón pZP-PVX. La secuencia completa del ADNc viral fue clonada bajo la dirección del promotor 35S del CaMV (pr 35S) y del terminador transcripcional del gen de la nopalina sintetasa (T-Nos). Se muestran los ORFs 1 a 5 que corresponden a la replicasa, TGBp1, TGBp2, TGBp3, y a la cápside viral, respectivamente. Las flechas señalan la posición de los promotores subgenómicos correspondientes a los ORFs del triple bloque de genes (pr sg TB) y a la proteína de la cápside (pr sg CP).

Con el fin de establecer un sistema de expresión viral que evitase la inoculación masiva de plantas y el manejo de grandes volúmenes de cultivo bacteriano se decidió evaluar la capacidad de expresión del amplicón pZP-PVX. Para ello, se transformaron plantas de *N. tabacum* con el vector de expresión pZP-PVX, que permite expresar en forma constitutiva el genoma de PVX, obteniéndose tres líneas transgénicas independientes, PVX-1, PVX-2, y PVX-3 (Figura 6.A). La presencia del amplicón se

evaluó mediante PCR con iniciadores específicos para la secuencia que codifica la CP viral, observándose la presencia de un fragmento de  $\approx 700$  pb que correspondía con el tamaño de amplificación esperado (Figura 6.B).

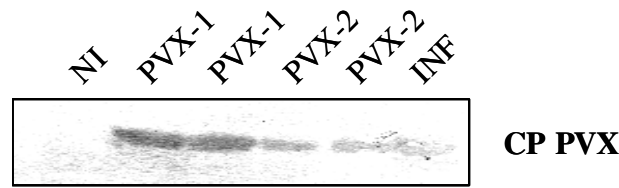


**Figura 6.** Plantas de *N. tabacum* transformadas con la construcción pZP-PVX. (A) Hojas de una planta *N. tabacum* no transformada y de las líneas PVX-1, PVX-2 y PVX-3. Los síntomas de infección por PVX en las líneas PVX-2 y PVX-3 se observan como un mosaico clorótico. (B) Análisis por PCR del ADN genómico de las líneas PVX-1, PVX-2, y PVX-3. El plásmido pG-PVX se utilizó como control positivo (C+). La mezcla de reacción sin ADN (C-) y el ADN de una planta no transformada (NT) se utilizaron como controles negativos. Marker: estándar de pesos moleculares (pb). La flecha señala la posición del fragmento de amplificación de  $\approx 700$  pb.

Con el fin de establecer que las plantas transformadas expresaban la secuencia viral, las mismas se evaluaron según dos criterios: 1) producción de viriones infectivos y 2) producción de proteínas virales.

Para analizar su capacidad de producir viriones infectivos se inocularon plantas no transformadas de *N. tabacum* cv Samsun con extractos de las líneas transformadas. A los 7 d.p.i. se observaron síntomas de infección viral en todas las plantas inoculadas. Se tomaron muestras de dichas plantas y se analizó la presencia de la CP viral mediante la técnica de *Western blot* (Figura 7). La acumulación de CP se constató en plantas tratadas tanto con extractos de PVX-1 como de PVX-2, indicando que ambas líneas

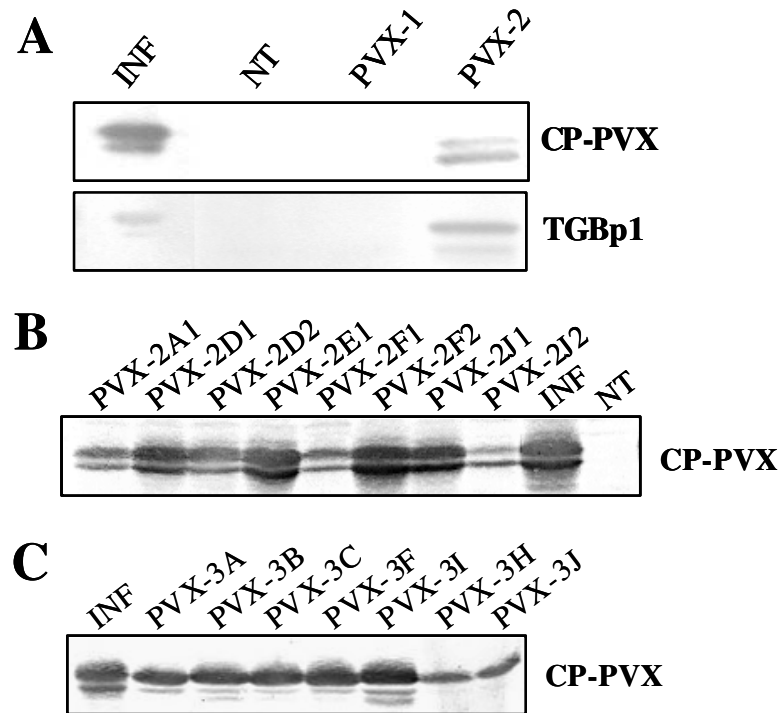
transformadas producían viriones infectivos.



**Figura 7.** Análisis de *Western blot* de plantas de *N. tabacum* cv Samsun inoculadas con extractos de las líneas PVX-1 y PVX-2. Los extractos proteicos obtenidos de las plantas inoculadas se separaron en SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron con anticuerpos específicos para la CP de PVX. Como controles se utilizaron muestras de una planta no infectada (NI) y de una planta infectada con PVX (INF).

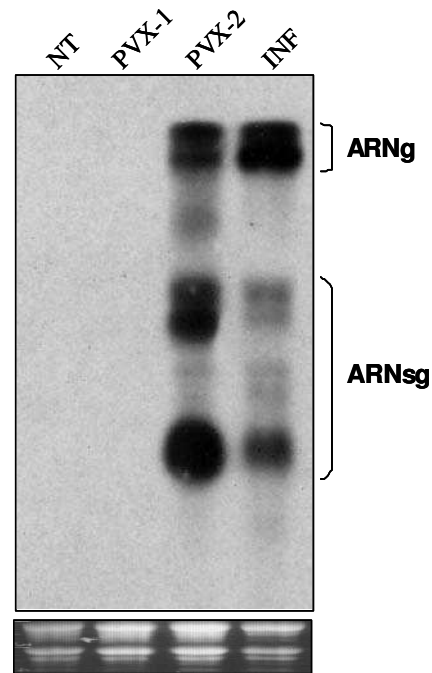
Por otro lado, se tomaron muestras de las líneas transformadas y se analizó la presencia de las proteínas virales mediante la técnica de *Western blot*. Se observó expresión de la CP de PVX y de la TGBp1 en plantas PVX-2 y de la CP de PVX en plantas PVX-3 (Figura 8.A). En contraste con este resultado, no se detectaron proteínas virales en plantas PVX-1. Como controles, se utilizaron muestras de una planta no transformada y de una planta infectada con PVX.

La aparición de síntomas de infección por PVX, así como la producción de proteínas virales se mantuvo estable durante al menos tres generaciones en las líneas derivadas de PVX-2 y durante dos generaciones en las líneas derivadas de PVX-3 (Figura 8.B y C).



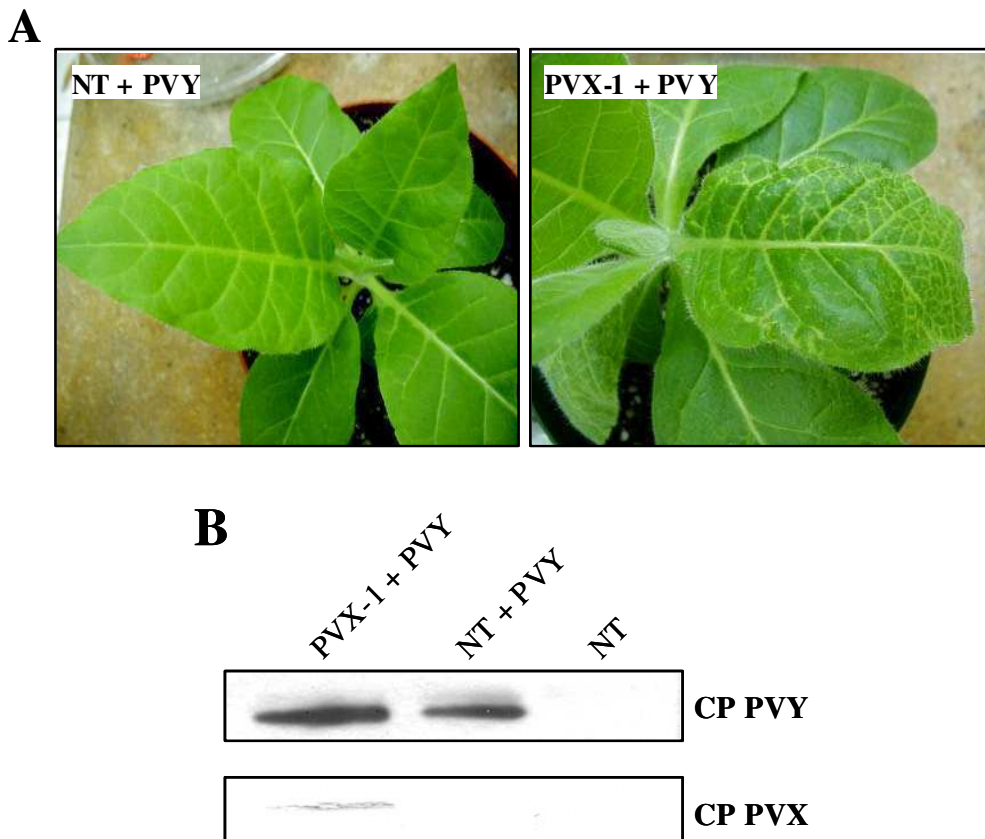
**Figura 8.** Expresión de proteínas virales en plantas de las líneas PVX-1, PVX-2, y PVX-3. (A) Análisis de *Western blot* de extractos totales de hoja de las líneas PVX-1 y PVX-2 (generación T1). (B) Análisis de *Western blot* de extractos de distintas plantas individuales derivadas de PVX-2 (generación T3, líneas A-J). (C) Análisis de *Western blot* de extractos de distintas plantas individuales derivadas de PVX-3 (generación T2, líneas A-J). En todos los casos se utilizaron extractos de plantas no transformadas (NT) e infectadas con PVX (INF) como controles negativos y positivos, respectivamente. Las muestras fueron reveladas con anticuerpos específicos para la CP y la proteína TGBp1 de PVX.

Como se describió anteriormente, la línea PVX-1 no mostró síntomas de infección ni produjo proteínas virales. Ello sugirió que, tal como se reportó en otros casos (Angell *et al.*, 1997), la expresión de la secuencia viral podría haber inducido una fuerte respuesta de PTGS en esta línea. Con el fin de establecer los niveles de ARN genómico viral en PVX-1 y PVX-2, se extrajo ARN total a partir de hojas de plantas adultas de ambas líneas y se realizó un análisis de *Northern blot* utilizando sondas específicas para el ORF de la CP viral. Como controles negativo y positivo, se utilizaron plantas no transformadas y plantas infectadas con PVX, respectivamente. Tal como se infería, PVX-1 no produce niveles detectables de ARN viral. En cambio, PVX-2 mostró niveles de acumulación del ARN viral comparables a los presentes en las plantas infectadas (Figura 9).



**Figura 9.** Análisis de *Northern blot* de las líneas PVX-1 y PVX-2. Se extrajeron muestras de ARN total de plantas PVX-1 y PVX-2, de plantas no transformadas (NT) y de plantas infectadas con PVX. El ARN se separó en un gel de agarosa (10  $\mu\text{g}/\text{calle}$ ) y se reveló con una sonda específica para la CP de PVX. (A) Autorradiografía correspondiente a una exposición de 18 h. Las bandas correspondientes al ARN genómico (ARNg) y a los ARNs subgenómicos (ARNsg) de PVX se observan sólo en las calles correspondientes a PVX-2 y a la planta infectada.

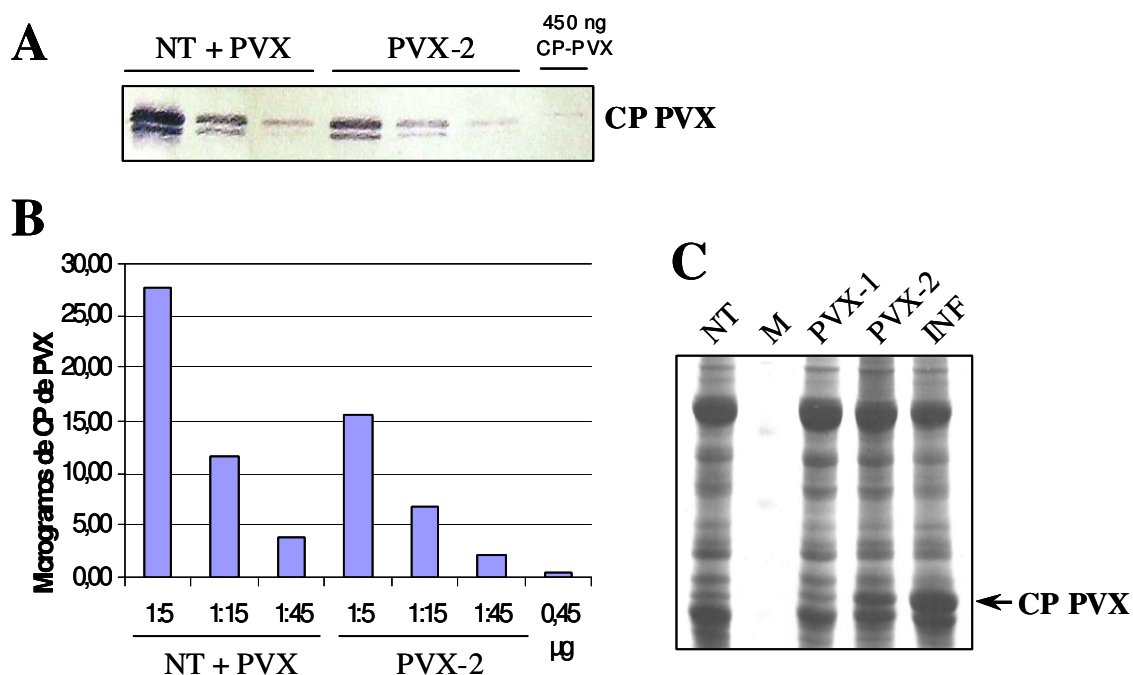
Está sólidamente establecido que el PTGS provoca la degradación de los ARN virales. Para determinar si la ausencia de ARN viral en la línea PVX-1 se debe a la presencia de este fenómeno, se inocularon plantas de la línea PVX-1 y plantas no transformadas con el virus PVY. Este virus expresa la proteína HC-Pro, la cual posee una fuerte actividad supresora del PTGS (Brigneti *et al.*, 1998). A los 8 d.p.i., se observaron síntomas característicos de la infección con PVY en las plantas control, mientras que en las plantas PVX-1 se observaron síntomas típicos de la doble infección PVX/PVY (Figura 10.A). Se tomaron muestras de proteínas totales de ambas plantas y se analizaron mediante ensayos de *Western blot*. Mientras que en las muestras de las plantas control sólo se detectó la banda correspondiente a la CP de PVY, en las muestras de PVX-1 se observó además la banda correspondiente a la CP de PVX (Figura 10.B). Estos datos apoyan la hipótesis de que la línea PVX-1 exhibe una disminución en los niveles de expresión del amplicón viral por efecto del PTGS.



**Figura 10.** Infección con PVY de plantas PVX-1 y de plantas no transformadas. (A) Se inocularon plantas PVX-1 y plantas no transformadas (NT) con un extracto liofilizado de plantas infectadas con PVY. En las plantas PVX-1 infectadas con PVY se observan hojas curvadas y nervaduras bien marcadas, síntomas normalmente observados en infecciones dobles con PVX-PVY. En las plantas NT se observan sólo nervaduras marcadas, síntomas típicos de PVY. (B) Análisis de *Western blot* de plantas PVX-1 y NT infectadas con PVY, utilizando anticuerpos específicos para la CP de PVY (panel superior) o PVX (panel inferior). Como control negativo se utilizó un extracto de planta NT sin infectar.

La cápside es la proteína viral con expresión mayoritaria y su acumulación puede ser utilizada como un parámetro para cuantificar los niveles de la replicación viral en el proceso de infección. Con el objeto de analizar la eficiencia del sistema de expresión en las líneas transformadas con el amplicón PVX, se prepararon extractos de PVX-2 y de plantas de tabaco infectadas con PVX y se realizaron ensayos de *Western blot*. Se sembraron diluciones seriadas (1:5) de ambas muestras y se las reveló utilizando anticuerpos específicos para la CP de PVX (Figura 11.A). Para cuantificar el nivel de proteínas, se sembraron distintas cantidades de CP de PVX recombinante como estándar (0,05; 0,15; y 0,45  $\mu\text{g}$ ) y se las analizó junto con las diluciones seriadas en el ensayo de *Western blot* que se muestra en la Figura 11.A. Se observó que la CP de PVX en la línea PVX-2 alcanzó niveles de expresión comparables con los de una infección

viral. Como puede observarse en la Figura 11.B, el nivel de CP en PVX-2 constituye cerca del 50% del que resulta de una infección viral.



**Figura 11.** Cuantificación de la producción de CP de PVX en la línea PVX-2. Se obtuvieron extractos de proteínas totales de plantas PVX-2, de plantas no transformadas (NT) e infectadas con PVX (INF). Las proteínas se separaron en SDS-PAGE y las membranas se revelaron con un anticuerpo específico para la CP de PVX. Se muestra una calle correspondiente a 0,45 µg de CP de PVX recombinante. (A) Diluciones seriadas 1:5 extractos proteicos de plantas PVX-2 y de plantas infectadas. (B) Cuantificación densitométrica del *Western blot* mostrado en (A). (C) Tinción del gel de poliacrilamida correspondiente con *Coomassie Blue*.

Utilizando la curva de concentración realizada con CP de PVX recombinante de concentración conocida y el software Image Quant<sup>TM</sup> (GE Healthcare Life Sciences), se estimó que las hojas de PVX-2 producen aproximadamente 9 mg de CP de PVX por g de peso fresco. Los niveles de CP de PVX producidos, tanto por la planta PVX-2 como por la planta infectada, pudieron observarse a simple vista en el gel de poliacrilamida teñido con *Coomassie Blue* (Figura 11.C).

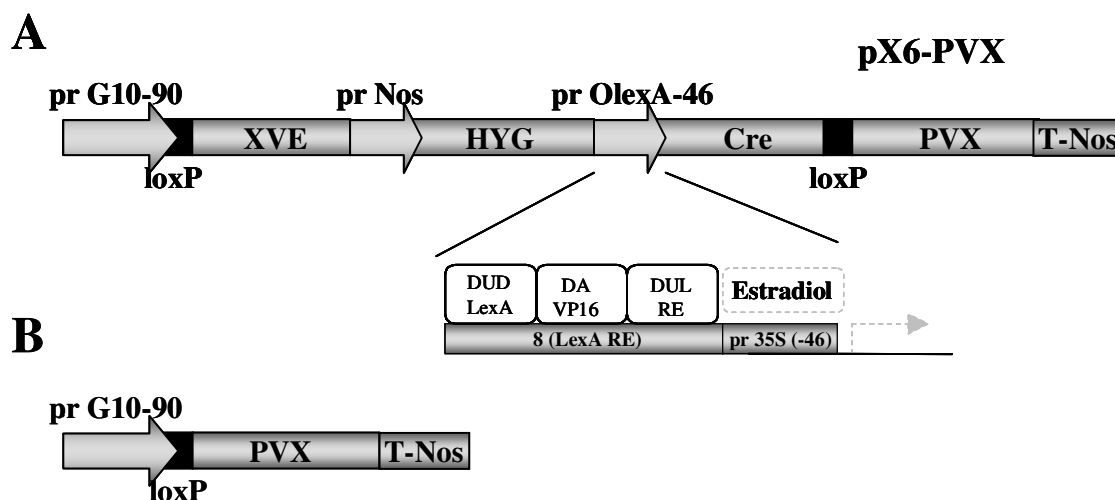
Esta es la primera vez que se obtienen altos niveles de expresión de proteínas virales en plantas transformadas con un amplicón viral. Dichos niveles de expresión son heredables, ya que se mantienen durante al menos 3 generaciones.



## Desarrollo del amplicón viral inducible pX6-PVX

Tal como se describe en la sección anterior, la expresión constitutiva del amplicón PVX desencadenó PTGS en algunas de las líneas obtenidas, tal como se describe en la sección anterior. Si bien se vislumbró la posibilidad de utilizar dicho amplicón para expresar altos niveles de proteínas heterólogas, la variabilidad observada en estas líneas puso de manifiesto la necesidad de desarrollar un sistema de expresión en que el PTGS no impactara en la expresión del amplicón. En este contexto, y con el objetivo de expresar proteínas heterólogas de manera controlada, se diseñó un amplicón inducible basado en la secuencia genómica de PVX. En teoría, la utilización de un promotor de este tipo evitaría el desencadenamiento del PTGS en etapas tempranas del desarrollo de la planta y permitiría inducir su expresión una vez completado su desarrollo. Como base para desarrollar el nuevo amplicón, se utilizó el plásmido pX6-GFP.In (Zuo *et al.*, 2001). Este vector fue exitosamente utilizado para la expresión de horquillas de silenciamiento, potentes disparadores del PTGS, demostrándose su efectividad para evitar el desencadenamiento de este mecanismo en etapas tempranas del desarrollo de la planta (Guo *et al.*, 2003).

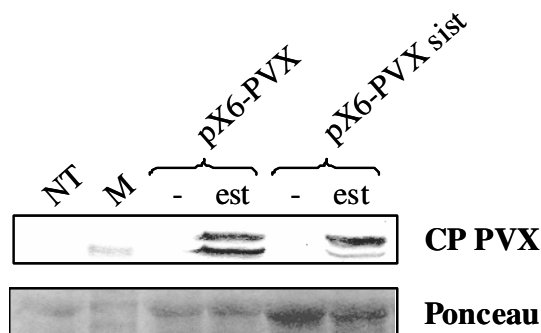
La secuencia correspondiente a PVX se subclonó en lugar del gen reportero *gfp*, lo que dio origen a la construcción pX6-PVX (Figura 12.A). Este sistema posee la ventaja de controlar doblemente la expresión génica mediante la inducción de la recombinasa Cre. La secuencia de interés (en este caso PVX) es clonada río abajo de los dos sitios loxP, en una región alejada del promotor sintético prG10-90. Entre ambos sitios loxP se encuentra la secuencia que codifica la recombinasa Cre bajo la regulación de un promotor inducible por estrógenos. Cuando se desea activar la expresión del amplicón, se induce la expresión de Cre mediante el agregado de estradiol. Esta enzima reconoce los sitios loxP y escinde la región flanqueada por los mismos, de forma tal que la secuencia de interés se sitúa en forma adyacente al promotor fuerte prG10-90 y queda bajo su regulación (Figura 12.B).



**Figura 12.** Esquema del *cassette* de expresión de la construcción pX6-PVX. (A) La secuencia genómica de PVX, junto con la secuencia del terminador T-Nos, fue clonada río abajo del sitio loxP derecho. El fragmento comprendido entre los dos sitios loxP contiene las secuencias codificantes de la recombinasa Cre y del gen *hpt* de resistencia a higromicina (HYG). (B) Luego de la inducción con estradiol y la recombinación de los fragmentos loxP, el amplicón viral queda posicionado bajo la regulación del promotor constitutivo fuerte prG10-90. XVE: activador transcripcional quimérico constituido por los dominios DUD LexA, DA VP16, y DUL RE. DUD LexA: dominio de unión al ADN de la proteína LexA, DA VP16: dominio activador de la transcripción VP16 del *Human Herpes Virus*; DUL RE: dominio de unión al ligando del receptor de estrógenos. prOlexA-46: promotor constituido por 8 copias del operador LexA (LexARE) fusionadas al promotor mínimo de 35S [pr35S(-46)].

Para evaluar la funcionalidad del amplicón inducible, se realizaron ensayos de expresión transitoria. Se co-agroinfiltraron hojas de *N. tabacum* con la construcción pX6-PVX, con o sin el agregado del inductor ( $\beta$ -estradiol 50  $\mu$ M). Se tomaron muestras a los 7 d.p.i., tanto de hojas agroinfiltradas como de hojas sistémicas, y se analizó la presencia de proteínas virales mediante un análisis de *Western blot* (Figura 13). Tal como se esperaba, se detectó acumulación de la CP de PVX a los 7 d.p.i. sólo en plantas co-agroinfiltradas con el inductor, tanto a nivel local como a nivel sistémico. Por el contrario, en las plantas no agroinfiltradas con el inductor no se observó la expresión de proteínas virales.

