Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

# Desarrollo de un sistema de expresión plastídico para producir el antígeno E7 del papilomavirus humano en tabaco

Morgenfeld, Mauro Miguel

2012

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Morgenfeld, Mauro Miguel. (2012). Desarrollo de un sistema de expresión plastídico para producir el antígeno E7 del papilomavirus humano en tabaco. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Morgenfeld, Mauro Miguel. "Desarrollo de un sistema de expresión plastídico para producir el antígeno E7 del papilomavirus humano en tabaco". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

**Dirección:** Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

**Contacto:** digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# "Desarrollo de un sistema de expresión plastídico para producir el antígeno E7 del papilomavirus humano en tabaco"

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

**Lic. Mauro Miguel Morgenfeld**

Director de tesis: **Dr. Fernando Bravo-Almonacid**

Consejero de Estudios: Dr. Jorge Prometeo Muschietti.

Lugar de trabajo:

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular
"Dr. Héctor N. Torres" (INGEBI-CONICET)

Buenos Aires, 2012

## *Agradecimientos*

A mis compañeros del grupo PAPA con los que supimos mantener un ambiente de trabajo siempre bueno. A Euge, con la que más tiempo compartimos, desde el principio cuando me enseñaban con Sonia los vericuetos del bombardeo hasta ahora que compartimos la Comisión Interna. A Eze, a quien siempre admiré por su capacidad de trabajo y su tenacidad para superar los obstáculos más difíciles, a Fede que siendo el más joven ya se integró muy bien al grupo. A toda la diáspora PAPA: Sergio, JP, Nati F., Nati M, Paula, Flor, Mari, Silvia y todos los que soportaron mi desorden cotidiano.

A mi jefe, Fernando, gran responsable del buen clima y la confianza dentro del grupo, aún cuando hubo que atravesar circunstancias externas complicadas. Gracias por el respeto que sentí siempre, incluso cuando no necesariamente coincidías con alguna de mis actividades extracurriculares. Difícilmente hubiera podido terminar esta tesis sin tu apoyo.

A mis compañeros del IBYME-INGEBI con los que compartimos tantas cosas desde mis comienzos como estudiante en el laboratorio de fertilización de gametas: el futbol de los martes, los asados de fin de año, las comilonas con la banda de herr Doctor, los torneos de ping-pong, las cargas de nitrógeno líquido, los seminarios del mediodía, las charlas de pasillo y demás alegrías y peripecias de tantos años.

A los partícipes necesarios que colaboraron con su trabajo como Gladys, Mari, Pancho y Norma, los indispensables del lavadero; Rubén el “arregla todo”; los administrativos del INGEBI y del DFBMC, especialmente a Luis por la buena onda y a Ana por su enorme eficiencia para recordar y resolver todo lo que yo olvidaba hacer.

A mis camaradas de *conCienclaCrítica* y a todos los que desde la Comisión Interna del IBYME-INGEBI, la Asociación Gremial Docente de la FCEN, los Jóvenes Científicos Precarizados, las reuniones docentes del IBMC y las asambleas de base, nos rebelamos contra las injusticias de este sistema desafiando al *status quo* en cada petitorio, movilización, clase pública, corte de calle, toma o cualquier otra actividad donde la solidaridad colectiva se impuso al individualismo impotente.

A mi familia toda, en particular a mi abuela Elisa que con su primeros 90 ya puede mandarse la parte con su nieto doctor en la misma facultad de su hijo y a mi madre que ya no va a preguntarme más para cuando la tesis.

A Dani y Nahuel, a ELLA por lo que me aguantó todo este tiempo, a EL por lo que va a tener que aguantar. A los dos porque los quiero tanto y me hacen muy feliz cada día.

# *"Desarrollo de un sistema de expresión plastídico para producir el antígeno E7 del papilomavirus humano en tabaco"*


## *Resumen*

Durante este trabajo se obtuvieron distintas líneas de plantas de tabaco transplantómicas para el antígeno viral E7 del virus del papiloma humano (VPH). La capacidad del sistema plastídico para producir el antígeno viral fue verificada. Asimismo se comprobó que la proteólisis del péptido es el factor determinante de la expresión y principal limitante de los niveles de acumulación de la proteína recombinante. La modificación de las características intrínsecas del polipéptido mediante la fusión traduccional a otras proteínas como la cápside viral de PVX o la enzima β-glucuronidasa mostró ser una estrategia válida para reducir la tasa de degradación de E7. De esta forma se alcanzó un incremento de la expresión entre 5 y 10 veces superior a lo observado con E7 por masa de tejido. Sin embargo los mejores resultados se obtuvieron al reorientar la acumulación del antígeno viral hacia un entorno con características bioquímicas diferentes como es el lumen tilacoide. Por primera vez se logró translocar una proteína codificada por el plastoma a través de la membrana tilacoide utilizando una secuencia específica de la misma especie, la señal bipartita amino-terminal del gen OEC23 de tabaco. Los niveles de acumulación del antígeno en el tilacoide resultaron ser dos órdenes de magnitud superiores a los observados en el estroma.

Los resultados de este trabajo muestran distintos abordajes basados en la utilización de plantas de tabaco transplastómicas como biorreactores para la producción de proteínas de interés inestables como E7 del VPH.



**Palabras clave:**

-Biorreactores- Cloroplasto -Tilacoide -Transplastómica -Vacuna -E7 -Papiloma

# *"Development of a plastidic expression system for the production of Human Papillomavirus E7 antigen in tobacco"*


## *Abstract*

In this work, different lines of transplantomic tobacco plants for the viral antigen E7 of human papillomavirus (HPV) virus were obtained. The plastid system capacity to produce the viral antigen was verified. Furthermore, we found that proteolysis of this peptide is the primary determinant of the expression and main limiting factor for recombinant protein accumulation. The modification of the intrinsic characteristics of the polypeptide by translational fusion with other proteins such as PVX coat protein or the enzyme β-glucuronidase proved to be a valid strategy to reduce the rate of E7 degradation. Using this strategy an increase in the expression from 5 to 10 times that of the observed value for E7 by tissue mass was achieved. However, the best results were obtained by redirecting the viral antigen into an environment with different biochemical characteristics such as the thylakoid lumen. For the first time, we achieved the translocation of a protein encoded by the plastoma across the thylakoid membrane by using a specific sequence from the same species, the bipartite signal amino-terminal of the OEC23 gene in Tobacco. Accumulation levels of the antigen in the thylakoid were two orders of magnitude higher than those observed in the stroma.

The results of this work demonstrate different approaches based on the use of transplastomic tobacco plants as bioreactors for the production of unstable proteins of interest, such as E7 from HPV.



**Key words:**

-Bioreactors -Chloroplast -Thylakoid -Transplastomic -Vaccine -E7-Papillomavirus

# *INDICE*


**INTRODUCCIÓN** **7**

Plantas como biorreactores 8

Tabaco como biorreactor 9

Transformación de cloroplastos 10

VPH y cáncer cervical 12

E7 como vacuna terapéutica 16

**OBJETIVOS** **20**

**CAPÍTULO I** **21**

**Introducción Capítulo I** **22**

**Resultados Capitulo I** **25**

Diseño de las construcciones pBSW 5´utr E7 y pBSW 5´utr E7CP 25

Transformación de cloroplastos de tabaco con E7 y E7CP 25

Integración de E7 y E7CP 29

Transcripción de E7 y E7CP 32

Expresión de E7 y E7CP 34

**Conclusiones Capítulo I** **36**

**CAPÍTULO II** **37**

**Introducción Capítulo II** **38**

**Resultados Capitulo II** **39**

Diseño de las construcciones pBSW 5´utr E7GUS y pBSW 5´utr GUSE7 39

Transformación de cloroplastos de tabaco con E7GUS y GUSE7 42

Integración de E7GUS y GUSE7 46

Transcripción de E7GUS y GUSE7 46

Expresión de E7GUS y GUSE7 49

**Conclusiones Capítulo II** **51**

**CAPÍTULO III** **52**

**Introducción Capítulo III** **53**

**Resultados Capítulo III** **55**

Diseño de las construcciones pBSW 5´utr StrE7 y pBSW 5´utr StrE7CP 55
Transformación de cloroplastos de tabaco con StrE7 y StrE7CP 58
Integración de StrE7 y StrE7CP 58
Transcripción de las líneas StrE7 y StrE7CP 62
Expresión de StrE7 y StrE7CP 64
Análisis comparativo de la expresión de E7 en las plantas transplastómicas 67
Organización tisular y celular de las líneas transplastómicas E7 y StrE7 71
Capacidad inmunogénica de extractos de plantas StrE7 y E7GUS 74
**Conclusiones Capítulo III** **76**

**DISCUSIÓN** **78**

**MATERIALES y MÉTODOS** **87**
Cepas bacterianas 88
Líneas de plantas 89
Plásmidos 90
Secuencias génicas expresadas 90
Oligonucleótidos iniciadores 96
Metodología del ADN recombinante 97
Preparación de plásmidos e insertos 98
Transformación de cloroplastos de tabaco por biobalística. 100
Rusticación 102
Esterilización y germinación de semillas de tabaco in vitro. 102
Análisis de ADN por PCR 103
PCR para chequeo de plantas transplastómicas. 103
Ensayo de Southern blot. 104
Preparación de los moldes para las sondas. 105
Ensayo de northern blot. 106
Extracción de proteínas. 107
Cuantificación de proteínas totales. 108
Cuantificación de E7 por ELISA. 108
Electroforesis de proteínas. 109
Ensayo de western blot. 109
Ensayo histoquímico para detectar actividad β-glucuronidasa 110

**REFERENCIAS** **113**

# *INTRODUCCIÓN*

## Plantas como biorreactores

La demanda de proteínas de interés económico ha registrado un incremento exponencial durante las últimas décadas. Hasta los años 80, la única forma de obtenerlas era su purificación a partir de fuentes naturales. En este marco surgió la biotecnología industrial basada en la tecnología del ADN recombinante con el desarrollo de sistemas procarióticos para la expresión de proteínas heterólogas. Esta respuesta exitosa abrió la puerta a la ingeniería de proteínas con propiedades nuevas y ventajosas. Los biorreactores bacterianos permitieron expandir drásticamente la producción reduciendo a su vez los costos asociados a la explotación de recursos naturales. Sin embargo, algunas limitaciones en la capacidad de estas células para producir ciertos tipos de proteínas así como para realizar modificaciones postraduccionales específicas de origen eucariótico, impuso un nuevo desafío tecnológico. La respuesta provino del desarrollo de biorreactores basados en el cultivo de levaduras y células de insectos y mamíferos. Los cultivos de células eucarióticas sin duda permitieron alcanzar los máximos niveles de calidad en las proteínas obtenidas. En la actualidad su importancia, particularmente en la industria farmacéutica, está fuera de discusión. Como contraparte, estos sistemas presentan una productividad y costos operativos muy desfavorables respecto de los sistemas procarióticos, determinando en algunos casos su inviabilidad económica. En su conjunto los sistemas de producción de proteínas recombinantes tradicionales basados en el cultivo de células procariotas y eucariotas presentan limitaciones. Especialmente en los costos y la complejidad del escalado de la producción ya que se debe mantener la esterilidad y la estabilidad de los cultivos durante su crecimiento. La producción de proteínas recombinantes en plantas aparece entonces como una alternativa interesante debido a su potencialidad para obtener altos niveles de expresión de polipéptidos recombinantes en un sistema seguro y de bajo costo. Esta potencialidad se basa en la concepción de cada planta como un biorreactor autónomo capaz de mantener las condiciones de expresión por sí mismo utilizando energía solar. De esta forma no es necesario mantener las rigurosas condiciones que requiere un fermentador. La posibilidad de escalar la producción aumentando el número de plantas sembradas simplifica enormemente la operación. En general esta tecnología resulta más simple, económica y robusta que la utilizada para el cultivo celular. En particular, para el caso de la producción de proteínas de interés farmacéutico como péptidos antimicrobianos, vacunas y anticuerpos, el uso de plantas como biorreactores presenta un gran potencial para superar tanto las limitaciones cualitativas de los sistemas procarióticos, permitiendo modificaciones postraduccionales de tipo eucariota, como el riesgo biológico asociado a

los fermentadores. En este sentido no se conocen patógenos vegetales capaces de infectar animales (Sharma *et al*., 2009). Comparativamente, la utilización de tabaco como biorreactor para la expresión de vacunas recombinantes representa un costo estimado 50 veces menor al correspondiente a un sistema de fermentación bacteriano (Kusnadi *et al*., 1997; Verma *et al*., 2007).

Desde los orígenes del hombre las plantas han sido fuente no sólo de alimentos sino también de medicinas. El posterior surgimiento de la agricultura trajo aparejado la domesticación y el manejo de numerosas especies vegetales. Hace dos décadas, a partir de la posibilidad de modificar genéticamente las plantas mediante la tecnología del ADN recombinante, el desarrollo agrario fue impactado notablemente luego de la introducción de variedades resistentes a herbicidas e insectos plaga, entre otros. En la actualidad la tecnología asociada al uso de las plantas como biorreactores aún no ha alcanzado su madurez. Sin embargo ya existen los primeros péptidos antimicrobianos, anticuerpos, enzimas y antígenos obtenidos por esta tecnología que han superado las estrictas regulaciones correspondientes a la industria farmacéutica e incluso, en algunos casos, ya se han introducido al mercado como es el caso del anticuepo contra la hepatitis B desarrollado por el CIGB de Cuba o la lipasa gástrica Merispasa® desarrollado por Meristem Therapeutics de Francia (Obembe *et al*., 2011).

## Tabaco como biorreactor

Entre los factores a considerar para la producción de una proteína específica utilizando una planta como biorreactor se encuentran la elección de la especie vegetal, el método de transgénesis, los elementos genéticos regulatorios de la expresión y la localización final del péptido tanto a nivel tisular como subcelular. Dentro de cada uno de estos existen múltiples alternativas. En todos los casos la estrategia planteada deberá ajustarse a las características particulares de la proteína de interés para obtener resultados positivos desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo (Tremblay *et al*., 2010) Sin duda la especie vegetal más utilizada e investigada como plataforma para la producción de proteínas recombinantes es el tabaco (*Nicotiana tabacum*). Son numerosas las ventajas que ofrece esta especie para la expresión de proteínas recombinantes. Con un contenido relativamente alto de proteína soluble total (PST) respecto de la biomasa total (aprox. 1%) y con la posibilidad de producir hasta 100t de biomasa por hectárea, el tabaco también se destaca por las facilidades que presenta su manipulación en el laboratorio. Las condiciones ya establecidas para la regeneración a partir de tejido foliar y su rápido

crecimiento favorecieron la puesta a punto de prácticamente todas las técnicas de transgénesis vegetal conocidas. El genoma nuclear del tabaco puede ser transformado vía *Agrobacterium tumefaciens* o mediante biobalística. En ambos casos es posible obtener plantas capaces de expresar la proteína de interés en forma estable a lo largo de generaciones sin necesidad de mayores manipulaciones biotecnológicas. La principal limitación de la transformación nuclear son los niveles relativamente bajos de expresión del transgén. Alternativamente, también es posible producir transitoriamente proteínas recombinantes en tabaco mediante la infección de la planta con vectores derivados de virus vegetales. Esta técnica permite obtener mayores cantidades de proteína dentro de los 5 días posteriores a la infección aunque requiere la manipulación individual de cada una de las plantas ya que el transgén no se integra al genoma. Una tercera alternativa capaz de superar las desventajas asociadas a la transformación nuclear y a la expresión transitoria es la transformación del genoma del cloroplasto.

## Transformación de cloroplastos

Los cloroplastos son las organelas de las células vegetales especializadas en el proceso de fotosíntesis, principal fuente de energía para la vida en la Tierra. Evolutivamente originados a partir de cianobacterias endosimbiontes, los plástidos poseen un genoma propio altamente poliploide con elementos genéticos funcionales asociados con la transcripción y la traducción procariota. Si bien la mayoría de las funciones plastídicas dependen de la importación de proteínas codificadas por cerca del 10% de los 30.000 genes nucleares, el genoma plastídico (plastoma o ptDNA) con un tamaño de 125kB-155Kb codifica casi 100 polipéptidos necesarios para el metabolismo de la organela (Bock *et al.*, 2010). Más allá de su tamaño relativamente pequeño, el plastoma presenta un enorme potencial para desarrollos biotecnológicos basados en la ingeniería genética. Las plantas transplastómicas presentan ventajas comparativas respecto de las plantas transgénicas obtenidas mediante la transformación del genoma nuclear (Maliga *et al.*, 2011).

**Recombinación homóloga, ausencia de silenciamiento y de modulación epigenética:** La posibilidad de determinar con precisión el sitio de integración del transgén en el plastoma mediante recombinación homóloga constituye una ventaja importante. De esta forma se evitan los efectos indeseables de las inserciones múltiples y al azar propios de la transgénesis nuclear. En el cloroplasto tampoco se registran fenómenos regulatorios de la transcripción vinculados con el silenciamiento o la

epigenética. Estas características del sistema plastídico brindan mayor estabilidad y menor variabilidad de la expresión genética y del fenotipo obtenido.

**Altos niveles de expresión heteróloga:** Los genes plastídicos representan un sistema altamente poliploide basado en el alto número de organelas por célula y en el alto número de copias de plastoma por cloroplasto. En el caso del tabaco, en las células del mesófilo, es posible observar una relación de 10.000 copias de cada gen plastídico por cada gen nuclear (Shaver *et al*., 2006). Esta característica permite alcanzar niveles de expresión extraordinariamente altos para genes plastídicos respecto de la proteína soluble total (PST). En el caso de genes homólogos se destaca la subunidad mayor de Rubisco (rbcL) con niveles del 20-30% PST (Whitney *et al*., 2011). En el caso de genes heterólogos es posible encontrar ejemplos de niveles de expresión muy altos para distintas proteínas, superando incluso el 50% de la PST (Lentz *et al*., 2010; Oey *et al*., 2009).

**Co-expresión múltiple de transgenes:** La naturaleza procariota de la maquinaria de transcripción plastídica permite la co-expresión de múltiples genes asociados en un mismo operón policistrónico. Esta posibilidad, ausente en la transgénesis nuclear, puede resultar de gran utilidad.

**Contención del transgén por herencia materna:** Una ventaja adicional es la contención del transgén en el cloroplasto debido a la herencia materna de los plástidos en la mayoría de las plantas. De esta forma se reduce drásticamente el riesgo de transferencia horizontal indeseada del transgén a través del polen.

Paralelamente una limitación del sistema de expresión plastídico que no debe ser soslayada es la imposibilidad de producir ciertas modificaciones postraduccionales propias de las células eucariontes como la glicosilación. Esta limitación podría ser superada incorporando al plastoma los genes correspondientes a las enzimas específicas de la vía de glicosilación eucariota.

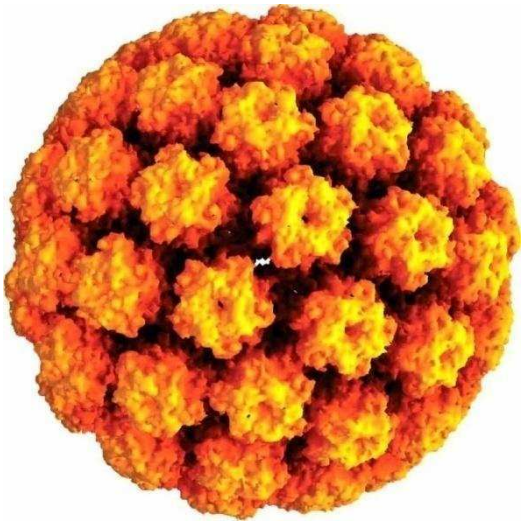
El primer antecedentes de ingeniería genética en genomas plastídicos fue reportado en 1988 en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton *et al*., 1988). Poco tiempo después se obtuvo la primera angiosperma transplastómica, *Nicotiana tabacum*, (Svab *et al*., 1990) la cual continúa siendo la especie modelo para la ingeniería plastídica. Si bien actualmente son varias las especies para loas cuales existe un protocolo bien establecido para la transformación plastídica (como lechuga, soja, tomate o papa), el desarrollo de cultivos comerciales transplastómicos aún resulta muy incipiente.

## VPH y cáncer cervical

El cáncer cervical es el segundo tipo de cáncer con mayor prevalencia entre las mujeres. Con más de 500.000 casos reportados por año y cerca de 300.000 muertes asociadas, su incidencia es particularmente alta en los países del tercer mundo. La asociación entre esta patología y la infección con virus del papiloma humano (VPHs) ha sido establecida en la década de 1970 por Harald zur Hausen (Su *et al.*, 2010), quien recibió el premio Nobel de Medicina de 2008 por este motivo.

Los VPHs constituyen un grupo heterogéneo dentro de la familia *Papillomaviridae* con más de 100 tipos identificados y secuenciados. A su vez pueden clasificarse en dos sub-grupos según su capacidad de infectar la piel o la mucosa tanto del tracto respiratorio superior como del aparato reproductivo humano. (Ghittoni *et al.*, 2010). Estructuralmente, los VPHs están compuesto por una molécula de ADN doble cadena circular asociado a histonas dentro de una cápside proteica icosahédrica de 55nm de diámetro sin envoltura externa **(figura I.1 A)**. Su genoma de menos de 8 kpb contiene entre 8 y 10 marcos de lectura (ORFs) para todos los tipos de VPH **(figura I.1 B)**. Está dividido en tres regiones: la región larga de control (LCR) no codificante que contiene la mayoría de los elementos regulatorios involucrados en la replicación viral y en la transcripción, la región de las proteínas tempranas (E1-E8) y la región de las proteínas tardías (L1 y L2). Las proteínas L1 y L2, correspondientes a las subunidades mayor y menor de la cápside viral, son necesarias para completar el ciclo vital del virus. En la etapa no productiva episomal, las células basales del epitelio llegan a formar hasta 200 copias con gran amplificación del genoma. Posteriormente, en las capas superficiales del epitelio, se transcribirá el ARNm codificante para las proteínas L1 y L2 de la cápside permitiendo en este nivel la formación de las partículas virales. Las proteínas E1 y E2 se unen a secuencias específicas del ADN, de tal modo que E1 es la proteína iniciadora de la replicación y E2 regula la transcripción siendo capaz de reprimir los promotores que controlan la expresión de los genes E6 y E7. De esta manera se regula la proliferación celular y la capacidad de transformación de las células infectadas. La proteína E4 se expresa en estadíos tardíos de la infección cuando se ensamblan los viriones. La proteína E5 no se expresa en las células neoplásicas ya que no es necesaria para mantener la transformación maligna de las células huésped. Las proteínas E6 y E7 tienen la capacidad de inmortalizar y transformar las células del cuello uterino. Por otra parte, mantienen el ambiente celular para que el genoma viral pueda subsistir mientras no se encuentre incorporado en los cromosomas.