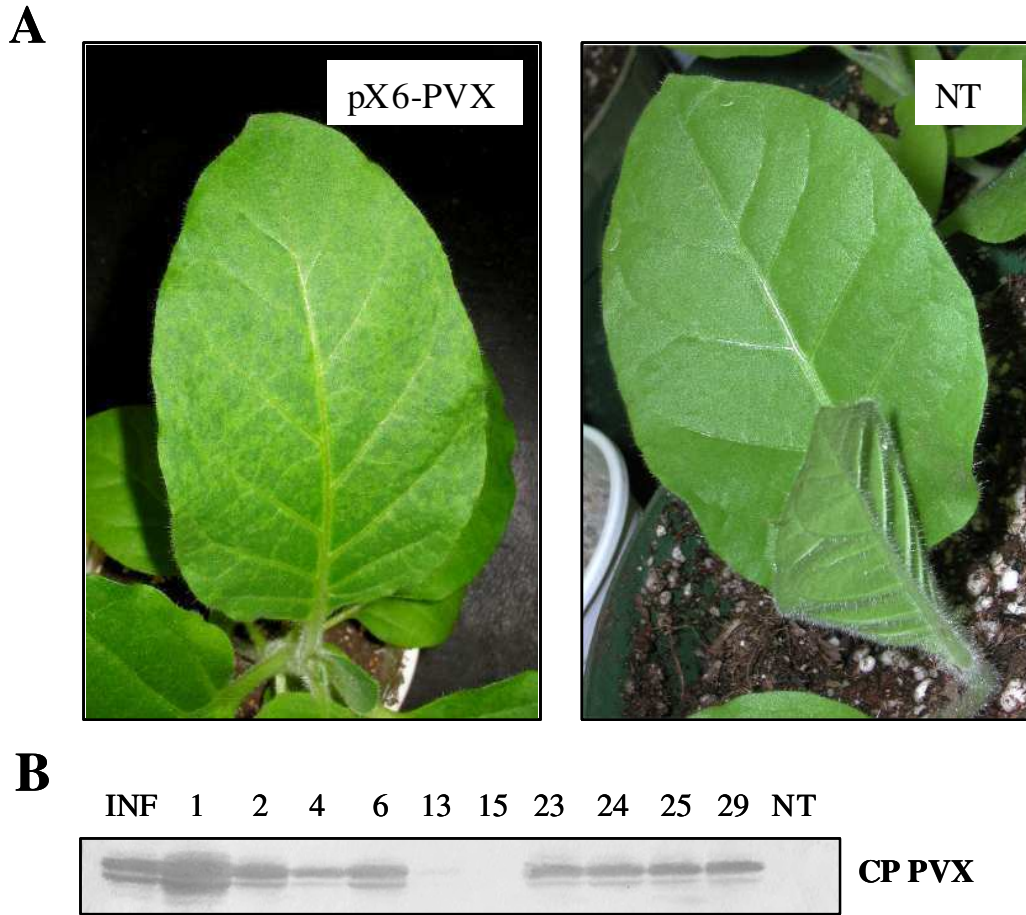
Los resultados obtenidos indicaron que el promotor inducible controlaba correctamente la expresión del amplicón y sugirieron que este sistema de expresión podía ser utilizado para la producción de proteínas de interés evitando el desencadenamiento del PTGS.



**Figura 13.** Análisis de *Western blot* de extractos proteicos de plantas de *N. tabacum* agroinfiltradas con la construcción pX6-PVX. Se agroinfiltraron hojas de plantas de 4 semanas en presencia y ausencia de  $\beta$ -estradiol 50  $\mu$ M (est). A los 7 d.p.i. se prepararon extractos de hojas agroinfiltradas (pX6-PVX) y sistémicas (pX6-PVX sist). La presencia de la CP de PVX se analizó con un anticuerpo específico para esta proteína (panel superior). Como control negativo, se utilizó un extracto de una planta sin agroinfiltrar (NT). Como control de carga, de proteína se realizó una tinción con Rojo Ponceau (panel inferior).

### Obtención y caracterización de plantas transformadas con la construcción pX6-PVX

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de expresión transitoria, se decidió obtener líneas que expresasen el amplicón inducible de manera estable. Se transformaron plantas de *N. tabacum* cv. Samsun con la construcción pX6-PVX y se seleccionaron 22 líneas independientes en medio conteniendo kanamicina. Se comprobó la presencia del transgén mediante la técnica de PCR con iniciadores específicos para la secuencia de la CP de PVX. Todas las líneas presentaron inicialmente fenotipos normales, a excepción de la línea 20, la que exhibió un crecimiento lento y hojas alargadas. Sin embargo, al ser rusticadas, la mayor parte de las líneas mostró síntomas de infección con PVX en ausencia del inductor (Figura 14.A). Un análisis de *Western blot* utilizando anticuerpos específicos para la CP de PVX mostró que todas las líneas expresan la proteína en ausencia del inductor (Figura 14.B).

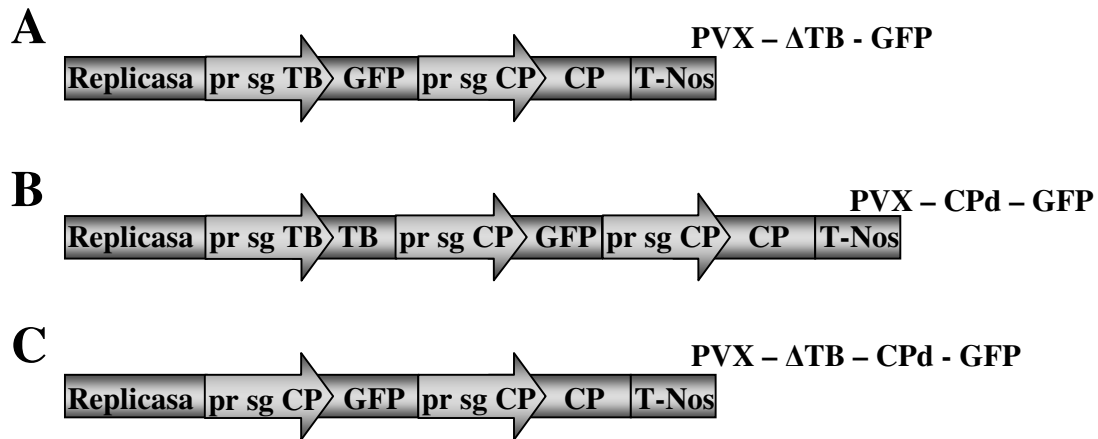


**Figura 14.** Plantas de *N. tabacum* transformadas con la construcción pX6-PVX. (A) Hoja de una línea representativa de las 22 seleccionadas, mostrando síntomas de infección por PVX en ausencia de  $\beta$ -estradiol (panel izquierdo) y hoja de una planta no transformada (panel derecho). (B) Análisis de *Western blot* de extractos de 10 de las 22 líneas seleccionadas utilizando anticuerpos específicos para la CP de PVX. Los extractos fueron preparados de hojas provenientes de plantas no tratadas con  $\beta$ -estradiol. Se utilizaron extractos de plantas no transformadas (NT) e infectadas con PVX (INF) como controles negativos y positivos, respectivamente.

Como puede concluirse de estos resultados, el sistema de inducción no respondió a nuestras expectativas en lo que se refiere a un control transcripcional estricto. Si bien la funcionalidad del amplicón se corroboró mediante el análisis de la expresión de la CP viral, el alto número de escapes no permitió controlar el momento de inicio de la infección. Sin embargo, la mayoría de las líneas obtenidas (18 de 22) expresaron altos niveles de la proteína viral, por lo cual este sistema resultó efectivo para minimizar el impacto del PTGS sobre la expresión del amplicón PVX.

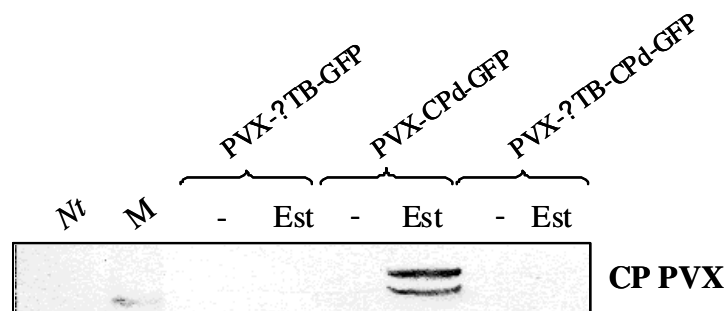
## **Desarrollo de los amplicones virales inducibles defectivos pX6-PVX- $\Delta$ TB-GFP, pX6-PVX-CPd-GFP y pX6-PVX- $\Delta$ TB-CPd-GFP**

Para superar el inconveniente planteado en el punto anterior, se decidió diseñar una nueva versión del amplicón inducible a partir de distintas versiones de PVX en las que se anularon las funciones de movilización célula a célula por eliminación del triple bloque viral (ORFs que codifican las proteínas TGBp1, TGBp2 y TGBp3). También se utilizó una versión de PVX en la que el promotor del ARN subgenómico de la CP está duplicado y puede ser utilizado para expresar transgenes de interés. La hipótesis de trabajo era que los escapes observados están causados por pequeños niveles de actividad transcripcional y por la posterior amplificación de transcritos infectivos a nivel citoplasmático. En este caso, una posible forma de mejorar el control de la expresión podría hacer uso de versiones modificadas del amplicón que originasen viriones con menor eficiencia infectiva. La Figura 15 muestra los esquemas de los *cassettes* de expresión correspondientes a las distintas construcciones genéticas diseñadas con este fin, todas las cuales incluyen al gen *gfp* como reportero. Todas estas versiones fueron clonadas río abajo del sitio loxP derecho. Las versiones  $\Delta$ TB carecen del triple bloque viral (TB) y son incapaces de producir una infección sistémica en la planta debido a la ausencia de las secuencias que codifican a las proteínas de movimiento. En la versión PVX- $\Delta$ TB-GFP la expresión del gen *gfp* está regulada por el promotor subgenómico del triple bloque (pr sg TB). Las versiones PVX-CPd-GFP y PVX- $\Delta$ TB-CPd-GFP tienen duplicado el promotor subgenómico del gen de la CP. La copia adicional de este promotor regula la expresión del gen *gfp* en ambas versiones.



**Figura 15.** Esquemas correspondientes a los amplicones PVX-ΔTB-GFP, PVX-CPd-GFP y PVX-ΔTB-CPd-GFP. En todos los casos, las secuencias virales modificadas fueron clonados río abajo del sitio loxP derecho del plásmido base pX6. Las tres versiones comprenden la secuencia del gen *gfp* como reportero. (A) La versión PVX-ΔTB-GFP carece del triple bloque de genes (TB) que codifican las proteínas de movimiento. La expresión del gen *gfp* está regulada por el promotor subgenómico del triple bloque (pr sg TB). (B) La versión PVX-CPd-GFP contiene dos copias del promotor subgenómico del gen de la cápside viral (pr sg CP), una de las cuales regula la expresión del gen *gfp*. (C) La versión PVX-ΔTB-CPd-GFP carece de las secuencias correspondientes al TB y contiene dos copias del pr sg CP, una de las cuales dirige la expresión del gen *gfp*.

Para comprobar la funcionalidad de las distintas versiones de amplicones inducibles, se realizaron ensayos de expresión transitoria. Se co-agroinfiltraron plantas de *N. tabacum* con las construcciones pX6-PVX-ΔTB-GFP, pX6-PVX-CPd-GFP y pX6-PVX-ΔTB-CPd-GFP, con o sin el agregado del inductor ( $\beta$ -estradiol 50  $\mu$ M). Se tomaron muestras de hojas agroinfiltradas a los 7 d.p.i. y se analizó la presencia de proteínas virales en ensayos de *Western blot* (Figura 16). Como puede observarse, sólo es posible detectar la presencia de la CP de PVX en las plantas co-agroinfiltradas con pX6-PVX-CPd-GFP y el agente inductor. La falta de inducción en las versiones carentes del TB podría deberse a que la baja eficiencia en la replicación del amplicón modificado estaría afectando severamente la acumulación de viriones.



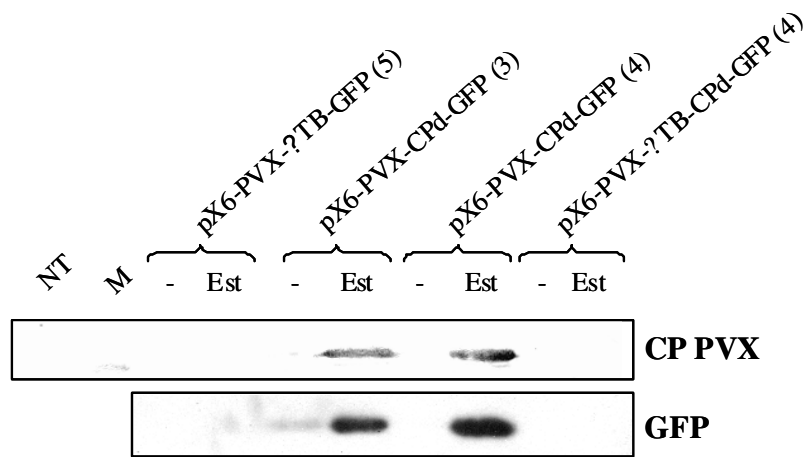
**Figura 16.** Expresión transitoria de distintas versiones de un amplicón inducible basado en PVX. Análisis de *Western blot* de extractos de plantas de *N. tabacum* agroinfiltradas con las construcciones pX6-PVX-ΔTB-GFP, pX6-PVX-CPd-GFP y pX6-PVX-ΔTB-CPd-GFP, con o sin el agregado del inductor ( $\beta$ -estradiol 50 $\mu$ M), a los 7 d.p.i. El revelado se realizó con un anticuerpo específico para la CP de PVX. Como control negativo, se muestra una planta sin agroinfiltrar (*Nt*). Se utilizó un marcador de peso molecular (M) para corroborar el tamaño de la CP.

### **Obtención y caracterización de plantas transformadas con las construcciones pX6-PVX-ΔTB-GFP, pX6-PVX-CPd-GFP y pX6-PVX-ΔTB-CPd-GFP**

Se transformaron plantas de *N. tabacum* cv. Samsun con las distintas versiones de amplicones inducibles, obteniéndose 2 líneas transgénicas con la construcción pX6-PVX-ΔTB-GFP, 3 líneas con pX6-PVX-CPd-GFP y 4 líneas con pX6-PVX-ΔTB-CPd-GFP. La identidad de dichas líneas fue evaluada mediante análisis de PCR. Todas ellas resultaron ser fenotípicamente indistinguibles de las plantas no transformadas.

Para verificar si los amplicones inducibles defectivos se replicaban ante la presencia del agente inductor, se agroinfiltraron hojas de algunas de las líneas obtenidas en estadios tempranos del desarrollo (4 hojas) con  $\beta$ -estradiol 50  $\mu$ M. Al cabo de 2 días, se tomaron muestras y se analizaron en ensayos de *Western blot* con anticuerpos específicos contra la CP de PVX y contra la proteína GFP. Como puede observarse, las líneas pX6-PVX-CPd-GFP(3) y pX6-PVX-CPd-GFP(4) fueron inducidas por  $\beta$ -estradiol 50  $\mu$ M (Figura 17). En las calles correspondientes a dichas plantas fue posible detectar tanto la presencia de la CP de PVX como de la proteína GFP, lo que constituyó un indicio de inducción exitosa. No sucedió lo mismo en el caso de las construcciones pX6-PVX-ΔTB-GFP(5) y pX6-PVX-ΔTB-CPd-GFP(4) en que no se detectó ninguna de las proteínas ensayadas. Un posible factor que explicaría la ausencia de proteínas virales en las plantas transformadas con pX6-PVX-ΔTB-GFP y pX6-PVX-ΔTB-CPd-GFP sería

la baja eficiencia de replicación de los respectivos amplicones. Aunque esta baja tasa de replicación ya había sido observada en ensayos previos de expresión transitoria, se esperaba que la inducción de estos amplicones en las plantas transformadas condujera a una mayor acumulación de transcritos infectivos a lo largo del tiempo.



**Figura 15.** Inducción de amplicones inducibles en plantas transformadas con las construcciones pX6-PVX- $\Delta$ TB-GFP, pX6-PVX-CPd-GFP y pX6-PVX- $\Delta$ TB-CPd-GFP. Se analizaron extractos de plantas de *N. tabacum* transformadas mediante *Western blot*, con o sin el agregado del inductor ( $\beta$ -estradiol 50  $\mu$ M), mediante *Western blot*, a los 2 d.p.i. Las bandas fueron reveladas con anticuerpos específicos para la CP de PVX y para la proteína GFP. Como control negativo, se muestra una planta sin agroinfiltrar (NT). M: estándar de peso molecular.



## Discusión I

La primera etapa del trabajo se focalizó en la transformación de *N. tabacum* con pZP-PVX y la caracterización de tres líneas independientes, PVX-1, PVX-2, y PVX-3. La identidad de estas líneas obtenidas fue evaluada por PCR y se analizó la expresión de PVX mediante ensayos de inmunodetección con anticuerpos que reconocen la CP viral y la proteína de movimiento TGBp1. En el caso de la línea PVX-1 no se detectó la presencia de proteínas virales. Sin embargo, en las líneas PVX-2 y PVX-3 se detectaron tanto la CP como TGBp1. De hecho, la línea PVX-2 produce niveles de CP que alcanzan el 50% de los niveles observados en plantas infectadas. Se comprobó que las tres líneas producen viriones de PVX infectivos inoculando plantas no transformadas con extractos de las plantas transformadas, observándose síntomas característicos a los 7 d.p.i. Al analizar los niveles de ARNs virales, se observó que PVX-2 produce altas cantidades de ARN genómico y de ARNs subgenómicos, mientras que PVX-1 no produce niveles detectables de los mismos. Con el objetivo de analizar si la falta de expresión viral podía atribuirse al PTGS, se infectaron plantas PVX-1 con PVY. Este virus codifica una proteína con fuerte actividad supresora del PTGS denominada HC-Pro. Como se esperaba, se detectaron niveles incrementados de la CP de PVX y, además, se observaron síntomas severos de infección.

En 1997, Angell y Baulcombe transformaron plantas de tabaco con una copia completa de ADNc del genoma de PVX y con versiones modificadas a las que se incorporó el gen *uidA* como reportero. En dichas versiones, el gen *uidA* fue insertado como un gen adicional o en reemplazo de la CP. Ninguna de las plantas transgénicas obtenidas en ese trabajo mostró síntomas de infección por PVX y se detectó muy baja expresión de ARN derivado del transgén. Estos fenómenos fueron atribuidos a la activación del PTGS, y se concluyó así que el ARN replicativo de PVX es un potente activador del silenciamiento. En contraste con los resultados descritos por estos autores, las líneas PVX-2 y PVX-3 mostraron fuertes síntomas de infección viral y un alto nivel de expresión de la CP de PVX. Es posible que las contradicciones observadas entre este trabajo de Tesis y los publicados anteriormente se deban a diferencias sutiles en las interacciones virus-hospedador. De hecho ambos trabajos difieren en la cepa de PVX utilizada, ya que en este trabajo se utilizó la cepa americana CP2 mientras que en Angell

y Baulcombe utilizaron la cepa UK3. Estudios de infección en plantas que portan el gen de resistencia Nb permiten clasificar a la cepa PVX-CP2 como virulenta y a la cepa PVX-UK3 como avirulenta (Malcuit *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que la diferencia en la capacidad de producir altos niveles de proteínas virales en plantas transformadas con una u otra cepa podría estar relacionada con sus determinantes de patogenicidad. Más recientemente se ha propuesto que la diferencia en la virulencia de tres cepas PVX filogenéticamente relacionadas estaría en parte determinada por un único aminoácido. La comparación de las secuencias aminoacídicas de TGBp1 de estas tres cepas permite determinar que difieren entre sí en sólo 5 aminoácidos y que sólo uno, el aminoácido número 167, difiere entre la cepa asintomática y las cepas sintomáticas. Al comparar las secuencias de la proteína TGBp1 codificada por la cepa PVX-CP2 con la codificada por la cepa PVX-UK3 es posible observar que la primera codifica una alanina en la posición 167 como en el caso de la cepa sintomática, mientras que la segunda contiene una serina en esa posición igual que la cepa asintomática, confirmando la diferencia en la virulencia de ambas cepas.

Dado que TGBp1 de PVX posee función supresora del PTGS sistémico (Voinnet *et al.*, 2000), cabe esperar que pequeñas diferencias en las secuencias de estas proteínas (TGBp1 de PVX<sub>UK3</sub> versus TGBp1 de PVX<sub>CP</sub>) provoquen diferencias en la eficacia de su actividad. De hecho, se ha demostrado recientemente que las TGBp1 de diferentes potexvirus difieren en su capacidad de suprimir el PTGS (Senshu *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en esta Tesis demuestran por primera vez que un amplicón integrado al genoma del hospedador puede replicarse a niveles comparables con los de una infección viral. Este hecho, medido por la producción de las proteínas CP y TGBp1, se reprodujo consistentemente a través de al menos tres generaciones de plantas lo que, debido a que PVX no es transmitido por las semillas, demuestra que la integración del amplicón ha ocurrido de forma estable. Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo permitieron vislumbrar la posibilidad de utilizar un amplicón basado en PVX para expresar en forma eficiente proteínas heterólogas en plantas transgénicas.

Si bien se lograron obtener dos líneas de plantas que expresan el amplicón PVX de manera estable y en altos niveles, en una tercera línea no fue posible detectar proteínas virales debido al establecimiento del PTGS. La cantidad limitante de líneas

obtenidas no permite arribar a conclusiones definitivas sobre este sistema, pero sí revela una cierta variabilidad respecto del patrón de expresión del amplicón. Probablemente, la obtención de un mayor número de líneas permitiría definir si la cepa de PVX utilizada en este trabajo es eficiente como vector de expresión constitutivo.

En un intento por evitar el desencadenamiento del PTGS, se utilizó una versión inducible del amplicón PVX. El vector inducible en el cual se introdujo el amplicón había sido utilizado previamente para la expresión controlada de horquillas de silenciamiento, y permitió evitar el desencadenamiento de PTGS en ausencia del inductor (Guo *et al.*, 2003).

Se obtuvieron 22 líneas de plantas transformadas con el amplicón de PVX inducible 18 de las cuales, sorpresivamente, produjeron niveles de CP comparables a los de una infección viral en ausencia del inductor. Si bien el sistema de expresión elegido no permitió un control apropiado del promotor inducible, los resultados obtenidos abrieron un camino para expresar altos niveles de proteínas recombinantes sin desencadenar el fenómeno de PTGS. Una posible explicación para la aparición de estos “escapes” podría consistir en que el promotor inducible utilizado no es lo suficientemente cerrado para evitar pequeñísimos niveles de transcripción. De ser así, un número muy bajo de genomas virales podría replicarse en el citoplasma de algunas células y propagar la infección al resto de la planta.

En un intento por controlar mejor el sistema de amplicones inducibles, se desarrollaron distintas versiones que exhibían una eficiencia de replicación disminuida. De esta forma, se esperaba controlar los pequeños escapes producidos por la tasa basal de transcripción en ausencia del agente inductor. El amplicón inducible pX6-PVX-CPd-GFP no se expresó en condiciones basales y respondió al efecto del inductor, tanto al ser evaluado en ensayos de expresión transitoria como en plantas transformadas. La obtención GFP expresada a partir de este amplicón inducible es el primer abordaje exitoso en este trabajo para producir proteínas heterólogas en plantas. Debería aumentarse el número de líneas transformadas con el amplicón pX6-PVX-CPd-GFP para caracterizar los rendimientos de este sistema.

Las otras dos versiones analizadas, pX6-PVX- $\Delta$ TB-GFP y pX6-PVX- $\Delta$ TB-CPd-GFP (defectivas en las funciones de movimiento célula a célula), no evidenciaron producción de proteínas virales en ausencia o presencia del inductor. Posiblemente, su baja eficiencia de replicación no permitió que se expresasen niveles detectables de dichas proteínas. Otra posible explicación podría basarse en que, dado que los amplicones  $\Delta$ TB carecen de la proteína TGBp1, y que dicha proteína posee actividad supresora del PTGS (Voinnet *et al.*, 2000), estos amplicones serían silenciados por los mecanismos intrínsecos de las plantas con mayor facilidad que los amplicones que sí la expresan.

Una posible continuidad de esta línea de trabajo consistiría en estabilizar genéticamente el amplicón pX6-PVX-CPd-GFP a través de varias generaciones de plantas transformadas para estudiar más detalladamente el rendimiento de este sistema de expresión. Por otro lado, cabe la posibilidad de diseñar amplicones inducibles que carezcan de las proteínas de movimientos TGBp2 y TGBp3, pero que expresen TGBp1. De esta manera, sería posible controlar el movimiento célula a célula, pero se contaría con la proteína supresora TGBp1 que permitiría que el virus infecte eficientemente la planta una vez que el amplicón haya sido inducido.