**A)**



http://www.virology.wisc.edu/virusworld/viruslist.php?virus=hpv

**B)**

**Genoma viral**

**E1:** replicación viral
**E2:** replicación viral y transcripción
**E4:** desestabilización de la red de citokeratina
**E5:** interacción con factores de crecimiento
**E6:** proliferación celular y evasión inmunológica
**E7:** proliferación celular y evasión inmunológica
**L1:** proteína mayor de la cápside
**L2:** proteína menor de la cápside
**PE:** Promotor temprano (P97)
**PL:** Promotor tardío (P670)
**LCR:** región larga de control de la transcripción génica y de la replicación viral

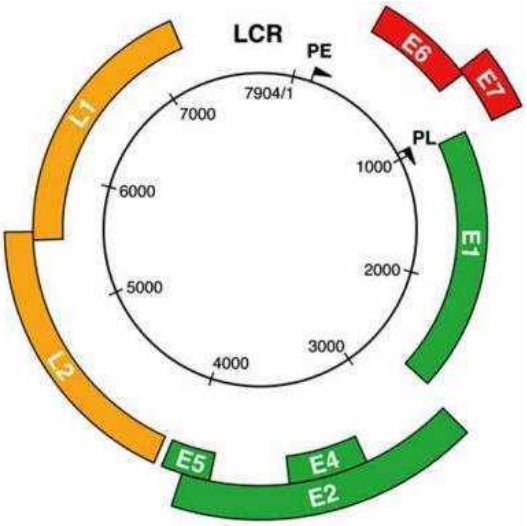


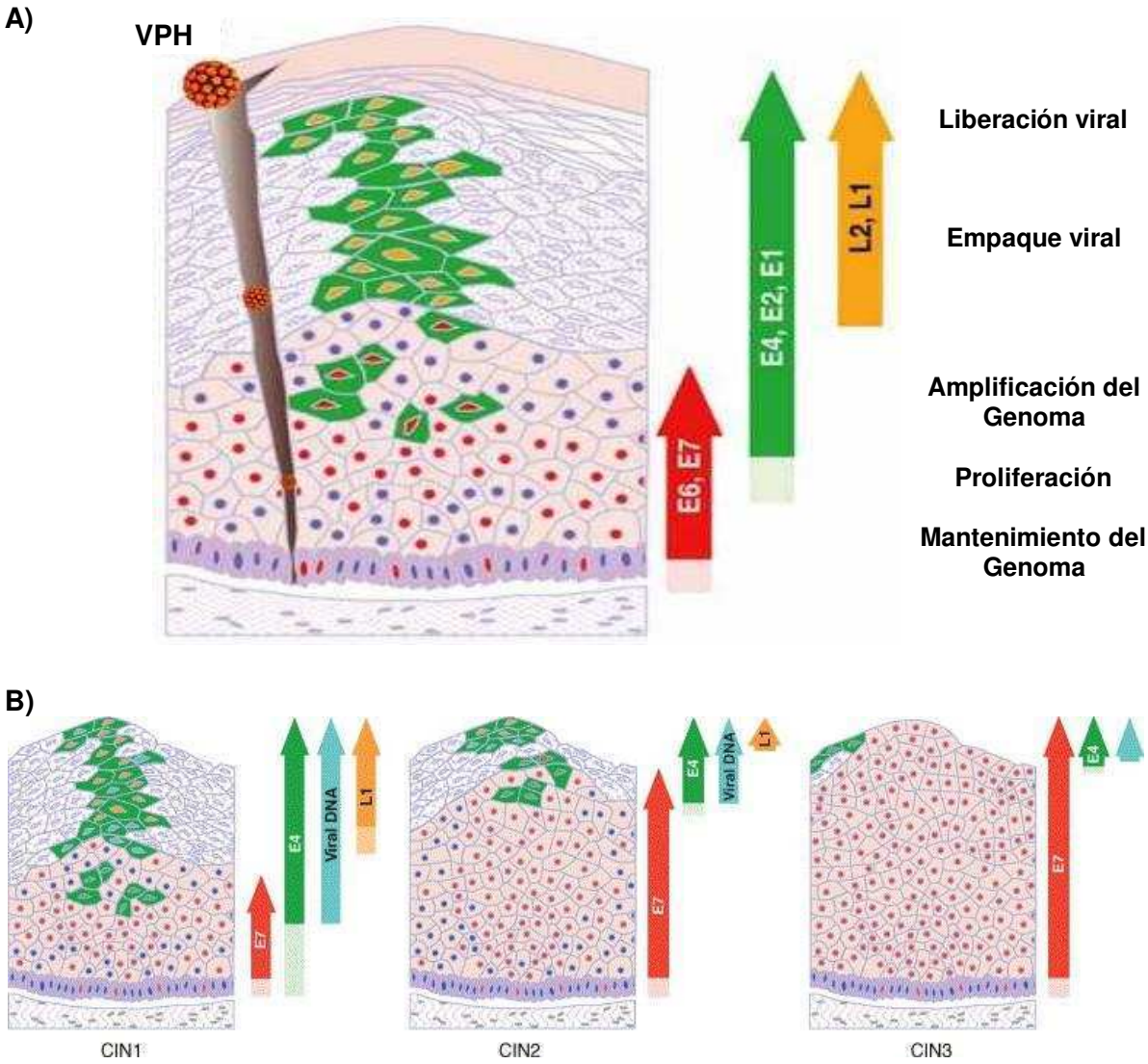

**Figura I.1: Virus del papiloma humano (VPH)**

A) Imagen generada por computadora de una partícula viral del VPH recubierta por 72 capsómeros formados por las proteínas de la cápside L1 y L2.

B) Esquema del genoma del VPH constituido por una doble cadena de ADN circular. Se muestran la posición de la región larga de control (LCR) y cada uno de los genes tempranos (E1-E7) y tardíos con sus promotores respectivos PE y PL, indicados con flechas. Las principales funciones de cada uno de estos genes se indican a la izquierda.

Entre los VPHs capaces de infectar la mucosa existe un grupo denominado de “alto riesgo” por su asociación con el cáncer cervical. Su ciclo comienza con la infección de las células de la capa basal del epitelio (figura I.2 A) y se encuentra estrechamente relacionado con la diferenciación del mismo (Doorbar, 2005). En los queratinocitos basales el genoma viral permanece como episoma expresando bajos niveles de E6 y E7, las cuales promueven la proliferación celular. Al migrar hacia las capas superiores del epitelio, estás células se diferencian gradualmente. La expresión de E6 y E7 es sustituida por la expresión de otros genes tempranos. Finalmente, el ciclo termina con la expresión de las proteínas virales L1 y L2 necesarias para ensamblar las nuevas partículas virales. Paradójicamente, el desarrollo de cáncer cervical no está asociado con el ciclo de vida del VPH, sino con su interrupción cuando el genoma viral se integra al genoma de los queratinocitos basales. Si esto ocurre, E6 y E7 pueden expresarse en forma constitutiva e inducir la transformación y proliferación celular. De esta forma se generan lesiones conocidas como neoplasias intraepiteliales cervicales (CIN) que pueden derivar en cáncer cervical (figura I.2 B).

Se estima que a la edad de 50 años, el 80% de las mujeres ha sufrido al menos una infección por VPH de “alto riesgo”. El tipo de VPH más peligroso es el VPH16 presente en el 50% de los casos registrados de neoplasia intraperitoneal y cáncer cervical. La incidencia del VPH16 se incrementa marcadamente en otros tipos de cáncer como cáncer de ano, pene, cabeza y cuello así como neoplasia vulvar y vaginal (Kreimer *et al*., 2005). Sin embargo, aún en las infecciones por VPHs de “alto riesgo”, no siempre se generan lesiones oncogénicas debido a la capacidad del sistema inmunológico de neutralizar la infección en un tiempo relativamente corto de 6 a 18 meses. En el 10% de los casos esto no ocurre y la infección persiste, pudiendo derivar en neoplasia intraepitelial del cérvix, la cual puede retroceder o, luego de un período de latencia, progresar hacia un carcinoma cervical invasivo. Hoy está bien establecida la presencia de al menos una copia del genoma viral transcribiéndose activamente en todas las células malignas. En particular la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 resulta esencial para el desarrollo sostenido en el tiempo del fenotipo tumoral. Por el contrario, los otros genes virales no están activos y no resultan necesarios para mantener este fenotipo.




de Doorbar J. (2005) **"The papillomavirus life cycle"**

**Figura I.2: Ciclo de vida del virus del papiloma humano (VPH)**

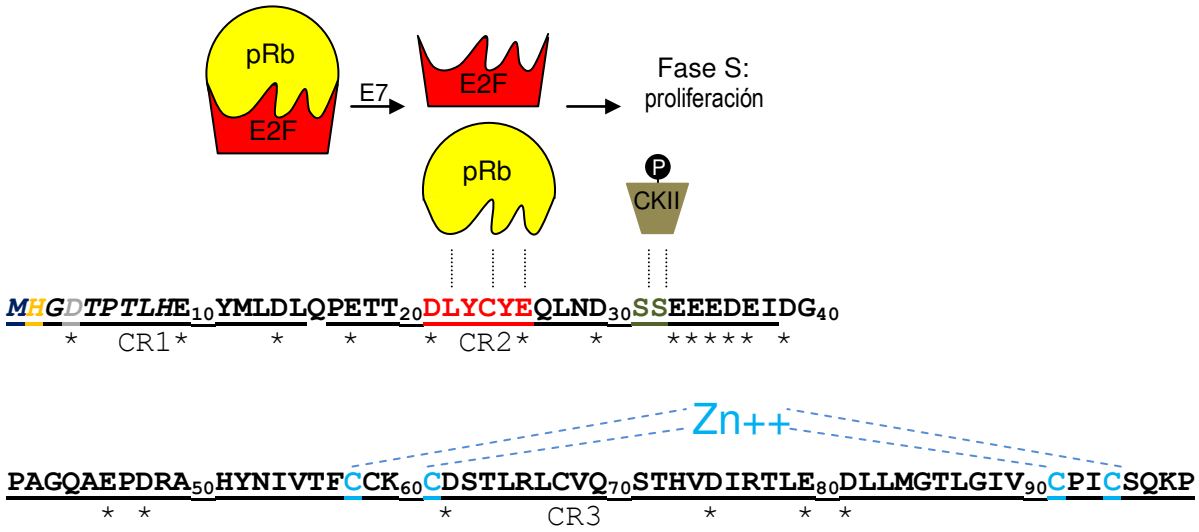
A) Patrón de expresión génica de VPH tipo 16 a medida que la célula infectada migra hacia la superficie epitelial. Después de la infección (en este caso a través de un corte), el genoma viral se mantiene como un episoma de bajo número de copias. Durante la diferenciación epitelial, el promotor p97 dirige la expresión de los genes E6 y E7 necesarios para la entrada en la fase S (rojo). El promotor de p670 es inducido en las capas medias y superiores del epitelio, entonces aumenta la expresión de las proteínas virales, E1, E2, E4 y E5) (verde), lo que facilita la amplificación del genoma viral y la expresión de las proteínas de la cápside viral (amarillo).

B) Cambios en el ciclo de vida del VPH 16 durante el desarrollo del cáncer de cuello uterino. Durante la progresión de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN) de grado 1 a 3, la regulación normal del ciclo de vida del virus del papiloma se pierde. En CIN1, las proteínas de la cápside viral se expresan únicamente en la superficie epitelial. En las lesiones CIN2 y CIN3, el orden de los eventos del ciclo de vida no se modifica, pero la extensión de la expresión de E7 aumenta sensiblemente.

## E7 como vacuna terapéutica

La implementación del control preventivo para la detección de lesiones citológicas redujo significativamente la incidencia del cáncer cervical en las regiones que lo adoptaron. Por otro lado, la reciente introducción de vacunas profilácticas contra VPH abre por primera vez la posibilidad de erradicar las enfermedades asociadas. Sin embargo ambos abordajes presentan limitaciones. El costo que insumen restringe el acceso de amplios sectores, especialmente en los países del tercer mundo donde las patologías asociadas son más frecuentes. En el caso de las vacunas existe una dificultad adicional debido a la imposibilidad de cultivar el virus para obtener luego partículas virales atenuadas. Al no poder reproducir *in vitro* la compleja organización tisular estratificada del epitelio necesaria para completar el ciclo del virus, las vacunas se basan en antígenos péptídicos de menor potencia y cobertura inmunológica. Más aún, las dos vacunas comerciales disponibles utilizan como principio activo antigénico a la subunidad mayor (L1) de la cápside viral del VPH. Por lo tanto su acción preventiva no atiende la situación de las mujeres previamente infectadas (Hildesheim *et al.*, 2007). En este sentido, existe una necesidad importante de avanzar con la investigación y el desarrollo de una vacuna terapéutica efectiva que a su vez resulte económicamente accesible para el conjunto de la población potencialmente afectada. (Hildesheim *et al.*, 2007).

La proteína E7 del VPH16 es una proteína de 11kDa de PM capaz de desregular la proliferación de las células que la expresan. La secuencia primaria de E7 consta de 98 aminoácidos, de los cuáles 7 corresponden a cisteínas y 19 a residuos ácidos **(figura I.3)**. Su porción carboxilo-terminal muestra una conformación compacta y un dominio de unión a zinc formado por dos motivos de tipo Cys-X-X-Cys, y funciona como dominio de dimerización (Liu *et al.*, 2006) u oligomerización (Alonso *et al.*, 2004). También se encuentran aquí la mayoría de los sitios específicos de interacción con los más de 40 ligandos proteicos conocidos. Su porción amino-terminal se caracteriza por contener a la mayoría de los residuos ácidos del polipéptido. Presenta una conformación laxa carente de un arreglo conformacional definido y estable. Esta particularidad le permite *in vivo* unirse con alta afinidad, en forma relativamente inespecífica, a diversos complejos proteicos incluidos aquellos asociados con la regulación de la expresión génica (Smotkin *et al.*, 1987). Paralelamente, la repulsión entre los grupos carboxilo aporta relativa rigidez a la disposición extendida de la cadena peptídica, aún luego del tratamiento con calor y SDS. Esta característica explicaría el patrón de migración aberrante en geles de poliacrilamida desnaturalizantes en los que E7 presenta un PM aparente de 17-20 kDa.




**$M_1$:** sitio de ubiquitinación particular localizado en el grupo amino libre del extremo amino terminal. Este proceso gatilla la proteólisis de E7 vía proteasoma.

**$H_2$:** su reemplazo por prolina redunda en una pérdida de la capacidad transformante. El mismo efecto se observó con la eliminación de los primeros 9 residuos aminoacídicos.

**$D_4$:** asociado con la mobilidad electroforética anómala en SDS-PAGE. Reemplazado por arginina en las secuencias E7 correspondientes a VPHs de bajo riesgo con perfil electroforético normal.

**$D_{21}$:** aumenta la afinidad por pRb del motivo canónico LXCXE al que precede en las cepas de alto riesgo. La mutación de $G_{21}$ por D en la secuencia E7 de VPH6 aumenta su afinidad por pRb.

**$L_{22}$-$E_{26}$:** secuencia consenso común LXCXE de unión a las denominadas *pocket proteins* (pRb, p107, p130) conservada en todas las variantes de E7 así como en E1A de adenovirus y T de SV40.

**$S_{31}$-$E_{32}$:** sitio de fosforilación por la proteína caseín kinasa II (CKII), proceso involucrado en la capacidad transformante de la proteína.

**$C_{58}$, $C_{61}$, $C_{91}$, $C_{94}$:** los dos motivos CXXC coordinan un átomo de Zn y estarían asociados a la capacidad de oligomerización de E7.

**Figura I.3: Análisis de la secuencia de la proteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16**

La proteína E7 de VPH 16 presenta 98 aminoácidos incluidos 19 residuos ácidos (*) y 7 cisteínas. Muestra una arquitectura modular con una porción amino-terminal (40aa) carente de estructuras secundaria y terciaria definidas a diferencia de la porción carboxi-terminal con estructura globular bien establecida. Es capaz de interaccionar con pRb (proteína supresora de retinoblastoma) liberando el factor E2F activo necesario para la replicación del ADN y la entrada a la fase S del ciclo celular en la transformación de células de mamífero.

Las secuencias de las tres proteínas presentan tres regiones conservadas (CR):

CR1: Es fundamental para la capacidad transformante de E7 aunque no presenta sitios de unión para ninguno de sus 40 ligando conocidos. Conserva alta homología de secuencia pero no de función con una porción de la proteína E1A de adenovirus.

CR2: Presenta el sitio de unión a pRb de alta afinidad así como las serinas fosforilables por CK II.

CR3: Incluye los sitios de unión de la mayoría de los blancos biológicos de E7 conocidos incluido un segundo sitio de unión a pRb de menor afinidad necesario para producir la liberación de E2F.

La porción amino- terminal presenta dos regiones conservadas (CR) de alta homología con la proteína E1A de adenovirus y el antígeno T del virus SV40. CR1 presenta un sitio de ubiquitinación en el extremo amino-terminal capaz de mediar la degradación de E7 y sus eventuales ligandos vía proteasoma (Massa *et al*., 2008; Reinstein *et al*., 2000). Este mecanismo sería uno de los responsables de la vida media particularmente corta de E7 *in vivo*. CR2 presenta el motivo Leu-X-Cys-X-Glu necesario para la asociación de E7 con la proteína supresora de retinoblastoma (pRB) (Munger *et al*., 1989). Esta región también presenta las dos serinas susceptibles de fosforilación por casein kinasa II, proceso involucrado en la capacidad transformante de E7. La asociación de E7 con pRB interfiere en la formación del complejo pRB/E2F. De esta forma el E2F liberado gatilla la activación de la transcripción de los genes necesarios para el inicio de la fase S del ciclo celular y la proliferación desregulada de las células epiteliales.

E7 es una de las dos proteínas virales expresadas en células epiteliales precancerosas o tumorales infectadas por VPH. Como tal, se ha postulado como un blanco factible para una vacuna terapéutica contra el desarrollo del cáncer cervical y otras neoplasias asociadas (Chen *et al*., 1991). Distintos abordajes inmunoterapéuticos basados en la proteína E7 del VPH16 han sido desarrollados tanto en modelos animales como en ensayos clínicos (Su *et al*., 2010). Inicialmente E7 mostró una inmunogenicidad relativamente baja con una respuesta mayoritariamente humoral. Sin embargo, la utilización de adyuvantes apropiados estimuló la respuesta inmunológica mediada por células, indispensable para erradicar la infección y frenar la progresión tumoral. Hoy día existen varios estudios clínicos exitosos utilizando vacunas basadas en E7 que lograron reversiones parciales o totales de lesiones oncológicas asociadas con VPH (Cid-Arregui, 2009).

El primer antecedente de expresión de E7 del VPH en plantas de tabaco se realizó utilizando un vector derivado del virus X de la papa (PVX) (Franconi *et al*., 2002). El antígeno, así expresado, mostró su potencial inmunoterapéutico en ratones despertando una respuesta humoral y celular capaz de inhibir el desarrollo de tumores que expresaban E7. Los bajos niveles de expresión obtenidos con este y otros sistemas de expresión, presumiblemente asociados con la rápida degradación de E7 por el proteasoma, constituyeron una limitación a superar. Recientemente se logró obtener un nivel de expresión mayor para E7 del VPH8 utilizando un vector basado en el virus del mosaico de tabaco con una señal de direccionamiento hacia el apoplasto (Noris *et al*.,

2011). La posibilidad de obtener altos niveles del antígeno recombinante utilizando un sistema de expresión estable y eficiente constituye un desafío aún abierto.

# *OBJETIVOS*

La hipótesis principal de este trabajo postula que el sistema de expresión plastídico de tabaco es capaz de expresar a la proteína antigénica E7 del VPH tipo 16 superando limitaciones observadas en otros sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

En este sentido, el objetivo general de este trabajo fue el desarrollo de una plataforma basada en el uso de plantas transplastómicas de tabaco, explorando distintas posibilidades, con el fin de obtener líneas de plantas capaces de alcanzar altos niveles de expresión de la proteína E7, para su utilización como antígeno en la formulación de una vacuna terapéutica contra el cáncer cervical.

Para ello se realizaron las siguientes etapas:

a) Obtener plantas de tabaco transplastómicas para E7.

b) Analizar la integración del transgén.

c) Estudiar los niveles de expresión de la proteína recombinante.

d) Evaluar la actividad biológica del antígeno obtenido.

e) Aumentar la potencia antigénica de E7

f) Ensayar distintas aproximaciones para mejorar los niveles de expresión de E7

g) Explorar la posibilidad de dirigir la expresión del transgén hacia el lumen tilacoidal

# *CAPÍTULO I*

## *Introducción Capítulo I*

Los protocolos actuales de transformación plastídica de tabaco se basan en el trabajo de Maliga y colaboradores (Svab *et al.*, 1990). Básicamente el vector de transformación con el gen selector y el gen de interés ingresa a las células vegetales adsorbido a microproyectiles de oro **(figura 1.1).** Las micropartículas de oro (o tungsteno) recubiertas de ADN son disparadas hacia el tejido foliar mediante el uso de un cañón génico impulsados por helio comprimido a alta presión. Una pequeña fracción del ADN entra a los cloroplastos y se integra al plastoma mediante el mecanismo de recombinación homóloga. Las hojas de tabaco bombardeadas son cortadas en trozos y luego del período de recuperación son incubadas en medio de regeneración RMOP en presencia de espectinomicina. El agente selector solo permite el desarrollo de brotes a partir de células que incorporaron el gen selector. Con el fin de depurar los plastomas no transformados y lograr la homoplastía, los brotes heteroplásticos se sometan a 2 o 3 rondas de regeneración sucesivas antes de incubar en medio MS sin hormonas para permitir el desarrollo de raíces necesarias para la etapa de larusticación. La homoplastía de las plantas transplastómicas, necesaria para estabilizar la expresión del transgén, se alcanza luego de varias rondas de regeneración en medio selectivo o bien a partir de las semillas provenientes de las plantas rusticadas en tierra. La germinación de las mismas en medio MS con espectinomicina permite obtener líneas transplastómicas homoplásticas.

Un punto importante en cualquier estrategia de transformación plastídica es el diseño del vector utilizado. En este sentido trabajos previos de nuestro laboratorio permitieron desarrollar el plásmido pBSW 5´utr (Wirth *et al.*, 2006). Resultados más recientes confirmaron el potencial de este vector para alcanzar altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en tabaco (Lentz *et al.*, 2010) y en papa (Segretin *et al.*, 2011). En el plásmido pBSW 5´utr el transgén se ubica río abajo de la secuencia promotora 5´ no codificante del gen *psbA* (5′*psbA*) y río arriba de la secuencia de terminación 3´no codificante del gen rps16. 5′*psbA* contiene secuencias de inicio de la transcripción y regiones no codificantes con sitios de unión a ribosoma (RBS). La secuencia *aadA* con un RBS localizado río arriba del codón inicial ATG se encuentra bajo el control del promotor *Prrn* permitiendo la selección de transformantes en presencia de espectinomicina. Todos los transgenes se incorporan al plastoma en el sitio de inserción (IS) ubicado entre los genes plastídicos ribosomales *rrn16* y *trnI*. Los eventos de recombinación homóloga entre el genoma del cloroplasto y el vector ocurren río arriba y río abajo del IS.

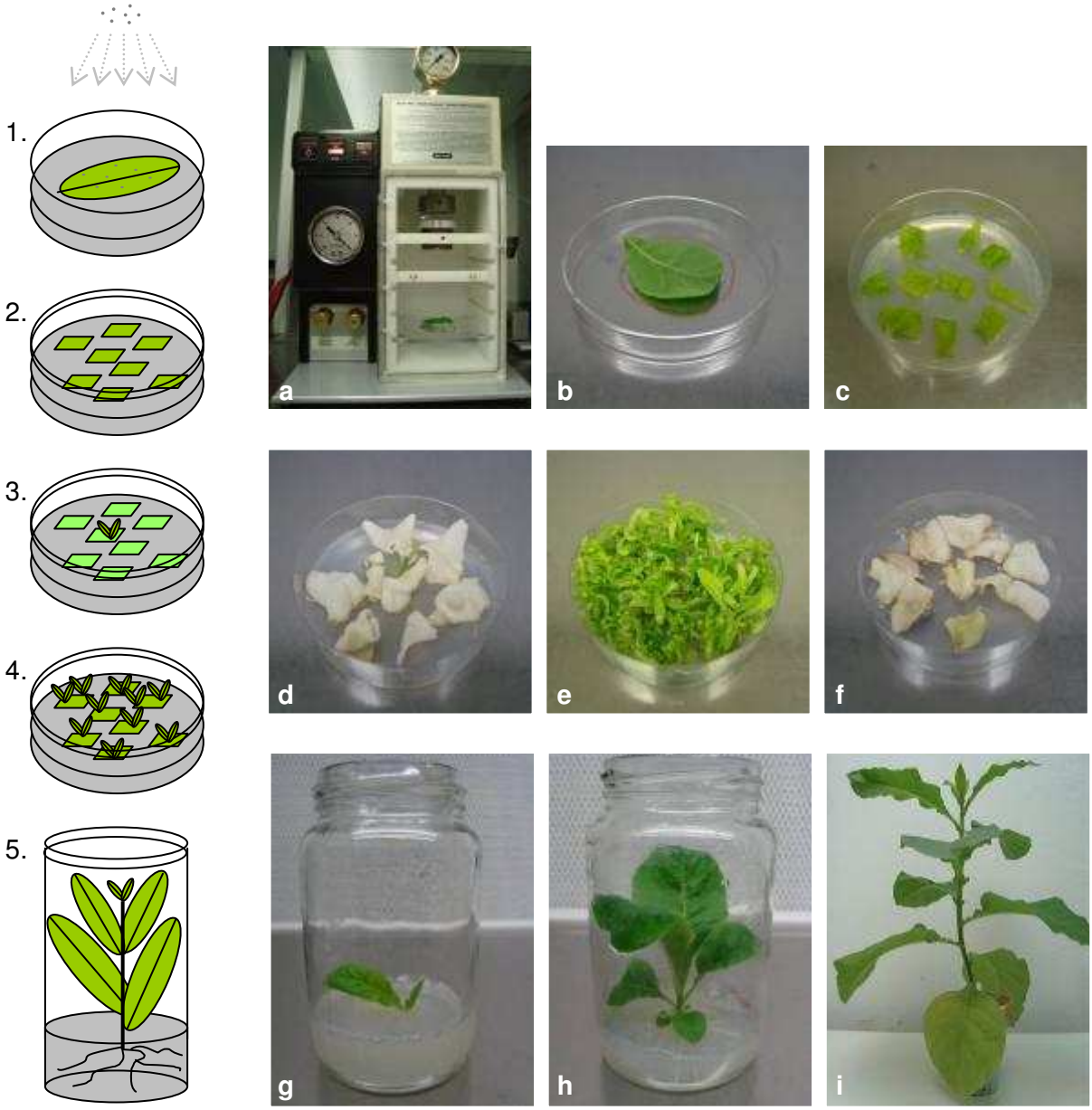



**Figura 1.1: Transformación mediante biobalística para obtener líneas transplastómicas**

1. El vector de transformación ingresa a las células vegetales mediante el uso del cañón génico (a).

2. El tejido foliar bombardeado (b) y cortado en trozos se incuba en medio de regeneración RMOP en presencia del agente selector (c)

3. La incorporación del gen de resistencia aadA permite la regeneración en presencia de espectinomicina de las células transplastómicas únicamente (d). (e: control de viabilidad en ausencia de espectinomicina, f: control de selección con tejido foliar no transformado)

4. Las rondas de regeneración sucesivas en medio selectivo facilitan la eliminación de plastomas no transformados presentes en los transformantes primarios (d).