## Capítulo II

### **Identificación de un nuevo supresor del PTGS codificado por un virus del género *Allexivirus***

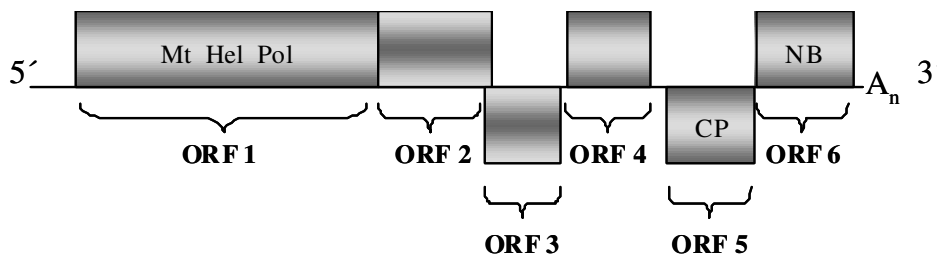
Como se mencionó en la Introducción, la expresión de proteínas heterólogas en plantas utilizando vectores virales debe superar el desencadenamiento del PTGS, el que se considera un mecanismo específico de defensa antiviral (Ruiz *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2003). La presencia de un vector viral replicativo gatilla eficazmente este mecanismo y, como consecuencia, se reducen significativamente los niveles de transcritos del mismo. Como resultado, se acumulan bajos niveles de la proteína de interés.

Para evadir este mecanismo defensivo, muchos virus codifican proteínas supresoras que inhiben el PTGS. Dado que estas proteínas actúan a nivel celular en forma no-específica, se las ha utilizado para favorecer la expresión de genes foráneos en plantas (Scholthof, 2007). Sin embargo, al afectar también la biogénesis de miARNs, estas proteínas suelen tener efectos pleiotrópicos que modifican severamente el fenotipo de la planta y limitan la producción de biomasa.

Con el fin de optimizar la utilización de amplicones virales como sistemas de expresión, se decidió encarar la identificación y caracterización de nuevas proteínas supresoras del PTGS que no afectasen drásticamente el fenotipo de la planta hospedante.

El ajo es infectado por una mezcla compleja de virus. Estos patógenos persisten en las generaciones siguientes y, si bien no causan la muerte de la planta, producen infecciones crónicas. Dichos virus pertenecen principalmente a los géneros *Potyvirus*, *Carlavirus*, y *Allexivirus*. Debido a que estos virus provocan infecciones persistentes, se decidió iniciar la búsqueda de nuevas proteínas supresoras del PTGS en este complejo. Se eligió el género *Allexivirus* debido a que aún no ha sido caracterizado ningún supresor del PTGS en virus pertenecientes a este género.

La organización general del genoma de los *Allexivirus* consiste en seis ORFs. El ORF 1 codifica la replicasa viral, los ORFs 2 y 3 codifican dos proteínas involucradas en el movimiento viral, y el ORF 5 codifica la proteína de la cápside. Los ORFs 4 y 6 codifican proteínas de función desconocida (Figura 18; Adams *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004).



**Figura 18.** Esquema de la organización típica de un genoma viral del género *Allexivirus*. El ORF 1 (replicasa) contiene motivos de metiltransferasa (Mt), helicasa (Hel), y ARN polimerasa ARN dependiente (Pol). Los ORFs 2 y 3 codifican proteínas responsables del movimiento viral. El ORF 4 es una proteína rica en serina de función desconocida. El ORF 5 codifica la proteína de la cápside viral (CP). El ORF 6 codifica una proteína de unión a ácidos nucleicos (NB).

El virus elegido para el estudio de nuevas proteínas supresoras del PTGS fue el *Garlic mite-borne filamentous virus* (GmbFV), que fuera previamente caracterizado en el laboratorio (Helguera *et al.*, 1997). En nuestro laboratorio se contaba con plásmidos conteniendo secuencias parciales del extremo 3' del genoma de un aislamiento local del GmbFV que incluían las secuencias correspondientes a la CP y al ORF6 (Helguera *et al.*, 1997). La función de la proteína codificada por el ORF6 era aún desconocida al iniciarse este trabajo, pero algunas características de la misma, como la presencia de dominios de unión a ácidos nucleicos, indicaban una potencial actividad supresora.

A partir de un plásmido ya caracterizado se procedió a amplificar por PCR la secuencia correspondiente al ORF 6, utilizando para ellos iniciadores específicos. El fragmento amplificado se clonó en el vector pDONR y su identidad fue corroborada por secuenciación (Figura 19).

```

atgattcctcaagacttcaagttactttgctggttacatgctaaaccactctctct
M I P Q D F K L L C C L H F A K P T L S
caagatctcaaaaaccttctcttcttctcatttgcggtgatgaatgtaaattaacgtaaa
Q D L K N L L F F I C V D E C K L I R K
gctagtcaaaataagccatttcaaggcacttctaagtttgctcaacgctgtagggcgaaa
A S Q N K P F Q G T S K F A Q R R R A K
cgctataacaggtggtttgactgcggcctacctaactagataaccacaaatgtaaagtc
R Y N R C F D C G A Y L L D N H K C K V
ctcacatcacgcgctcagtcagacgtgctagcagttatccatgagggacccgtaagcta
L T S R A Q S D V L A V I H E G P V K L
tatgctgaaaggacctacagaccaaattctgatgcagcactactgattgagagtgacctta
Y A E R T Y R P N S D A A L L I E S D L
gaatattttaaaattttaaaattatag
E Y F K I L K L -

```

**Figura 19.** Secuencia nucleotídica del ORF6 del GmbFV y secuencia aminoacídica deducida de la misma.

La secuencia proteica codificada en el ORF 6 (proteína 15K) fue comparada con las informadas en las bases de datos para identificar regiones conservadas que pudiesen resultar importantes para su actividad. Se encontró que sólo algunos géneros de los virus pertenecientes a la familia *Flexiviridae* (*Allexivirus*, *Carlavirus*, *Mandarivirus*, *Trichovirus*, y *Vitivirus*) codifican en su genoma proteínas homólogas a 15K y, al comparar su secuencia aminoacídica, se identificó una región altamente conservada rica en residuos de arginina. Dicha región presenta un motivo conservado del tipo AXRRRA (Figura 20). Teniendo en cuenta un reporte que involucraba a las regiones ricas en residuos arginina en la interacción con ARN y ADN (Crane-Robinson *et al.*, 2006), se resolvió estudiar la importancia de dichos residuos en la actividad de la proteína 15K. Mediante un protocolo de mutagénesis dirigida se procedió a reemplazar los residuos de arginina por residuos de alanina en la región recuadrada en la Figura 20.

```

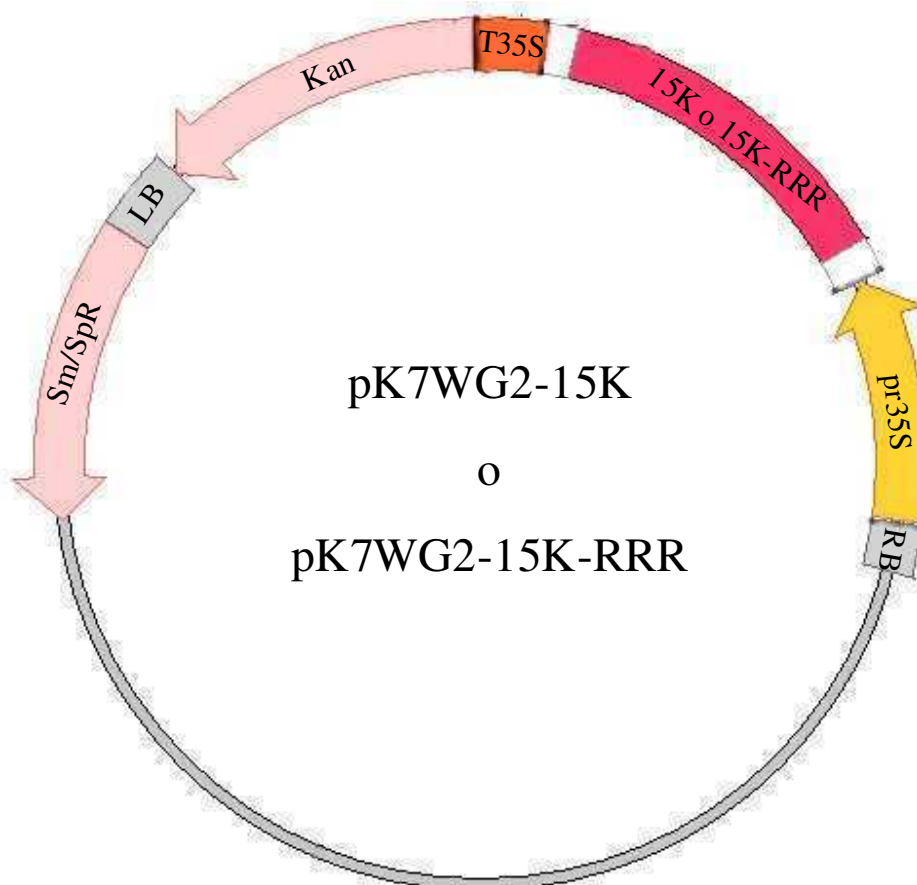
Ax15KGMbFV      NHLFFICVDECKLIRKASQNKPFQGTSKFAQRRRAKRYNRCFDCGAYLLDNHKCKVLTSR 84
Ax15KGarVA      AHLFFTCVNECKLVRIARENKPFLLGTSKCAQRRRAKRYNRCFDCGAYLLDNHKCRIFVSR 84
AxNABPGarVE     ILIFSRVTTECKLRR-LSENKPFGRSKFAMRRRAKRYNRCFDCGAVLIDDHQCKVLTSR 83
AxNABPShVX     TLLFRACETSKLNRLLDNKPFQGTSKCAKRRRAKRYNRCFDCGAYLYDDHVCKRFVTSR 84
Ax15KGarVC      LIYIYMLAAPNLLLGRKMLQNKPFQGTSKCAARRRAKRYNRCFDCGGYLLNNHVCKQFPTR 84
AxNABPGarVX     IIIYNLTFDSRKLGRKAQQNKPFQGTSKCAARRRAKRYGRCFDCGALLEANHVCKLFTTR 84
Ca16KLSV       LLSAFPFDICRDILRRTSSHIVGLGRSRYARRRRALQIGRCERCYRVYP--PVCGSKCDN 100
CaNABPPLCV     LISVLPIDICVCIALRALKTEPFGFRSSYARRRRKAIGRCERCYRVYP--PICNSKCDN 75
CaNABPChVB     QGNVCPIHLCVDIYKRAFPKRVNKGSRSSYARRRRALQELGRCHRCYRVYPLPFPEISRCDN 75
Ca11KPVS       RLGYILPVEVCVNIISLSAGPVSGGRSTYARKRRRARSIGRCWRCYRVYP--PICNSKCDN 72
Ma23KICRV     IQITIIISCADYFHSVRCASSRYLGSSRSYAVKRRARLNYCYKCGHPLYLKNPHTCRPGR 180
ViRNABPGVA     -----MDDPSPFLTGRSTFAKRRRARRRMNVCKCGAIMHNNKDKSSISS 44
CaNABPSPChFV   CCLLIISSIVSNYKGMRTYKFFACGQSKSAIKRRRARRMQICPRCAKYECGKKCEPNTYSQ 86
TrNABPPMV     LCKLMLLAREVLAVDNKTRLKLCGRSSFAKRRRADSLAVCSFCYRINCVDYKCMRAF 91
                * * * * *

```

**Figura 20.** Alineación de secuencias de proteínas homólogas a 15K de distintos géneros virales pertenecientes a la familia *Flexiviridae*. **Allexivirus:** *Garlic mite-borne filamentous virus* (Acc. N° no publicado) (Ax15KGMbFV), *Garlic virus A* (Acc. N° NP\_569131) (Ax15KGarVA), *Garlic virus E* (Acc. N° NP\_659017) (AxNABPGarVE), *Shallot virus X* (Acc. N° NP\_620653) (AxNABPShVX), *Garlic virus C* (Acc. N° NP\_569137) (Ax15KGarVC), *Garlic virus X* (Acc. N° NP\_044576) (AxNABPGarVX). **Carlavirus:** *Lily symptomless virus* (Acc. N° NP\_932793) (Ca16KLSV), *Passiflora latent carlavirus* (Acc. N° YP\_717538) (CaNABPPLCV), *Chrysanthemum virus B* (Acc. N° YP\_001086457) (CaNABPChVB), *Potato virus S* (Acc. N° YP\_277434) (Ca11KPVS), *Sweet potato chlorotic fleck virus* (Acc. N° YP\_164263) (CaNABPSPChFV). **Mandarivirus:** *Indian citrus ringspot virus* (Acc. N° NP\_203558) (Ma23KICRV). **Vituvirus:** *Grapevine virus A* (Acc. N° NP\_619666) (ViRNABPGVA). **Trichovirus:** *Peach mosaic virus* (Acc. N° YP\_002308568) (TrNABPPMV). La caja señala el dominio AXRRRA que fue mutado en la construcción pK7WG2-15K-RRR. Los asteriscos señalan los aminoácidos altamente conservados en los distintos virus.

Tanto la secuencia que codifica la proteína 15K como la de la versión mutagenizada 15K-RRR, se clonaron en el vector de expresión pK7WG2 bajo el promotor constitutivo 35S del CaMV, dando origen a las construcciones pK7WG2-15K y pK7WG2-15K-RRR, respectivamente. Dichos vectores fueron utilizados para transformar células de *A. tumefaciens*, que fueron luego usados en ensayos de agroinfiltración. En la Figura 21 se muestra un esquema de las construcciones pK7WG2-15K y pK7WG2-15K-RRR.



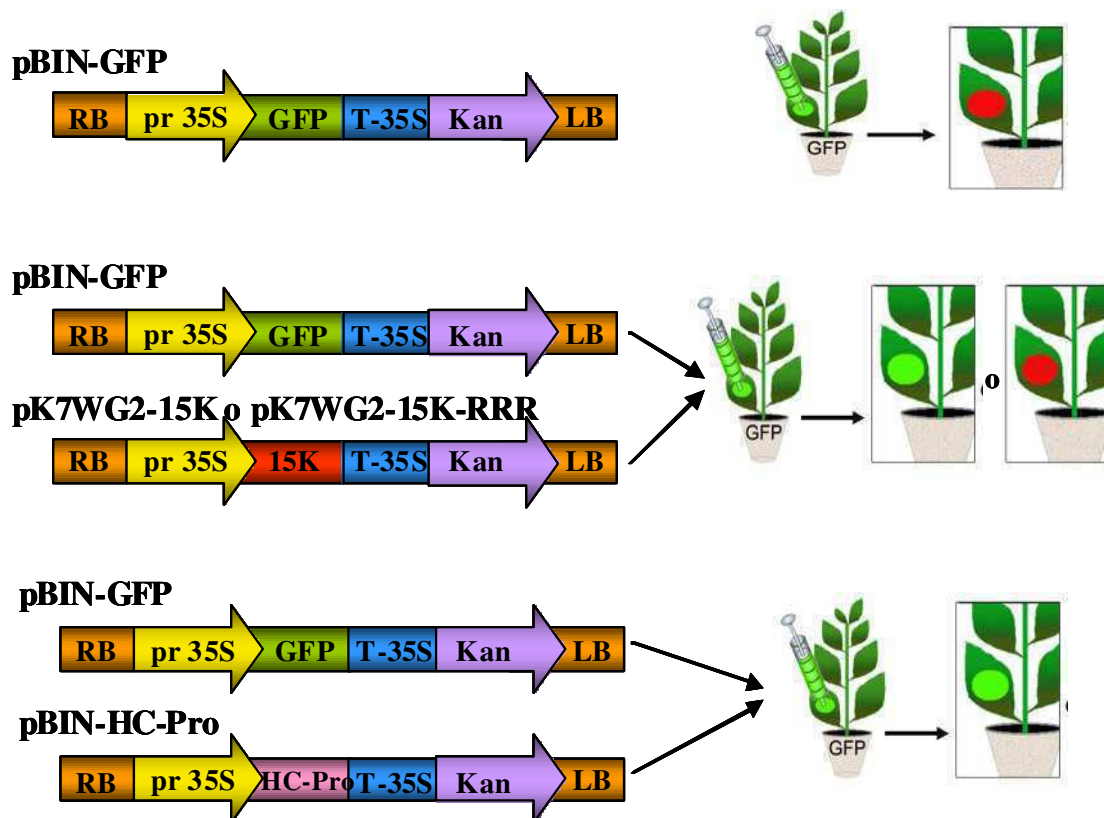


**Figura 21.** Esquema de las construcciones pK7WG2-15K y pK7WG2-15K-RRR. La secuencia de 15K amplificada por PCR se subclonó en el vector pK7WG2 mediante el sistema de recombinación Gateway, dando origen al vector pK7WG2-15K. Alternativamente, la secuencia de la versión mutagenizada, 15K-RRR, fue subclonada en el vector pK7WG2 para dar origen al vector pK7WG2-15K-RRR. Sm/SpR: gen de resistencia a la espectinomicina y estreptomicina; Kan: gen de resistencia a la kanamicina; T35S: terminador 35S, 15K: secuencia codificante de la proteína 15K; 15K-RRR: secuencia codificante de la proteína 15K mutagenizada; pr35S: promotor 35S del CaMV; RB y LB: borde derecho y borde izquierdo del ADN-T de *Agrobacterium*, respectivamente.

### La proteína 15K suprime el silenciamiento a nivel local

Para explorar la posible actividad supresora del PTGS de la proteína 15K se efectuaron ensayos de co-agroinfiltración en hojas de la línea transgénica 16C de *N. benthamiana*, la cual expresa la proteína GFP en forma constitutiva. Para inducir el PTGS se utilizaron células de *A. tumefaciens* transformadas con el vector binario pBIN-GFP, el que permite expresar la secuencia del gen *gfp* bajo el promotor 35S de CaMV. Para visualizar la supresión del PTGS, se realizaron co-agroinfiltraciones de hojas con agrobacterias transformadas con las construcciones pK7WG2-15K y pBIN-GFP. Como

control positivo de estos ensayos, se realizaron co-agroinfiltraciones con las construcciones pBIN-HC-Pro (la que permite expresar la proteína supresora HC-Pro del PVY) y pBIN-GFP. La proteína HC-Pro ha sido ampliamente descrita como supresora local del PTGS (Brigneti *et al.*, 1998; Anandalakshmi *et al.*, 1998; Kasschau and Carrington, 1998). Como control negativo se utilizó el vector pBIN61. Además, se realizaron ensayos similares con la versión mutagenizada, pK7WG2-15K-RRR, para evaluar la importancia de la región rica en arginina en la actividad de la proteína 15K. Un esquema del protocolo utilizado se muestra en la Figura 22.



**Figura 22.** Esquema de los ensayos de co-agroinfiltración en hojas *N. benthamiana* 16C. Para inducir el PTGS, se agroinfiltraron plantas pBIN-GFP. Para evaluar la actividad supresora de la proteína 15K y de la versión mutagenizada 15K-RRR, se co-agroinfiltraron plantas con las construcciones pBIN-GFP y pK7WG2-15K o pK7WG2-15K-RRR. Como control de supresión del PTGS se utilizó la construcción pBIN-HC-Pro. Como control negativo, se utilizó el vector pBIN61. A los 5 d.p.i. se observaron las plantas bajo luz UV y se extrajeron muestras de ARN y proteína totales de los tejidos agroinfiltrados para realizar ensayos de *Northern* y *Western blot*, respectivamente. El color rojo observado al iluminar las hojas con luz UV corresponde a la fluorescencia característica de la clorofila, y el color verde brillante corresponde a GFP. RB y LB son los bordes derecho e izquierdo del ADN-T de *Agrobacterium*, respectivamente.

Se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* 16C con las siguientes construcciones:

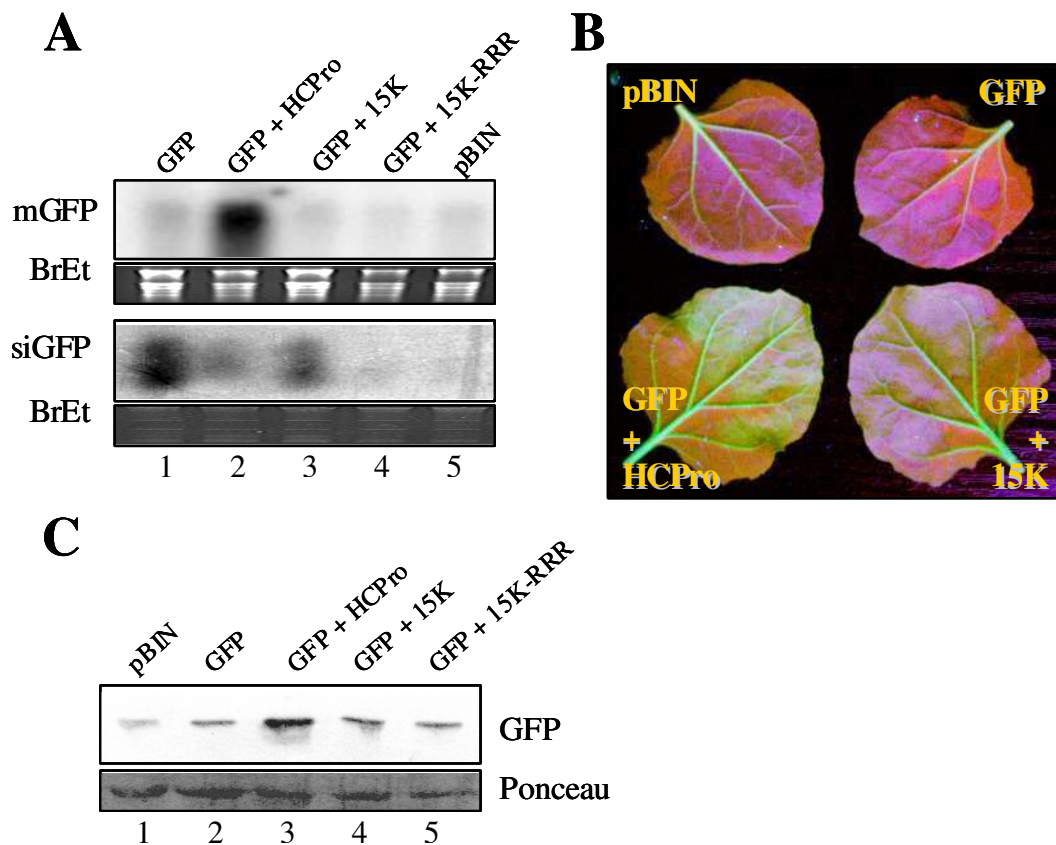
1. pBIN-GFP,
2. pBIN-GFP + pBIN-HC-Pro,
3. pBIN-GFP + pK7WG2-15K,
4. pBIN-GFP + pK7WG2-15K-RRR,
5. pBIN61.

A los 5 d.p.i. se analizaron los niveles de ARNm y siARNs correspondientes a *gfp* y de proteína GFP en el tejido foliar agroinfiltrado. Además, la expresión de GFP se observó por fluorescencia iluminando las plantas con luz ultravioleta (UV 365 nm).

Los niveles de ARNm de GFP disminuyeron notablemente en las plantas agroinfiltradas con la construcción pBIN-GFP (calle 1, Figura 23.A). Lo mismo ocurrió cuando se co-agroinfiltraron las construcciones pBIN-GFP y pK7WG2-15K (calle 3, Figura 23.A). En cambio, cuando se co-agroinfiltraron las construcciones pBIN-GFP y pBIN-HC-Pro, se detectaron altos niveles de ARNm correspondientes a GFP, indicando la supresión efectiva del PTGS sobre el gen *gfp* (calle 2, Figura 23.A). Simultáneamente, se evaluaron los niveles de siARNs correspondientes a GFP. Cuando se agroinfiltró con pBIN-GFP, se detectaron grandes cantidades de siARNs derivados del ARNm de GFP (calle 1, Figura 23.A). Dichos niveles disminuyeron parcialmente en las muestras provenientes de tejidos co-agroinfiltrados con pBIN-GFP y pK7WG2-15K (calle 3, Figura 23.A). La disminución en los niveles de siARNs correspondientes al ARNm de GFP disminuyeron más aún cuando se co-agroinfiltraron las construcciones pBIN-GFP y pBIN-HC-Pro (calle 2, Figura 23.A). Cuando se analizaron las plantas co-agroinfiltradas con pBIN-GFP y pK7WG2-15K-RRR, se observó una disminución notable en los niveles de ARNm de GFP (calle 4, Figura 23.A). Sin embargo, se detectaron muy bajas cantidades de siARNs correspondientes a GFP.