5. Finalmente los brotes transplastómicos (g) se incuban en medio MS libre de fitohormonas para promover el enraizamiento (h) antes de ser rusticados en tierra (i) con el fin de obtener semillas homoplásticas.

Para ello el vector presenta una región flanqueante izquierda (LFR) que incluye 1169 pb de la secuencia del gen plastídico ribosomal *rrn16* y una región flanqueante derecha (RFR) de 1015 pb conteniendo la secuencia plastídica completa de *trnI* y parcial de *trnA*.

El primer antecedente de expresión de la proteína antigénica E7 del VPH en plantas data de 2002 (Franconi *et al.*, 2002). En ese caso, se utilizó un vector viral basado en el virus vegetal PVX con el fin de mejorar los niveles de expresión de E7 previamente obtenidos en sistemas basados en bacterias, levaduras y baculovirus (Park *et al.*, 1993) donde la vida media del polipéptido resultó ser notablemente baja. El extracto proteico vegetal mostró una interesante capacidad adyuvante *per se,* capaz de estimular la respuesta inmune humoral y celular de ratones inoculados. Sin embargo los niveles de expresión de E7 resultaron ser relativamente bajos (0,05% de la proteína solubletotal), presumiblemente debido a su corta vida media asociada a la degradación vía proteasoma.

En este contexto, la posibilidad de expresar E7 en cloroplasto de tabaco no sólo permite aprovechar las ventajas antes mencionadas de los sistemas de expresión vegetal en general, sino también de las plantas transplastómicas en particular. Más aún en el caso de E7, el sistema plastídico ofrece la potencialidad de superar las limitaciones de la expresión transitoria y al mismo tiempo sortear la vía de degradación asociada al proteasoma citoplasmático.

Paralelamente, es necesario evaluar distintos abordajes con el fin de aumentar la inmunogenicidad de E7. Las secuencias correspondientes a virus de plantas, especialmente las proteínas de la cápside, han demostrado un gran potencial como estimuladores de la repuesta inmune de epítopes silentes o pobremente inmunogénicos. En particular la fusión de la proteína de cápside (CP) del PVX a la secuencia de E7 utilizada en vacunas a ADN resultó efectiva para mejorar la respuesta inmune tanto humoral como celular (Massa *et al.*, 2008).

En la primera etapa de este trabajo nuestro objetivo fue obtener plantas transplastómicas para la proteína E7 del VPH16 y para la proteína de fusión E7CP con el fin de evaluar la capacidad del sistema plastídico para expresar eficientemente este antígeno con potencial inmunoterapéutico contra el cáncer cervical.

# *Resultados Capitulo I*

## Diseño de las construcciones pBSW 5´utr E7 y pBSW 5´utr E7CP

Con el fin de expresar la proteína E7 del virus del papiloma humano (VPH) y la proteína de fusión E7CP en cloroplastos de tabaco, se diseñaron vectores de expresión específicos basados en el plásmido pBSW 5´utr GUS (Wirth *et al.*, 2006). E7CP codifica en un marco continuo de lectura, la secuencia de E7 del virus del papiloma humano río arriba de la cápside del virus X de papa (CP).

Las secuencias de E7 (310 pb) y E7CP (1066 pb) se obtuvieron mediante amplificación por PCR utilizando el plásmido pGreen PVX E7CP #78 (cedido por la doctora Alicia Zelada) como molde y *primers* específicos: pr5´E7 Nde – pr3´E7 Sma (para E7) y pr5´E7 Nde – pr3´E7-CP Mlu (para E7CP) **(figura 1.2)**. Ambos insertos fueron respectivamente sub-clonados en los vectores pGemT y pZeR0 2. Los vectores pBSW 5´utrE7 y pBSW 5´utrE7CP se obtuvieron insertando alternativamente la secuencia de E7 y E7CP digerida con las enzimas NdeI y SpeI entre los sitios *Nde*I y *Xba*I del vector pBSW 5´utr.

Antes de proceder con la transformación propiamente dicha, la integridad de ambas construcciones se verificó por mapeo de restricción y secuenciación **(figura 1.3)**. Dado que la maquinaria de síntesis proteica procariota reconoce varios elementos de la transcripción y la traducción plastídicos, es posible comprobar en bacterias la funcionalidad de una construcción diseñada para transformar el plastoma. Con este propósito, los extractos proteicos de *E. coli* transformadas con pBSW 5´utr E7, pBSW 5´utr E7CP y pBSW 5´utr GUS como control, fueron analizados mediante la técnica de w*estern blot* utilizando un anticuerpo monoclonal contra E7 como primer anticuerpo. La expresión de E7 y E7CP fue confirmada verificando la funcionalidad de ambos vectores.

## Transformación de cloroplastos de tabaco con E7 y E7CP

Las líneas transplastómicas fueron obtenidas a partir del bombardeo de hojas de *Nicotiana tabacum cv*. Petit Havana con cada uno de los vectores descriptos. Las plantas regeneradas en presencia del antibiótico selector espectinomicina fueron inicialmente analizadas mediante PCR con el fin de detectar la presencia de secuencias transgénicas utilizando los primers prFw localizado sobre el gen *rrn16* del genoma plastídico, y el primer prRev correspondiente a las secuencia aadA del vector **(figura 1.4)**. Utilizando esta metodología se seleccionaron tres plantas para cada una de las construcciones

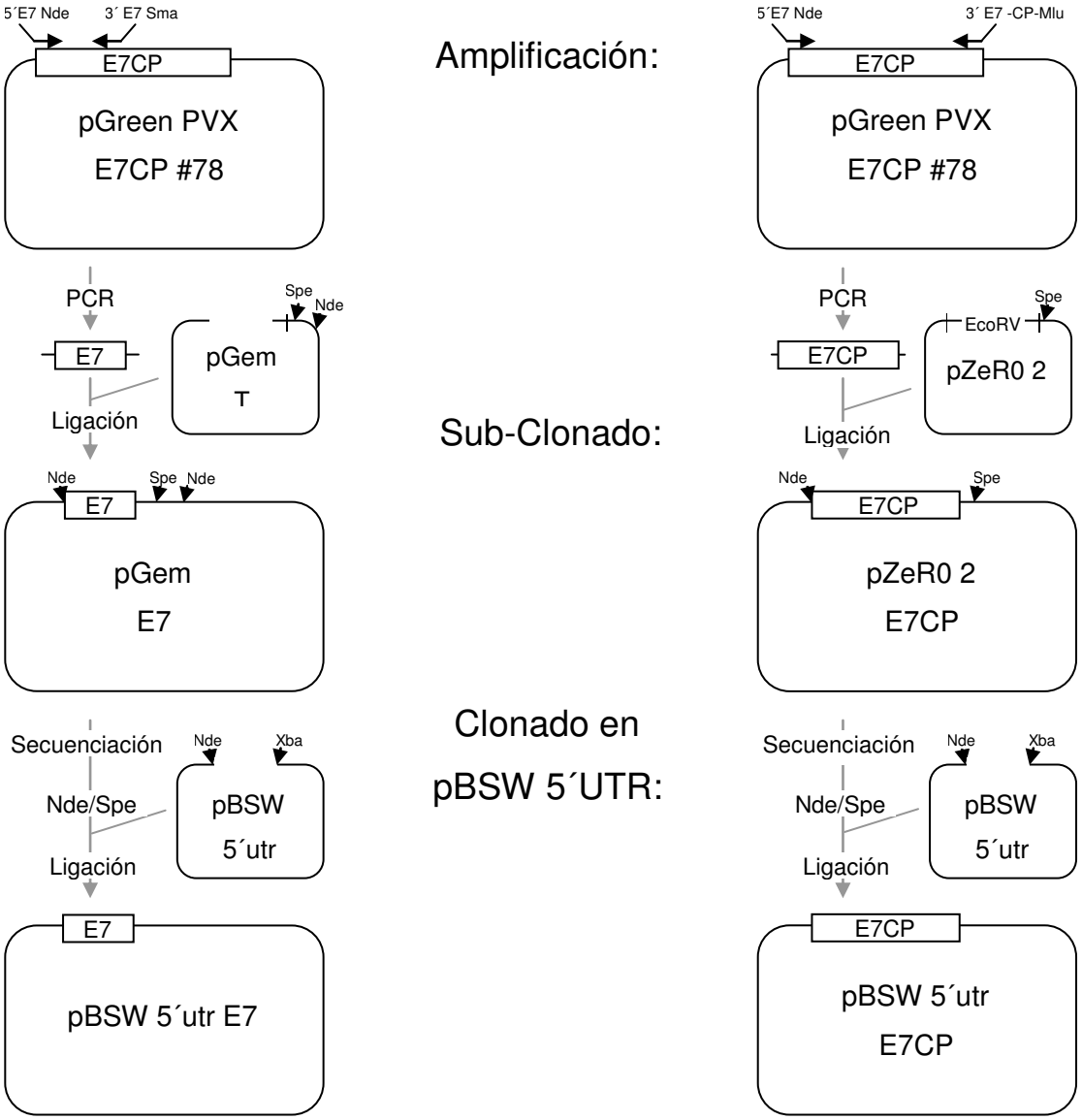



**Figura 1.2: Construcción de los vectores pBSW 5´utr E7 y pBSW 5´utr E7CP.**

Las secuencias de E7 (310 pb) y E7CP (1066 pb) se obtuvieron mediante amplificación por PCR utilizando el plásmido pGreen PVX E7CP #78 como molde y primers específicos: pr5´E7 Nde – pr3´E7 Sma (para E7) y pr5´E7 Nde – pr3´E7-CP Mlu (para E7CP). Ambos insertos fueron respectivamente sub-clonados en los vectores pGemT y pZeR0 2. Los vectores pBSW 5´utrE7 y pBSW 5´utrE7CP se obtuvieron insertando alternativamente la secuencia de E7 y E7CP digerida con las enzimas NdeI y SpeI entre los sitios Nde I y Xba I del vector pBSW 5´utr.

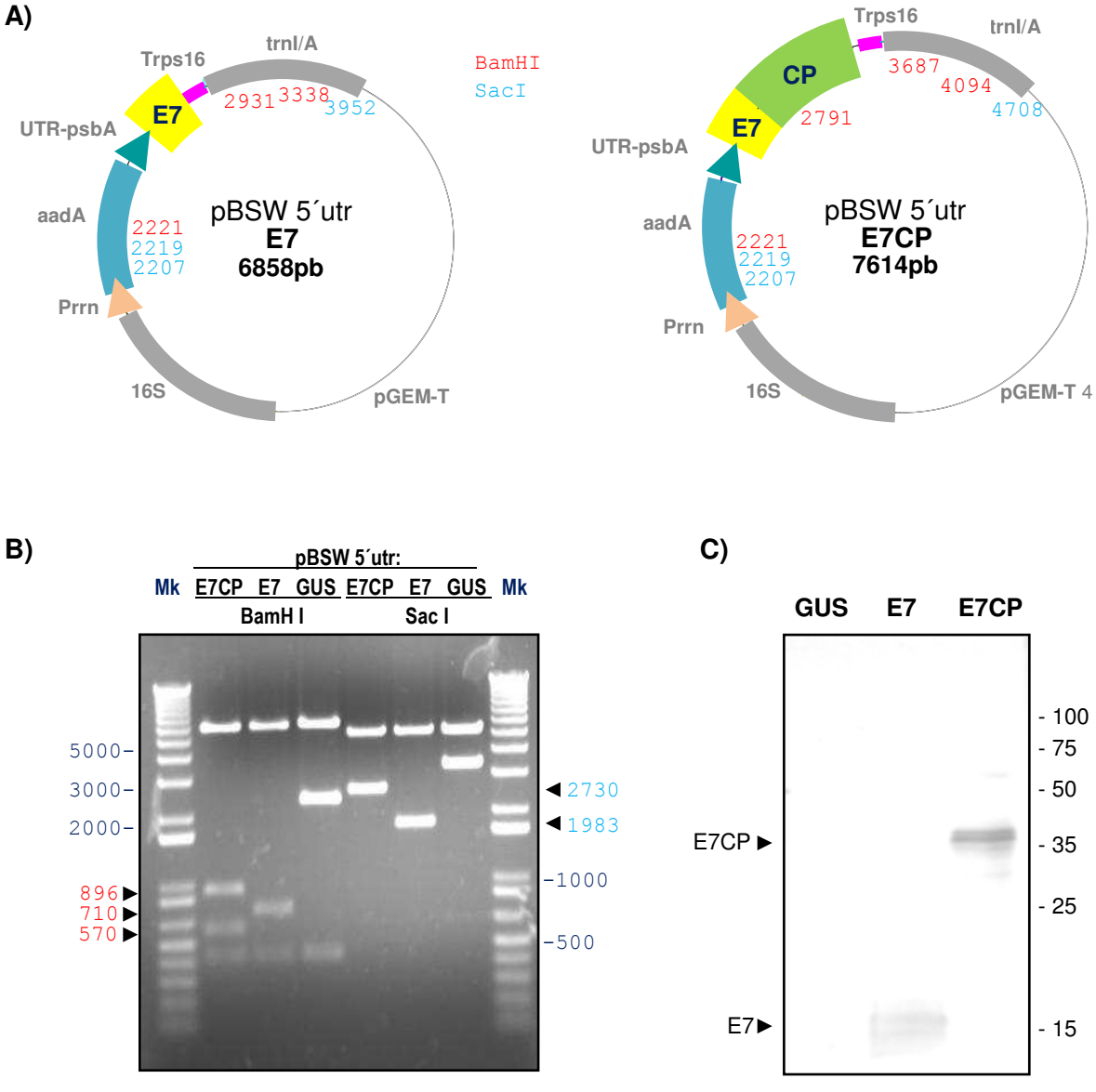



**Figura 1.3: Verificación funcional de pBSW 5´utr E7 y pBSW5´utr E7CP en E. coli**

A) Esquema de los vectores , donde se muestra la localización de los sitios correspondientes a las enzimas BamHI y SacI en los vectores pBSW5´utrE7.

B) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión de los plásmidos pBSW5´utrE7, pBSW5´utrE7CP y pBSW5´utrGUS con las enzimas BamHI y SacI. Las flechas indican los tamaños esperados para las bandas distintivas de cada construcción. Marcador de PM Mk (1kbPlus, Invitrogen).

C) Extractos proteicos totales obtenidos a partir de bacterias transformadas con los vectores pBSW 5´utrE7 (UE7), pBSW 5´utrE7CP (UCP) y pBSW 5´utrGUS (UGU) fueron analizados por western blot. Como primer anticuerpo se utilizó anti E7 monoclonal de ratón. A la derecha se indican las posiciones del marcador de peso molecular en kDa (BRP, Promega). Las flechas señalan las bandas correspondientes a E7 y E7CP.

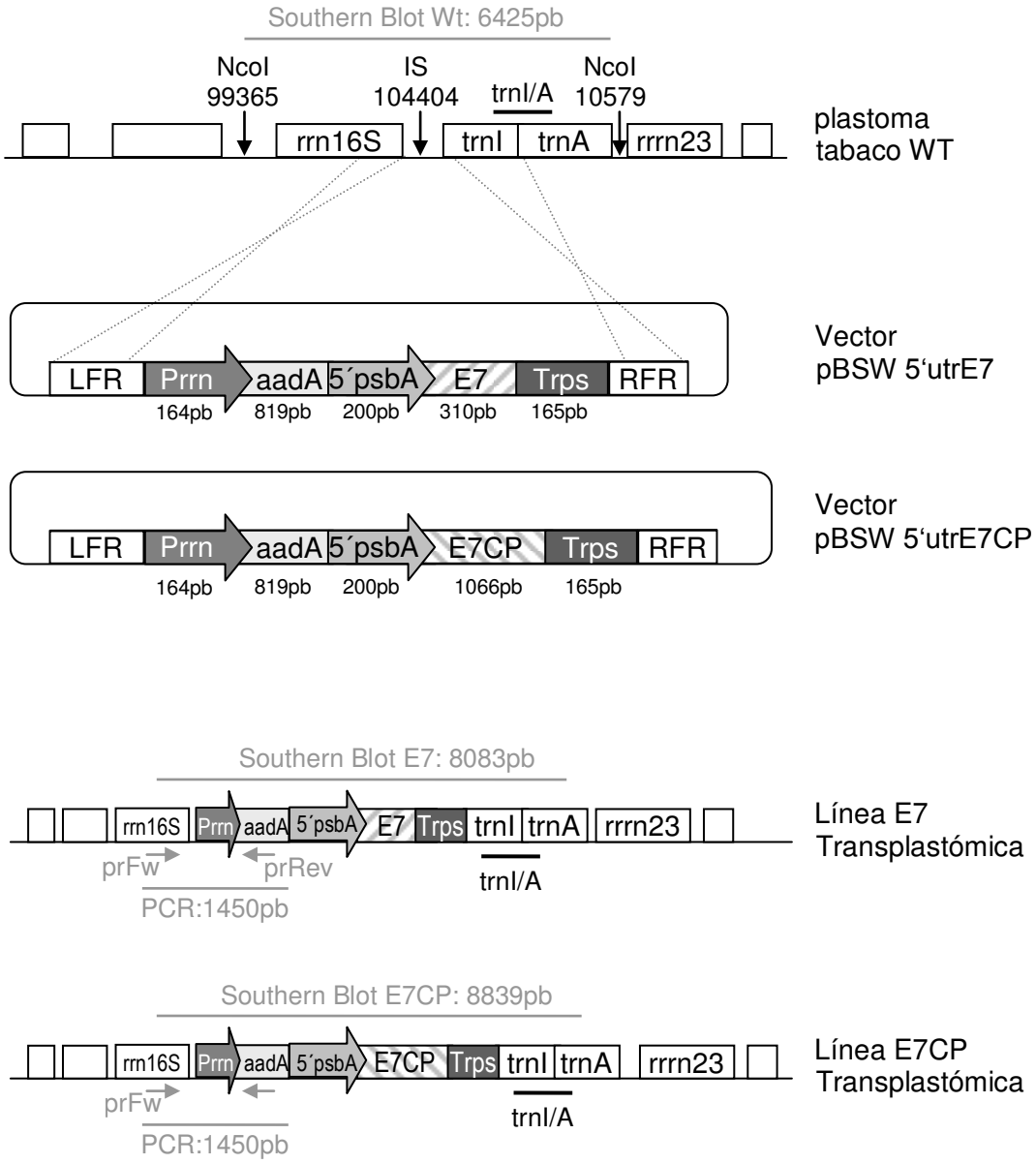



**Figura 1.4: Esquema de la integración de E7 y E7CP en el plastoma de tabaco**

Los vectores de transformación pBSW 5´utrE7 y pBSW 5´utrE7CP presentan las secuencias de ambos transgenes ubicadas río abajo de la secuencia 5´ del gen psbA (5′psbA). Rio abajo de la misma se encuentra la secuencia de terminación región 3´no codificante del gen trps16. La secuencia aadA se ubica bajo el control del promotor Prrn. Todos los transgenes se encuentran entre la región flanqueante izquierda (LFR) y la región flanqueante derecha (RFR). IS: sitio de inserción de los transgenes. rrn23: secuencia codificante de la subunidad 23S de los rRNA. TrnI/A: Sonda utilizada para los ensayos de Southern blot. Las flechas horizontales indican la posición de los primers utilizados para los análisis de PCR.

**(figura 1.5 A)**. Las mismas fueron sometidas a dos o tres rondas adicionales de regeneración en presencia de espectinomicina antes de ser rusticadas para obtener semillas con el fin de alcanzar la homoplastía **(figura 1.5 B)**. Las plantas germinadas a partir de estas semillas fueron utilizadas en los análisis posteriores.

El fenotipo de las plantas correspondientes a las 6 líneas resistentes a espectinomicina resultó indistinguible del fenotipo de plantas de tabaco control **(figura 1.5 C)**.

## Integración de E7 y E7CP

La integración del transgén y la homoplastía de las líneas transplastómicas fueron evaluadas mediante la técnica de *Southern blot*. El ADN extraído de hojas fue cortado con la enzima de restricción *NcoI* capaz de reconocer dos sitios de corte que flanquean el sitio de inserción posicionados uno río arriba de la región de recombinación izquierda (3' rrn16S) y el otro río abajo de la región de recombinación derecha (trnI-3'trnA) respectivamente **(figura 1.4)**. En los plastomas *wild type* digeridos de esta forma, el sitio de recombinación queda incluido en un fragmento de 6,4kpb mientras que en los plastomas transformados con E7 y E7CP el fragmento específico muestra un tamaño mayor de 8kpb y 8,7kpb, respectivamente.

Ningún transgén presenta sitios de restricción reconocidos por la enzima *NcoI.* El ensayo de *Southern blot* fue revelado con la sonda trnI/A correspondiente a la región flanqueante derecha. Este análisis confirmó los resultados previamente obtenidos por PCR confirmando la integración de los elementos transgénicos en tres líneas independientes para cada construcción. Asimismo, la ausencia de la banda de 6,4kpb asociada al genoma *wild type* en las seis líneas transplastómicas revela la homoplastia alcanzada en las plantas provenientes de las semillas obtenidas luego de las rondas de regeneración sucesivas en presencia del agente selector **(figura 1.6 A)**.

Posteriormente la misma membrana fue revelada con la sonda E7. Esta sonda hibrida únicamente con plastomas transformados con el gen del VPH. La presencia de una señal específica exclusivamente en las líneas transplastómicas confirmó la integración del transgén en los plastomas de las seis líneas mencionadas **(figura 1.6 B)**.

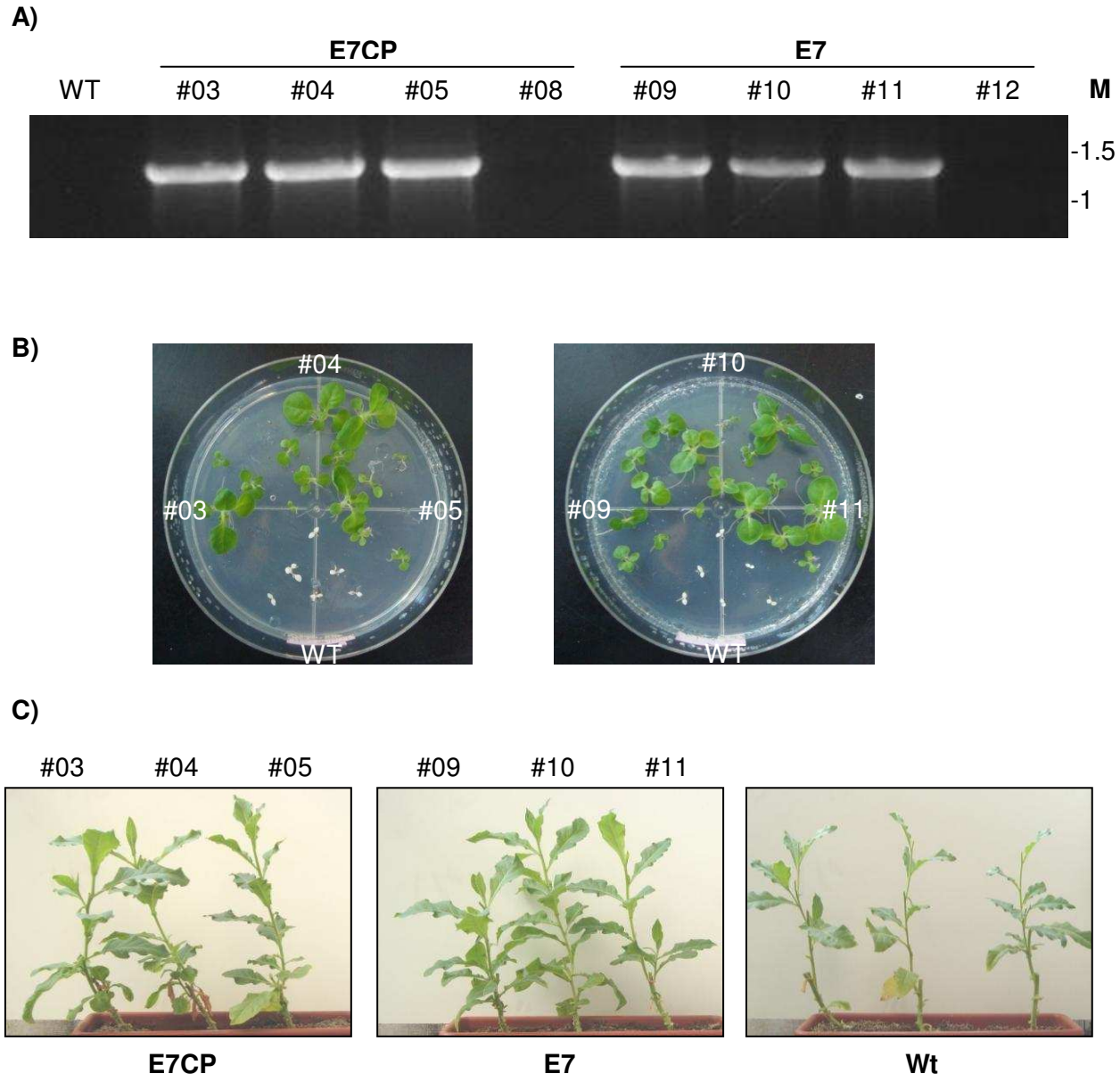



**Figura 1.5: Características genotípicas y fenotípicas de las líneas E7 y E7CP**

A) Análisis mediante PCR de las plantas transplastómicas: ADN de las plantas obtenidas con las distintas construcciones (pBSW 5´utr E7CP: #03, #04, #05, #08;r pBSW 5´utr E7: #09, #10, #11, #12) fue utilizado como molde en una PCR con los primers pr 5´Fw y pr3´Rev. M: marcador de PM en kpb. El producto de amplificación de 1450pb corresponde a las líneas transplastómicas. Las plantas 08 y 12 resultaron ser mutantes no transformadas, espontáneamente resistentes a espectinomicina.

B) Semillas prevenientes de las plantas antes mencionadas fueron germinadas en medio MS con espectinomicina.

C) Fenotipo de las plantas transplastómicas: plantas de tabaco transplastómicas E7 y E7CP (foto tomada 100 días post-germinación).

Wt: control sin transformar

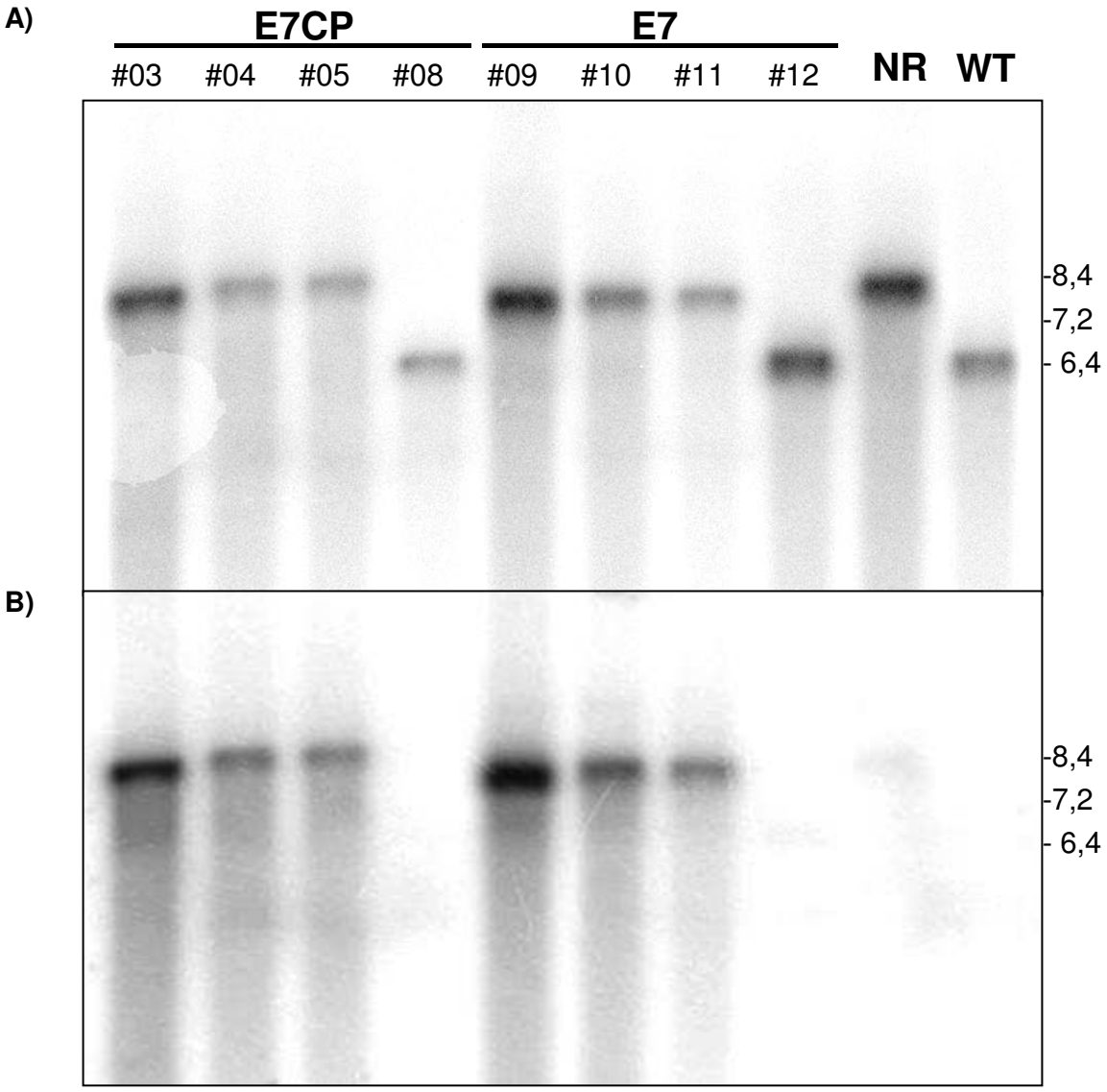



**Figura 1.6: Análisis de la integración de los transgenes E7 y E7CP mediante Southern blot**

El ADN celular total fue digerido con NcoI, resuelto en electroforesis y transferido a una membrana de Nylon, luego fue revelada alternativamente con dos sondas específicas: A) La sonda trnI/A reveló una banda de 6,4kpb en los plastomas no transformados (NT, #08, #12), de 8,8kpb en las líneas E7CP (#03, #04 y #05) y de 8,1kpb en las líneas E7 (#09, #10 y #11). B) La sonda E7 reveló únicamente las bandas correspondientes a las líneas transplastómicas E7CP (#03, #04 y #05) y E7 (#09, #10 y #11). NR: línea transplastómica control no relacionada con E7. La posición de los marcadores de PM correspondientes a ADN del fago λ cortado con BstEII se muestra a la derecha.

## Transcripción de E7 y E7CP

La transcripción del gen E7 y de la fusión E7CP fue confirmada por análisis de *northern blot* a partir del ARN total extraído de hojas de las distintas líneas obtenidas. Los transcriptos específicos fueron detectados mediante hibridación con la sonda E7 correspondiente a la secuencia de este gen **(figura 1.7 A)**. En las líneas transformadas con el vector pBSW-utrE7 (#09, #10 y #11), se observaron tres tipos de transcriptos. El de menor tamaño (475b), corresponde al monocistrón de E7 regulado por el promotor psbA. El bicistrón de tamaño intermedio (1500b) bajo control del promotor *Prrn* incluye las secuencias de E7 y la de *aadA*. El tercer transcripto, con un tamaño aproximado de 3150b incluye, además de los genes antes mencionados, el rARN 16S y se encuentra bajo el promotor *Prrn* endógeno. En el caso de las líneas transformadas con el vector pBSW-utrE7CP (#03, #04 y #05) también se observaron tres tipos de transcriptos conteniendo E7 con los mismos elementos antes mencionados más el gen CP fusionado a E7 **(figura 1.7 B)**. La adición de CP redundó en un tamaño mayor para los tres transcriptos correspondiente a las 750b del gen de la cápside viral del PVX. Además de los tres transcriptos principales también es posible observar bandas de menor intensidad correspondientes a procesamientos indeterminados de los ARNm y/o a sitios alternativos para el inicio o finalización de la transcripción.

La intensidad de las bandas correspondientes a los tres transcriptos específicos observados en las tres líneas transformadas con la fusión E7CP fue notablemente menor a las bandas observadas en las líneas transformadas con E7. Esta diferencia no se debe a diferencias en la carga. En el control de carga se observa la imagen de la fluorescencia correspondiente al rRNA ribosomal teñido con bromuro de etidio en cada una de las calles del gel previo a la transferencia a la membrana.

Ni en las plantas no transformadas (NT) ni en los escapes (#08 y #12) se observaron transcriptos específicos conteniendo la secuencia de E7 en consonancia con las características esperadas para las plantas carentes del transgén.

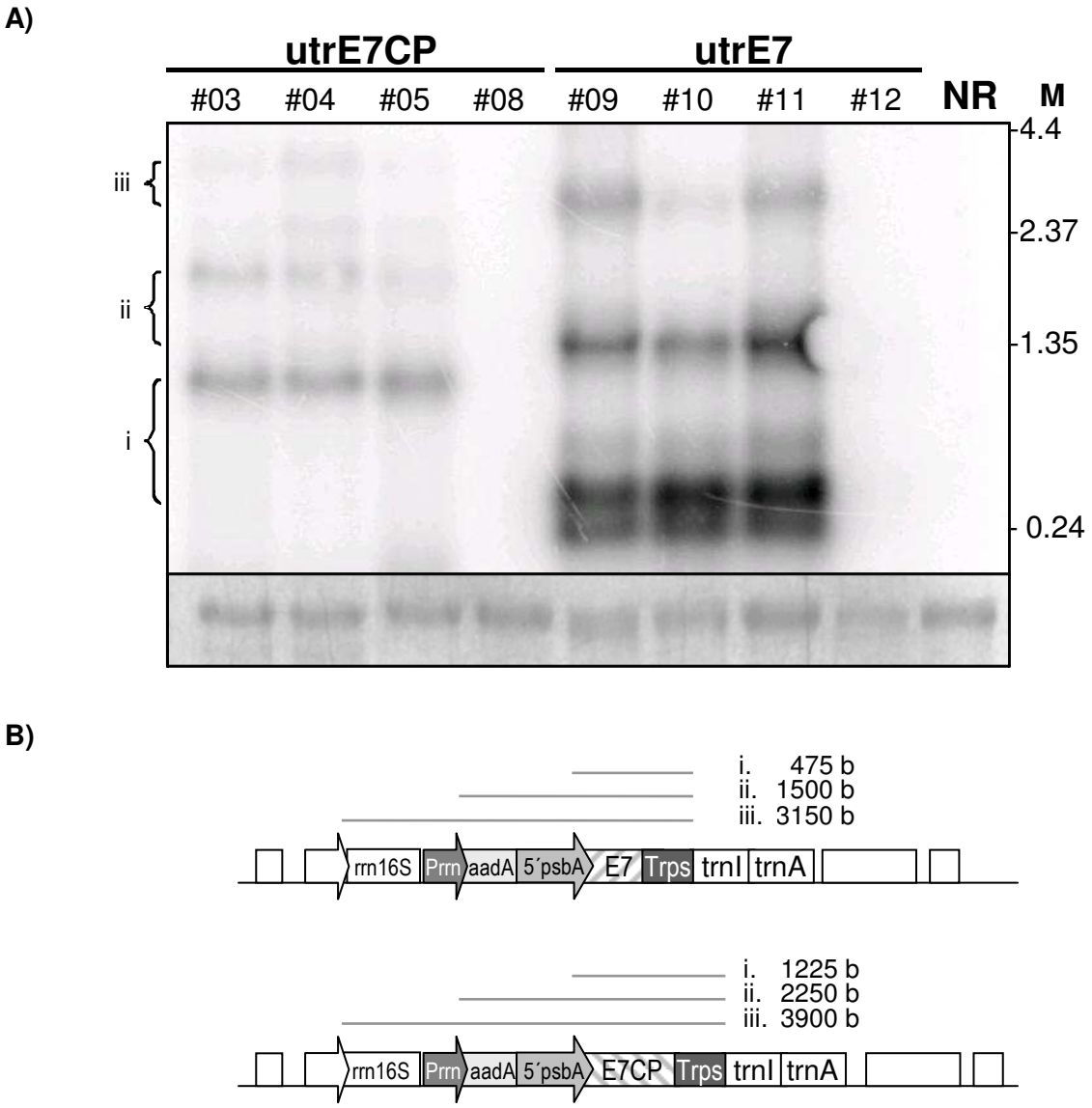



**Figura 1.7: Análisis de la transcripción de E7 y E7CP mediante northern blot**

El ARN celular total fue resuelto en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes y transferido a una membrana de Nylon, luego fue revelada con la sonda correspondiente a la secuencia de E7.

A) Northern blot de plantas transformadas con pBSW 5´utrE7CP y pBSW 5´utrE7. La referencia de carga se muestra abajo. NR: línea trasnplastómica control no relacionada con E7. M: RNA marker (Invitrogen, USA).

B) Mapa de los transcriptos esperados en cada caso. (i) transcripto monocistrónico bajo control del promotor PpsbA. (ii) transcripto bicistrónico bajo control del promotor Prrn localizado río arriba del gen aadA. (iii) transcripto tricistrónico bajo control del promotor endógeno Prrn16. E7CP (#03, #04 y #05) y E7 (#09, #10 y #11).

## Expresión de E7 y E7CP

Se estudió la expresión de E7 y E7CP en las líneas de tabaco transformadas, analizando la presencia de la proteína mediante *western blot.* Las proteínas totales extraídas de hojas de cada una de las líneas transplastómicas fueron sometidas a SDS-PAGE 15% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron reveladas con el anticuerpo monoclonal anti E7 como primer anticuerpo. Los resultados correspondientes a las líneas #09, #10 y #11 mostraron una banda con el tamaño esperado para la proteína E7 (**figura 1.8 A)**. La banda de 17kDa de PM aparente es mayor al PM real de E7 (11kDa). De acuerdo a la bibliografía, esta diferencia es propia de un patrón de corrida distorsionado característico de E7 (Armstrong *et al.*, 1993). La presencia de la banda específica indica que el sistema es capaz de expresar la proteína recombinante E7 sin la necesidad de estar fusionada a otro polipéptido.

Por otro lado en las calles correspondientes a las plantas transformadas con el vector pBSW-utrE7CP (#03, #04 y #05) se observó una banda de 37kDa, tamaño esperado para la proteína de fusión además de una banda de peso molecular menor correspondiente a un producto de proteólisis. En este caso la intensidad de las bandas de E7CP observadas resultó claramente mayor que la observada en las bandas correspondientes a E7, indicando que la fusión a la proteína de cápside del PVX ayudó a estabilizar a E7 incrementando los niveles de expresión de la proteína de fusión.

Además de las bandas específicas para E7 y E7CP se observan agregados de mayor peso molecular. Estos agregados resistentes al tratamiento desnaturalizante por calor y SDS responden a interacciones características de E7 previamente descriptas por la bibliografía (Franconi *et al.*, 2002).

Los niveles de expresión de proteína recombinante en las líneas transplastómicas fueron determinados mediante el ensayo de ELISA (**figura 1.8 B)**. La cuantificación arrojó 0,1% para E7 y 0,5% para E7CP respecto de la proteína soluble total (PST). Estos valores resultan consistentes con lo observado en el ensayo de *Western blot*.

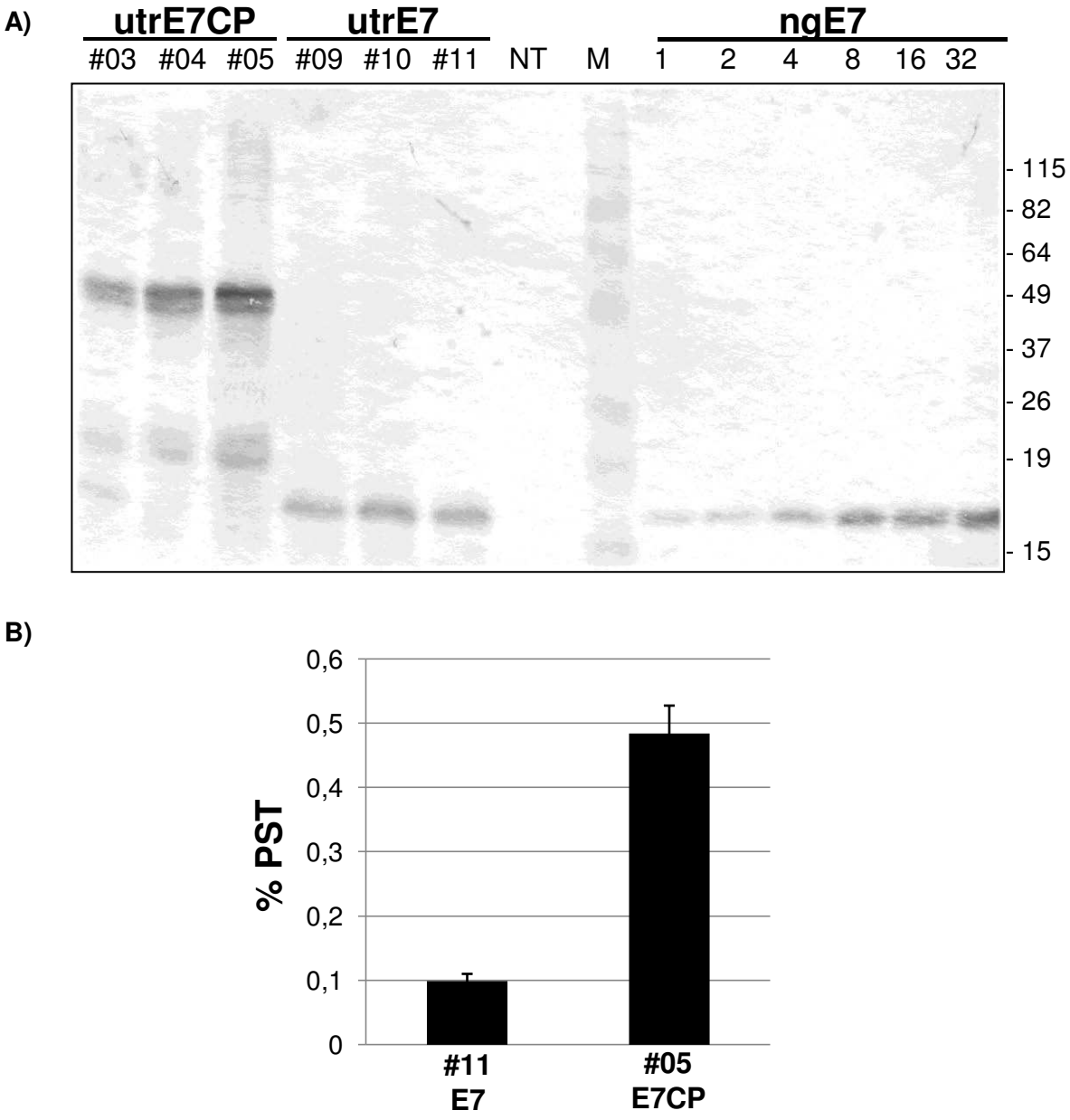



**Figura 1.8: Análisis de la expresión de E7 y E7CP mediante western blot y ELISA**

A) Extractos de proteínas totales de hojas fueron resueltos en SDS-PAGE y transferidos a una membrana de nitrocelulosa, luego revelada con anticuerpo monoclonal anti-E7. (03, 04, 05): líneas transplastómicas E7CP. (09, 10, 11): líneas transplastómicas E7. (NT): control no transformado. M: marcador de peso molecular (Benchmark, Invitrogen USA). ngE7: distintas cantidades (nanogramos) de proteína E7 purificada sembrada en cada calle como referencia.

B) Se grafican los niveles de expresión de E7 para las líneas #11 (E7) y #05 (E7CP). Las determinaciones se realizaron sobre extractos proteicos totales de hojas mediante la técnica de ELISA, utilizando antiE7 como primer anticuerpo. Los valores son el promedio de seis mediciones para cada planta. Las barras representan el desvío estándar (DS) para cada medición. %PST: porcentaje de E7 respecto de las proteínas solubles totales en hoja.

## *Conclusiones Capítulo I*

El principal objetivo en esta primera parte fue introducir la secuencia del gen de la proteína E7 del virus del papiloma humano en el plastoma de tabaco con el fin de expresar el antígeno inmunoterapéutico. Los resultados mostraron la capacidad del sistema plastídico para expresar exitosamente el antígeno recombinante. La fusión del gen del VPH con el correspondiente al de cápside del virus X de papa había sido propuesta para mejorar la respuesta inmunológica (Massa *et al.*, 2007) en vacunas a ADN. En contraste con los resultados obtenidos para las vacunas ADN de E7CP, en este trabajo se observó que la fusión a la CP aumenta los niveles de expresión de la proteína recombinante. Este aumento no se debe a una mayor tasa de transcripción por parte de E7CP ni a una menor estabilidad del transcripto de E7 ya que los niveles de este último resultan comparativamente mayores de acuerdo a los resultados obtenidos por *northern blot*. Dado que ambos transcriptos comparten la misma secuencia río arriba del codón de inicio de la traducción (región 5´UTR del gen psbA) y rio abajo del mismo (secuencia codificante de E7), podemos concluir que la velocidad y la tasa de inicio de la traducción no estarían relacionadas con la mayor acumulación de la proteína de fusión. Los mayores niveles de expresión de la proteína E7CP respecto de E7 podemos atribuirla entonces a la capacidad del péptido CP fusionado al extremo carboxi-terminal de E7 de aumentar la estabilidad de este último.