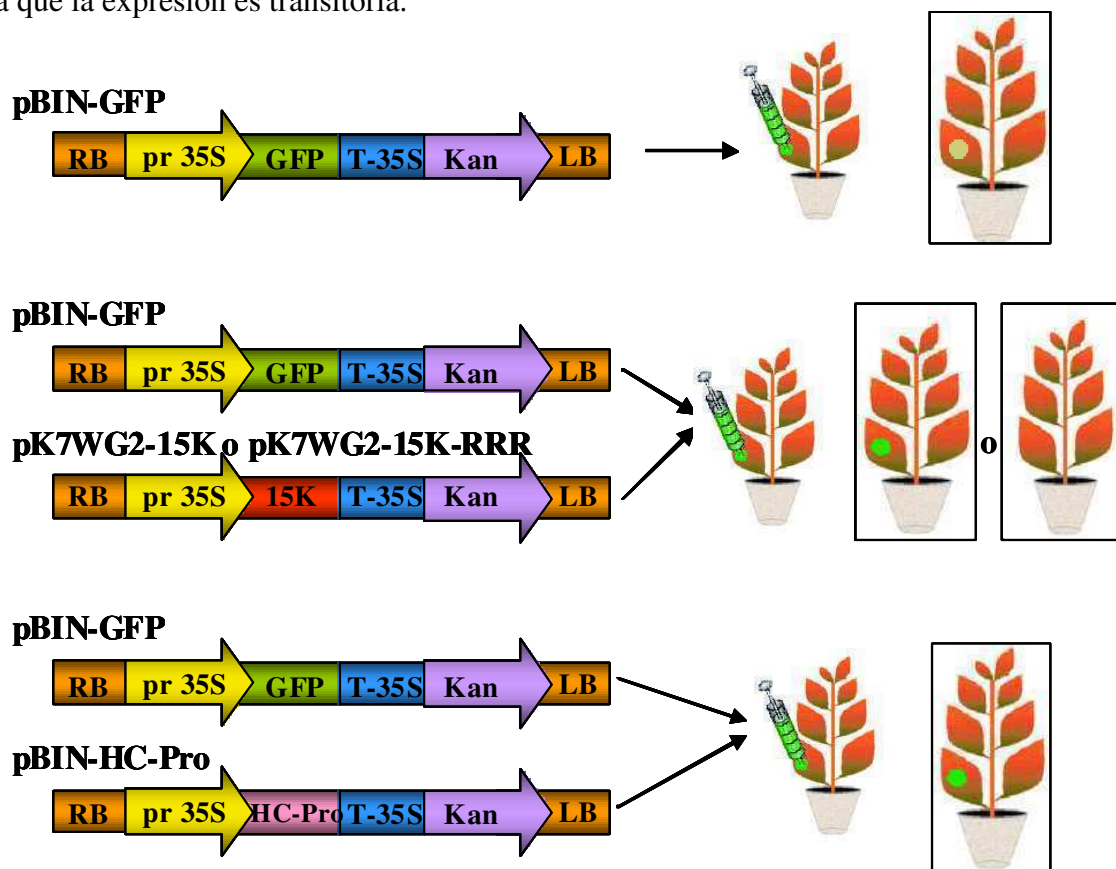
Al evaluar este ensayo iluminando las plantas con luz UV, contrariamente a lo observado para los niveles de ARNm, se observó un leve aumento en los niveles de fluorescencia de GFP de las hojas co-agroinfiltradas con pBIN-GFP y pK7WG2-15K en comparación con la fluorescencia observada en las hojas agroinfiltradas con pBIN-GFP (Figura 23.B). Por esta razón, se decidió analizar la expresión de la proteína GFP mediante ensayos de *Western blot*. En la Figura 23.C se muestra la detección de GFP

con anticuerpos específicos en un ensayo de este tipo realizado con extractos provenientes de tejidos agroinfiltrados con las construcciones indicadas. Como puede observarse, en las plantas de *N. benthamiana* 16C co-agroinfiltradas con las construcciones pBIN-GFP y pK7WG2-15K se detectaron niveles levemente superiores que en las plantas agroinfiltradas sólo con pBIN-GFP (calles 4 versus 2, Figura 23.C). En las plantas co-agroinfiltradas con pBIN-GFP y pBIN-HC-Pro se detectaron altos niveles de GFP, tal como se describe en la bibliografía (calles 3, Figura 23.C). Por otro lado, los niveles de GFP detectados en las plantas co-agroinfiltradas con las construcciones pBIN-GFP y pK7WG2-15K-RRR resultaron levemente menores a los detectados en los extractos provenientes de plantas co-agroinfiltradas con pBIN-GFP y pK7WG2-15 (calle 4 versus 5, Figura 23.C).



**Figura 22.** Ensayos de agroinfiltración de *N. benthamiana* 16C. (A) Se tomaron muestras de las plantas agroinfiltradas con las construcciones indicadas, a los 5 d.p.i. Se realizaron ensayos de *Northern blot* de ARN total extraído de la región agroinfiltrada en las plantas. El revelado se realizó con una sonda específica para GFP. También se analizó la presencia de siARNs, que fueron detectados con una ribosonda. Como control de carga, se muestran ambos geles teñidos con bromuro de etidio. (B) Fotografía de las hojas agroinfiltradas en (A) iluminadas con luz UV. (C) *Western blot* de extractos de plantas de *N. benthamiana* 16C agroinfiltradas con las construcciones indicadas. Como control de carga, se muestra la tinción de la membrana con Rojo Ponceau. pBIN-GFP (GFP); pBIN-GFP y pBIN-HCPro (GFP + HC-Pro); pBIN-GFP y pK7WG2-15K (GFP + 15K); pBIN-GFP y pK7WG2-15K-RRR (GFP + 15K-RRR); pBIN61 (pBIN).

Dado que las diferencias observadas en las co-agroinfiltraciones con pBIN-GFP y pK7WG2-15K fueron leves, se realizaron ensayos similares en plantas de *N. benthamiana* no transgénicas con el objeto de confirmar estos resultados. De esta manera, se intentó reducir el *background* de GFP debido a la expresión constitutiva del transgén en las plantas de la línea 16C. En este caso, se observó la fluorescencia verde originada por la agroinfiltración de la construcción pBIN-GFP, cuya máxima expresión se detectó los 3 d.p.i. Dicha fluorescencia se extendió sobre el *background* de clorofila, que emite fluorescencia de color rojo (Figura 24). A los 3 d.p.i, la fluorescencia verde de la proteína GFP decayó debido, en parte, al desencadenamiento del PTGS y en parte a que la expresión es transitoria.



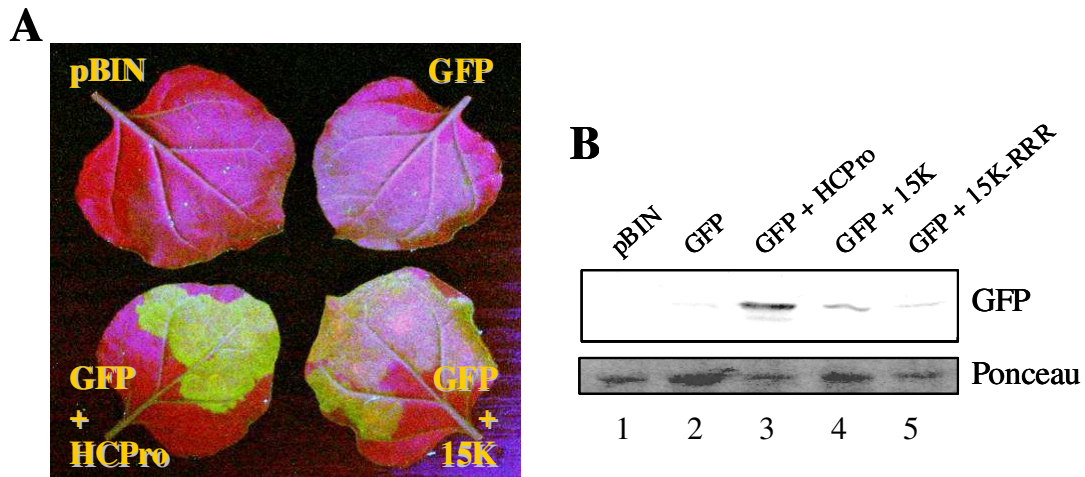
**Figura 24.** Esquema de los ensayos de co-agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* no transgénica. Se agroinfiltraron plantas con la construcción pBIN-GFP y se comenzaron a observar los efectos del PTGS a los 4 d.p.i. Para evaluar la actividad supresora de la proteína 15K y de la versión mutagenizada 15K-RRR, se co-agroinfiltraron plantas con las construcciones pBIN-GFP y pK7WG2-15K o pK7WG2-15K-RRR. Como control positivo de supresión, se utilizó la construcción pBIN-HC-Pro. Como control negativo, se utilizó el vector pBIN61. A los 5 d.p.i. se observaron las plantas bajo luz UV y se extrajeron muestras de proteínas totales de los tejidos agroinfiltrados para realizar ensayos de *Western blot*. El color rojo observado al iluminar las hojas con luz UV corresponde a la fluorescencia característica de la clorofila, y el color verde brillante corresponde a GFP. RB y LB son los bordes derecho e izquierdo del ADN-T, respectivamente.

Se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* no transgénicas con las siguientes construcciones:

1. pBIN61,
2. pBIN-GFP,
3. pBIN-GFP + pBIN-HC-Pro,
4. pBIN-GFP + pK7WG2-15K,
5. pBIN-GFP + pK7WG2-15K-RRR.

Luego de 5 d.p.i. se observaron las plantas iluminándolas con luz UV, y se extrajeron muestras para su posterior análisis por *Western blot*.

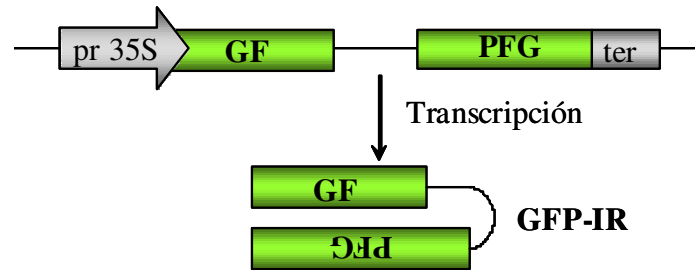
Como puede observarse en la Figura 25.A, las hojas co-agroinfiltradas con pBIN-GFP y pK7WG2-15K mostraron fluorescencia verde mayor a la observada en el control de silenciamiento agroinfiltrado con pBIN-GFP. Al analizar la expresión de la proteína GFP mediante *Western blot*, se detectaron mayores niveles de proteína en la calle correspondiente a pBIN-GFP y pK7WG2-15K en comparación con los niveles detectados para el tejido agroinfiltrado con pBIN-GFP (calle 4 versus 2, Figura 25.B). Como control positivo de supresión se efectuó la co-agroinfiltración de las construcciones pBIN-GFP y pBIN-HC-Pro. La misma permitió detectar altos niveles de proteína GFP, indicando la supresión efectiva del silenciamiento sobre el gen *gfp*. El análisis de *Western blot* de extractos obtenidos a partir de tejido co-agroinfiltrado con pBIN-GFP y pK7WG2-15K-RRR mostró que los niveles de GFP disminuyeron con respecto a la co-agroinfiltración realizada con pBIN-GFP y pK7WG2-15K (calle 4 versus 5, Figura 25.B).



**Figura 25.** Ensayos de agroinfiltración de *N. benthamiana* no transgénicas. (A) Fotografía de hojas agroinfiltradas con las construcciones indicadas iluminadas con luz UV. (B) Ensayo de *Western blot* de hojas agroinfiltradas en (A). El silenciamiento se indujo mediante agroinfiltración con el transgén *gfp*. Las muestras para los ensayos de *Western blot* se tomaron a los 5 d.p.i. Como control de carga se muestra la tinción de la membrana con Rojo Ponceau. pBIN-GFP (GFP); pBIN-GFP y pBIN-HCPro (GFP + HC-Pro); pBIN-GFP y pK7WG2-15K (GFP + 15K); pBIN-GFP y pK7WG2-15K-RRR (GFP + 15K-RRR); pBIN61 (pBIN).

El resultado obtenido fue análogo al descrito en la Figura 23.C, pero el incremento en el nivel de la proteína GFP detectado resultó más notorio. Dado que las variaciones fueron sutiles, es posible que la observación de las mismas fuera enmascarada por la expresión de la proteína GFP de la línea 16C de *N. benthamiana* y sólo se hicieran evidentes en el *background* no transgénico.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de la proteína 15K de suprimir el PTGS local desencadenado por un inductor fuerte. Para ello, se realizaron ensayos similares a los descritos en la Figura 22 utilizando una horquilla de silenciamiento (construcción pBIN-GFP-IR; Lichner *et al.*, 2003; Figura 26). Dicha construcción está formada por la primera parte de la secuencia *gfp* (GF) unida mediante un *linker* con la secuencia completa de *gfp* en orientación invertida (PFG). Luego de la transcripción de la construcción pBIN-GFP-IR, se genera una estructura de ARN doble cadena debido a la complementariedad entre ambas porciones de *gfp*.



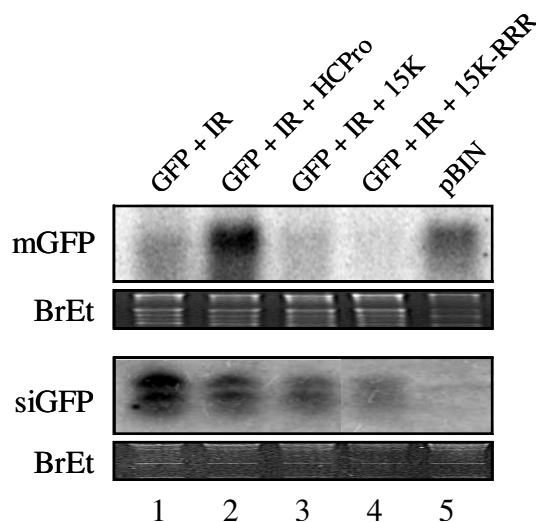
**Figura 26.** Esquema de una horquilla de silenciamiento para *gfp* (pBIN-GFP-IR). Las repeticiones invertidas de la secuencia de *gfp* se expresan bajo la dirección del promotor 35S. El transcrito resultante se pliega en forma de ARN doble cadena y es capaz de inducir fuertemente el silenciamiento del transgen *gfp*.

Se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* 16C con las siguientes construcciones:

1. pBIN-GFP + pBIN-GFP-IR,
2. pBIN-GFP + pBIN-GFP-IR + pBIN-HC-Pro,
3. pBIN-GFP + pBIN-GFP-IR + pK7WG2-15K,
4. pBIN-GFP + pBIN-GFP-IR + pK7WG2-15K-RRR,
5. pBIN61.

A los 5 d.p.i., se observaron las plantas bajo luz UV y se extrajeron muestras de ARN total del tejido agroinfiltrado para su análisis por *Northern blot*. Dicho análisis mostró que los niveles de ARNm de GFP disminuyeron notablemente en las plantas co-agroinfiltradas con las construcciones pBIN-GFP y pBIN-GFP-IR (calle 1, Figura 27). Un resultado similar se obtuvo cuando se co-agroinfiltraron las construcciones pBIN-GFP, pBIN-GFP-IR y pK7WG2-15K (calle 3, Figura 27). En cambio, cuando se co-agroinfiltraron las construcciones pBIN-GFP, pBIN-GFP-IR y pBIN-HC-Pro se detectaron altos niveles de ARNm correspondientes a GFP, indicando la supresión efectiva del silenciamiento sobre el gen *gfp* (calle 2, Figura 27). Por otra parte, se detectaron grandes cantidades de siARNs correspondientes al ARNm de GFP cuando se co-agroinfiltró con las construcciones pBIN-GFP y pBIN-GFP-IR. En las hojas co-agroinfiltradas con pBIN-GFP, pBIN-GFP-IR y pK7WG2-15K, si bien se observó una disminución en los niveles de ARNm de GFP, fue posible observar un leve descenso en los niveles de siARNs en comparación con los niveles detectados en los controles de silenciamiento (calle 1 versus 3, Figura 27). Se observó un resultado similar en las hojas co-agroinfiltradas con pBIN-GFP, pBIN-GFP-IR y pK7WG2-15K-RRR.





**Figura 27.** Ensayos de agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana* 16C. Se tomaron muestras de las plantas agroinfiltradas con las construcciones indicadas a los 5 d.p.i y se realizaron ensayos de *Northern blot* a partir de ARN total extraído de la región de tejido agroinfiltrada. Los transcritos se visualizaron con una sonda específica para GFP. En el panel inferior se muestra la detección de siARNs, revelados con una ribosonda específica. Como control de carga, se muestran tinciones de ambos geles con bromuro de etidio. pBIN-GFP y pBIN-GFP-IR (GFP + IR); pBIN-GFP y pBIN-GFP-IR y pBIN-HCPro (GFP + IR+ HC-Pro); pBIN-GFP y pBIN-GFP-IR y pK7WG2-15K (GFP + IR + 15K); pBIN-GFP y pBIN-GFP-IR y pK7WG2-15K-RRR (GFP + IR + 15K-RRR); pBIN61 (pBIN).

En conjunto, estos resultados muestran que la proteína 15K posee una leve actividad supresora del PTGS a nivel local. Dicha actividad se ve parcialmente disminuida cuando la región rica en arginina es mutagenizada.

### **La proteína 15K suprime el silenciamiento a nivel sistémico desencadenado tanto por una señal débil como por una señal fuerte**

Con el fin de analizar el efecto de la proteína 15K sobre el PTGS sistémico se realizaron ensayos de co-agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana* 16C similares a los descritos en la Figura 22. Al cabo de 14 d.p.i. se analizaron los niveles de ARNm GFP en las hojas superiores, distantes al sitio de agroinfiltración. En todos los casos se evaluaron los niveles del ARNm de GFP en las hojas 3 y 4 (designando hoja “1” a la más joven completamente desarrollada). Además, se evaluó la expresión de GFP observando las plantas bajo luz UV (365 nm). En todos los ensayos se utilizó como

control positivo de supresión la construcción pBIN-HC-Pro. Como control negativo se utilizó el vector pBIN61. También se realizaron ensayos de detección de siARN.

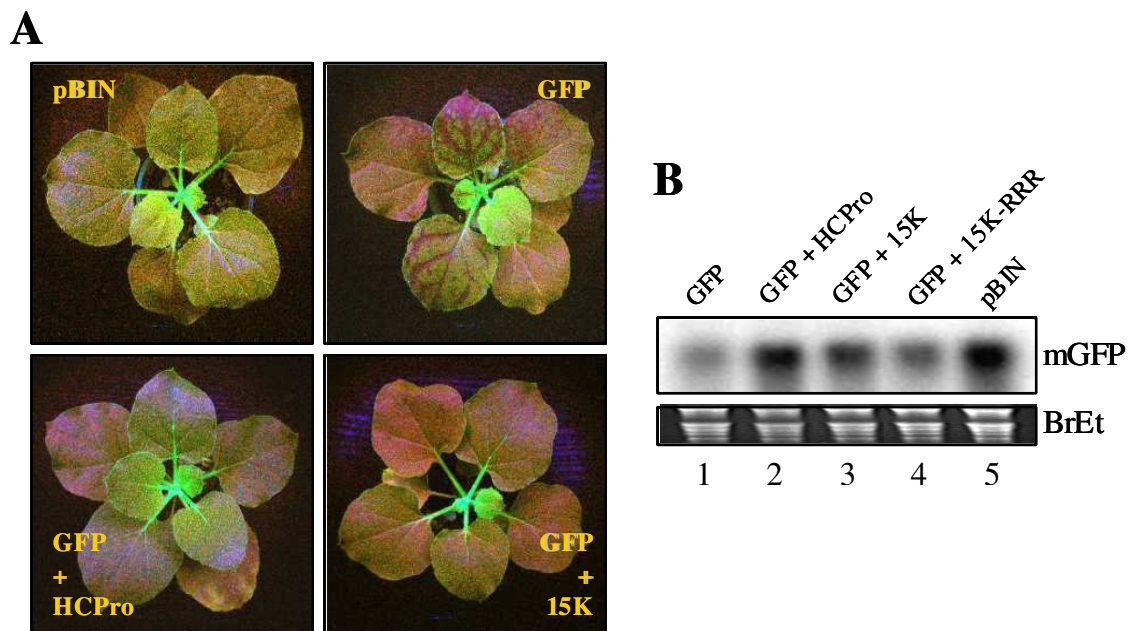
Con el objetivo de evaluar el efecto supresor a nivel sistémico induciendo el PTGS mediante una señal débil, se agroinfiltraron las plantas de *N. benthamiana* 16C con las siguientes construcciones:

1. pBIN-GFP,
2. pBIN-GFP + pBIN-HCPro,
3. pBIN-GFP + pK7WG2-15K,
4. pBIN-GFP + pK7WG2-15K-RRR,
5. pBIN61

La Figura 28.A muestra imágenes de las plantas agroinfiltradas, iluminadas con luz UV. Sólo se observó silenciamiento sistémico, caracterizado por la desaparición de la fluorescencia verde en los sitios cercanos a las nervaduras, en las plantas agroinfiltradas con pBIN-GFP. En las plantas co-agroinfiltradas con las construcciones pBIN-GFP y pK7WG2-15K no se observó silenciamiento sistémico, al igual que en control de supresión co-agroinfiltrado con pBIN-GFP y pBIN-HC-Pro.

En forma consistente con la observación anterior, el análisis de *Northern blot*, reveló que las plantas co-agroinfiltradas con las construcciones pBIN-GFP y pK7WG2-15K expresaron altos niveles de ARNm de GFP en las hojas sistémicas (calle 3, Figura 28.B). Un resultado análogo se obtuvo en el caso del control positivo de supresión co-agroinfiltrado con pBIN-GFP y pBIN-HC-Pro (calle 2, Figura 28.B). Por el contrario, en las plantas agroinfiltradas con pBIN-GFP (calle 1, Figura 28.B) se observó una notable disminución de los niveles de ARNm de GFP. En el tejido co-agroinfiltrado con pBIN-GFP y pK7WG2-15K-RRR se detectaron niveles de ARNm de GFP mayores a los observados en el control positivo de PTGS agroinfiltrado con pBIN-GFP (calle 4 versus 1, Figura 28.B). Sin embargo, estos niveles no alcanzaron los niveles detectados en el tejido co-agroinfiltrado con pBIN-GFP y pK7WG2-15K (calle 4 versus 3, Figura 28.B).

La detección de los siARN no fue posible en los casos de análisis de PTGS sistémico. Probablemente, este hecho se deba a que los mismos se encuentran en muy baja concentración en hojas distantes de la señal de inducción inicial del PTGS.



**Figura 28.** Ensayos de agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana* 16C. (A) Fotografía de las plantas agroinfiltradas con las construcciones indicadas iluminadas con luz UV. (B) Ensayos de *Northern blot* a partir de ARN total extraído de hojas sistémicas de plantas agroinfiltradas, a los 14 d.p.i. La hibridación se realizó con una sonda específica para la secuencia de *gfp*. Como control de carga, se muestra la tinción del gel con bromuro de etidio. pBIN-GFP (GFP); pBIN-GFP y pBIN-HCPro (GFP + HC-Pro); pBIN-GFP y pK7WG2-15K (GFP + 15K); pBIN-GFP y pK7WG2-15K-RRR (GFP + 15K-RRR); pBIN61 (pBIN).

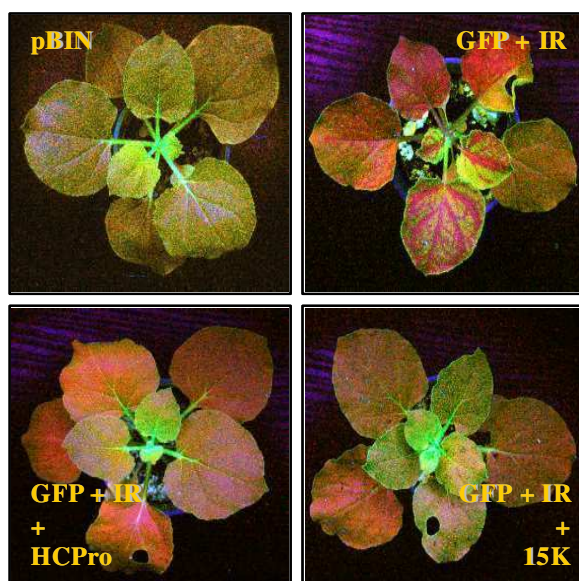
Por último, se evaluó la capacidad de la proteína 15K para suprimir el PTGS sistémico desencadenado por una señal inductora fuerte. En este caso, se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* 16C con las siguientes construcciones:

1. pBIN-GFP + pBIN-GFP-IR,
2. pBIN-GFP + pBIN-GFP-IR + pBIN-HCPro,
3. pBIN-GFP + pBIN-GFP-IR + pK7WG2-15K,
4. pBIN-GFP + pBIN-GFP-IR + pK7WG2-15K-RRR,
5. pBIN61.

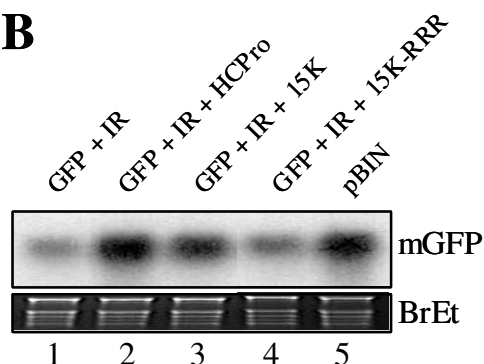
Luego de 14 d.p.i., se observaron las plantas bajo luz UV y se tomaron muestras de ARN de las hojas 3 y 4 para efectuar un análisis de *Northern blot*. Tal como se observa en la Figura 29.A, sólo las plantas co-agroinfiltradas con las construcciones pBIN-GFP y pBIN-GFP-IR exhibieron silenciamiento sistémico caracterizado por la desaparición de la fluorescencia verde en los sitios cercanos a las nervaduras. En las plantas co-agroinfiltradas con pBIN-GFP, pBIN-GFP-IR y pK7WG2-15K no se

observó silenciamiento sistémico, al igual que en control positivo de supresión co-agroinfiltrado con las construcciones pBIN-GFP, pBIN-GFP-IR y pBIN-HC-Pro.