En conjunto, los resultados de esta primera parte sugieren que plantas de tabaco transformadas genéticamente a nivel de sus plastomas pueden ser potenciales fuentes de antígeno E7 como principio activo de una vacuna inmunoterapéutica. En particular, la fusión a péptidos estabilizantes como la cápside del virus X de la papa emerge como una estrategia promisoria para incrementar los niveles de expresión de proteínas recombinantes inestables en el cloroplasto. En este sentido, si bien los niveles de expresión de E7 alcanzados resultan superiores a los observados en plantas transformadas a nivel nuclear (Franconi *et al.*, 2002), resulta necesario explorar distintas alternativas con el fin de optimizar la acumulación de proteínas relativamente inestables en esta organela. Con este objetivo, además de la fusión a péptidos estabilizantes se han postulado diversas estrategias complementarias como el direccionamiento hacia el lumen tilacoidal, la coexpresión de chaperonas, la eliminación de proteasas específicas y la optimización del uso de codones (Maliga, 2004). Esta última estrategia, exitosa en la transformación a nivel nuclear, no ha mostrado demasiado éxito a nivel plastídico (Daniell *et al.*, 2009).

# *CAPÍTULO II*

## *Introducción Capítulo II*

La experiencia acumulada hasta el momento con plantas transplastómicas indica que cada proteína heteróloga alcanza niveles de expresión muy variables e impredecibles (Bock *et al*., 2010; Rybicki, 2010). Los trabajos previos de nuestro laboratorio utilizando el vector pBSW 5´utr permitieron verificar dicha variabilidad logrando desde un 0,05% de la PST para el caso del factor de crecimiento epitelial humano (Wirth *et al*., 2006) hasta superar el 40% de la PST para la enzima β-glucuronidasa de *E. coli* (Segretin *et al*., 2011). En principio, las diferencias en la acumulación de cualquier proteína expresada en cloroplasto se encuentran condicionadas por la tasa de transcripción del transgén, la estabilidad del ARN mensajero, la traducibilidad de este último y la estabilidad del polipéptido correspondiente. En general es aceptado que la regulación de la expresión de genes plastídicos ocurre esencialmente a nivel postranscripcional (Deng *et al*., 1987). En particular, la expresión superior de la proteína de fusión E7CP, respecto a la expresión de E7 y teniendo en cuenta que el transcripto más abundante es el correspondiente a E7, demuestra que al menos en este caso el factor limitante es la estabilidad del péptido.

La comprensión y prevención de la degradación de proteínas recombinantes en plantas constituyen un foco de interés creciente en el campo del uso de las plantas como biorreactores (Benchabane *et al*., 2008). La fusión de péptidos capaces de estabilizar la proteína heteróloga de interés resulta una estrategia recurrente para mejorar la acumulación de proteínas de vida media corta en células vegetales (Hondred *et al*., 1999; Muto *et al*., 2009; Patel *et al*., 2007; Van Rooijen *et al*., 1995). También ha sido utilizada para aumentar la expresión plastídica de polipéptidos heterólogos (Gray *et al*., 2009; Sanz-Barrio *et al*., 2011). En nuestro laboratorio, la expresión del epítope antigénico VP1 del virus de la fiebre aftosa fusionado a la enzima β-glucuronidasa en cloroplastos de tabaco permitió obtener niveles de expresión extraordinarios, superiores al 50% de la PST (Lentz *et al*., 2010).

En la segunda parte de este trabajo, nos propusimos entonces mejorar los niveles de expresión de E7 mediante la fusión a una proteína altamente estable en el entorno plastídico como es la enzima β-glucuronidasa (GUS). En particular, nuestro objetivo fue expresar en el cloroplasto proteínas de fusión carboxi-terminal (E7GUS) y amino-terminal (GUSE7) con el fin de comparar los niveles de expresión en cada caso.

# *Resultados Capitulo II*

## Diseño de las construcciones pBSW 5´utr E7GUS y pBSW 5´utr GUSE7

El plásmido pBSW 5´utr E7GUS se diseñó para codificar en un marco continuo de lectura la secuencia E7 del virus del papiloma humano río arriba del gen *uid-A* correspondiente a la enzima β-glucuronidasa (GUS).

Las secuencias de E7 (310 pb) y GUS (1810 pb) se obtuvieron mediante amplificación por PCR **(figura 2.1)**. En el primer caso se utilizó el plásmido pGem E7 como molde y los *primers* específicos pr5´E7 Nde - pr3´E7 Hind, subclonándose el fragmento obtenido en el plásmido pZeR0. La secuencia correspondiente al gen GUS se amplificó utilizando el vector pBI121 como molde y los oligonucleótidos 5´GUS Hind - 3´GUS Xba como *primers*. El producto de amplificación fue subclonado en el vector pGem. Luego, el inserto obtenido a partir de la digestión de pZeR0 E7 con las enzimas *NdeI* y *HindIII* se insertó río arriba del gen GUS entre los sitios correspondientes del plásmido pGemGUS. Finalmente el fragmento E7GUS proveniente de la digestión de pGemE7GUS con *NdeI* y *Xba* fue clonado en el plásmido pBSW 5´utr digerido con las mismas enzimas para obtener el vector de transformación pBSW 5´utr E7GUS.

El plásmido pBSW 5´utr GUSE7 se diseño para codificar en un marco continuo de lectura la secuencia de GUS río arriba de E7 **(figura 2.2)**. La secuencia de E7 se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando el plásmido pGem E7 como molde y los *primers* específicos pr5´E7 Hind - pr3´SP6, subclonándose el fragmento obtenido en el plásmido pZeR0. La secuencia correspondiente al gen GUS se amplificó utilizando el vector pBI121 como molde y los oligonucleótidos 5´GUS Nde - 3´GUS Hind como *primers*. El producto de amplificación fue subclonado en el vector pZeR0. Luego, el inserto obtenido a partir de la digestión de pZeR0 E7 con las enzimas *HindIII* y *XbaI* se insertó río abajo del gen GUS entre los sitios correspondientes del plásmido pZeR0 GUS. Finalmente el fragmento GUSE7 proveniente de la digestión de pZeR0 GUSE7 con *NdeI* y *Xba* fue clonado en el plásmido pBSW 5´utr digerido con las mismas enzimas para obtener el vector de transformación pBSW 5´utr GUSE7.

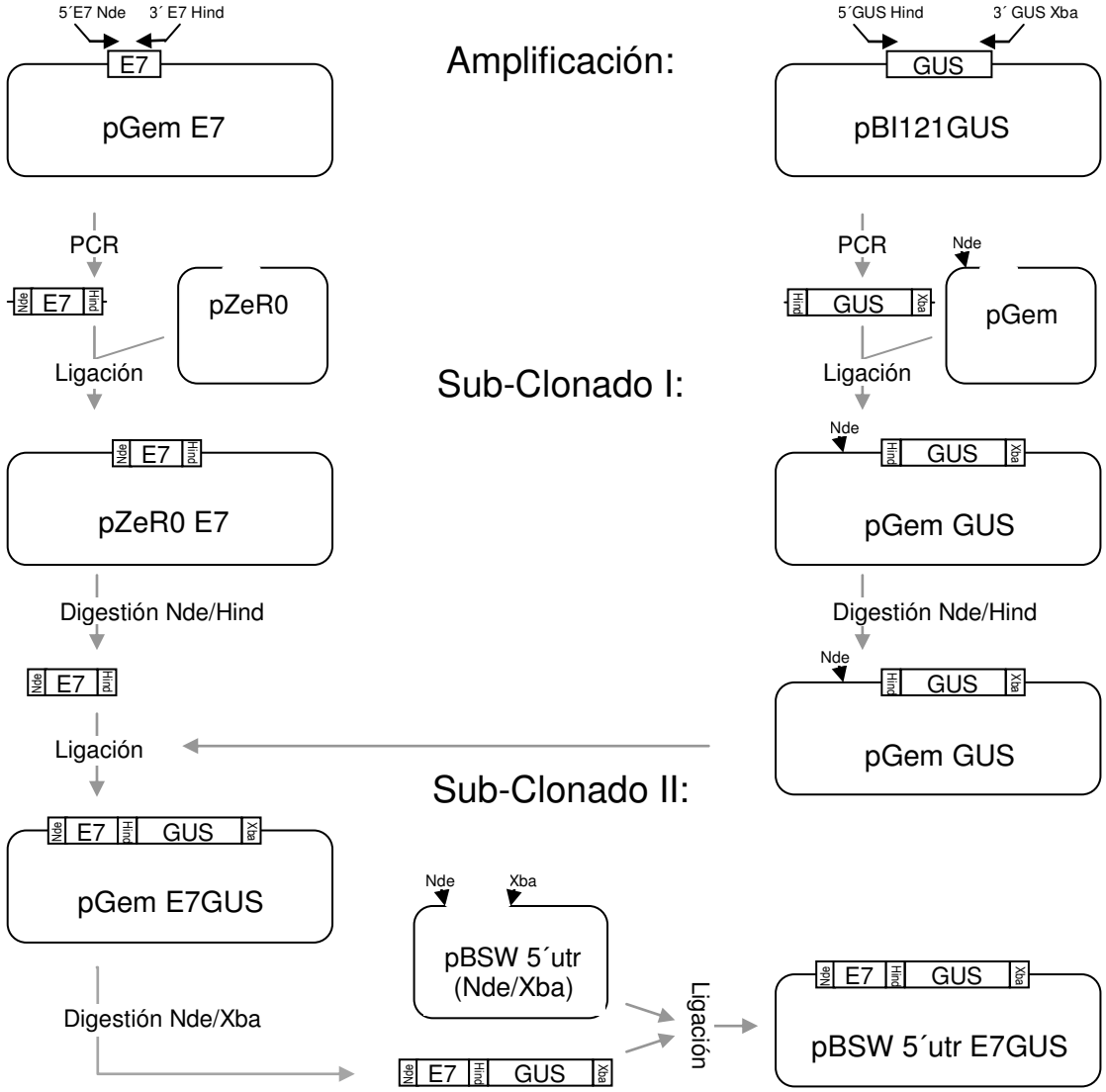



**Figura 2.1: Construcción del vector pBSW 5´utr E7GUS.**

La secuencia de E7 (305 pb) flanqueada por los sitios NdeI y HindIII se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando el plásmido pGemE7 como molde y primers específicos: pr5´E7 Nde – pr3´E7 Hind. Paralelamente se amplificó el inserto correspondiente a GUS flanqueado por los sitios HindIII y XbaI (1830pb), utilizando al vector pBI121 como molde y los primers específicos pr5´GUS Hind – pr3´GUS Xba. Los productos de amplificación fueron respectivamente sub-clonados en los vectores pZeR0 2 y pGemT. Los plásmidos así obtenidos fueron digeridos con las enzimas NdeI y HindIII con el fin de subclonar el fragmento Nde E7 Hind (291pb) en el plásmido pGemGUS obteniendo en un marco continuo, la secuencia de E7 del virus del papiloma humano río arriba del gen de la β-Glucuronidasa (GUS) de E. coli. El plásmido pGem E7GUS fue cortado con las enzimas NdeI y XbaI y el fragmento resultante Nde E7GUS Xba (2120pb) fue clonado en el vector de transformación digerido con las mismas enzimas para obtener el vector pBSW 5´utr E7GUS (8655pb).

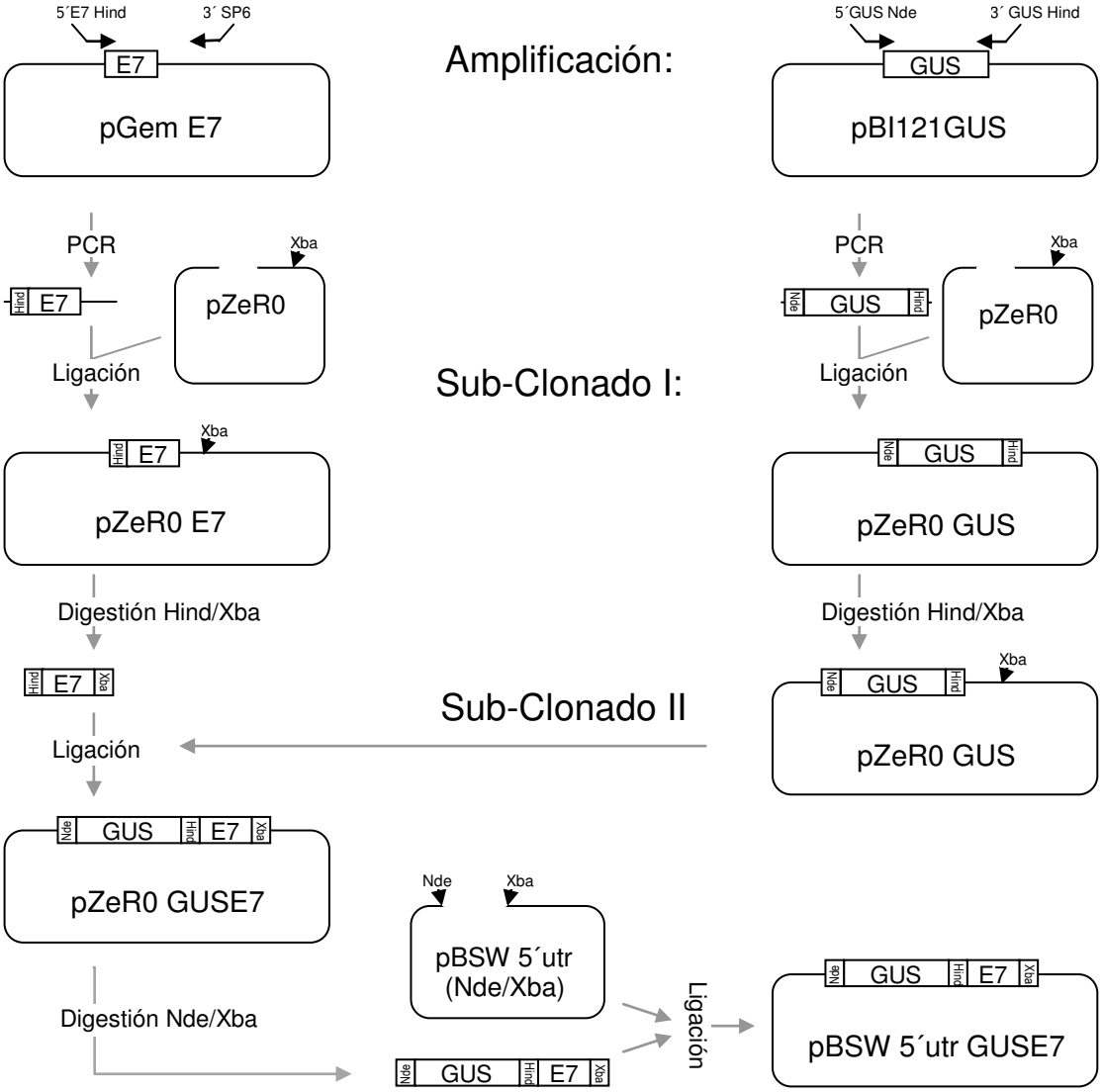



**Figura 2.2: Construcción del vector pBSW 5´utr GUSE7.**

La secuencia Hind E7 SP6 (408 pb) se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando el plásmido pGemE7 como molde y primers específicos: pr5´E7 Hind y pr3´SP6. Paralelamente se amplificó el inserto correspondiente a Hind GUS Xba (1850pb), utilizando al vector pBI121 como molde y a los primers específicos pr5´GUS Nde – pr3´GUS Hind. Los productos de amplificación fueron subclonados en pZeR0 2. Los plásmidos así obtenidos fueron digeridos con las enzimas Hind III y XbaI con el fin de subclonar el fragmento Hind E7 Xba (445pb) en el plásmido pZeR0 GUS obteniendo, en un marco continuo, la secuencia de E7 del virus del papiloma humano río abajo del gen de la β-Glucuronidasa (GUS) de E. coli. pZeR0 GUSE7 fue digerido con las enzimas NdeI y XbaI y el fragmento resultante Nde GUSE7 Xba (2250pb) fue clonado en el vector de transformación digerido con las mismas enzimas para obtener el vector pBSW 5´utr E7GUS (8797pb).

La integridad de ambas construcciones se verificó en *E. coli* antes de proceder a la transformación de las células vegetales **(figura 2.3)**. Con este propósito, extractos proteicos de *E. coli* transformada con los plásmidos pBSW 5´utrE7GUS y pBSW 5´utrGUSE7 fueron analizados junto con los controles transformados con pBSW 5´utrE7, pBSW 5´utrE7CP y pBSW 5´utrGUS. Por un lado se realizó un ensayo de actividad β-glucuronidasa utilizando el sustrato histoquímico X-Gluc. Se verificó la actividad de la enzima en cultivos transformados con las construcciones correspondientes a las proteínas de fusión E7GUS y GUSE7 así como en el control positivo transformado con pBSW 5´utr GUS **(figura 2.3 B)**.

Por otro lado, los mismos extractos fueron sometidos a SDS-PAGE y luego analizados mediante la técnica de *western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal contra E7 como primer anticuerpo. La expresión de E7 fue confirmada en las cepas E7GUS y GUSE7 así como en E7CP utilizada como control positivo **(figura 2.3 C)**. Estos resultados confirmaron la integridad de los vectores E7GUS y GUSE7 utilizados luego para la transformación plastídica de *N. tabacum*.

## Transformación de cloroplastos de tabaco con E7GUS y GUSE7

Las líneas transplastómicas E7GUS y GUSE7 fueron obtenidas a partir del bombardeo de hojas de *Nicotiana tabacum cv*. Petit Havana con cada uno de los vectores descriptos. Las plantas regeneradas en presencia del antibiótico selector espectinomicina fueron inicialmente analizadas mediante PCR con el fin de detectar la presencia de secuencias transgénicas utilizando los primers prFw localizado sobre el gen *rrn16* del genoma plastídico y el primer prRev correspondiente a la secuencia del gen *aadA* del vector **(figura 2.4 )**. Utilizando esta metodología se seleccionaron tres plantas obtenidas con cada una de las construcciones **(figura 2.5 A)**.

Las mismas fueron sometidas a tres rondas adicionales de regeneración en presencia de espectinomicina antes de ser rusticadas para la obtención de semillas con el fin de alcanzar homoplastía **(figura 2.5 B)**. Las plantas germinadas a partir de estas semillas fueron sometidas a los análisis posteriores. El fenotipo de las plantas correspondientes a las 6 líneas resistentes a espectinomicina resultó indistinguible respecto del fenotipo de plantas de tabaco *wild type* **(figura 2.5 C)**.

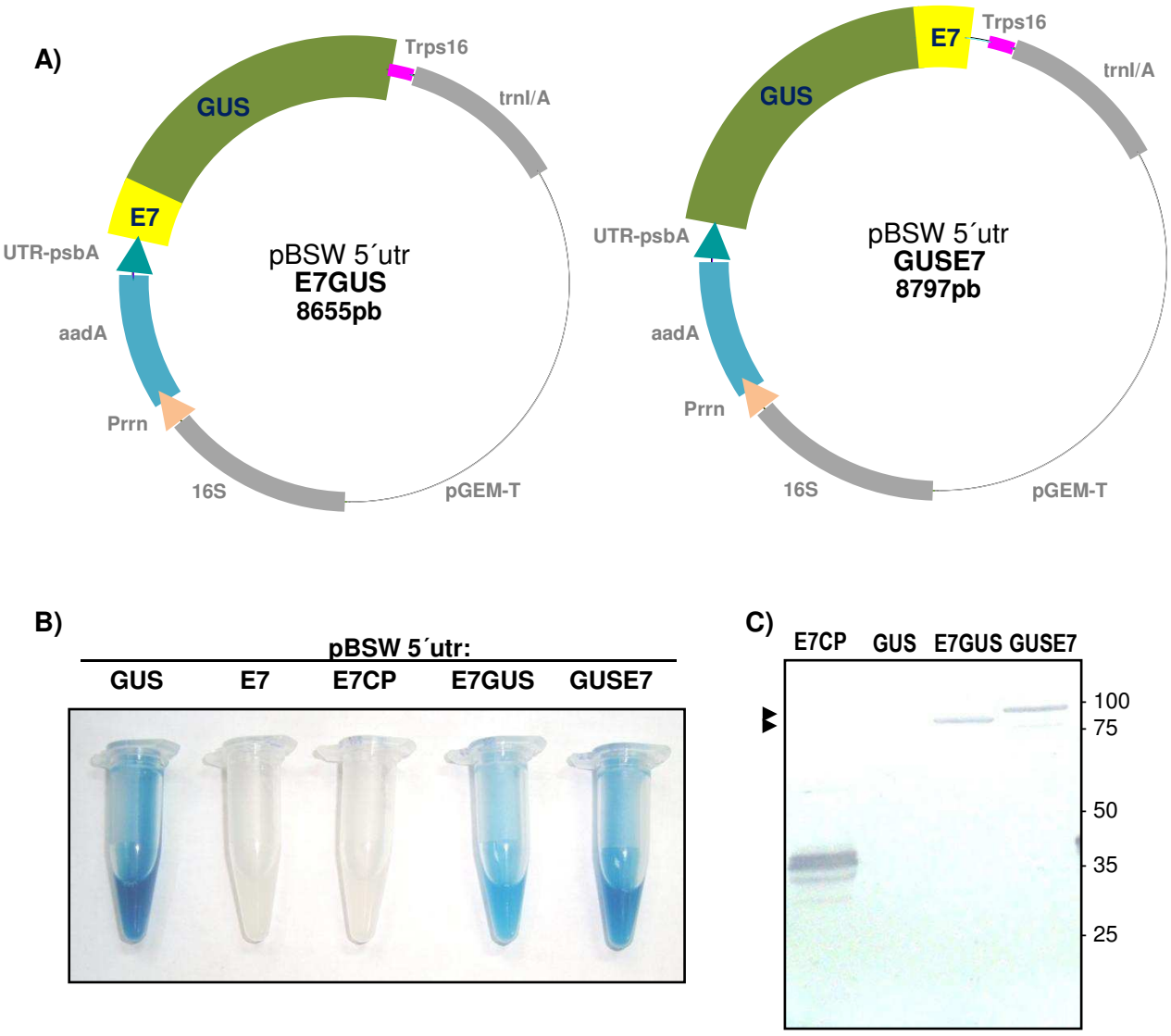



**Figura 2.3: Verificación funcional de pBSW 5´utr E7GUS y pBSW5´utr GUSE7 en E. coli**

A) Esquema de los vectores pBSW 5´utrE7GUS (E7GUS) y pBSW 5´utrGUSE7 (GUSE7).

B) Ensayos de actividad β-Glucuronidasa en cultivos de E. coli correspondientes a bacterias transformadas con los vectores pBSW 5´utrE7GUS (E7GUS) y pBSW 5´utrGUSE7 (GUSE7). GUS: control positivo. E7 y E7CP: controles negativos.

C) Extractos proteicos totales obtenidos a partir de bacterias transformadas con los vectores pBSW 5´utrE7GUS (E7GUS) y pBSW 5´utrGUSE7 (GUSE7) analizados por western blot. Como primer anticuerpo se utilizó un anticuerpo anti E7 monoclonal. A la derecha se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular en kDa (BRP, Promega). Las flechas señalan las bandas correspondientes a E7GUS y GUSE7. GUS: control negativo. E7CP: control positivo.