**A**



**B**



**Figura 29.** Ensayos de agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana* 16C. (A) Fotografía de las plantas co-agroinfiltradas con las construcciones indicadas iluminadas con luz UV. (B) Análisis de *Northern blot* a partir de ARN total extraído de hojas sistémicas de plantas agroinfiltradas a los 14 d.p.i. La hibridación se efectuó con una sonda específica para la secuencia de *gfp*. Como control de carga se muestra una tinción del gel con bromuro de etidio. pBIN-GFP y pBIN-GFP-IR (GFP + IR); pBIN-GFP y pBIN-GFP-IR y pBIN-HCPro (GFP + IR+ HC-Pro); pBIN-GFP y pBIN-GFP-IR y pK7WG2-15K (GFP + IR + 15K); pBIN-GFP y pBIN-GFP-IR y pK7WG2-15K-RRR (GFP + IR + 15K-RRR); pBIN61 (pBIN).

El análisis por *Northern blot* de las plantas co-agroinfiltradas con las construcciones pBIN-GFP y pBIN-GFP-IR mostró una notable disminución en los niveles de ARNm de GFP (calle 1, Figura 29.B). Por el contrario, en las plantas co-agroinfiltradas con las construcciones pBIN-GFP, pBIN-GFP-IR y pK7WG2-15K se detectaron altos niveles de ARNm de GFP (calle 3, Figura 29.B). Se observó un resultado similar en el caso del control positivo de supresión co-agroinfiltrado con las construcciones pBIN-GFP, pBIN-GFP-IR y pBIN-HC-Pro (calle 2, Figura 29.B). Los resultados obtenidos en los ensayos de co-agroinfiltración utilizando la versión mutagenizada 15K-RRR mostraron una disminución parcial en los niveles de ARNm de GFP.

La Tabla 4 muestra un resumen de los resultados obtenidos sobre la eficiencia de la actividad supresora a nivel sistémico, tanto de la proteína 15K como de la proteína mutagenizada 15K-RRR. La eficiencia de supresión se expresó como el porcentaje de plantas de *N. benthamiana* 16C que mostraron fluorescencia verde al ser observadas bajo luz UV luego de 14 d.p.i. con las construcciones indicadas, y que no mostraron señales de PTGS.

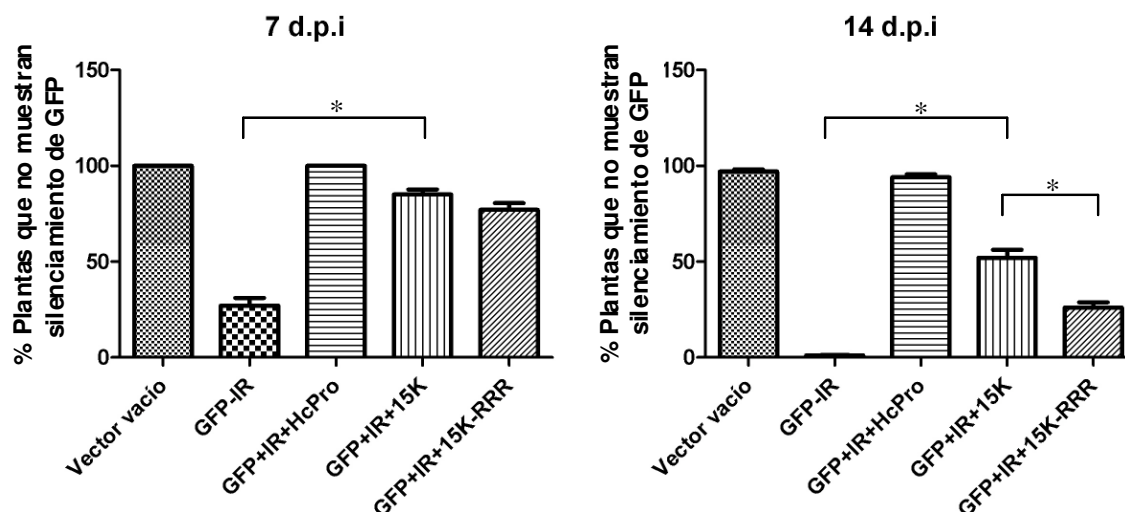
Los resultados expuestos en la Tabla 4 y en la Figura 30, muestran que la proteína 15K suprime el silenciamiento sistémico desencadenado por una señal fuerte (pBIN-GFP-IR) con una eficiencia del 85% a los 7 d.p.i. y del 51% a los 14 d.p.i. Esta eficiencia es reducida cuando se introducen mutaciones en el dominio rico en residuos de arginina, tal como lo demuestran los análisis de *Northern blot* realizados con la proteína mutagenizada 15K-RRR. En este caso la eficiencia de supresión es de 75% a los 7 d.p.i., y la diferencia resulta significativa con respecto a la proteína 15K original descendiendo a 27% a los 14 d.p.i.

<b>7 d.p.i.</b>	<b>% Plantas que no muestran silenciamiento de GFP</b>	<b>Número total de plantas evaluadas</b>
<b>Vector vacío</b>	100 %	52
<b>GFP + IR</b>	29 %	52
<b>GFP + IR + HC-Pro</b>	100 %	51
<b>GFP + IR + 15K</b>	85 %	52
<b>GFP + IR + 15K-RRR</b>	75 %	26

<b>14 d.p.i.</b>	<b>% Plantas que no muestran silenciamiento de GFP</b>	<b>Número total de plantas evaluadas</b>
<b>Vector vacío</b>	97 %	46
<b>GFP + IR</b>	1 %	48
<b>GFP + IR + HC-Pro</b>	93 %	46
<b>GFP + IR + 15K</b>	51 %	49
<b>GFP + IR + 15K-RRR</b>	27 %	31

**Tabla 4.** Ensayos de agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana* 16C realizados para evaluar la actividad supresora del PTGS a nivel sistémico de la proteína 15K y de la proteína mutagenizada 15K-RRR. Se mide la eficiencia de supresión de cada una de las combinaciones de construcciones co-agroinfiltradas como % promedio de plantas que no muestran silenciamiento de GFP al ser iluminadas con luz UV, tanto para ensayos 7 d.p.i., como para 14 d.p.i. Además, se indica en número total de plantas evaluadas en cada caso. Los datos representan el resultado de 9 réplicas. Vector vacío: pBIN61; GFP + IR: pBIN-GFP y pBIN-GFP-IR; GFP+IR+HC-Pro: pBIN-GFP, pBIN-GFP-IR y pBIN-HCPro; GFP+IR+15K: pBIN-GFP, pBIN-GFP-IR y pK7WG2-15K; GFP+IR+15K-RRR: pBIN-GFP, pBIN-GFP-IR y pK7WG2-15K-RRR.

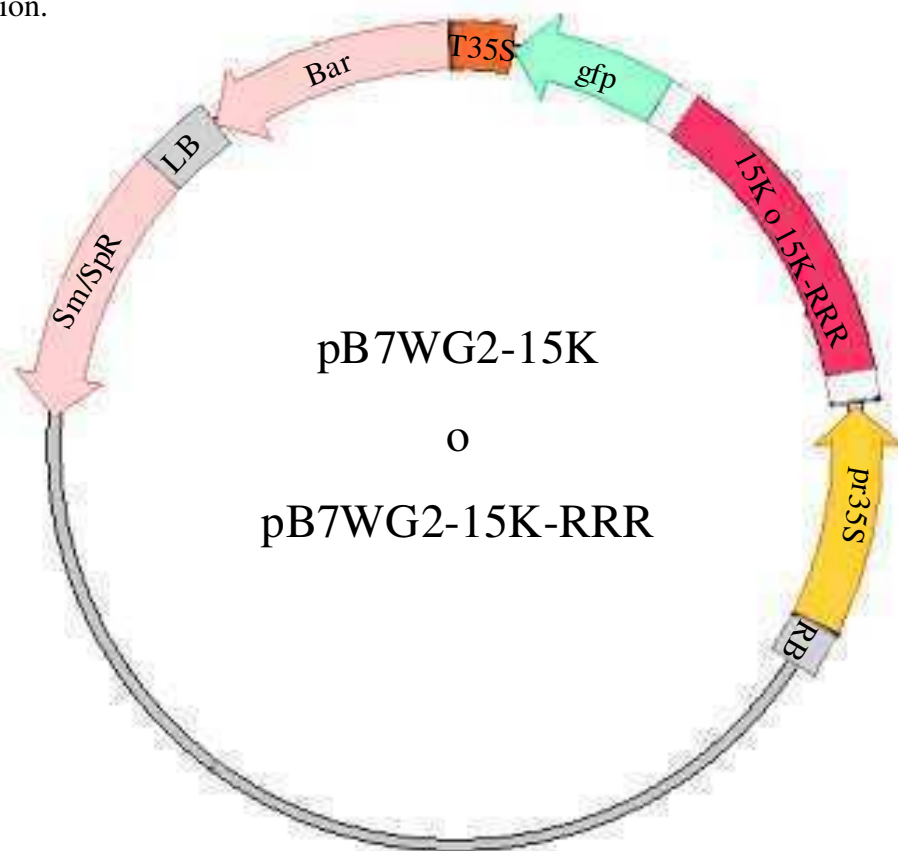


**Figura 30.** Análisis estadístico de la eficiencia de supresión del PTGS a nivel sistémico de la proteína 15K. Se calculó el % promedio de supresión obtenido en 9 réplicas, con su correspondiente error estándar (SEM). Se realizó un análisis por ANOVA seguido de un Test de Tukey de comparación múltiple. Para los ensayos a los 7 d.p.i, se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos, excepto la agroinfiltración con el vector vacío (pBIN61) versus las co-agroinfiltraciones con las construcciones pBIN-GFP + pBIN-GFP IR + pBIN-HC-Pro, y las co-agroinfiltraciones con las construcciones pBIN-GFP IR + pK7WG2-15K versus las co-agroinfiltraciones con las construcciones pBIN-GFP-IR + pK7WG2-15K-RRR ( $P < 0,001$ ). Para los ensayos a los 14 d.p.i, se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos, excepto la agroinfiltración con el vector vacío (pBIN61) versus las co-agroinfiltraciones con las construcciones pBIN-GFP + pBIN-GFP IR + pBIN-HC-Pro ( $P < 0,001$ ).

Estos resultados confirman que la proteína 15K es capaz de suprimir el PTGS a nivel sistémico, desencadenado tanto por una señal débil (transgén; ARNsc) como por una señal fuerte (horquilla de silenciamiento; ARNdc). Si bien los niveles de supresión inducidos por la proteína 15K no son tan elevados como los correspondientes a HC-Pro, su actividad supresora es evidente. Dicha actividad se describe por primera vez en este trabajo. Por otro lado, se muestra la importancia de la región rica en arginina en la actividad supresora de la proteína 15K, dado que cuando la misma es mutagenizada su actividad supresora disminuye parcialmente.

### Localización subcelular de la proteína 15K y de la versión mutagenizada 15K-RRR

Para poder estudiar la localización de la proteína 15K a nivel subcelular, se realizó una fusión de su secuencia codificante con la secuencia de la proteína GFP. Para ello, la secuencia de 15K se sub-clonó en el vector de expresión binario pB7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002) bajo el promotor constitutivo 35S del CaMV dando origen al plásmido pB7FWG2-15K. (Figura 31). La construcción obtenida, permitió expresar la proteína 15K fusionada en su extremo C-terminal con la secuencia de GFP. Dicha construcción se utilizó en ensayos de co-agroinfiltración que se describen a continuación.



**Figura 31.** Esquema del vector de expresión pB7FWG2-15K o del vector de expresión pB7FWG2-15K-RRR. La secuencia de 15K amplificada por PCR se sub-clonó en el vector pB7FWG2 mediante el sistema de recombinación Gateway, dando origen al vector pB7FWG2-15K. Alternativamente, la secuencia de la versión mutagenizada, 15K-RRR, fue sub-clonada en el vector pB7FWG2 para dar origen al vector pB7FWG2-15K-RRR. Sm/SpR: gen de resistencia a la espectinomicina y estreptomicina; Bar: gen de resistencia a glufosinato; T35S: terminador 35S; 15K: secuencia codificante de la proteína 15K, 15K-RRR: secuencia codificante de la versión mutagenizada de la proteína 15K, pr35S: promotor 35S del CaMV, RB y LB: bordes derecho e izquierdo del ADN-T de *Agrobacterium*, respectivamente.

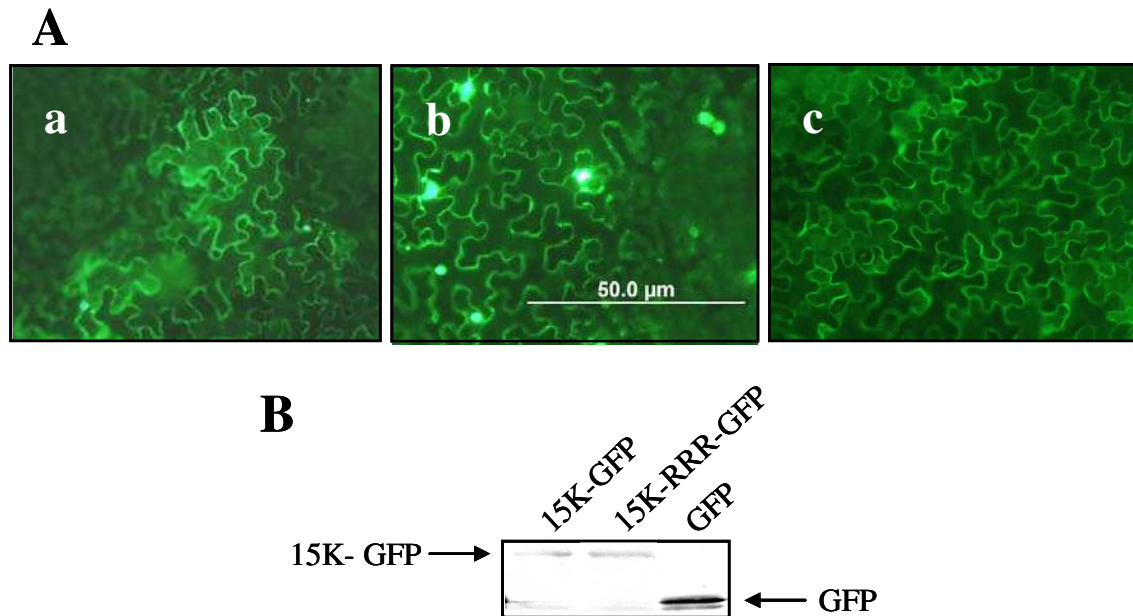
Debido a que los bajos niveles de expresión observados en los ensayos preliminares que dificultaban la visualización de GFP, se co-agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con la construcción pB7FWG2-15K y con la proteína supresora del silenciamiento p19 del *Tomato Bushy Stunt Virus* (TBSV) expresada a partir del vector binario pBIN (pBIN-p19) (Voinnet *et al.*, 1999). Como control, se utilizó pBIN-GFP, cuyo producto de expresión se localiza en el citoplasma celular (Haseloff *et al.*, 1997). Se observó la fluorescencia en hojas con un microscopio dotado de un filtro específico para visualizar GFP. Como se observa en la Figura 32.A.a, la proteína 15K se localizó principalmente en el citoplasma, en forma similar a la proteína GFP expresada a partir del vector control (pBIN-GFP; Figura 32.A.c).

Por otro lado, utilizando el mismo enfoque aplicado a la proteína 15K, se realizó una fusión de la secuencia codificante de la proteína mutagenizada 15K-RRR con la secuencia de la proteína GFP. La construcción obtenida, pB7FWG2-15K-RRR, se utilizó en ensayos de co-agroinfiltración para evaluar si las sustituciones en los residuos de arginina, que disminuyen la actividad supresora, afectan la localización de la proteína.

Se co-agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con pB7FWG2-15K-RRR y pBIN-p19, y se efectuó un análisis similar al de la proteína no mutagenizada. Como se observa en la Figura 32.A.b, las sustituciones realizadas en los residuos de arginina no afectaron la localización de la proteína 15K-RRR, dado que la misma también fue detectada en el citoplasma. Estos ensayos sugieren que los cambios observados en la actividad supresora no se relacionan con la localización subcelular de la proteína 15K.

Con el fin de comprobar la correcta expresión de las construcciones fusionadas a GFP, se realizó un análisis de *Western blot* de extractos de plantas agroinfiltradas empleando anticuerpos específicos para GFP (Figura 32.B). Los ensayos revelaron bandas de tamaños consistentes con las fusiones de las proteínas 15K y 15K-RRR con la proteína GFP (calle 1 y 2, Figura 32.B). Como control, se utilizó un extracto de planta agroinfiltrada con pBIN-GFP, que reveló una banda del tamaño correspondiente a la proteína sin fusionar (calle 3, Figura 32.B).





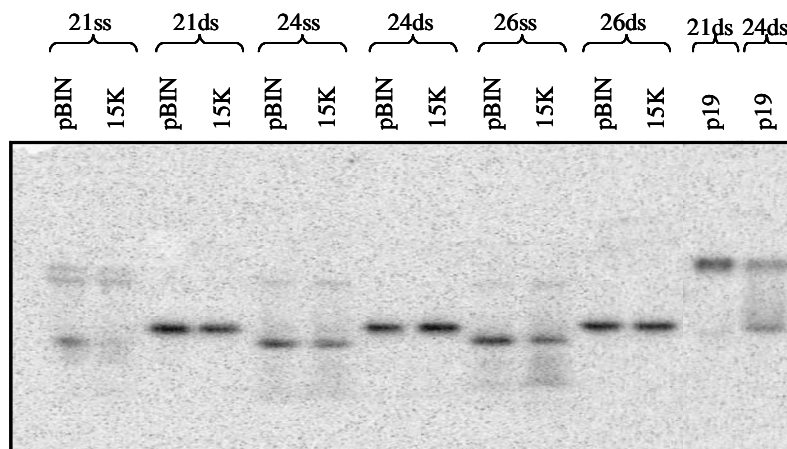
**Figura 32.** Localización de la proteína 15K a nivel subcelular. (A) Se co-agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con las construcciones pBIN-p19 y pB7FWG2-15K (a) o pBIN-p19 y pB7FWG2-15K-RRR (b) y se estableció su localización subcelular mediante observación con un microscopio de fluorescencia a los 4 d.p.i.. Como control positivo de localización citoplasmática, se co-agroinfiltraron las construcciones pBIN-p19 y pBIN-GFP (c). (B) Análisis de *Western blot* de extractos de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones pB7FWG2-15K (15K-GFP), pB7FWG2-15K-RRR (15K-RRR-GFP), y pBIN-GFP (GFP). La detección se efectuó utilizando anticuerpos específicos contra GFP.

### Estudios sobre la capacidad de unión de la proteína 15K a ARNs pequeños

Un trabajo publicado por Lákatos *et al.* (2006) sugiere que el “secuestro” de ARNs pequeños es una estrategia común a varias proteínas supresoras de origen viral. En base a dicho trabajo, se decidió estudiar si la proteína 15K utiliza una estrategia de este tipo para suprimir el PTGS utilizando ensayos de *band shift*. Estos ensayos fueron realizados durante una breve estadía en el Laboratorio de Virología Vegetal del *Agricultural Biotechnology Center* en Gödöllő, Hungría, dirigido por el Dr Jozsef Burgyán.

Se prepararon extractos de plantas agroinfiltradas con la construcción pK7WG2-15K o con el vector pBIN vacío y se los incubó con ARNs sintéticos de distintos tamaños (21, 24, o 26 nt), de simple o doble cadena marcados con  $^{32}\text{P}$ . La mezcla de

reacción fue separada por electroforesis en un gel de poliacrilamida y el gel fue sometido a autorradiografía.



**Figura 33.** Ensayo de un unión de la proteína 15K a ARNs pequeños. Se muestra la autorradiografía de un ensayo de *band shift* realizado con ARNs de distintos tamaños (21, 24, o 26 nt) de simple (ss) o doble (ds) cadena marcados con  $^{32}\text{P}$ . Se utilizó la construcción pBIN-p19 que permite expresar la proteína p19 del CymRSV como control positivo. pBIN: vector vacío; 15K: pK7WG2-15K; p19: pBIN-p19.

En la Figura 33 se muestran los resultados obtenidos en este ensayo. Se usó como control la proteína supresora p19 del *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV; Shilhavy *et al.*, 2002), que une ARNs pequeños de doble cadena (Lákatos *et al.*, 2006). Se realizaron tres ensayos independientes, y en ninguno de ellos fue posible establecer que la proteína 15K se uniera a ácidos nucleicos. En contraste, y tal como se esperaba, se observó una modificación en la migración de la proteína p19 al ser incubada con oligonucleótidos de doble cadena de 21 ó 24 nt. Se concluyó que la proteína 15K no se une a oligonucleótidos de 21, 24, ó 26 nt de simple o doble cadena, al menos en las condiciones utilizadas en este ensayo.

### **Obtención y caracterización de plantas transformadas con la construcción pK7WG2-15K**

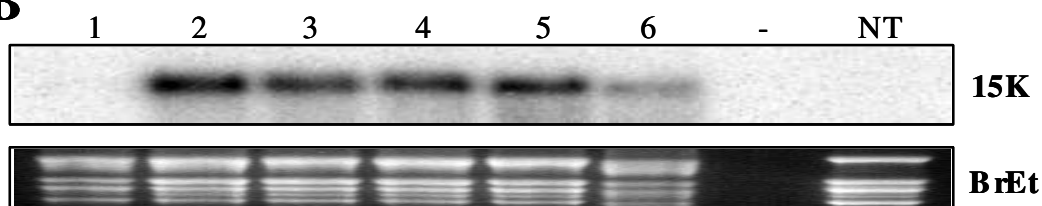
Tal como se describe en la introducción, una posible estrategia para expresar proteínas en plantas de manera eficiente y superar los efectos del PTGS, es la obtención de plantas dobles transgénicas que expresen por un lado el amplicón con el epítipo/proteína de interés y, por el otro, una proteína supresora del PTGS. Con

frecuencia, las proteínas supresoras, como p19 o HC-Pro, inducen fenotipos no deseados cuando se las expresa de manera estable, ya que pueden interferir con la biogénesis de miARNs y, por ende, con el programa de desarrollo de la planta (Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004; Siddiqui *et al.*, 2008). Este efecto parecería estar relacionado con aquellas proteínas con una actividad supresora fuerte. Dado que la proteína 15K mostró una actividad supresora débil, al menos al compararla con la actividad de HC-Pro, existiría la posibilidad de que la expresión estable de dicha proteína no afectase el fenotipo de la planta que la exprese. Al mismo tiempo, su actividad supresora podría resultar lo suficientemente efectiva como para permitir obtener altos niveles de expresión de proteínas de interés.

Para evaluar el efecto de la proteína 15K expresada de manera estable, se transformaron plantas de *N. tabacum* con *A. tumefaciens* conteniendo la construcción pK7WG2-15K.

Se obtuvieron 6 líneas que resultaron fenotípicamente indistinguibles de las plantas no transformadas (Figura 34.A). Las diferencias observadas en el crecimiento entre las distintas líneas de la Figura 34.A se tornaron imperceptibles luego de algunas semanas más de desarrollo. Las líneas obtenidas fueron evaluadas por *Northern blot* con una sonda específica para 15K.

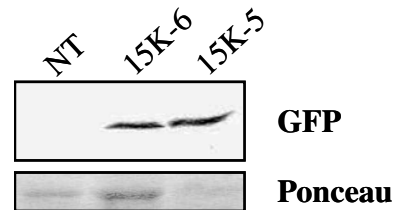
Como se observa en la Figura 34.B, en las líneas 2–6 se detectó una banda de hibridación al revelar con una sonda específica para 15K, indicando que dichas líneas expresaron el transgén de 15K. En el caso de la línea 1, no se detectó expresión del ARNm de 15K.

**A****B**

**Figura 34.** Plantas de *N. tabacum* transformadas con la construcción pK7WG2-15K. (A) Fenotipo de las líneas 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Todas las líneas muestran un fenotipo similar al de una planta no transformada. Las diferencias de tamaño sólo fueron observadas al inicio de la rusticación. (B) Se analizó la expresión de 15K mediante ensayos de *Northern blot* utilizando una sonda específica que detecta el ARNm correspondiente. Como control, se utilizó una planta no transformada (NT). Como control de carga, se muestra una tinción del gel con bromuro de etidio (BrEt).

Con el fin de analizar los niveles de expresión de la proteína 15K, tanto en las plantas transgénicas como en los ensayos de agroinfiltración, se decidió generar anticuerpos específicos contra la misma. Para ello se clonó la secuencia codificante de la proteína 15K en el vector de expresión en procariotas pET28 (pET28-15K). La proteína expresada se purificó a partir de un cultivo líquido y se utilizó para inocular ratones. El suero obtenido se utilizó para la detección de la proteína en ensayos de *Western blot*. Desafortunadamente, el anticuerpo exhibió una reacción cruzada con una proteína no identificada de *N. tabacum* de tamaño similar al correspondiente a 15K, por lo que resultó de escasa utilidad.

Para analizar el efecto de la proteína supresora 15K sobre la expresión de otro transgén, se realizaron ensayos de expresión transitoria en las plantas transformadas con el vector de expresión pBIN-GFP. Se agroinfiltraron plantas de las líneas 15K-6 y 15K-5, y una planta no transformada como control negativo. Se tomaron muestras a los 5 d.p.i. y se evaluaron los niveles de expresión de GFP mediante análisis de *Western blot*. Como se observa en la Figura 35, los niveles de GFP resultaron mucho mayores en las plantas transformadas que en las no transformadas.



**Figura 35.** Agroinfiltración de pBIN-GFP en plantas de *N. tabacum* transformadas con la construcción pK7WG2-15K. Se agroinfiltraron con pBIN-GFP dos plantas de líneas independientes que expresaban 15K. Luego de 5 d.p.i., se tomaron muestras de hojas y se analizaron los respectivos extractos mediante ensayos de *Western blot* con anticuerpos específicos para GFP. Como control, se agroinfiltró una planta no transformada. En el panel inferior se muestra el control de carga de la membrana por tinción con Rojo Ponceau.

## Discusión II

En este Capítulo se describe por primera vez la actividad supresora del PTGS de la proteína 15K del GmbFV. Dicha proteína fue capaz de suprimir el silenciamiento desencadenado tanto por un inductor débil (construcción pBIN-GFP), como por un inductor fuerte (construcción pBIN-GFP-IR).

La proteína 15K mostró una leve actividad supresora del PTGS a nivel local que se evidenció en un aumento de los niveles de proteína GFP detectados en los ensayos de *Western blot* y en observaciones de hojas agroinfiltradas bajo luz UV. Coincidentemente, los niveles de siARN se vieron parcialmente disminuídos en las plantas co-agroinfiltradas con las construcciones pBIN-GFP y pK7WG2-15K. Sin embargo, el aumento en el nivel de la proteína GFP y la disminución de los siARN derivados del ARNm de GFP no fueron acompañados por un aumento en los niveles de ARNm correspondientes, como está descrito para el caso de las proteínas supresoras clásicas. Estos resultados atípicos podrían estar relacionados con un mecanismo de acción particular de la proteína 15K.

El mecanismo más común mediante el cual actúa el PTGS en plantas es la degradación de los ARNm. Recientemente, Brodersen *et al.* (2008) mostraron que, al igual que en animales, la inhibición de la traducción mediada por PTGS es un mecanismo frecuente a través del cual los siARNs inhiben la expresión de un ARNm blanco en plantas. En base a estos hallazgos, una posible hipótesis que explicaría el mecanismo de acción de la proteína 15K podría fundarse en que ésta actuaría evitando que se reprima la traducción de la proteína blanco, y no mediante la estabilización del ARNm. Esta hipótesis implicaría un mecanismo considerablemente diferente a los descritos para los supresores virales clásicos.

Por otro lado, la actividad supresora de 15K a nivel sistémico resultó mucho más evidente. Las observaciones realizadas bajo luz UV y los análisis de *Northern blot*, revelaron que las plantas de *N. benthamiana* 16C co-agroinfiltradas con las construcciones pBIN-GFP y pK7WG2-15K expresaron altos niveles de ARNm de GFP, comparables a los observados en el control de supresión. Los niveles de supresión alcanzados al desencadenar el PTGS con una señal débil fueron de 94% a los 7 d.p.i.,

manteniéndose una efectividad del 56% a los 14 d.p.i. Cuando se indujo el silenciamiento con un gatillo fuerte, dicha actividad alcanzó niveles de efectividad cercanos al 85% a los 7 d.p.i. y el efecto supresor persistió a los 14 d.p.i., manteniéndose en niveles que alcanzaron el 51%. Estos resultados evidencian una importante actividad supresora de la proteína 15K frente al PTGS sistémico.

Con respecto a la caracterización bioquímica de la proteína 15K, es posible concluir que el dominio rico en residuos de arginina juega un papel considerable en la actividad supresora, ya que cuando los mismos fueron sustituidos por residuos de alanina, la proteína perdió parcialmente su actividad. Este efecto fue mucho más evidentemente sobre su acción supresora a nivel sistémico que a nivel local.

Por otra parte, los estudios de localización ubicaron a la proteína 15K en el citoplasma, y dicha localización no se modificó en los casos de la versión mutagenizada 15K-RRR, por lo que la disminución en la actividad supresora debido a las mutaciones no estaría en principio relacionada con un cambio en la localización de la proteína.

Los ensayos preliminares de *band shift* indicaron que la proteína 15K presente en extractos de plantas agroinfiltradas no es capaz de unirse a ARNs pequeños sintéticos de 21, 24, o 26 nt de simple o doble cadena en las condiciones evaluadas. Sin embargo, debería considerarse la posibilidad de realizar nuevos ensayos en los que las condiciones experimentales permitan aumentar los niveles de la proteína. Una alternativa sería repetir los ensayos utilizando proteína 15K recombinante para aumentar la concentración de la misma en la mezcla de reacción. Esta estrategia ha sido descrita previamente para otros supresores como p19 y p21, probablemente debido a que la expresión de los mismos en los extractos vegetales agroinfiltrados sería baja.

Se obtuvieron plantas transformadas con la construcción pK7WG2-15K, y se comprobó la expresión del transgén mediante análisis de *Northern blot*. Todas las líneas obtenidas mostraron fenotipos indistinguibles con las plantas no transformadas. Este es un hecho llamativo ya que, dado que la proteína 15K resultó ser una buena supresora del PTGS sistémico, se esperaría que la misma interfiriera con alguna vía de desarrollo de la planta, tal como está descrito en la bibliografía (Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004; Siddiqui *et al.*, 2008). Una posible explicación sería que el blanco de acción por

el cual la proteína 15K ejerce su actividad supresora del PTGS no sería compartido por las vías del silenciamiento mediadas por siARNs y miARNs.

Las plantas transformadas con la construcción pK7WG2-15K fueron agroinfiltradas con un vector de expresión de GFP, obteniéndose niveles considerablemente superiores a los observados en las plantas no transformadas. Estos resultados, conjuntamente con el fenotipo normal de las plantas, alentaron la posibilidad de utilizar las plantas transformadas con la construcción pK7WG2-15K como base para la producción de proteínas heterólogas. No obstante, debería considerarse que los ensayos descritos fueron realizados en plantas transformadas de la primera generación, por lo que es necesario obtener más generaciones y confirmar la expresión estable del transgén antes de iniciar estudios para su utilización en un protocolo de producción a gran escala.

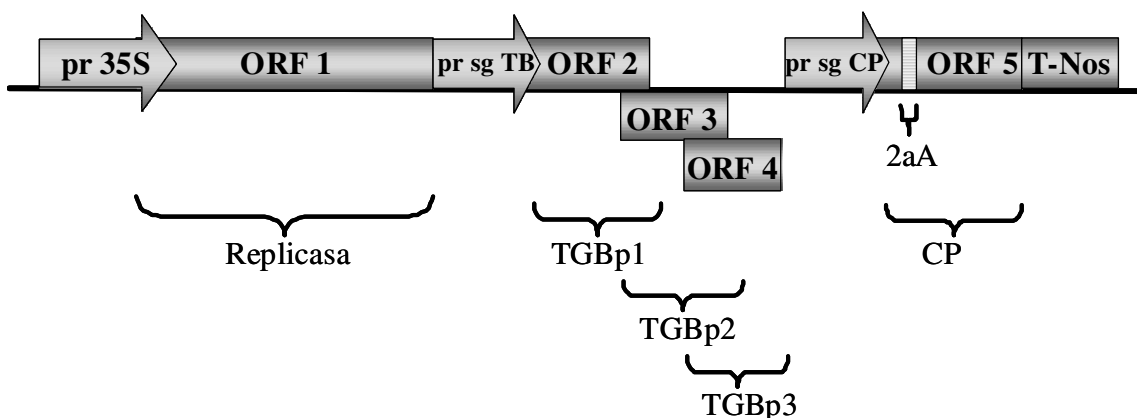


## Capítulo III

### Desarrollo de un sistema de expresión basado en la supresión del PTGS

Con el fin de evaluar distintos sistemas de expresión de proteínas heterólogas en plantas, se realizaron ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana* con el amplicón PVX-2aA, previamente desarrollado en nuestro laboratorio. Dicho amplicón fue clonado en el vector binario pZP200 dando origen a la construcción pZP-PVX-2aA. El amplicón contiene la secuencia del antígeno A del FMDV unido a la secuencia del sitio 2a unida al extremo amino terminal. Ambas secuencias se encuentran insertadas dentro de la CP de PVX, luego del codón número 13 a partir del ATG.

Las secuencias 2a y A se expresan a partir del promotor subgenómico de la proteína de la cápside viral (Figura 36). Tal como se mencionó en la Introducción, debido a que el sitio 2a no induce “saltos” de lectura en el 100% de los casos (su secuencia ha sido modificada para disminuir la eficiencia de reconocimiento), cabe esperar que sea posible la detección tanto de CP libre como de CP fusionada al antígeno A (Cruz et al., 1996).

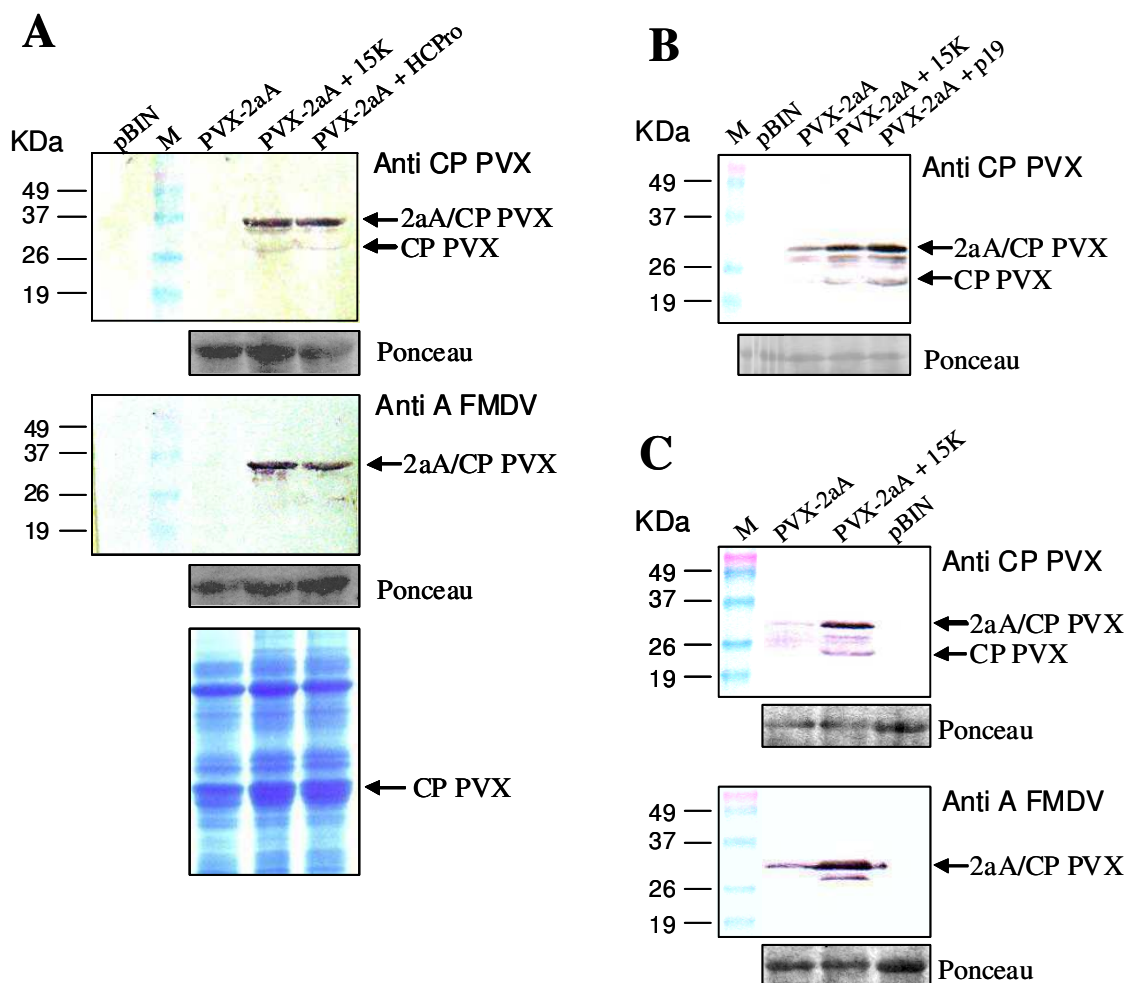


**Figura 36.** Esquema del amplicón PVX-2aA. Las secuencias que codifican el sitio antigénico A del FMVD y el sitio 2a (2aA) fueron ligadas a la secuencia codificante de la CP de PVX, dando así origen a una proteína quimérica. La secuencia completa del amplicón fue clonada bajo la dirección del promotor 35S del CaMV (pr 35S) y del terminador transcripcional del gen de la nopalina sintetasa (T-Nos). Se detalla la posición de los promotores subgenómicos de los ORFs correspondientes al triple bloque de genes (pr sg TB) y a la proteína de la cápside (pr sg CP). Además, se muestran los ORFs 1 a 5 que corresponden a la replicasa, TGBp1, TGBp2, TGBp3, y cápside viral, respectivamente.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se habían obtenido bajos niveles de expresión del antígeno A a partir de ensayos de agroinfiltración realizados con amplicones modificados desarrollados en base al genoma de PVX (Stiefel, 2003). Una posible causa para explicar este bajo nivel de expresión fue que el nivel de replicación de los amplicones modificados mediante la inserción de un gen de interés, resultaba demasiado bajo para superar la respuesta de PTGS de la planta.

Para intentar superar esta posible limitación, se decidió realizar co-agroinfiltraciones con el amplicón pZP-PVX-2aA y las construcciones pBIN-P19, pBIN-HC-Pro o pK7WG2-15K, las que permiten la expresión de las respectivas proteínas supresoras. A los 3–5 d.p.i. se recolectaron muestras de hojas y se analizaron extractos de las mismas mediante ensayos de *Western blot* utilizando anticuerpos específicos para la CP de PVX y para el epítotope A.

Los resultados de las co-agroinfiltraciones mostraron que la expresión de cualquiera de las tres proteínas supresoras, 15K, p19, o HC-Pro, permitió elevar notablemente los niveles de acumulación del antígeno A y de la CP de PVX (Figura 37.A, B y C). El análisis de los extractos realizados 3 d.p.i. mostró que tanto la proteína 15K como la HC-Pro, fueron capaces de elevar los niveles de la CP de PVX fusionada al epítotope A y de la CP de PVX libre. La proteína de fusión pudo ser detectada tanto por los anticuerpos específicos contra la CP de PVX como contra el epítotope A del FMDV (Figura 37.A, panel superior y panel medio). La sobreexpresión de la CP de PVX pudo observarse incluso en un gel teñido con Coomassie Blue (Figura 37.A, panel inferior). En contraste, los extractos que fueron agroinfiltrados solamente con el amplicón PVX-2aA no mostraron niveles de expresión significativos de las proteínas de interés.



**Figura 37.** Análisis de Western blot de plantas de *N. benthamiana* co-agroinfiltradas con el amplicón pZP-PVX-2aA y con distintas construcciones que expresan proteínas supresoras del PTGS. (A) Extractos de hojas obtenidos a los 3 d.p.i. Panel inferior: tinción con Coomassie Blue. (B) Extractos de hojas obtenidos a los 4 d.p.i. (C) Extractos de hojas obtenidos a los 5 d.p.i. Las membranas fueron reveladas con anticuerpos específicos contra la CP de PVX o contra el epítipo A de FMDV. PVX-2aA: agroinfiltración con pZP-PVX-2aA; PVX-2aA + 15K: co-agroinfiltración con pZP-PVX-2aA y pK7WG2-15K; PVX-2aA + p19: co-agroinfiltración con pZP-PVX-2aA y pBIN-p19; PVX-2aA + HC-Pro: co-agroinfiltración con pZP-PVX-2aA y pBIN-HC-Pro; pBIN: agroinfiltración con pBIN; M: marcador de peso molecular. CP PVX: CP de PVX; 2aA/CP PVX: CP de PVX fusionada con el epítipo A. Como control de carga, se muestran en cada caso tinciones de las membranas con Rojo Ponceau.

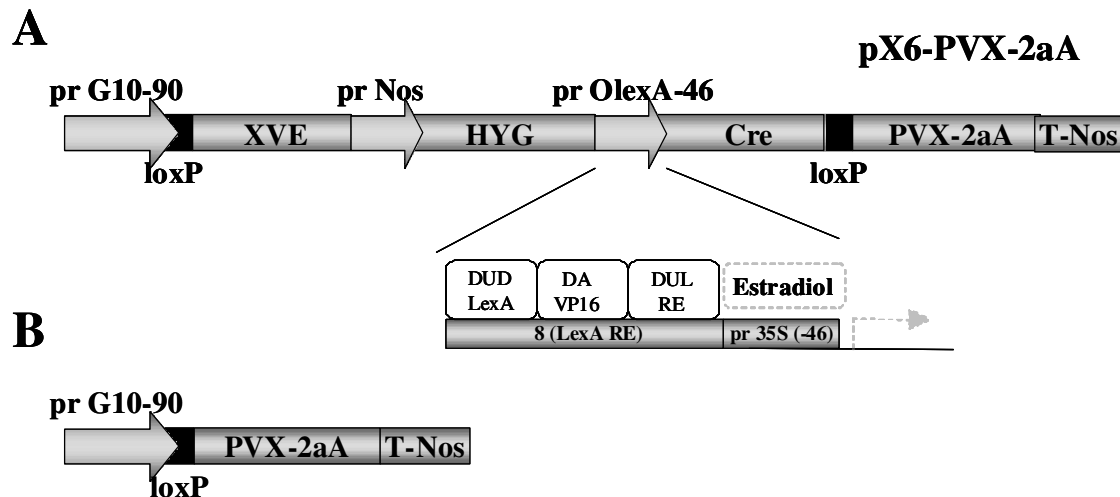
En la Figura 37.B, se observa que las proteínas supresoras utilizadas, 15K y p19, provocan un aumento notable de los niveles de las proteínas de interés a los 4 d.p.i. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas en el ensayo revela que 15K aumenta 2,4 veces los niveles de CP de PVX fusionada al epítipo A del FMDV mientras que p19 lo hace 3,2 veces. Finalmente, al analizar los resultados obtenidos a los 5 d.p.i., fue posible determinar que la proteína supresora 15K mantuvo su efecto en el tiempo,

permitiendo alcanzar niveles de la CP de PVX fusionada al epítotope A 4,7 veces mayores que los obtenidos al agroinfiltrar sólo con PVX-2aA.

En los ensayos de *Western blot* revelados con anticuerpos específicos para la CP de PVX fue posible detectar una banda mayoritaria correspondiente a la CP de PVX fusionada con el epítotope A, así como también una banda minoritaria correspondiente a la CP de PVX libre (Figura 37.A, B, y C). Esto se debe, como se comentó anteriormente, a que el “salto” de los ribosomas inducidos por el sitio 2a no es 100% eficaz. Además, se observaron productos de degradación de diversos tamaños, mayores al de la CP libre pero menores a la CP fusionada al epítotope A.

### **Expresión transitoria del epítotope A del FMDV a partir de la construcción pX6-PVX-2aA**

Dado que los ensayos realizados con el amplicón inducible pX6-PVX (Capítulo I) mostraron que era posible obtener altos niveles de acumulación de proteínas virales, se decidió evaluar la eficiencia de producción del epítotope A del FMDV a partir del mismo vector. Para ello, se subclonó la secuencia correspondiente al amplicón PVX-2aA en el vector de expresión vegetal pX6 (ver Capítulo I) y se obtuvo el vector de expresión inducible pX6-PVX-2aA (Figura 38).

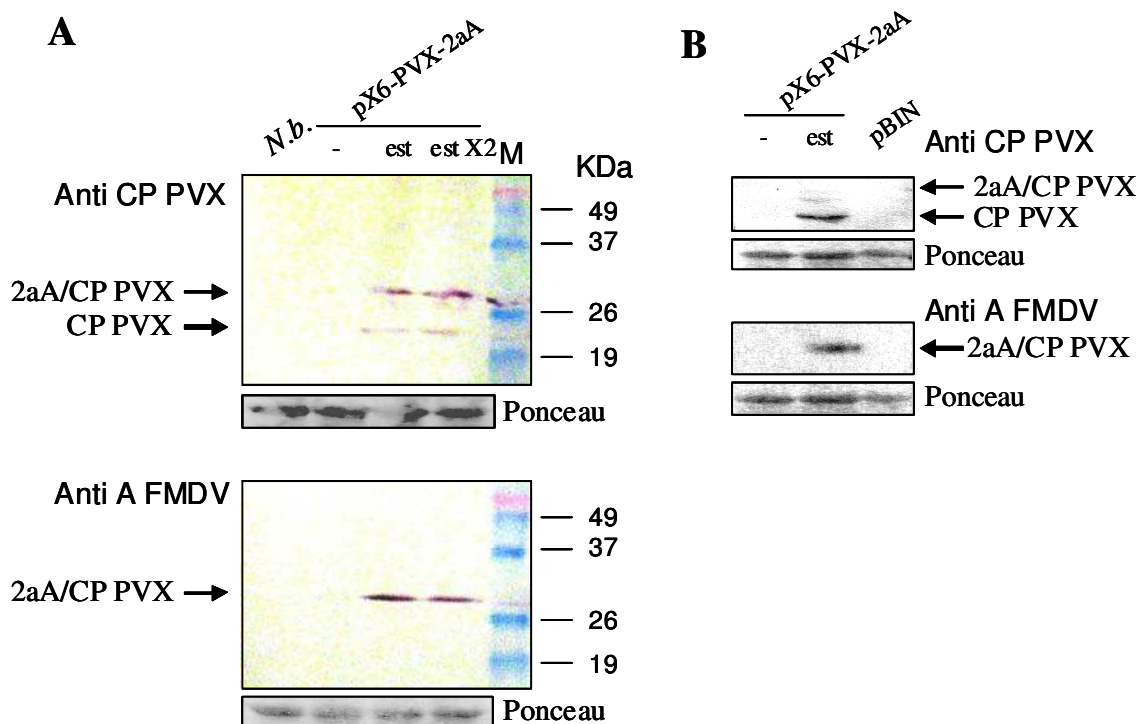


**Figura 38.** Esquema del *cassette* de expresión de la construcción pX6-PVX-2aA. (A) La secuencia genómica de PVX-2aA, junto con la secuencia del terminador T-Nos, fueron clonadas río abajo del sitio loxP derecho. El fragmento comprendido entre los dos sitios loxP contiene las secuencias codificantes de la recombinasa Cre y del gen *hpt* de resistencia a higromicina (HYG). (B) Luego de la inducción con estradiol y la recombinación de los fragmentos loxP, el amplicón viral queda posicionado bajo la regulación del promotor constitutivo fuerte prG10-90. XVE: activador transcripcional quimérico constituido por los dominios DUD LexA, DA VP16, y DUL RE. DUD LexA: dominio de unión al ADN de la proteína LexA, DA VP16: dominio activador de la transcripción VP16 del *Human Herpes Virus*; DUL RE: dominio de unión al ligando del receptor de estrógenos. prOlexA-46: promotor constituido por 8 copias del operador LexA (LexARE) fusionadas al promotor mínimo de 35S [pr35S(-46)].

Se realizaron ensayos de agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana* con el amplicón inducible pX6-PVX-2aA, solo o en presencia de  $\beta$ -estradiol 50 mM, y se tomaron muestras a los 2 d.p.i. Se indujeron nuevamente las plantas con la misma dosis de estradiol, con el objetivo de optimizar la inducción, y se tomaron muestras al día siguiente. Se analizaron dichos extractos mediante análisis de *Western blot* con anticuerpos específicos para la CP de PVX y el epítipo A (Figura 39.A).

La acumulación de proteínas virales y de epítipo A sólo se observó en los extractos de las plantas tratadas con  $\beta$ -estradiol. Sin embargo, los niveles de acumulación no resultaron tan elevados como los registrados para el caso del amplicón inducible pX6-PVX (Figura 13). Este hecho podría deberse a la reducción en la eficiencia de la replicación del amplicón provocada por la inserción de la secuencia 2aA.

Por otro lado, se agroinfiltraron plantas de *N. tabacum* con el amplicón inducible pX6-PVX-2aA, solo o en presencia de  $\beta$ -estradiol 50 mM. Se tomaron muestras de hojas a los 7 d.p.i. y se analizaron extractos de las mismas mediante análisis de *Western blot* utilizando anticuerpos específicos para la CP de PVX y para el epítotope A del FMDV. Como puede observarse en la Figura 39.B, los resultados fueron similares a los obtenidos en *N. benthamiana*.