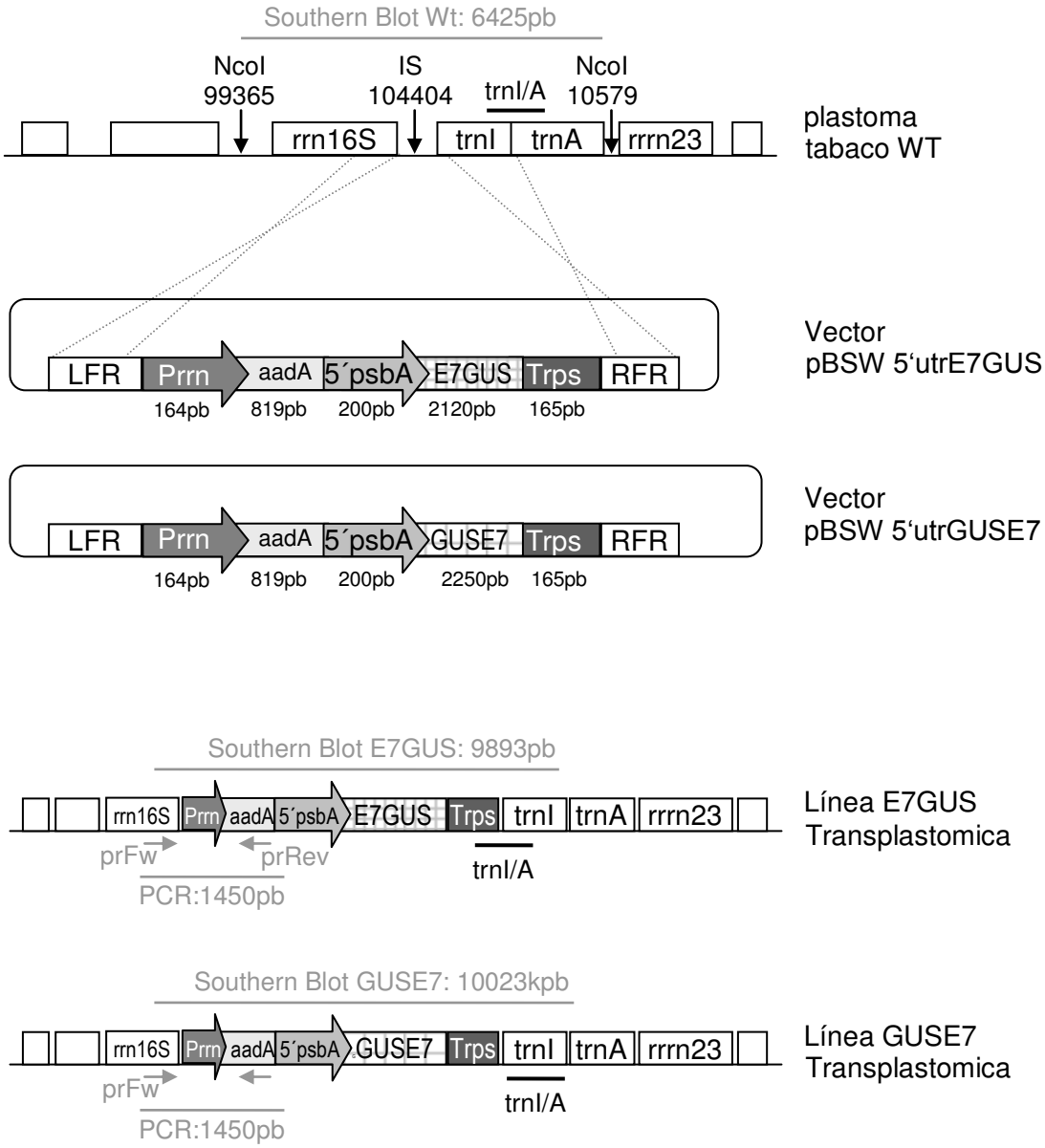



**Figura 2.4: Esquema de la integración de E7GUS y GUSE7 en el plastoma de tabaco.**

Los vectores de transformación pBSW 5´utrE7GUS y pBSW 5´utrGUSE7 presentan las secuencias de ambos transgenes ubicadas río abajo de la secuencia 5´ del gen psbA (5′psbA). Rio abajo de la misma se encuentra la secuencia de terminación del gen trps16. La secuencia aadA se encuentra bajo el control del promotor Prrn. Todos los transgenes se encuentran entre la región flanqueante izquierda (LFR) y la región flanqueante derecha (RFR). IS: sitio de inserción. rrn23: secuencia codificante de la subunidad 23S de los rRNA. trnI/A: Sonda utilizada para los ensayos de Southern blot. Las flechas horizontales indican la posición de los primers utilizados para los análisis mediante la técnica de PCR.

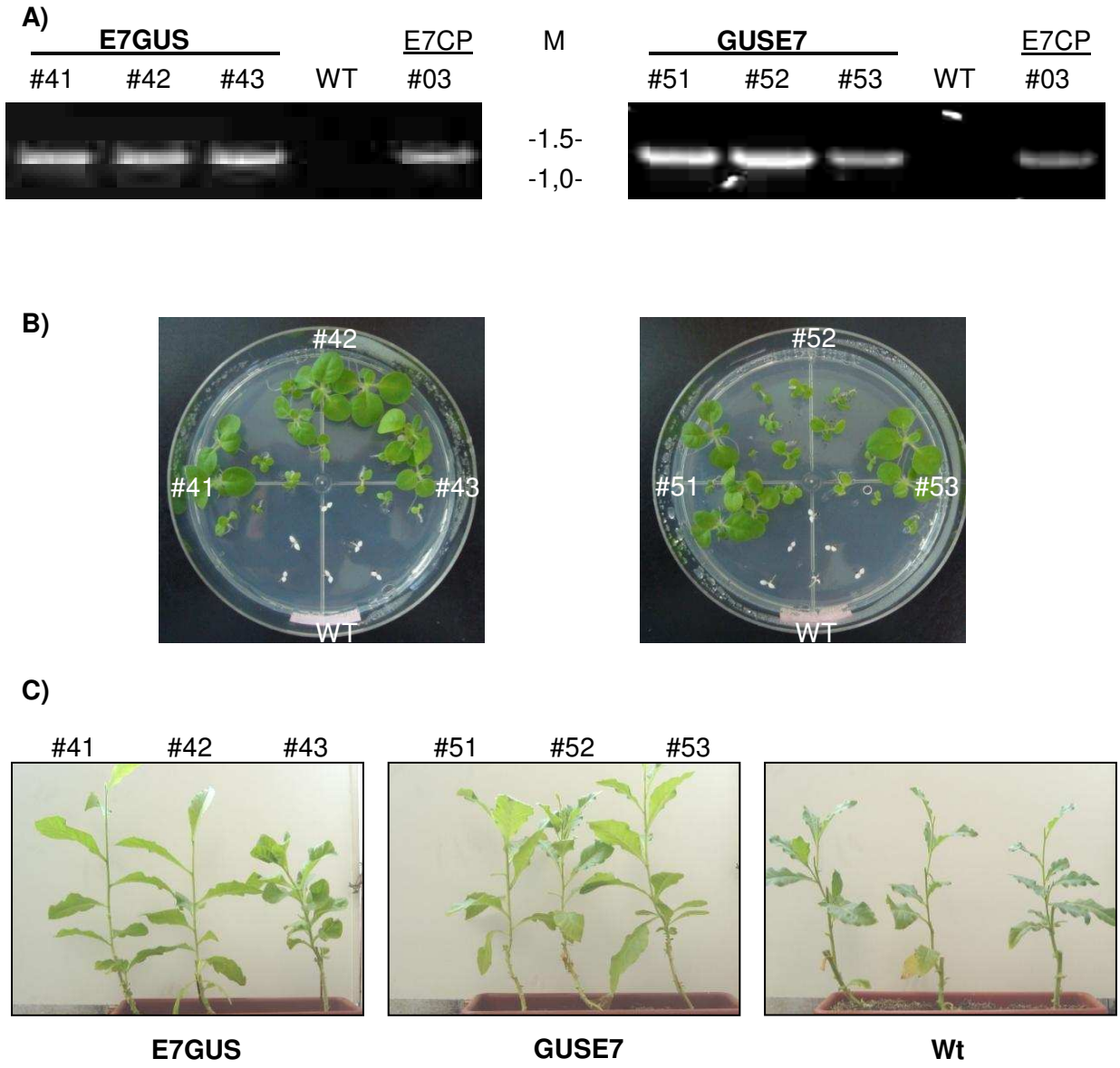



**Figura 2.5: Características genotípicas y fenotípicas de las líneas E7GUS y GUSE7**

A) Análisis mediante PCR de las plantas transplastómicas: ADN de las plantas obtenidas utilizando las distintas construcciones (pBSW 5´utr E7GUS: #41, #42, #43; pBSW 5´utr GUSE7: #51, #52, #53) fue utilizado como molde en una reacción de PCR utilizando los primers pr 5´Fw y pr3´Rev como iniciadores. M: marcador de PM en kpb. El producto de amplificación de 1450pb corresponde a las líneas transplastómicas. E7CP: control positivo

B) Semillas prevenientes de las plantas antes mencionadas germinadas en medio MS con espectinomicina.

C) Fenotipo de las plantas transplastómicas: plantas de tabaco transplastómicas E7GUS y GUSE7 (100 días post-germinación).

Wt: control sin transformar

## Integración de E7GUS y GUSE7

La integración del transgén y la homoplastía de las líneas transplastómicas E7GUS y GUSE7 fueron evaluadas mediante la técnica de *Southern blot*. El ADN extraído de hojas fue cortado con la enzima de restricción *NcoI* capaz de reconocer dos sitios de corte que flanquean el sitio de inserción posicionados uno río arriba de la región de recombinación izquierda (3' rrn16S) y el otro río abajo de la región de recombinación derecha (trnI-3'trnA), respectivamente. En los plastomas *wild type* digeridos de esta forma, el sitio de recombinación queda incluido en un fragmento de 6,4kpb mientras que en los plastomas transformados con E7GUS y GUSE7 el fragmento específico muestra un tamaño mayor de 9,9kpb y 10kpb, respectivamente **(figura 2.6)**.

## Transcripción de E7GUS y GUSE7

La transcripción del gen E7 y de la fusión E7CP fue confirmada por análisis de *northern blot* a partir del ARN total extraído de hojas de las distintas líneas obtenidas. Los transcriptos específicos fueron detectados mediante hibridación con la sonda E7 correspondiente a la secuencia de este gen **(figura 2.7A)**. En las líneas transformadas con el vector pBSW 5`utrE7GUS (#41, #42 y #43), se observaron tres tipos de transcriptos principales. El de menor tamaño (2250b), corresponde al monocistrón de E7GUS regulado por el promotor *psbA.* El bicistrón de tamaño intermedio (3300b), bajo control del promotor *Prrn* incluye la secuencia de E7GUS y la de *aadA*. El tercer transcripto, con un tamaño aproximado de 4950b incluye además de los genes antes mencionados, el rARN 16S y se encuentra bajo el promotor *Prrn* endógeno. En el caso de las líneas transformadas con el vector pBSW 5´utr GUSE7 (#51, #52 y #53) también se observaron tres tipos de transcriptos conteniendo GUSE7 con los mismos elementos antes mencionados **(figura 2.7B)**. La intensidad de las bandas correspondientes a los tres transcriptos específicos observados en las tres líneas transformadas con la fusión GUSE7 fue levemente mayor a las bandas observadas en las líneas transformadas con E7GUS.

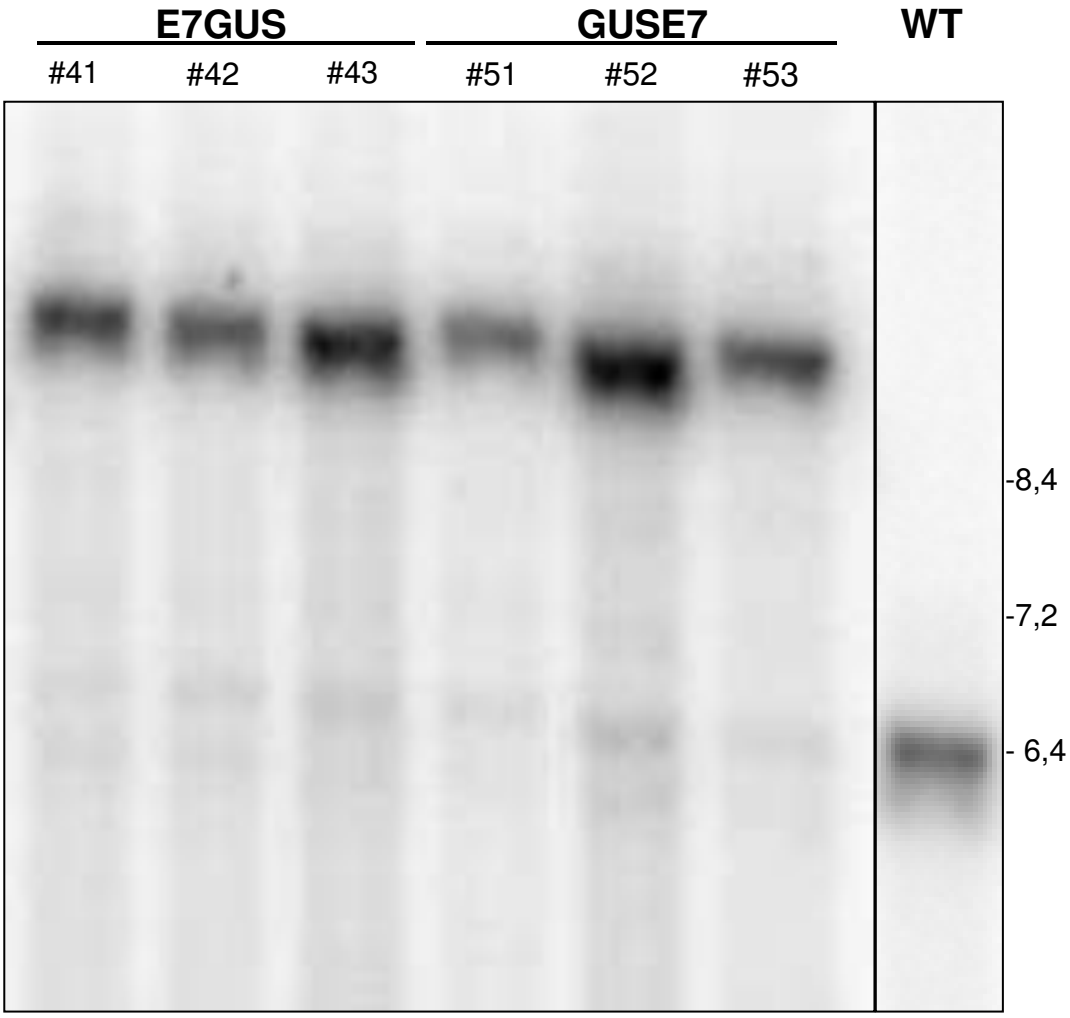



**Figura 2.6: Análisis de la integración de E7GUS y GUSE7 mediante Southern blot**

El ADN celular total fue digerido con NcoI, resuelto mediante electroforesis y transferido a una membrana de Nylon para ser revelada. La sonda trnI/A reveló una banda de 6,4kpb en los plastomas wild type (WT), de 9,9kpb en las líneas E7GUS (#41, #42 y #43) y de 10kpb en las líneas GUSE7 (#51, #52 y #53). La posición de los marcadores de PM , ADN del fago λ cortado con BstEII se muestra a la derecha.

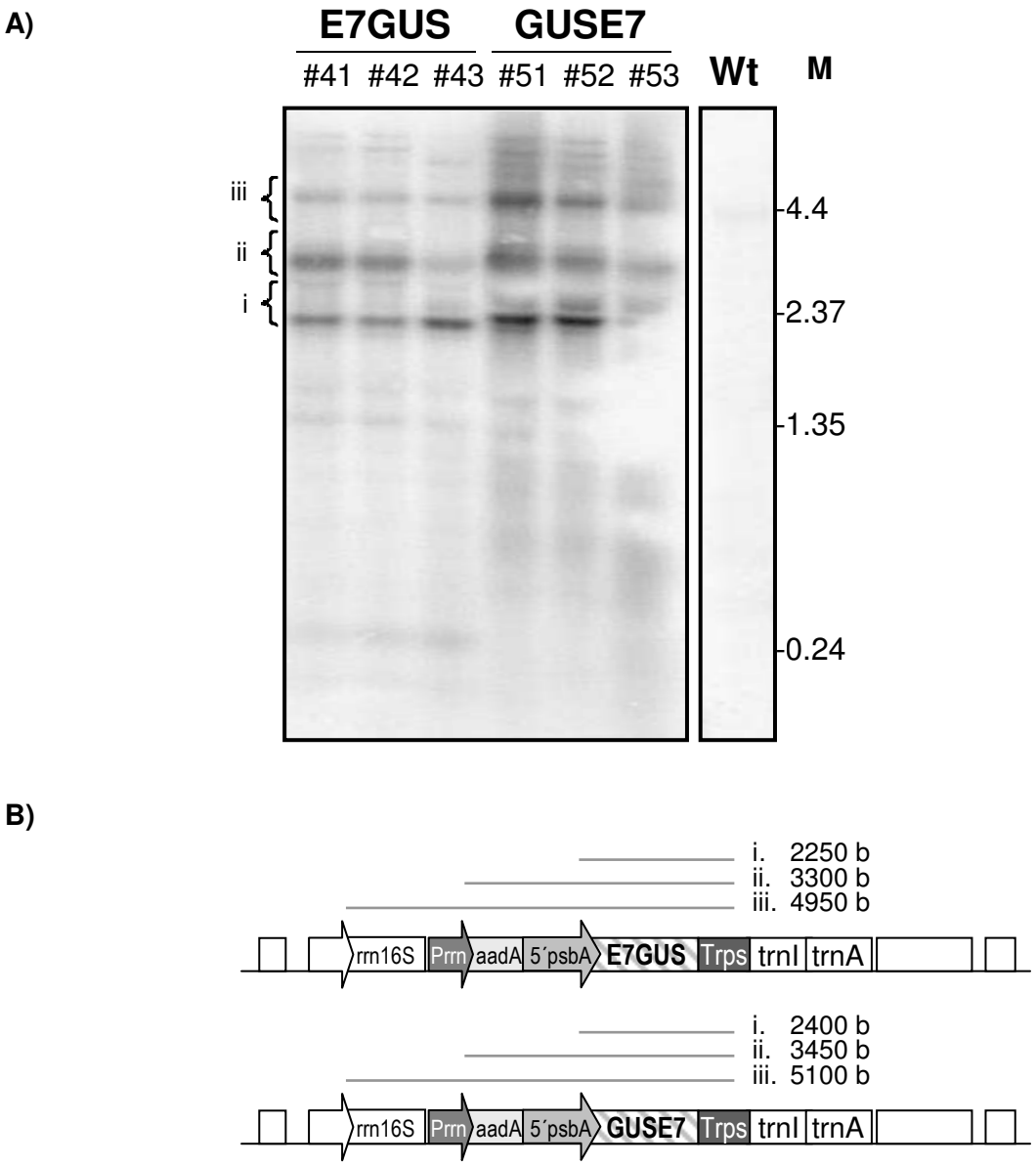



**Figura 2.7: Análisis de la transcripción de E7GUS y GUSE7 mediante northern blot**

El ARN celular total fue resuelto bajo condiciones desnaturalizantes y transferido a una membrana de Nylon para ser luego revelada con la sonda correspondiente a la secuencia de E7.

A) Ensayo de northern blot de las plantas transformadas con pBSW 5´utrE7GUS y pBSW 5´utrGUSE7. Wt: planta de tabaco no transformada. .M: RNA marker (Invitrogen, USA).

B) Mapa de los transcriptos, se indica el tamaño esperado en cada caso. (i) transcripto monocistrónico bajo control del promotor PpsbA. (ii) transcripto bicistrónico bajo control del promotor Prrn localizado río arriba del gen aada. (iii) transcripto tricistrónico bajo control del promotor endógeno Prrn16. E7GUS (#41, #42 y #43) y GUSE7 (#51, #52 y #53).

## Expresión de E7GUS y GUSE7

La expresión de E7 y E7CP en las líneas de tabaco transformadas, se estudió analizando la presencia de la proteína antigénica mediante *western blot*. Las proteínas totales extraídas de hojas de cada una de las líneas transplastómicas fueron resueltas en un SDS-PAGE 15% y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron reveladas con el anticuerpo monoclonal anti E7 como primer anticuerpo **(figura 2.8 A)**. Los resultados correspondientes a las líneas #41, #42 y #43 mostraron una banda correspondiente a E7GUS con un tamaño aparente mayor al real (80kDa). En el caso de los resultados observados para la líneas #51, #52 y #53, transformadas con GUSE7, la distorsión del patrón de corrida característico de E7 resultó más notoria ya que el tamaño aparente superó los 90kDa. En ambas construcciones se observó una segunda banda de menor peso molecular presumiblemente asociada a un producto de degradación de las proteínas de fusión. La intensidad de las bandas correspondientes a la proteína de fusión observada en las tres líneas transformadas con la fusión GUSE7 fue levemente mayor a las bandas observadas en las líneas transformadas con E7GUS. Paralelamente se comprobó la presencia de actividad β-glucuronidasa en las hojas de las líneas transplastómicas **(figura 2.8 B)**. El ensayo histoquímico arrojó resultados positivos para las seis líneas analizadas verificando la funcionalidad de la enzima fusionada a E7 tanto en su extremo amino-terminal como en el extremo carboxilo-terminal.

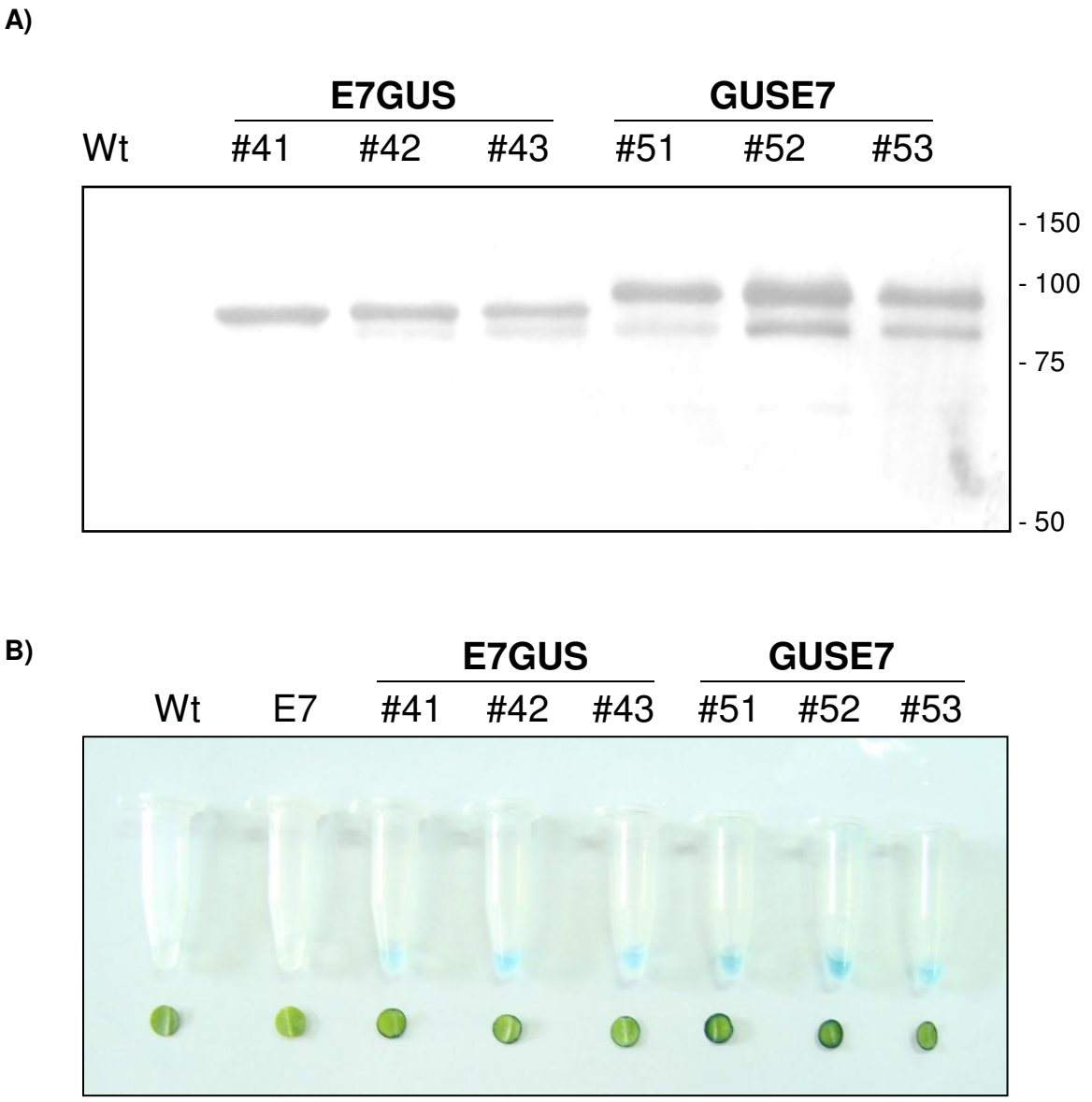



**Figura 2.8: Análisis de la expresión de E7GUS y GUSE7 mediante western blot e histoquímica**

A) Extractos de proteínas totales de hojas fueron resueltas en un SDS-PAGE y transferidos a una membrana de nitrocelulosa luego revelada con anticuerpo monoclonal anti-E7. A la derecha se indican las posiciones del marcador de peso molecular en kDa. (BRP, Promega USA).

B) Ensayos de actividad β-Glucuronidasa en hojas correspondientes a las líneas transplastómicas.

Líneas transplastómicas E7GUS (#41, #42, #43), líneas transplastómicas GUSE7: (#51, #52, #53). (Wt): control negativo correspondiente a una planta no transformada. E7: control negativo correspondiente a una línea transplastómica para E7.

## *Conclusiones Capítulo II*

En este capítulo se exploró la estrategia de fusionar péptidos con capacidad de estabilizar proteínas recombinantes con el fin de aumentar los niveles de expresión de la proteína E7. Con este propósito se escogió la secuencia aminoacídica correspondiente a la enzima β-glucuronidasa. Esta proteína es capaz de acumularse a niveles extraordinariamente altos en el entorno plastídico. Se diseñaron vectores conteniendo a la fusión carboxilo-terminal (E7GUS) y amino-terminal (GUSE7) y se obtuvieron tres líneas transplastómicas homoplásticas para cada una de ellas. La comparación de la acumulación de transcriptos para ambos transgenes no registró mayores diferencias entre sí aunque se observó un nivel ligeramente mayor para el caso de la fusión GUSE7. El análisis de la expresión de cada una de las proteínas recombinantes también mostró niveles similares con una acumulación algo mayor para la fusión GUSE7. Ambas construcciones mostraron niveles de expresión superiores a los alcanzados con E7 y E7CP aunque muy por debajo de los obtenidos en trabajos anteriores con GUS o VP1GUS. Esto estaría indicando que la presencia de GUS estabiliza parcialmente a la proteína de fusión respecto de E7 no fusionada pero al mismo tiempo la presencia de esta última reduce la vida media de GUS en el estroma de los cloroplastos.

Estos resultados sugieren la necesidad de explorar otras estrategias orientadas a optimizar la plataforma de expresión plastídica para el caso de proteínas particularmente inestables como E7.

# *CAPÍTULO III*

## *Introducción Capítulo III*

La ingeniería genética en cloroplastos es un área de investigación y desarrollo que ha reportado avances significativos en los últimos años. Existe particular interés en conocer y predecir los mecanismos plastídicos involucrados en la estabilidad de las proteínas heterólogas ya que suelen ser el factor determinante para el nivel de acumulación de las mismas (Grevich *et al.*, 2005). Sin embargo, el conocimiento de los procesos asociados a la estabilidad e integridad de las proteínas exógenas como la regulación del plegamiento, el direccionamiento y la acumulación, es aún muy limitado.

Las distintas proteínas presentes en el estroma - entre 2000 y 5000 - son capaces de sufrir modificaciones postraduccionales específicas como multimerización (Daniell, 2006), lipidización (Glenz *et al.*, 2006), eliminación de la metionina amino-terminal (Meinnel *et al.*, 2006) y formación de puentes disulfuro (Sanz-Barrio *et al.*, 2011) entre otros procesos que condicionan su conformación y estabilidad. El pH, los iones disponibles, el potencial redox y los ligandos potenciales, también resultan determinantes. En particular existe una maquinaria específica en cada compartimiento celular dedicada al "control de calidad" de las proteínas circundantes. La integridad funcional y la estabilidad de todas las proteínas involucran reacciones bioquímicas complejas e interdependientes catalizadas por un grupo de proteínas particular capaz de actuar sobre polipéptidos agregados o con plegamiento anómalo. Dentro de este grupo, las chaperonas actúan reorganizando el plegamiento de proteínas siendo capaces de eliminar agregados proteicos. Las proteasas intervienen en última instancia degradando ambos tipos de estructuras potencialmente nocivas para el metabolismo celular. En el caso del estroma plastídico, esta maquinaria está compuesta por proteínas codificadas tanto por el genoma nuclear como por el plastoma (Leidhold *et al.*, 2007). Si bien existen estudios específicos sobre las chaperonas (Schroda, 2004) (Willmund *et al.*, 2008) y las proteasas plastídicas (Sakamoto, 2006), todavía resulta pobre la comprensión y predicción de cómo su accionar afecta los niveles de acumulación correspondientes a las proteína heterólogas.

El lumen tilacoide se encuentra contenido por una membrana especializada en la fosforilación oxidativa de la fotosíntesis. Presenta condiciones particulares respecto del pH y el potencial redox En el interior de esta estructura se han identificado alrededor de 230 proteínas correspondientes al 5-10% de las proteínas plastídicas totales (Peltier *et al.*, 2000). Muchas de ellas se encuentran involucradas con el plegamiento, la degradación y la protección de péptidos contra el estrés oxidativo. Estas proteínas están

codificadas en el genoma nuclear y translocan postraduccionalmente primero al estroma y luego al lumen tilacoide por cuatro vías alternativas: la Sec, la TAT, la dependiente de SRP y la "espontánea" (Albiniak *et al.*, 2012; Gutensohn *et al.*, 2006; Settles *et al.*, 1998). La mayoría de ellas presenta una señal bipartita compuesta por un péptido de tránsito en su extremo amino-terminal seguido de un péptido señal. El primero es removido por una peptidasa del estroma durante la importación desde el citosol atravesando la doble membrana plastídica. El segundo, responsable de la translocación a través de la membrana tilacoide, es removido por una peptidasa específica del lumen. Las vías Sec y TAT presentan alta homología con mecanismos de secreción bacterianos. La vía TAT presenta una característica distintiva; es capaz de translocar proteínas completamente plegadas utilizando la fuerza protón motriz como único requerimiento energético. La secuencia del péptido señal TAT se distingue por un par de argininas "mellizas" localizadas en el extremo carboxilo-terminal (Chaddock *et al.*, 1995). Hace una década se obtuvieron líneas de tabaco transformadas a nivel del genoma nuclear con secuencias quimeras diseñadas con distintas señales bipartitas localizadas en un mismo marco abierto de lectura, río arriba del gen reportero EGFP (Marques *et al.*, 2003). En este caso se observó que únicamente con las señales asociadas a la vía TAT se lograba una translocación eficiente de EGFP hacia el lumen tilacoide (Marques *et al.*, 2004).

Todos los mecanismos involucrados en el plegamiento y la estabilidad de una proteína se encuentran determinados por la interacción entre la secuencia primaria del polipéptido y las condiciones del entorno. Por este motivo, la misma secuencia aminoacídica en entornos diferentes puede presentar estabilidad diferencial. Como hipótesis principal de este capítulo propusimos el direccionamiento de E7 plastídica hacia el lumen tilacoidal como una estrategia potencialmente capaz de incrementar la acumulación del péptido en un compartimiento con características internas distintas a las del estroma. En particular, nuestro objetivo fue expresar en el cloroplasto las proteínas StrE7 y StrE7CP diseñadas para dirigir su translocación desde el estroma hacia el lumen tilacoide mediante la incorporación de la señal bipartita tipo TAT de la proteína lumenal de tabaco OEC23 (Str), río arriba de las proteínas E7 y E7CP estudiadas en el capítulo I.

# *Resultados Capítulo III*

## Diseño de las construcciones pBSW 5´utr StrE7 y pBSW 5´utr StrE7CP

La señal Str de direccionamiento al lumen tilacoide corresponde a los primeros 82 aminoácidos del precursor de la subunidad de 23kDa del complejo generador de oxígeno del fotosistema II (OEC23) de tabaco. Su secuencia se obtuvo mediante PCR utilizando como molde ADN total de *Nicotiana tabacum* con los *primers* 5´Str SpeAse y 3´Lum NdeXba **(figura 3.1)**. El fragmento obtenido (250pb) se subclonó en el vector pZeR02. De la digestión de pZeR0 Str con *Ase*I y *Xba*I se obtuvo un inserto que a su vez fue clonado en el vector pBSW5´utr digerido con *Nde*I y *Xba*I. Estas mismas enzimas fueron utilizadas para cortar el vector pBSW5´utr Str e insertar alternativamente la secuencia de E7 o de E7CP.

La integridad de los vectores pBSW5´utr StrE7 y pBSW5´utr StrE7CP y su capacidad de expresar ambas proteínas quimera se comprobó antes de proceder con la transformación plastídica aprovechando la compatibilidad con la maquinaria de traducción procariótica. Con este propósito, extractos proteicos de *E. coli* transformadas con pBSW 5´utr Str E7, pBSW 5´utr StrE7CP, pBSW 5´utrGUS como control negativo, pBSW 5´utr E7 y pBSW 5´utr E7CP como controles positivos, fueron analizados mediante la técnica de *western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal contra E7 como primer anticuerpo. La expresión de StrE7 y StrE7CP fue confirmada verificando la funcionalidad de ambos vectores **(figura 3.2)**. La comparación entre las bandas de StrE7 y E7, así como la de StrE7CP y E7CP, mostró siempre un tamaño mayor para las versiones fusionadas a la señal bipartita indicando la ausencia de procesamiento de la señal por parte de las bacterias.

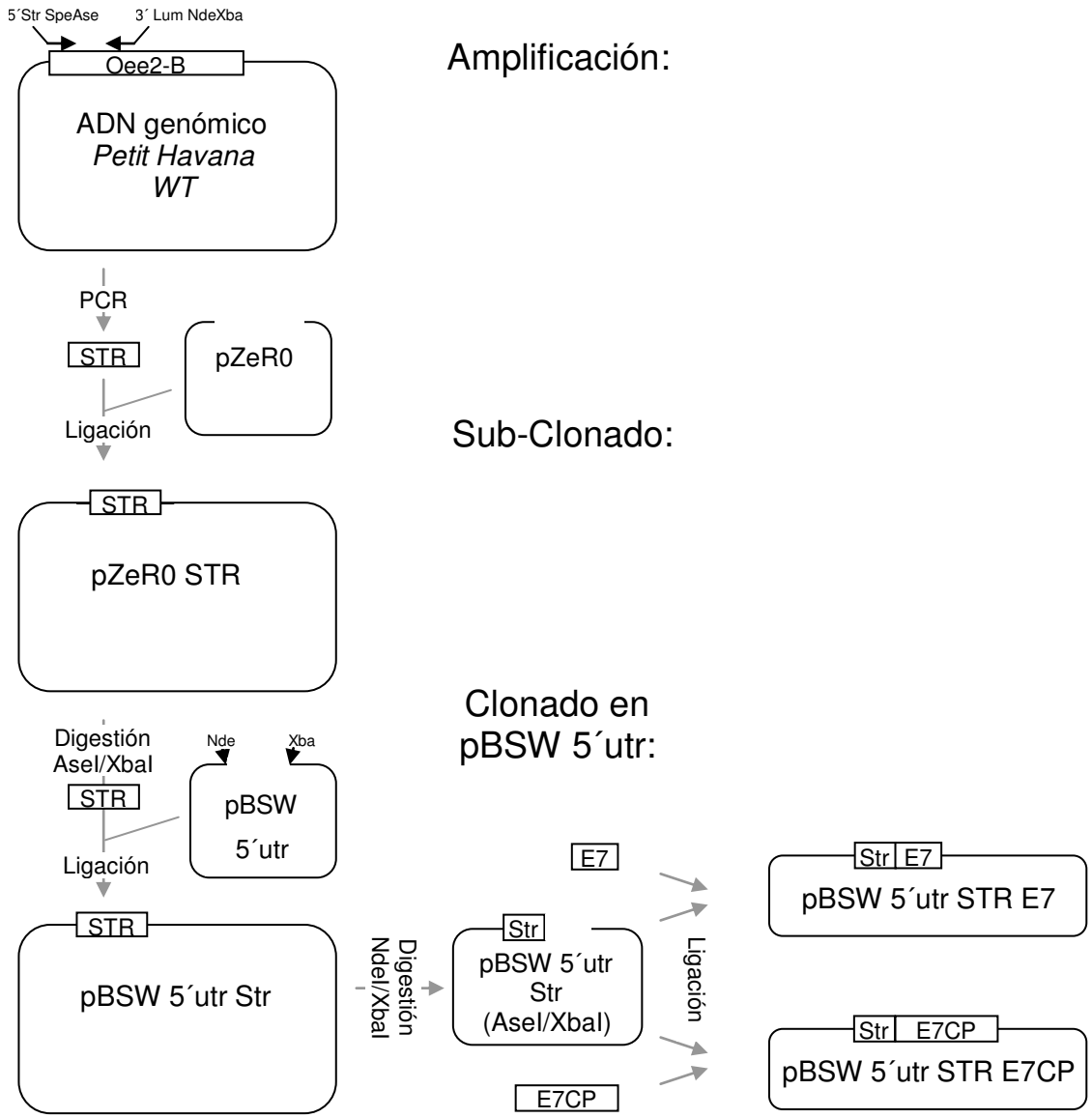



**Figura 3.1: Construcción de los vectores pBSW 5´utr StrE7 y pBSW 5´utr StrE7CP.**

La secuencia de la señal peptídica de translocación correspondiente al gen de la proteína de 23kDa del complejo generador de oxígeno del cloroplasto (OEC23, CAA44292) se obtuvo mediante amplificación por PCR. Se utilizó ADN de Nicotiana tabacum var Petit Havana como molde y primers específicos: pr5´Str SpeAse – pr3´Lum NdeXba. El fragmento obtenido fue subclonado en el vector pZeR02. Posteriormente el producto de la digestión con las enzimas AseI y XbaI fue subclonado en el plásmido pBSW 5´utr digerido con NdeI y XbaI. Los vectores pBSW 5´utr StrE7 y pBSW 5´utr StrE7CP se obtuvieron insertando alternativamente las secuencias de E7 y E7CP digeridas con las enzimas NdeI y XbaI entre los sitios NdeI y XbaI del vector pBSW 5´utr Str.

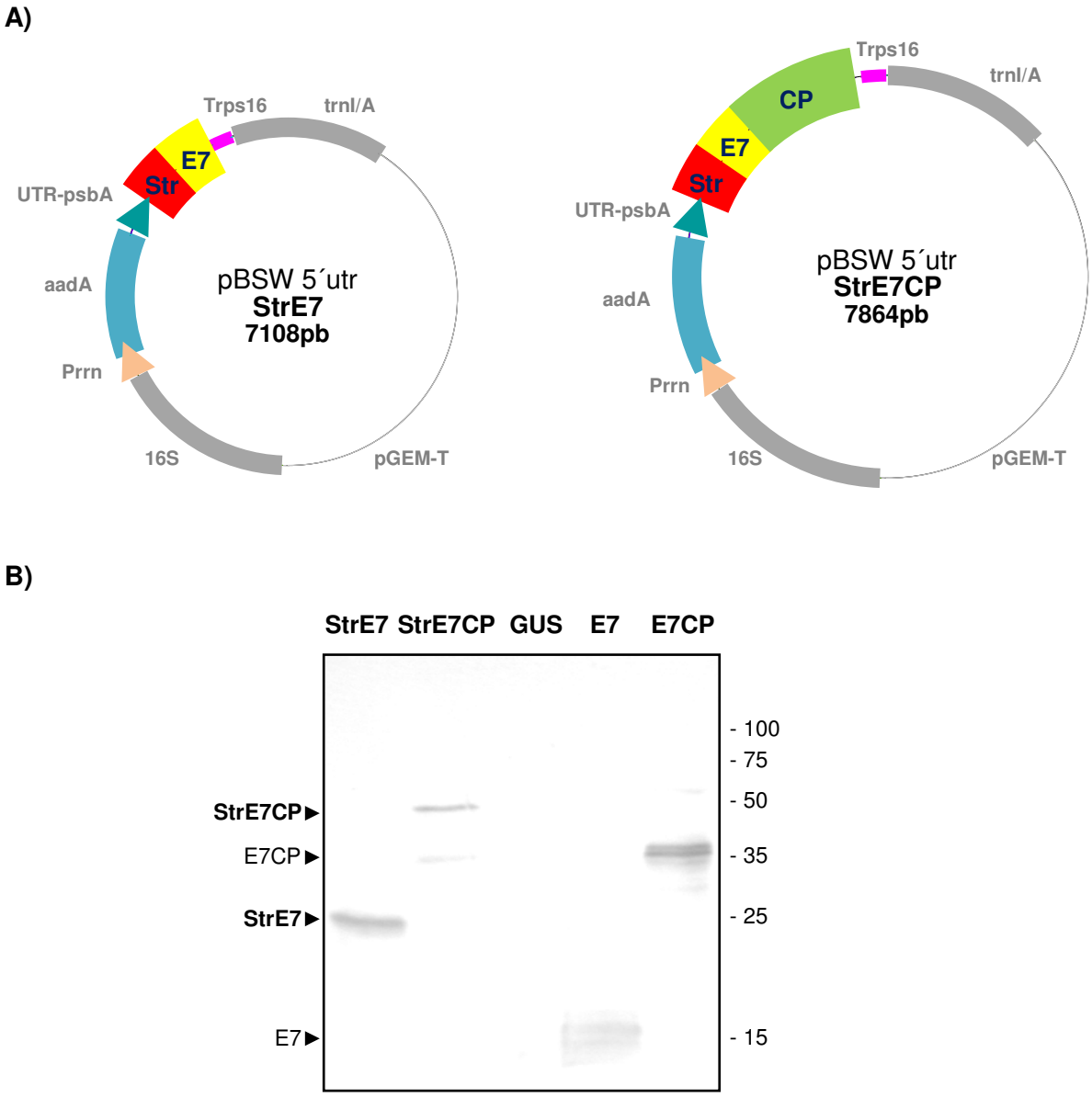



**Figura 3.2: Verificación funcional de pBSW 5´utr StrE7 y pBSW5´utr StrE7CP en E. coli**

A) Esquema de los vectores pBSW5´utr StrE7 y pBSW5´utr StrE7CP.

B) Extractos proteicos totales obtenidos a partir de bacterias transformadas con los vectores pBSW 5´utr StrE7 y pBSW 5´utr StrE7CP fueron analizados por western blot. Como primer anticuerpo se utilizó anti E7 monoclonal de ratón. A la derecha se indican las posiciones del marcador de peso molecular en kDa. Las flechas señalan las bandas correspondientes a StrE7 y StrE7CP así como a las bandas de E7 y E7CP incluidas como controles positivos. GUS: control negativo (bacterias transformadas con pBSW 5´utr GUS).

## Transformación de cloroplastos de tabaco con StrE7 y StrE7CP

Las líneas transplastómicas fueron obtenidas a partir del bombardeo de hojas de *Nicotiana tabacum cv*. Petit Havana con cada uno de los vectores descriptos. Las plantas regeneradas en presencia del antibiótico selector espectinomicina fueron inicialmente analizadas mediante PCR con el fin de detectar la presencia de secuencias transgénicas utilizando los primers prFw, localizado sobre el gen *rrn16* del genoma plastídico, y el primer prRev, localizado sobre la secuencia *aadA* del vector **(figura 3.3)**. Se caracterizaron así tres líneas PCR positivas para cada una de las construcciones **(figura 3.4 A)**. Las mismas fueron sometidas a dos o tres rondas adicionales de regeneración en presencia de espectinomicina antes de ser rusticadas para la obtención de semillas con el fin de alcanzar homoplastía **(figura 3.4 B)**. Las plantas germinadas a partir de estas semillas fueron sometidas a los análisis posteriores. El fenotipo de las plantas correspondientes a las 6 líneas resistentes a espectinomicina resultó indistinguible respecto del fenotipo de plantas de tabaco *wild type* **(figura 3.4 C)**.

## Integración de StrE7 y StrE7CP

La integración del transgén y la homoplastía de las líneas transplastómicas para StrE7 y StrE7CP fueron evaluadas mediante la técnica de *Southern blot*. El ADN extraído de hojas fue cortado con la enzima de restricción *Nco*I, capaz de reconocer dos sitios de corte específicos flanqueantes del sitio de inserción posicionados uno río arriba de la región de recombinación izquierda (3' rrn16S) y el otro río abajo de la región de recombinación derecha (trnI-3'trnA) respectivamente **(figura 3.3)**. En los plastomas *wild type* digeridos de esta forma el sitio de recombinación queda incluido en un fragmento de 6,4kpb, mientras que en los plastomas transformados con StrE7 y StrE7CP el fragmento específico muestra un tamaño mayor de 8,3kpb y 9,1kpb, respectivamente. Inesperadamente, la banda revelada con la sonda E7 correspondiente a la línea #32 de StrE7CP mostró un tamaño levemente mayor al esperado **(figura 3.5)**..

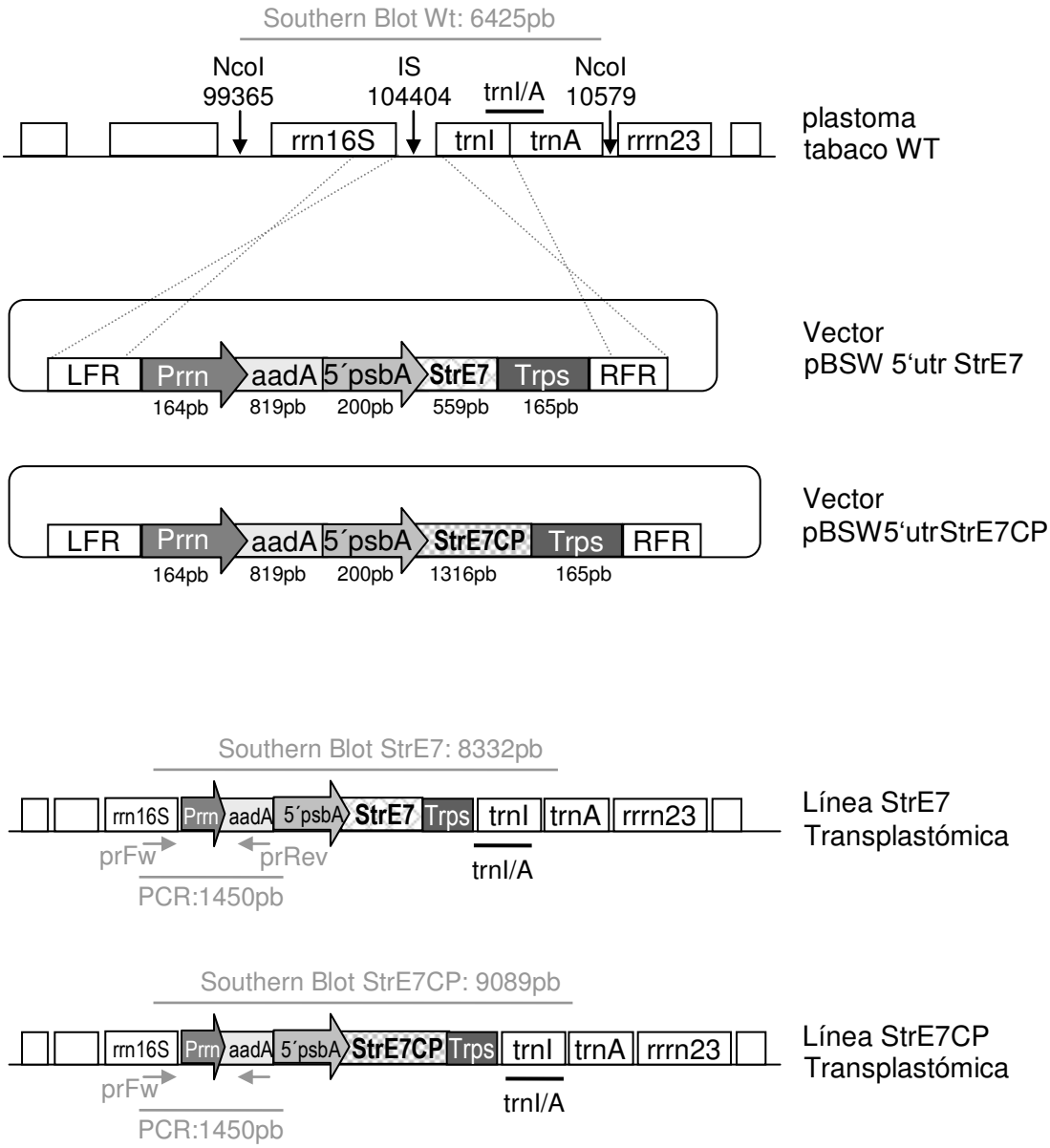



**Figura 3.3: Esquema de la integración de StrE7 y StrE7CP en el plastoma de tabaco.**

Los vectores de transformación pBSW 5´utrE7GUS y pBSW 5´utrGUSE7 presentan las secuencias de ambos transgenes ubicadas río abajo de la secuencia 5´ del gen psbA (5′psbA), Rio abajo de la misma se encuentra la secuencia de terminación región 3´no codificante del gen trps16. La secuencia aadA se ubica bajo el control del promotor Prrn. Todos los transgenes se encuentran entre la región flanqueante izquierda (LFR) y la región flanqueante derecha (RFR). IS: sitio de inserción de los transgenes. rrn23: secuencia codificante de la subunidad 23S de los rRNA. TrnI/A: Sonda utilizada para los ensayos de Southern blot. Las flechas horizontales indican la posición de los primers utilizados para los análisis de PCR.