**Figura 39.** Agroinfiltraciones con el amplicón inducible pX6-PVX-2aA. Se agroinfiltraron plantas con el amplicón inducible pX6-PVX-2aA, con o sin el agregado del agente inductor ( $\beta$ -estradiol 50 mM). (A) Análisis de *Western blot* de extractos de hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* a los 3 d.p.i. (B) Análisis de *Western blot* de extractos de hojas agroinfiltradas de *N. tabacum* a los 7 d.p.i. pX6-PVX-2aA: agroinfiltración con pX6-PVX-2aA; pX6-PVX-2aA est: agroinfiltración con pX6-PVX-2aA con el agregado de  $\beta$ -estradiol 50 mM; pBIN: agroinfiltración con el vector pBIN. Las bandas fueron visualizadas con anticuerpos específicos para la CP de PVX o para el epítotope A de FMDV. M: marcador de peso molecular. CP PVX: CP de PVX; 2aA/CP PVX: CP de PVX fusionada con el epítotope A. Como control de carga, se muestran en cada caso tinciones de las membranas con Rojo Ponceau.

En los ensayos presentados en la Figura 39.A, revelados con anticuerpos específicos para la CP de PVX, fue posible detectar una banda mayoritaria correspondiente a la CP de PVX fusionada con el epítotope A, así como también una banda minoritaria correspondiente a la CP de PVX libre. Esto se debe, de forma similar al resultado mostrado en la Figura 37, a que el sitio 2a no induce el “salto” de los

ribosomas en el 100% de los casos. Sin embargo, en la Figura 39.B, las proporciones de CP fusionada con A y de CP libre parecen haberse invertido. Posiblemente se deba a diferentes respuestas de las plantas hospedadoras (*N. benthamiana* versus *N. tabacum*) frente a la expresión de los amplicones utilizados.

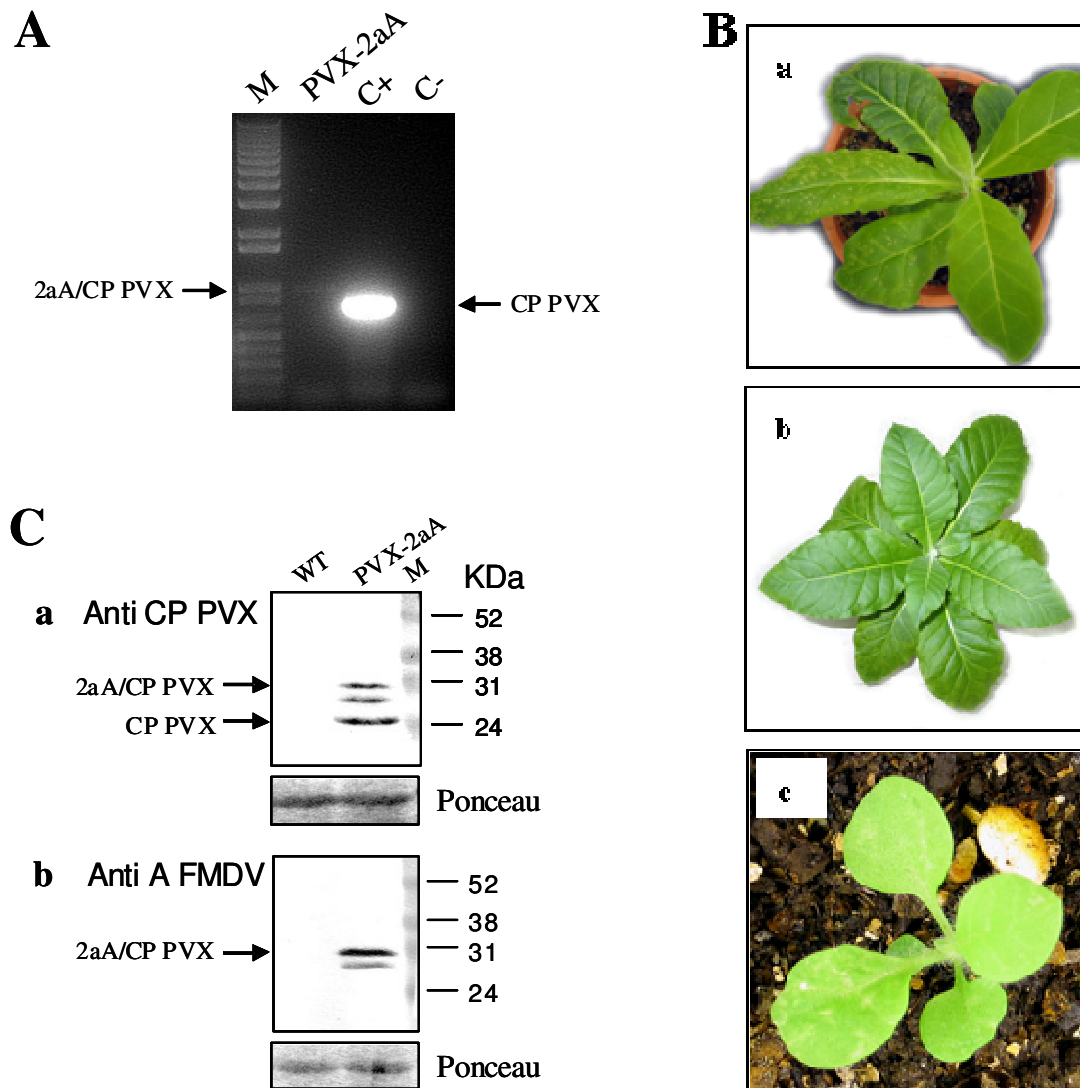
## **Caracterización de plantas de tabaco transformadas con el amplicón PVX-2aA**

El interés manifestado en este trabajo por optimizar la expresión de los amplicones basados en PVX reside principalmente en las grandes ventajas que tienen los sistemas virales para alcanzar altos niveles de expresión de proteínas heterólogas en plantas. Sin embargo, una posible limitación crucial para implementar este enfoque es que la amplificación viral desencadena el fenómeno de PTGS. En el caso particular de PVX, trabajos previos se había reportado que la integración y expresión del genoma viral en el genoma de la planta desencadenaba una fuerte respuesta de PTGS (Angell and Baulcombe, 1997). Sin embargo, ésta podía superarse (al menos parcialmente) co-expresando el amplicón con una proteína supresora del PTGS (Mallory *et al.*, 2002b).

Con el fin de confirmar si estos resultados se verificaban en el sistema de expresión utilizado en este trabajo, y considerando los resultados expuestos en el Capítulo I, se transformaron plantas de *N. tabacum* cv Samsun con el amplicón constitutivo pZP-PVX-2aA. Luego de la etapa de selección, se obtuvo una línea transformada, denominada PVX-2aA en la que se analizó la expresión del amplicón.

La identidad de la línea PVX-2aA fue caracterizada en forma preliminar por PCR utilizando iniciadores específicos para la secuencia de la CP de PVX (Figura 40.A). La planta obtenida fue rusticada, y si bien su crecimiento fue normal, luego de pocos días se observaron síntomas de infección en forma de puntos necróticos (Figura 40.B.a). Estos síntomas se mantuvieron durante varios meses, como puede observarse en la planta adulta (Figura 40.B.b). Más allá de ese rasgo distintivo, la planta PVX-2aA creció al mismo ritmo y hasta el mismo tamaño que una planta no transformada.

Se obtuvieron semillas de la planta transformada, y se observó que la progenie tenía el mismo fenotipo que la planta original (Figura 40.B.c). Se extrajeron muestras de dicha planta, que fueron analizadas por *Western blot* con anticuerpos específicos para la CP de PVX y para el epítipo A de FMDV. En la Figura 40.C se muestra que la planta analizada expresa tanto la CP viral (Figura 40.C.a) como la CP fusionada al epítipo A del FMDV fusionado a la CP de PVX (Figura 40.C.b).



**Figura 40.** Análisis de *Western blot* de la línea PVX-2aA de *N. tabacum*. (A) Análisis por PCR del ADN genómico de la línea PVX-2aA. El vector pG-PVX se utilizó como control positivo (C+). El ADN de una planta no transformada se utilizó como control negativo (C-). M: marcador de peso molecular. (B) Fenotipos observados en las generaciones T0 y T1 en distintas etapas del crecimiento; (a) planta T0 15 días después de la rusticación; (b) planta T0 3 meses después de la rusticación; (c) plántula originada a partir de semillas de una planta T0. (C) Análisis de *Western blot* con anticuerpos específicos contra (a) la CP de PVX o (b) contra el epítipo A del FMDV de extractos de plantas T1. M: marcador de peso molecular. CP PVX: CP de PVX; 2aA/CP PVX: CP de PVX fusionada con el epítipo A. Como control de carga, se muestran en cada caso tinciones de las membranas con Rojo Ponceau.



De manera similar a lo observado para el caso de la expresión transitoria del amplicón PVX-2aA en *N. tabacum* (Figura 39.B), cuando dicho amplicón se expresó en forma integrativa fue posible detectar una banda mayoritaria correspondiente a la CP de PVX libre, así como también una banda minoritaria correspondiente a la CP de PVX fusionada con el epítotope A (Figura 40.C.a y b). Además, se observó una banda de tamaño intermedio que posiblemente corresponda a productos de degradación. Utilizando una curva de CP de PVX con concentraciones conocidas, se estimó que la planta PVX-2aA expresa aproximadamente 0,95 mg de CP fusionada al epítotope A y 1,9 mg de CP libre por gramo de tejido fresco.

### **Cruzamientos entre plantas de *N. tabacum* que expresan el amplicón PVX-2aA y plantas de *N. tabacum* que expresan la proteína supresora 15K**

Si bien la planta transformada con la construcción pZP-PVX-2aA expresa satisfactoriamente el epítotope de interés, luego de aproximadamente 4 meses, el desencadenamiento de la respuesta de PTGS provoca una disminución de los niveles de acumulación de dicho epítotope. Procurando superar esta restricción, hacia la finalización de este trabajo de Tesis se efectuaron cruzamientos entre la línea 15K-6 que expresa la proteína supresora y la línea PVX-2aA que expresa el amplicón. La línea PVX2aA fue utilizada como polinizadora y la línea 15K fue utilizada como receptora. Los resultados de estos cruzamientos no pudieron ser evaluados al momento de finalizar este trabajo.

### Discusión III

En el capítulo anterior se demostró que 15K es un supresor eficiente del PTGS a nivel sistémico, y que su actividad a nivel local, aunque detectable, es menos eficaz. Los ensayos que condujeron a esta conclusión fueron realizados midiendo la expresión del transgén reportero *gfp* (como parámetro de silenciamiento/supresión), mediante ensayos de *Northern* y *Western blot*. En los mismos, la actividad supresora a nivel local de la proteína 15K sólo pudo evidenciarse al evaluar el nivel de proteína, mediante ensayos de *Western blot* y por observación de la fluorescencia de GFP bajo luz UV, y no por el nivel de los transcriptos correspondientes. Este hecho sugirió que la proteína 15K no actuaría suprimiendo la degradación de ARNm, sino evitando la inhibición de la traducción.

En los ensayos descritos en la Figura 37, 15K favorece la expresión de un amplicón viral a nivel local. Mientras que la expresión transitoria de PVX-2aA permitiría producir aproximadamente 0,5 mg de proteína CP fusionada al epítotope A por gramo de tejido fresco a los 5 d.p.i., la co-expresión del amplicón con la proteína 15K eleva estos niveles a 2,7 mg por gramo de tejido fresco. Estos resultados se obtuvieron analizando los niveles de expresión de proteínas virales y de interés, y estarían indicando que 15K facilita la expresión del amplicón viral basado en PVX. En este caso, y a diferencia de los resultados obtenidos al agroinfiltrar plantas con un transgén (Capítulo II), la actividad supresora de la proteína 15K a nivel local resultó muy evidente.

Una posible explicación que justifique esta observación podría basarse en que 15K podría tener un efecto sinérgico con la actividad del amplicón PVX, ya que el mismo codifica una proteína supresora del PTGS, TGBp1 (Voinnet *et al.*, 2000). De hecho, es posible observar que la co-expresión de la proteína 15K con un amplicón viral (Figura 37.A, B, y C) aumenta los niveles de expresión del mismo de una manera proporcionalmente mayor al aumento que se produce al co-expresarla con el transgén *gfp* (Figura 23.C).

Las vías mediante las cuales las plantas provocan el silenciamiento de secuencias virales o de transgenes son diferentes, pero sin embargo comparten algunos de sus componentes principales. Por lo tanto, otra posible explicación sobre las diferencias observadas en los ensayos antes mencionados, radicaría en que 15K actuaría a distintos niveles según la vía que estuviese involucrada (silenciamiento de secuencias virales o silenciamiento de transgenes).

Por otra parte, se evaluó la expresión del amplicón inducible pX6-PVX-2aA mediante ensayos de agroinfiltración. En este caso, sólo se observaron proteínas virales y el epítipo A del FMDV en las plantas tratadas con  $\beta$ -estradiol como agente inductor. Un resultado similar pudo establecerse en dos especies hospedadoras distintas: *N. benthamiana* y *N. tabacum*. Este sistema inducible podría ser evaluado también en líneas celulares, ya que existen antecedentes exitosos de este tipo en los cuales se utilizó un amplicón viral inducible basado en TMV (Dohi *et al.*, 2006).

En todos los casos, en los ensayos de *Western blot* realizados a partir de extractos de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones de interés (Figura 37.A, B y C; Figura 39.A) fue posible observar una banda mayoritaria correspondiente a la CP de PVX fusionada con el epítipo A. Además, se detectó una banda minoritaria correspondiente a la CP de PVX libre. Como se mencionó anteriormente, esto se debe a que el sitio 2a no induce el “salto” de los ribosomas de forma 100% eficiente. Esta proporción se vio invertida en el caso de las agroinfiltraciones realizadas en *N. tabacum* (Figura 39.B), así como también en la línea transformada de manera estable (Figura 40.B). En estos casos, la proporción de CP libre resultó mayoritaria en comparación con la CP fusionada al epítipo A. Posiblemente estas diferencias se deban a respuestas desiguales entre las plantas hospedadora (*N. benthamiana* versus *N. tabacum*) frente a la expresión del amplicón utilizado. Howard *et al.* (2004) realizaron estudios sobre el transporte de TGBp1 y CP de PVX a través del plasmodesmo en varias especies vegetales. Concluyeron que las plantas de *N. benthamiana* tienen una habilidad única para promover el movimiento de proteínas de una célula a otra. Tomando en cuenta estos hallazgos, y el hecho de que la presencia del la CP de PVX libre es un requisito indispensable para el movimiento y la replicación de PVX, podríamos suponer que la CP libre en hospedadores como *N. tabacum* es un requisito de mayor importancia para la replicación y movilización de PVX que en *N. benthamiana*. Esta hipótesis podría

explicar por qué, en el entorno de *N. tabacum* el sitio 2a induce una mayor acumulación de la CP, mientras que en el de *N. benthamiana*, un hospedador menos restrictivo, esta acumulación sería menor.

Además, se obtuvo una línea de *N. tabacum* transformada con pZP-PVX-2aA. Esta línea expresa niveles de proteína de fusión CP-2aA cercanos 0,95 mg/g de tejido fresco, comparables con otros métodos de expresión presentes en la bibliografía. Cabe remarcar que este es el primer caso de una planta que expresa establemente un epítipo de interés a partir de un amplicón basado en PVX. Sin embargo, luego de aproximadamente 4 meses, se observaron efectos atribuibles a una respuesta de PTGS y la planta dejó de mostrar síntomas de infección. En estas condiciones, no se detectó la presencia de proteínas transgénicas.

En la bibliografía no se encontraron muchos desarrollos de este tipo que hayan resultado exitosos. En muchos casos, los efectos fenotípicos originados por la expresión de proteínas supresoras del PTGS, tales como el enanismo, limitan la aplicabilidad de este método debido a la escasa biomasa obtenida. Sin embargo, Mallory *et al.* (2002) obtuvieron plantas transgénicas de tabaco que co-expresaban una proteína supresora del PTGS junto con un amplicón basado en el genoma de PVX. Las plantas transgénicas fueron obtenidas mediante el cruzamiento de una línea que expresaba una versión mutante de la proteína HC-Pro del *Tobacco Etch Virus*, la línea TEV-B, con una línea que contenía un amplicón basado en PVX con la secuencia de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). Las mismas expresaron altos niveles de la proteína GUS en sus hojas, sin que las plantas mostrasen síntomas virales ni fenotipos aberrantes. Dicho sistema, denominado “*Amplicon-plus*”, está protegido bajo patentamiento y, sorprendentemente, no se publicaron resultados adicionales sobre esta línea de trabajo a lo largo de varios años.

Durante el desarrollo de esta Tesis, Azhakanandam *et al.* (2007) expresaron de forma transitoria la proteína L1 del *Canine Oral Papillomavirus* (COPV L1) mediante la infección de plantas de tabaco de la línea TEV-B con un amplicón basado en PVX que contenía el gen que codifica L1. En este caso la proteína de interés se fusionó a una señal de localización para dirigirla hacia el cloroplasto y evitar su degradación en el citoplasma. Además, desarrollaron un sistema de *agrospray* para la inoculación

simultánea de un alto número de plantas con *Agrobacterium*. El sistema se denominó “*Amplicon-plus Targetting Technology*”.

En los ensayos de co-agroinfiltración con PVX-2aA y 15K presentados en este trabajo (Figura 37), se obtuvieron niveles de expresión de la proteína CP fusionada al epítotope A de 2,7 mg/g tejido fresco. Estos niveles superan a los obtenidos en plantas que expresan el amplicón de manera estable (2,7 mg/g tejido fresco versus 0,95 mg/g tejido fresco). En este contexto, y combinando las distintas mejoras tecnológicas que fueron surgiendo durante el desarrollo de esta Tesis, como por ejemplo la aplicación de agrobacterias a gran escala mediante *agrospray*, resultaría posible utilizar la proteína 15K en sistemas producción de proteínas de interés.

Los sistemas de expresión transitoria como los descritos en este trabajo resultan sumamente útiles, no sólo para la producción de proteínas de interés farmacéutico en forma rutinaria, sino también frente a requerimientos sanitarios urgentes, tales como brotes epidémicos, dado que en pocos días podrían obtenerse grandes cantidades de la proteína de interés para su utilización como fuente de producción de vacunas.

Dado que la proteína 15K resulta efectiva para la supresión del PTGS inducido por amplicones basados en PVX, se planteó utilizar plantas transformadas con la proteína 15K como base para la producción de proteínas fusionadas a la CP viral obteniéndose niveles mayores a los que se obtendrían mediante sistemas alternativos. Una ventaja considerable de un sistema de expresión basado en la proteína 15K radica en el fenotipo predominantemente normal que presentan las plantas transformadas con dicha proteína, lo que permitiría obtener cantidades de biomasa mucho mayores que en los casos descritos con otros amplicones. Además, a diferencia de los desarrollos mencionados, su uso no estaría restringido a condiciones de licenciamiento existentes. De hecho, al contener varios componentes novedosos, el sistema desarrollado en esta Tesis podría ser patentado para la producción de proteínas de interés.

Para consolidar los resultados expuestos, hacia la finalización de este trabajo de Tesis se obtuvieron semillas provenientes del cruzamiento entre una línea 15K que expresa la proteína supresora y la línea PVX-2aA que expresa el amplicón. Si bien los resultados de este cruzamiento no pudieron ser aún evaluados, podrían obtenerse niveles

de expresión comparables a los observados en los ensayos de expresión transitoria con el amplicón PVX-2aA y 15K. Este análisis se efectuará en el marco de la continuidad de esta línea de trabajo por otros miembros del laboratorio.

## **Referencias**

1. **Adams MJ, Antoniw JF, Bar-Joseph MA, Brunt A, Candresse T, Foster GD, Martelli GP, Milne RG and Fauquet CM** (2004). The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Arch Virol* 149: 1045–1060.
2. **Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, Vance VB** (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13079–13084.
3. **Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, Herr JM Jr, Mau C, Mallory A, Pruss G, Bowman L, Vance VB** (2000). A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 290: 142–144.
4. **Angell SM, Baulcombe DC** (1997). Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating *Potato virus X* RNA. *EMBO Journal* 16, 3675–3684.
5. **Azhakanandam K, Weissinger SM, Nicholson JS, Qu R, Weissinger AK** (2007). Amplicon-plus targeting technology (APTT) for rapid production of a highly unstable vaccine protein in tobacco plants. *Plant Molecular Biology* 64, 619.
6. **Basaran P, Rodríguez-Cerezo E** (2008). Plant molecular farming: opportunities and challenges. *Crit Rev Biotechnol.* 28(3):153-72.
7. **Baulcombe D** (1999). Viruses and gene silencing in plants. *Arch Virol Suppl.* 15:189-201.
8. **Baulcombe D** (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431:356–63.
9. **Baumberger N, Baulcombe DC** (2005). *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 16;102(33):11928-33.
10. **Beclin C, Boutet S, Waterhouse P, Vaucheret H** (2002). A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Curr. Biol.* 12:684–88.
11. **Belanger H, Fleysh N, Cox S, Bartman G, Deka D, Trudel M, Koprowski H, Yusibov V** (2000). *Human respiratory syncytial virus* vaccine antigen produced in plants. *FASEB Journal* 14, 2323-2328.
12. **Bendahmaney A, Farnham G, Moffett P, Baulcombe DC** (2002). Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site–leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato. *The Plant Journal* 32, 195–204.
13. **Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ** (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 18;409(6818):363-6.
14. **Bey P, Binaghi M, Mentaberry AN, Zelada AM** (2010). Plant viral vectors as a tool for recombinant vaccine production. *The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology*, GSB Journals, aceptado para su publicación.
15. **Bisaro DM** (2006). Silencing suppression by *geminivirus* proteins. *Virology* 344: 158–168.
16. **Blevins T, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, Beknazariants D, Si-Ammour A, Park HS, Vazquez F, Robertson D, Meins F Jr, Hohn T, Pooggin MM** (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res* 34: 6233–6246.
17. **Bohmert K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M, Benning C** (1998). AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J.* 2;17(1):170-80.



- 18. Borovsky D, Rabindran S, Dawson WO, Powell CA, Iannotti DA, Morris TJ, Shabanowitz J, Hunt DF, DeBondt HL, DeLoof A (2006).** Expression of *Aedes* trypsin-modulating oostatic factor on the virion of TMV: A potential larvicide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103, 18963-18968.
- 19. Bouche N, Laouressergues D, Gascioli V, Vaucheret H (2006).** An antagonistic function for *Arabidopsis* DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *Embo J* 25: 3347-3356.
- 20. Bravo-Almonacid, F & Mentaberry, A (1989).** Nucleotide cDNA sequence coding for the PVYo coat protein. *Nucleic Acids Research*, 17: 4401.
- 21. Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC (1998).** Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J*. 16;17(22):6739-46.
- 22. Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto Y, Sieburth L, Voinnet O (2008).** Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320, 1185.
- 23. Brodzik R, Bandurska K, Deka D, Golovkin M, Koprowski H (2005).** Advances in *Alfalfa mosaic virus*-mediated expression of anthrax antigen in planta. *Biochem Biophys Res Commun*. 16;338(2):717-22.
- 24. Calamante, G (1998).** Tesis doctoral: Utilización del virus x de la papa como vector de expresión transitoria en plantas. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI) FCEyN, UBA CONICET.
- 25. 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.
- 26. Cerovská N, Hoffmeisterová H, Pecenková T, Moravec T, Synková H, Plchová H, Velemínský J (2008).** Transient expression of HPV16 E7 peptide (aa 44-60) and HPV16 L2 peptide (aa 108-120) on chimeric potyvirus-like particles using *Potato virus X*-based vector. *Protein Expression and Purification* 58, 154-161.
- 27. Chadd H, & Chamow S (2001).** Therapeutic antibody expression technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 12:188-194.
- 28. Chapman EJ, Prokhnevsky AI, Gopinath K, Dolja VV, Carrington JC (2004).** Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes & Development* 18, 1179-1186.
- 29. Chen J, Zheng HY, Antoniw JF, Adams MJ, Chen JP, and Lin L (2004).** Detection and classification of allexiviruses from garlic in China. *Arch Virol* 149: 435-445.
- 30. Chichester JA, Musiychuk K, de la Rosa P, Horsey A, Stevenson N, Ugulava N, Rabindran S, Palmer GA, Mett V, Yusibov V (2007).** Immunogenicity of a subunit vaccine against *Bacillus anthracis*. *Vaccine* 25,3111-3114.

- 31. Chichester JA, Musiychuk K, Farrance CE, Mett V, Lyons J, Mett V, Yusibov V (2009).** A single component two-valent LcrV-F1 vaccine protects non-human primates against pneumonic plague. *Vaccine* 27(25-26):3471-4. Epub 2009 Feb 5.
- 32. Clemente M, Curilovic R, Sassone A, Zelada A, Angel SO, Mentaberry AN (2005).** Production of the main surface antigen of *Toxoplasma gondii* in tobacco leaves and analysis of its antigenicity and immunogenicity. *Molecular Biotechnology* 30, 41-50.
- 33. Cruz SS, Chapman S, Roberts AG, Roberts IM, Prior DA, Oparka KJ (1996).** Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(13):6286-90.
- 34. Daniell, H, Streatfield, S & Wycoff, K (2001).** Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, 6: 219-226.
- 35. de Felipe P, Luke GA, Hughes LE, Gani D, Halpin C, Ryan MD (2006).** E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein. *Trends Biotechnol.* 24(2):68-75.
- 36. Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O (2006).** Hierarchical action and inhibition of plant dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313: 68–71.
- 37. Diaz-Pendon JA, Li F, Li WX, Ding SW (2007).** Suppression of antiviral silencing by *Cucumber mosaic virus* 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* 19: 2053–2063.
- 38. Ding SW (2000).** RNA silencing. *Curr Opin Biotechnol* 11(2):152-6.
- 39. Dohi K, Nishikiori M, Tamai A, Ishikawa M, Meshi T, Mori M (2006).** Inducible virus-mediated expression of a foreign protein in suspension-cultured plant cells. *Archives of Virology* 6, 1075-1084.
- 40. Donnelly ML, Luke G, Mehrotra A, Li X, Hughes LE, Gani D, Ryan MD (2001).** Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *Journal of General Virology* 82, 1013-1025.
- 41. Dorokhov YL, Sheveleva AA, Frolova OY, Komarova TV, Zvereva AS, Ivanov PA, Atabekov JG (2007).** Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves. *Tuberculosis (Edinb)* 87(3):218-24. Epub 2006 Dec 19.
- 42. Dunoyer P, Himber C, Voinnet O (2005).** DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat Genet* 37: 1356–1360.
- 43. Dunoyer P, Lecellier CH, Parizotto EA, Himber C, Voinnet O (2004).** Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16, 1235-1250.
- 44. Durrani Z, McInerney TL, McLain L, Jones T, Bellaby T, Brennan FR, Dimmock NJ (1998).** Intranasal immunization with a plant virus expressing a peptide from HIV-1 gp41 stimulates better mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization. *Journal of Immunology Methods* 220, 93-103.

- 45. 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.
- 46. Evangelista R, Kusnadi A, Howard J & Nikolov Z** (1998). Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant  $\beta$ -glucuronidase from transgenic corn. *Biotechnology Progress*, 14: 607-614.
- 47. Ferraro G, Becher ML, Angel SO, Zelada A, Mentaberry AN, Clemente M** (2008). Efficient expression of a *Toxoplasma gondii* dense granule Gra4 antigen in tobacco leaves. *Experimental Parasitology* 120, 118-22.
- 48. Finnegan EJ, Margis R, Waterhouse PM** (2003). Posttranscriptional gene silencing is not compromised in the *Arabidopsis* CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) mutant, a homolog of Dicer-1 from *Drosophila*. *Curr Biol.* 4;13(3):236-40.
- 49. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 19;391(6669):806-11.
- 50. 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.
- 51. Franconi R, Di Bonito P, Dibello F, Accardi L, Muller A, Cirilli A, Simeone P, Donà MG, Venuti A, Giorgi C** (2002). Plant-derived *Human papilloma virus* 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection. *Cancer Research* 62, 3654-3658.
- 52. Funston GM, Kallioinen SE, de Felipe P, Ryan MD, Iggo RD** (2008). Expression of heterologous genes in oncolytic adenoviruses using picornaviral 2A sequences that trigger ribosome skipping. *J Gen Virol.* 89(Pt 2):389-96.
- 53. Fusaro AF, Matthew L, Smith NA, Curtin SJ, Dedic-Hagan J, Ellacott GA, Watson JM, Wang MB, Brosnan C, Carroll BJ, Waterhouse PM** (2006). RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO Rep* 7: 1168–1175.
- 54. Fütterer J, Bonneville JM and Hohn T** (1989). *Cauliflower mosaic virus* as a gene expression vector for plants. *Physiologia Plantarum* 79, 154-157.
- 55. Gascioli V, Mallory AC, Bartel DP, Vaucheret H** (2005). Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr Biol* 15: 1494–1500.
- 56. Gazzani S, Lawrenson T, Woodward C, Headon D, Sablowski R** (2004). A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* 306:1046–48.
- 57. 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.
- 58. Giddings G** (2001). Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*, 12:450-454.
- 59. Giddings G, Allison G, Brooks D & Carter A** (2000). Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*, 18: 1151-1155.

- 60. Gilleland HE, Gilleland LB, Staczek J, Harty RN, García-Sastre A, Palese P, Brennan FR, Hamilton WD, Bendahmane M, Beachy RN** (2000). Chimeric animal and plant viruses expressing epitopes of outer membrane protein F as a combined vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 27, 291-297.
- 61. Gitlin L, Andino R** (2003). Nucleic acid-based immune system: the antiviral potential of mammalian RNA silencing. *J Virol.* 77(13):7159-65.
- 62. Glazov E, Phillips K, Budziszewski GJ, Schöb H, Meins FJ, Levin JZ** (2003). A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for posttranscriptional silencing in *Arabidopsis*. *Plant J.* 35:342-49.
- 63. Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S** (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 18:134-141.
- 64. Golden TA, Schauer SE, Lang JD, Pien S, Mushegian AR, Grossniklaus U, Meinke DW, Ray A** (2002). SHORT INTEGUMENTS1/SUSPENSOR1/CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, is a maternal effect gene required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130(2):808-22.
- 65. Golovkin M, Spitsin S, Andrianov V, Smirnov Y, Xiao Y, Pogrebnyak N, Markley K, Brodzik R, Gleba Y, Isaacs SN, Koprowski H** (2007). Smallpox subunit vaccine produced in *Planta* confers protection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17;104(16):6864-9. Epub 2007 Apr 11.
- 66. Guo HS, Fei JF, Xie Q, Chua NH** (2003). A chemical-regulated inducible RNAi system in plants. *Plant Journal* 34, 383-392.
- 67. Hamilton AJ, Baulcombe DC** (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 29;286(5441):950-2.
- 68. Haq T, Mason H, Clements J & Arntzen C** (1995). Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268: 714-716
- 69. Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S** (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2122-2127.
- 70. Humber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O** (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.* 22:4523-33.
- 71. Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, & Fraley RT** (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- 72. Howard AR, Heppler ML, Ju HJ, Krishnamurthy K, Payton ME, Verchot-Lubicz J** (2004). Potato virus X TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves. *Virology.* 328(2):185-97.
- 73. <http://www.thepoultrysite.com/poultrynews/8909/vaccine-to-be-made-in-biotech-plant-cells>**
- 74. Jacobsen SE, Running MP, Meyerowitz EM** (1999). Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* 126(23):5231-43.

- 75. Karasev AV, Foulke S, Wellens C, Rich A, Shon KJ, Zwierzynski I, Hone D, Koprowski H, Reitz M** (2005). Plant based HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach. *Vaccine* 23, 1875-80.
- 76. Karimi M, Inze D, Depicker A** (2002). Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* (5): 193-195.
- 77. Kasschau KD, Carrington JC** (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95:461–470
- 78. Kennerdell JR, Carthew RW** (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 23;95(7):1017-26.
- 79. 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.
- 80. Komarova TV, Skulachev MV, Zvereva AS, Schwartz AM, Dorokhov YL, Atabekov JG** (2006). New viral vector for efficient production of target proteins in plants. *Biochemistry (Mosc)* 71, 846-850.
- 81. Korban SS, Krasnyanski SF, Buetow DE** (2002). Foods as production and delivery vehicles for human vaccines. *J Am Coll Nutr.* 21(3 Suppl):212S-217S.
- 82. 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.
- 83. Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja VV, Calvino LF, Lopez-Moya JJ, Burgyan J** (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 25: 2768–2780.
- 84. Larrick J & Thomas D** (2001). Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 411-418.
- 85. Li F & Ding SW** (2006). Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol* 60:503–531.
- 86. Li H, Li WX, Ding SW** (2002). Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 17;296(5571):1319-21.
- 87. Li HW, Ding SW** (2005). Antiviral silencing in animals. *FEBS Lett.* 31;579(26):5965-73.
- 88. Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X** (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 39-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 15: 1501–1507.
- 89. Lichner Z, Silhavy D, Burgyán** (2003). Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. *Journal of General Virology*, 84: 975–980.
- 90. Lico C, Capuano F, Renzone G, Donini M, Marusic C, Scaloni A, Benvenuto E, Baschieri S** (2006). Peptide display on Potato virus X: molecular features of the coat protein-fused peptide affecting cell-to-cell and phloem movement of chimeric virus particles. *Journal of General Virology* 87, 3103-3112.

- 91. Lico C, Mancini C, Italiani P, Betti C, Boraschi D, Benvenuto E, Baschieri S** (2009). Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8+ T cells in mice. *Vaccine* 27(37):5069-76.
- 92. Lindbo JA** (2007). High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible *Tobacco mosaic virus* expression vectors. *BMC Biotechnology* 7:52.
- 93. Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM, Dougherty WG** (1993). Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *Plant Cell* 5(12):1749-1759.
- 94. Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC** (2003). Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 30, 296-303.
- 95. Ma J, Drake P, & Christou P** (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics* 4: 794-805.
- 96. Malcuit I, de Jong W, Baulcombe DC, Shields DC, Kavanagh TA** (2000). Acquisition of multiple virulence/avirulence determinants by potato virus X (PVX) has occurred through convergent evolution rather than through recombination. *Virus Genes* 20(2):165-72.
- 97. Mallory AC, Parks G, Endres MW, Baulcombe D, Bowman LH, Pruss GJ, Vance VB** (2002b). The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants. *Nat Biotechnol* 20(6):622-5.
- 98. Mallory AC, Reinhart BJ, Bartel D, Vance VB, Bowman LH** (2002a). A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 12;99(23):15228-33.
- 99. Marconi G, Albertini E, Barone P, De Marchis F, Lico C, Marusic C, Rutili D, Veronesi F, Porceddu A** (2006). *In-planta* production of two peptides of the *Classical Swine Fever Virus* (CSFV) E2 glycoprotein fused to the coat protein of Potato virus X. *BMC Biotechnology* 6, 29.
- 100. Margis R, Fusaro AF, Smith NA, Curtin SJ, Watson JM, Finnegan EJ, Waterhouse PM** (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Lett* 1;580(10):2442-50.
- 101. Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y** (2005). Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology* 23, 718-723.
- 102. Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, Mancini C, Spada M, Belardelli F, Benvenuto E, Capone I** (2001). Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against *Human immunodeficiency virus type 1*. *Journal of Virology* 75, 8434-8439.
- 103. 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5335-5340.
- 104. 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.
- 105. Mason H., Man-Kit Lam D & Arntzen C** (1992). Expression of *Hepatitis B* surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11745-11749.

- 106. Massa S, Franconi R, Brandi R, Muller A, Mett V, Yusibov V, Venuti A** (2007). Anti-cancer activity of plant-produced HPV16 E7 vaccine. *Vaccine*. 25(16):3018-21. Epub 2007 Jan 19.
- 107. McCormick AA, Corbo TA, Wykoff-Clary S, Nguyen LV, Smith ML, Palmer KE, Pogue GP** (2006a). TMV-peptide fusion vaccines induce cell-mediated immune responses and tumor protection in two murine models. *Vaccine* 24, 6414-6423.
- 108. McCormick AA, Corbo TA, Wykoff-Clary S, Palmer KE, Pogue GP** (2006b). Chemical conjugate TMV-peptide bivalent fusion vaccines improve cellular immunity and tumor protection. *Bioconjugate Chemistry* 17, 1330-1338.
- 109. Mechtcheriakova IA, Eldarov MA, Nicholson L, Shanks M, Skryabin KG, Lomonosoff GP** (2006). The use of viral vectors to produce *Hepatitis B virus* core particles in plants. *J Virol Methods* 131(1):10-5.
- 110. Meins F Jr** (2000). RNA degradation and models for posttranscriptional gene silencing. *Plant Mol. Biol.* 43:261-73.
- 111. Meins F Jr, Si-Ammour A, Blevins T** (2005). RNA silencing systems and their relevance to plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:297-318.
- 112. Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D** (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* 80: 5747-5756.
- 113. Mett V, Lyons J, Musychuk K, Chichester JA, Brasil T, Couch R, Sherwood R, Palmer GA, Streatfield SJ, Yusibov V** (2007). A plant-produced plague vaccine candidate confers protection to monkeys. *Vaccine*.25, 3014-3017.
- 114. Meyer P & Saedler H** (1996). Homology-dependent Gene Silencing in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:23-48.
- 115. Mlotshwa S, Pruss GJ, Peragine A, Endres MW, Li J, Chen X, Poethig RS, Bowman LH, Vance V** (2008). DICER-LIKE2 Plays a Primary Role in Transitive Silencing of Transgenes in *Arabidopsis*. *PLoS One.* 12;3(3):e1755.
- 116. Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu Z, Steplewsky K, Hooper D, Koprowsky H & Yusinov V** (1998). Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2481-2485.
- 117. Moissiard G & Voinnet O** (2006). RNA silencing of host transcripts by *Cauliflower mosaic virus* requires coordinated action of the four *Arabidopsis* Dicer-like proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19593-19598.
- 118. Moissiard G, Parizotto EA, Himber C, Voinnet O** (2007). Transitivity in *Arabidopsis* can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral encoded suppressor proteins. *RNA* 13: 1268-1278.
- 119. Monger W, Alamillo JM, Sola I, Perrin Y, Bestagno M, Burrone OR, Sabella P, Planaduran J, Enjuanes L, Garcia JA, Lomonosoff GP** (2006). An antibody derivative expressed from viral vectors passively immunizes pigs against *Transmissible gastroenteritis virus* infection when supplied orally in crude plant extracts. *Plant Biotechnology Journal* 4, 623-631.

- 120. Mor T, Gomez-Lim M & Palmer K** (1998). Perspective: edible vaccines a concept coming of age. *Trends in Microbiology* 6: 449-453.
- 121. Morgenfeld M, Segretin ME, Wirth S, Lentz E, Zelada A, Mentaberry A, Gissmann L, Bravo-Almonacid F** (2010). Potato virus X coat protein fusion to human papillomavirus 16 E7 oncoprotein enhance antigen stability and accumulation in tobacco chloroplast. *Mol Biotechnol.* 43(3):243-9.
- 122. Muangsan N, Beclin C, Vaucheret H, Robertson D** (2004). Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants. *Plant J.* 38:1004–14.
- 123. Murashige T & Skoog F** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 431.
- 124. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R** (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2(4):279-289.
- 125. Natilla A, Hammond RW, Nemchinov LG** (2006). Epitope presentation system based on cucumber mosaic virus coat protein expressed from a Potato virus X-based vector. *Archives of Virology* 151, 1373-1386.
- 126. Nemchinov LG, Natilla A** (2007). Transient expression of the ectodomain of matrix protein 2 (M2e) of Avian influenza A virus in plants. *Protein Expression and Purification* 56, 153-159.
- 127. Nemchinov LG, Liang TJ, Rifaat MM, Mazyad HM, Hadidi A, Keith JM** (2000). Development of a plant-derived subunit vaccine candidate against Hepatitis C virus. *Archives Virology* 2000, 145, 2557-2573.
- 128. Ngô H, Tschudi C, Gull K, Ullu E** (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 8;95(25):14687-92.
- 129. Obbard DJ, Gordon KH, Buck AH, Jiggins FM** (2009). The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 12;364(1513):99-115.
- 130. O'Brien GJ, Bryant CJ, Voogd C, Greenberg HB, Gardner RC, Bellamy AR** (2000). Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into virus-like particles. *Virology* 270, 444-453
- 131. Omarov RT, Ciomperlik JJ, Scholthof HB** (2007). RNAi-associated ssRNA specific ribonucleases in *Tombusvirus* P19 mutant-infected plants and evidence for a discrete siRNA-containing effector complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1714–1719.
- 132. Orman BE, Celnik RM, Mandel MA, Torres HN, Mentaberry AN** (1991). Complete nucleotide sequence of a Latin-American isolate of *Potato virus X*. *Virus Res.* 19(2-3):236.
- 133. Pan L, Zhang Y, Wang Y, Wang B, Wang W, Fang Y, Jiang S, Lv J, Wang W, Sun Y, Xie Q** (2008). Foliar extracts from transgenic tomato plants expressing the structural polyprotein, P1-2A, and protease, 3C, from *Foot-and-mouth disease virus* elicit a protective response in guinea pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 15;121(1-2):83-90.



- 134. Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X** (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 3; 12(17):1484-95.
- 135. Pérez Filgueira DM, Zamorano PI, Domínguez MG, Taboga O, Del Médico Zajac MP, Puntel M, Romera SA, Morris TJ, Borca MV, Sadir AM** (2003). Bovine herpes virus gD protein produced in plants using a recombinant Tobacco mosaic virus (TMV) vector possesses authentic antigenicity. *Vaccine* 21, 4201-4209.
- 136. Pérez-Filgueira DM, Brayfield BP, Phiri S, Borca MV, Wood C, Morris TJ** (2004a). Preserved antigenicity of HIV-1 p24 produced and purified in high yields from plants inoculated with a tobacco mosaic virus (TMV)-derived vector. *Journal of Virology Methods* 121, 201-208.
- 137. Pujol M., Ramírez NI, Ayala M, Gavilondo JV, Valdés R, Rodríguez M, Brito J, Padilla S, Gomez L, Reyes B, Peral R, Perez M, Marcelo JL, Mila L, Sanchez RF, Rolando P, Cremata JA, Enriquez G, Mendoza O, Ortega M, Borroto C** (2005). An integral approach towards a practical application for a plant-made monoclonal antibody in vaccine purification. *Vaccine* 23: 1833–1837.
- 138. Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP** (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16: 1616–1626.
- 139. Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC** (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10, 937-946.
- 140. Ryan MD and Drew J** (1994). Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J.* 13(4):928-33.
- 141. Saejung W, Fujiyama K, Takasaki T, Ito M, Hori K, Malasit P, Watanabe Y, Kurane I, Seki T** (2007). Production of dengue 2 envelope domain III in plant using TMV-based vector system. *Vaccine* 25, 6646-6654.
- 142. 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.
- 143. Sambrook, J, Fritsch, E, & Maniatis, T** (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edition. Ed: Nolan, C. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 144. Sanchez-Navarro J, Miglino R, Ragozzino A, Bol JF** (2001). Engineering of *Alfalfa mosaic virus* RNA 3 into an expression vector. *Arch Virol.* 146(5):923-39.
- 145. Santa Cruz S, Chapman S, Roberts AG, Roberts IM, Prior DAM and Oparka JK** (1996). Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 6286-6290.
- 146. Santi L, Giritch A, Roy CJ, Marillonnet S, Klimyuk V, Gleba Y, Webb R, Arntzen CJ, Mason HS** (2006). Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis* antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 861-866.
- 147. Saumet A, Lecellier CH** (2006). Anti-viral RNA silencing: do we look like plants? *Retrovirology* 12;3:3.

- 148. Scholthof HB** (2005). Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends Plant Sci* 10: 376–382.
- 149. Scholthof HB** (2007). Heterologous expression of viral RNA interference suppressors: RISC management. *Plant Physiology* 145, 1110-1117.
- 150. Senshu H, Ozeki J, Komatsu K, Hashimoto M, Hatada K, Aoyama M, Kagiwada S, Yamaji Y, Namba S** (2009). Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection. *J Gen Virol.* 90(Pt 4):1014-24.
- 151. Shoji Y, Chichester JA, Bi H, Musiychuk K, de la Rosa P, Goldschmidt L, Horsey A, Ugulava N, Palmer GA, Mett V, Yusibov V** (2008). Plant-expressed HA as a seasonal influenza vaccine candidate. *Vaccine* 26, 2930-2934.
- 152. Shoji Y, Bi H, Musiychuk K, Rhee A, Horsey A, Roy G, Green B, Shamloul M, Farrance CE, Taggart B, Mytle N, Ugulava N, Rabindran S, Mett V, Chichester JA, Yusibov V** (2009). Plant-derived hemagglutinin protects ferrets against challenge infection with the A/Indonesia/05/05 strain of avian influenza. *Vaccine* 27, 1087-1092.
- 153. Siddiqui SA, Sarmiento C, Truve E, Lehto H, Lehto K** (2008). Phenotypes and functional effects caused by various viral RNA silencing suppressors in transgenic *Nicotiana benthamiana* and *N. tabacum*. *Mol Plant Microbe Interact* 21(2):178-87.
- 154. Silhavy D, Molnár A, Lucioli A, Szittyá G, Hornyik1 C, Tavazza M, Burgyán J** (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *The EMBO Journal*, 21(12): 3070-3080.
- 155. Smith M & Glick B** (2000). The Production of antibodies in plants: An idea whose time has come? *Biotechnology Advances*, 18: 85-89.
- 156. Smith ML, Lindbo JA, Dillard-Telm S, Brosio PM, Lasnik AB, McCormick AA, Nguyen LV, Palmer KE** (2006). Modified Tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications. *Virology* 348, 475-488.
- 157. Staczek J, Bendahmane M, Gilleland LB, Beachy RN, Gilleland HE Jr** (2000). Immunization with a chimeric tobacco mosaic virus containing an epitope of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* provides protection against challenge with *P. aeruginosa*. *Vaccine* 18(21):2266-74.
- 158. Stiefel E** (2003). Tesis de licenciatura: Expresión de antígenos de fiebre aftosa en amplicones virales basados en el virus X de la papa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad de Belgrano. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, INGEBI-CONICET.
- 159. Sugiyama Y, Hamamoto H, Takemoto S, Watanabe Y, Okada Y** (1995). Systemic production of foreign peptides on the particle surface of tobacco mosaic virus. *FEBS Letters* 359, 247-250.
- 160. Streatfield SJ, Howard JÁ** (2003). Plant production systems for vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2(6):763-75.

- 161. Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC** (1999). The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 15;99(2):123-32.
- 162. Tacket CO** (2005). Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. *Vaccine* 7;23(15):1866-9.
- 163. Takeda A, Sugiyama K, Nagano H, Mori M, Kaido M, Mise K, Tsuda S, Okuno T** (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Lett.* 4;532(1-2):75-9.
- 164. Takeda A, Tsukuda M, Mizumoto H, Okamoto K, Kaido M, Mise K, Okuno T** (2005). A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO J* 24: 3147–3157.
- 165. Tang G, Reinhard BJ, Bartel DP, Zamore PD** (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* 17:49–63.
- 166. Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason H & Arntzen C** (1995). Immunogenicity of transgenic plant-derived *Hepatitis B* surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3358-3361.
- 167. Turpen TH, Reinf SJ, Charoenvit Y, Hoffman SL, Fallarme V, Grill LK** (1995). Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Biotechnology* 13, 53-57.
- 168. Twyman RM, Schillberg S, Fischer R** (2005). The transgenic plant market in the pharmaceutical industry. *Expert Opinion on Emerging Drugs* 10,185–218.
- 169. 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.
- 170. Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR** (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2(4):291-9.
- 171. Vargason JM, Szittyá G, Burgyan J, Tanaka-Hall TM** (2003). Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115:799–811.
- 172. Verch T, Hooper DC, Kiyatkin A, Steplewski Z, Koprowski H** (2004). Immunization with a plant-produced colorectal cancer antigen. *Cancer Immunology Immunotherapy* 53, 92-99.
- 173. 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.
- 174. Vogler H, Akbergenov R, Shivaprasad PV, Dang V, Fasler M, Kwon MO, Zhanybekova S, Hohn T, Heinlein M** (2007). Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by *tobamovirus* replicase protein. *J Virol* 81:10379–10388.
- 175. Voinnet O** (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* 6: 206–220.
- 176. Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC** (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103, 157–167.
- 177. Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC** (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14147–14152.

- 178. Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of *Tomato bushy stunt virus*. *Plant Journal* 33, 949-956.
- 179. Walmsley A & Arntzen C** (2003). Plant cell factories and mucosal vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* 14:145-150.
- 180. Wang MB & Waterhouse PM** (2000). High-efficiency silencing of a beta-glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Mol Biol.* 43(1):67-82.
- 181. Wang XG, Zhang GH, Liu CX, Zhang YH, Xiao CZ & Fang RX** (2001). Purified cholera toxin B subunit from transgenic tobacco plants possesses authentic antigenicity. *Biotechnology and Bioengineering* 72: 490-494.
- 182. Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB** (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 10;95(23):13959-64.
- 183. Waterhouse PM, Wang M-B, Finnegan EJ** (2001). Role of short RNAs in gene silencing. *Trends Plant Sci.* 6:297–301.
- 184. Wigdorovitz A, Pérez Filgueira DM, Robertson N, Carrillo C, Sadir AM, Morris TJ, Borca MV** (1999). Protection of mice against challenge with Foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant Tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1. *Virology* 264, 85-91.
- 185. Xie Z, Allen E, Wilken A, Carrington JC** (2005). DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12984–12989.
- 186. Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC** (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* 2(5):E104.
- 187. Ye K, Malinina L, Patel D** (2003). Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 426: 874–878.
- 188. Yoshikawa M, Peragine A, Park MY, Poethig RS** (2005). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 19: 2164–2175.
- 189. 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5784-5788.
- 190. Zelada AM, Calamante G, de la Paz Santangelo M, Bigi F, Verna F, Mentaberry A, Cataldi A** (2006). Expression of tuberculosis antigen ESAT-6 in *Nicotiana tabacum* using a *Potato virus X*-based vector. *Tuberculosis* 86,263-267.
- 191. Zhang X, Yuan YR, Pei Y, Lin SS, Tuschl T, Patel DJ, Chua NH** (2006). *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* 20:3255–3268.

**192. Zuo J, Niu QW, Chua NH (2000).** An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant Journal* 24, 265–273.

**193. Zuo J, Niu QW, Møller SG, Chua NH (2001).** Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nat Biotechnol.* 19(2):157-61.