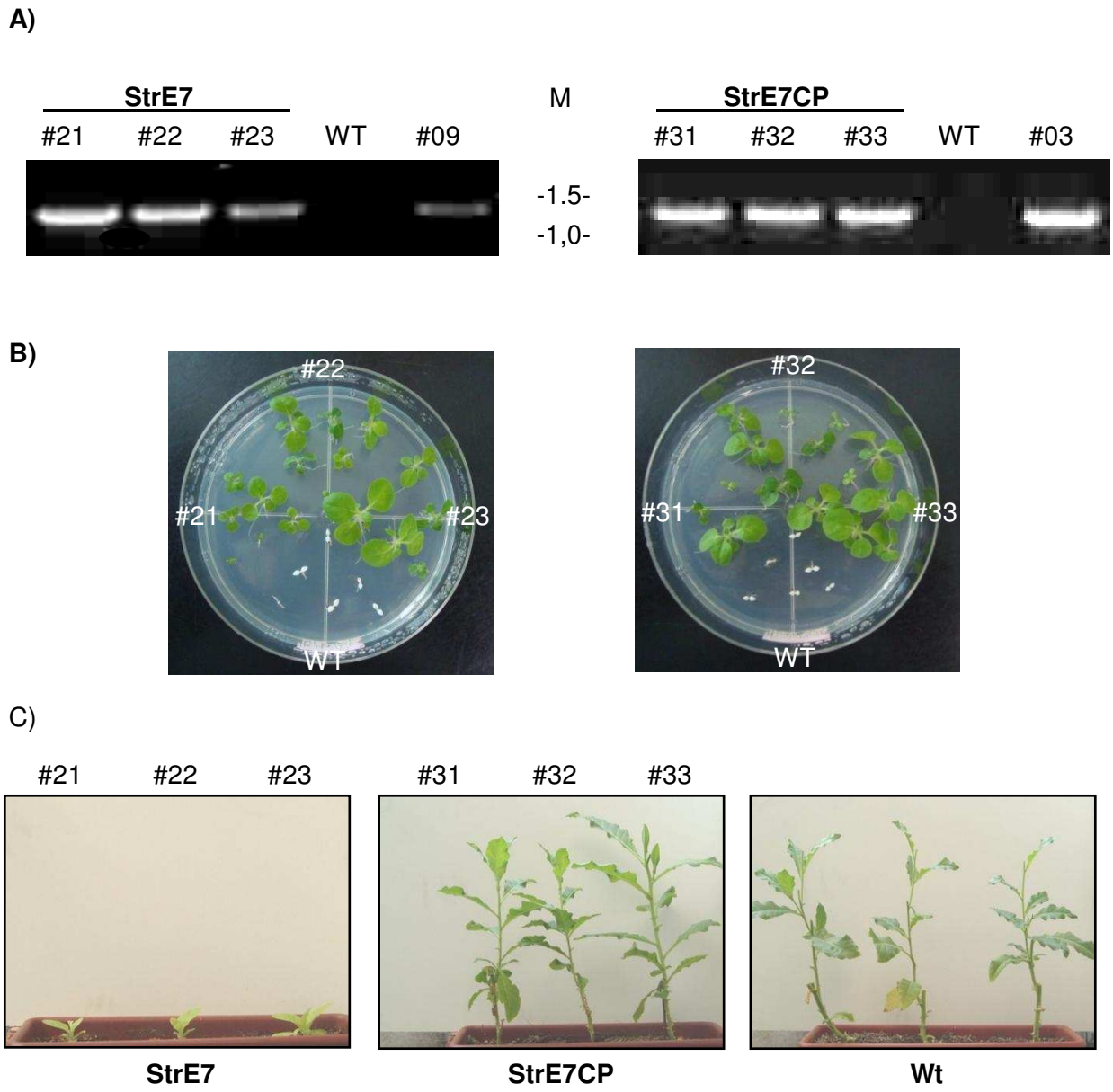



**Figura 3.4: Características genotípicas y fenotípicas de las líneas StrE7 y StrE7CP**

A) Análisis mediante PCR de las plantas transplastómicas: ADN de las plantas obtenidas con las distintas construcciones (pBSW 5´utr StrE7: 21, 22, 23; pBSW 5´utr StrE7CP: 31, 32, 33) fue utilizado como molde en una reacción de PCR con los primers pr5´Fw y pr3´Rev como iniciadores. M: marcador de PM en kpb. El producto de amplificación de 1450pb corresponde a las líneas transplastómicas.

B) Semillas provenientes de las plantas antes mencionadas germinadas en medio MS con espectinomicina.

C) Fenotipo de las plantas transplastómicas: plantas de tabaco transplastómicas StrE7 y StrE7CP (foto tomada 100 días post-germinación).

Wt: control sin transformar.

A)

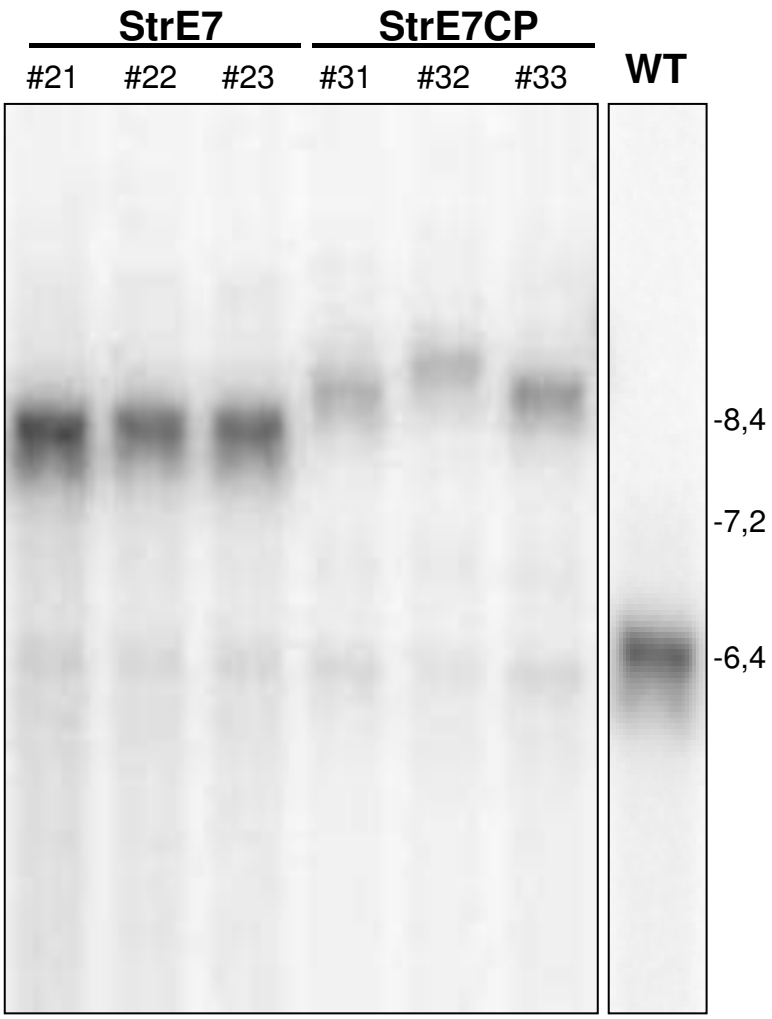



**Figura 3.5: Análisis de la integración de StrE7 y StrE7CP mediante Southern blot**

El ADN celular total fue digerido con la enzima NcoI, resuelto mediante electroforesis y transferido a una membrana de Nylon para ser revelada. La sonda trnI/A reveló una banda de 6,4kpb en los plastomas wild type (WT) de 8,25kpb en las líneas Str E7 (#21, #22 y #23) y una de 8,95kpb en las líneas StrE7CP (#31,#32 y #33). La posición de los marcadores de PM correspondientes a ADN del fago λ cortado con Bste II se muestra a la derecha.

Un nuevo ensayo de *Southern blot* revelado con la sonda correspondiente a la secuencia de E7 validó los resultados previamente obtenidos por PCR confirmando la integración de los elementos transgénicos en tres líneas independientes para cada construcción. Asimismo, la ausencia de la banda de 6,4kpb asociada al genoma *wild type* en las seis líneas transplastómicas mostró la homoplastía alcanzada en las plantas.

## Transcripción de las líneas StrE7 y StrE7CP

La transcripción del gen StrE7 y de StrE7CP fue confirmada por análisis de *northern blot* a partir del ARN total extraído de hojas de las distintas líneas obtenidas. Los transcriptos específicos fueron detectados mediante hibridación con la sonda E7 correspondiente a la secuencia de este gen. En las líneas transformadas con el vector pBSW-utr StrE7 (#21, #22 y #23), se observaron tres tipos de transcriptos. El de menor tamaño (725b) corresponde al monocistrón de E7 regulado por el promotor *psbA*. El bicistrón de tamaño intermedio (1750b) bajo control del promotor *Prrn* incluye la secuencia de E7 y la de *aadA*. El tercer transcripto, con un tamaño aproximado de 3400b incluye, además de los genes antes mencionados, el rARN 16S y se encuentra bajo el promotor *Prrn*. En el caso de las líneas transformadas con el vector pBSW-utr StrE7CP (#31, #32 y #33) también se observaron tres tipos de transcriptos conteniendo E7 con los mismos elementos antes mencionados más el gen CP fusionado a E7 **(figura 3.6 A y B)**. La adición de CP redundó en un tamaño mayor para los tres transcriptos correspondiente a las 750b del gen de la cápside viral del PVX. Al igual que en el *Southern* blot las bandas correspondientes a los tres transcriptos específicos observados en la línea #32 corrieron con un tamaño aparente levemente mayor al esperado. Esta diferencia podría atribuirse a un rearreglo o una repetición no determinada en la secuencia correspondiente a StrE7CP.

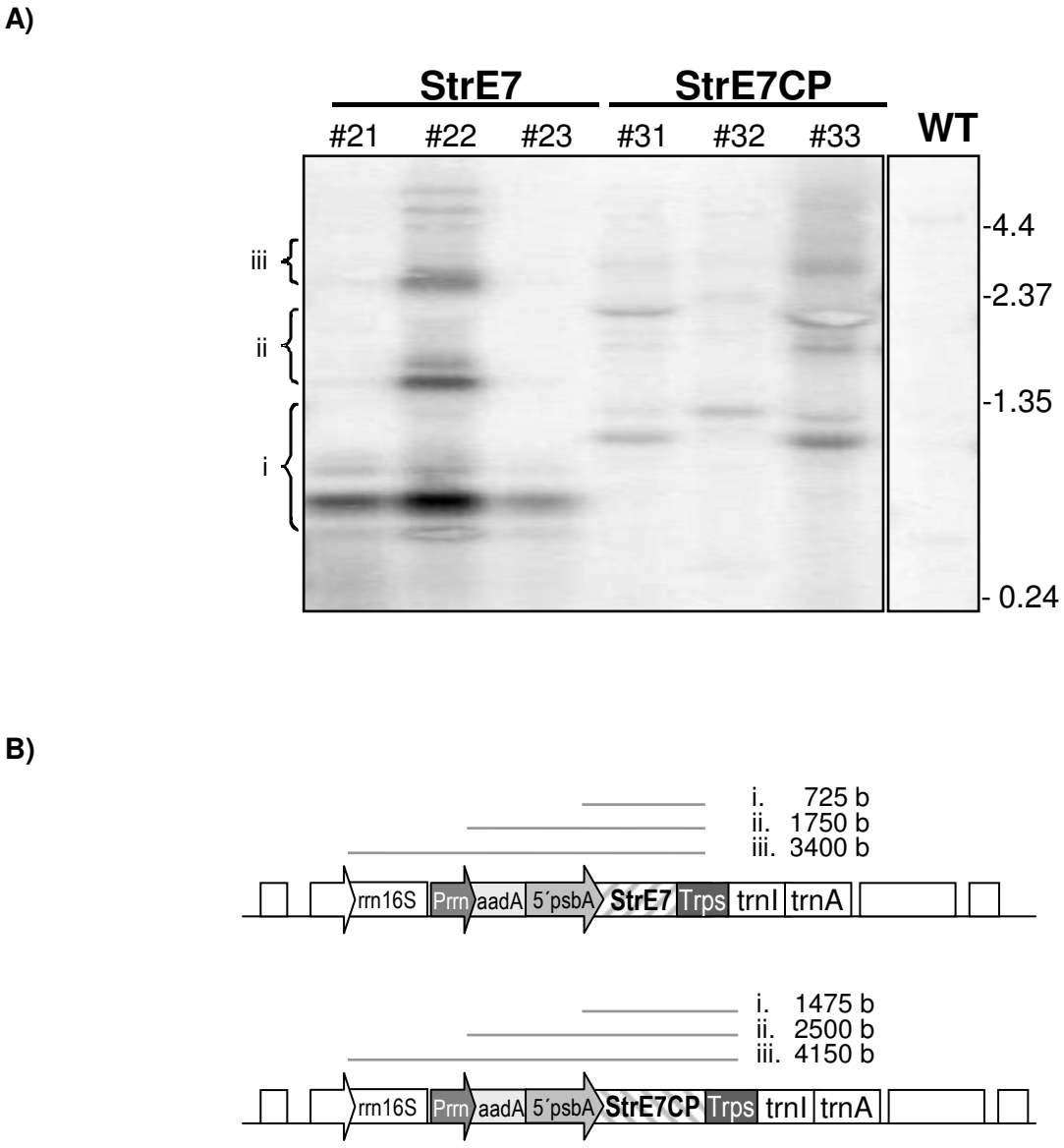



**Figura 3.6: Análisis de la transcripción de StrE7 y StrE7CP mediante northern blot**

El ARN celular total fue corrido bajo condiciones desnaturalizantes y transferido a una membrana de Nylon para ser revelada con la sonda correspondiente a la secuencia de E7. A) Northern blot plantas transformadas con pBSW 5´utr StrE7 y pBSW 5´utr StrE7CP. B) Mapa de los transcriptos, se indica el tamaño esperado en cada caso. M: RNA marker (Invitrogen, USA). (i) transcripto monocistrónico bajo control del promotor PpsbA. (ii) transcripto bicistrónico bajo control del promotor Prrn localizado río arriba del gen aadA. (iii) transcripto tricistrónico bajo control del promotor endógeno Prrn16. StrE7 (21,22 y 23) y StrE7CP (31, 32 y 33). Wt: control no transformado

## Expresión de StrE7 y StrE7CP

Se estudió la expresión de StrE7 y StrE7CP en las líneas de tabaco transformadas, analizando la presencia de la proteína mediante *western blot.* Las proteínas totales de hojas de cada una de las líneas transplastómicas fueron resueltas en un SDS-PAGE 15% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron reveladas con el anticuerpo monoclonal anti E7 como primer anticuerpo (**figura 3.7)**.

Los resultados correspondientes a las líneas StrE7 (#21, #22 y #23) mostraron niveles de expresión notablemente mayores a los observados en las líneas StrE7CP (#31, #32 y #33) si tenemos en cuenta todas las bandas reveladas por el anticuerpo. Esta diferencia observada es aún mayor si se compara la proteína total sembrada para cada calle del gel tal como se puede apreciar considerando los resultados de la tinción de un gel equivalente con azul de Coomassie. Los niveles de expresión altos de StrE7 permiten observar agregados de mayor PM en un amplio rango de tamaños sin que sea posible observar una banda discreta. Las bandas de mayor tamaño están asociadas a las particulares interacciones de E7 con otras proteínas resistentes a la desnaturalización por calor, SDS y β-mercaptoetanol. En las tres líneas StrE7CP se observó una banda de PM similar a la correspondiente a E7CP (37kDa). Además la línea #32 mostró una banda de mayor PM (≈45kDa) de origen indeterminado. En los extractos de la planta control no se observó ninguna banda inespecífica. Ante la dificultad de realizar un fraccionamiento subcelular para determinar la localización de las proteínas recombinantes, consecuencia de las características de la proteína E7 de formar agregados insolubles al interactuar con otras proteínas de la planta, y con el fin de comprobar el correcto procesamiento de la señal bipartita Str, se estimó el tamaño de las bandas específicas en un ensayo *de western blot* diseñado para comparar los patrones de expresión en hojas y bacterias capaces de expresar StrE7, StrE7CP, E7, E7CP y GUS como control negativo (**figura 3.8)**. En particular se compensó la cantidad de extracto proteico sembrado en cada calle con el fin de evitar la saturación para poder observar bandas específicas discretas. Los resultados mostraron que el retraso en la corrida de las construcciones StrE7 y StrE7CP respecto de E7 y E7CP, atribuibles a la presencia de Str, únicamente se observaron en los extractos bacterianos donde la señal no es procesada. Por el contrario los extractos provenientes de hojas correspondientes a las líneas transplastómicas para StrE7 (#21) y StrE7CP (#31) mostraron patrones de bandas de tamaño similar a las líneas E7 (#11) y E7CP (#05), respectivamente. Estos resultados son indicativos del reconocimiento y procesamiento específico de la señal bipartita en el lumen tilacoide.

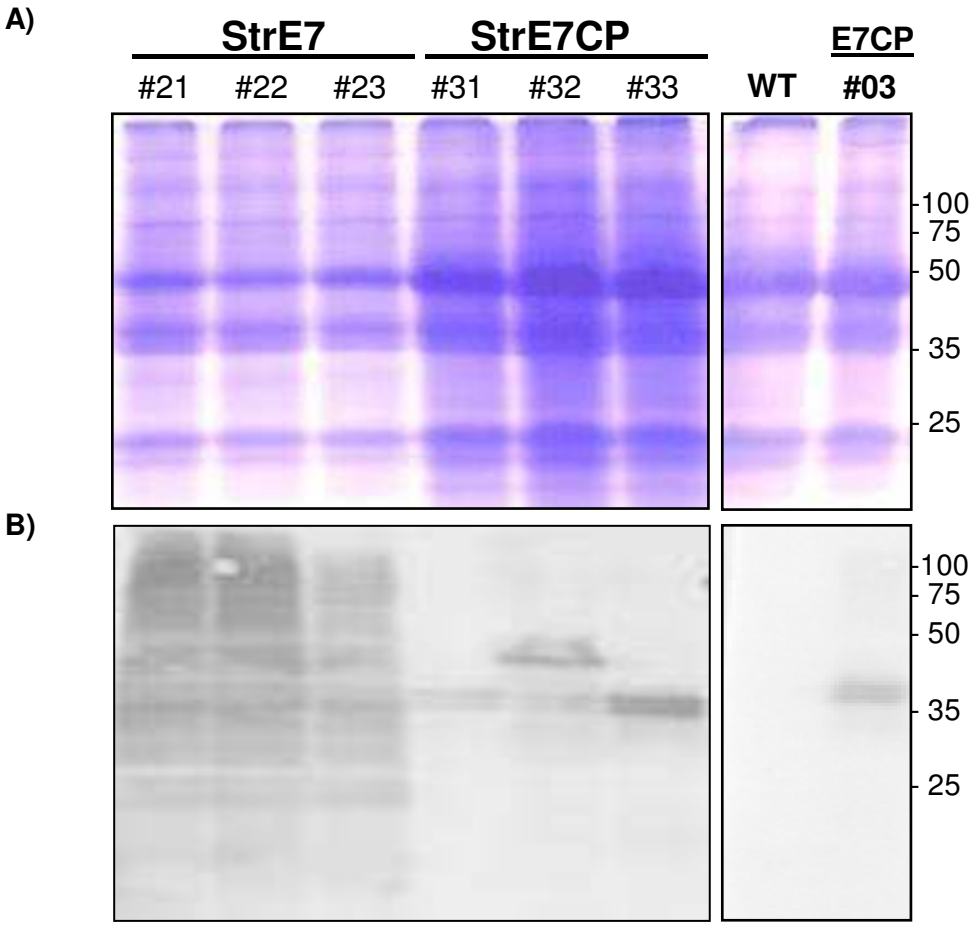



**Figura 3.7: Análisis de la expresión de StrE7 y StrE7CP mediante western blot**

Extractos de proteínas totales de hojas fueron resueltos mediante SDS-PAGE y transferidos a una membrana de nitrocelulosa para ser luego revelada con el anticuerpo monoclonal anti-E7. (21, 22, 23): líneas transplastómicas StrE7. (31, 32, 33): líneas transplastómicas strE7CP. (Wt): control proveniente de plantas no transformadas. A la derecha se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular en kDa. (BRP, Promega USA).

A) Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie.

B) Membrana de nitrocelulosa revelada con antiE7 como primer anticuerpo.

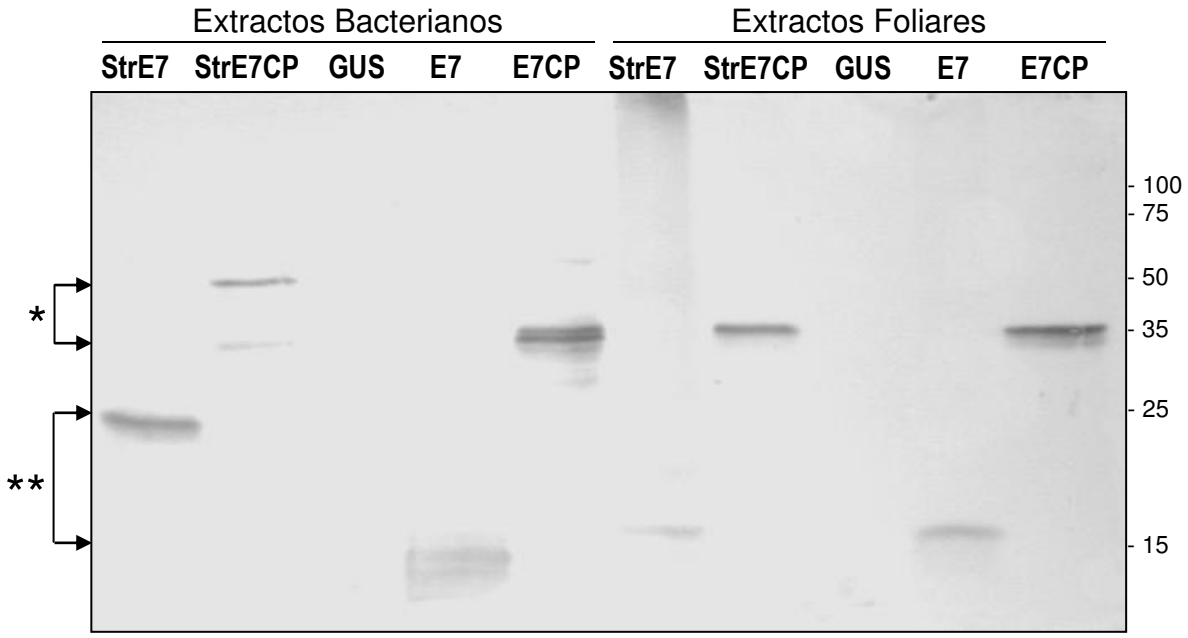



**Figura 3.8: Análisis del procesamiento de la señal de translocación Str mediante western blot**

Extractos proteicos totales obtenidos a partir de bacterias transformadas con los vectores pBSW 5´utr StrE7 y pBSW 5´utr StrE7CP y extractos obtenidos a partir hojas de plantas transplastómicas obtenidas con las mismas construcciones fueron analizados por western blot. Como primer anticuerpo se utilizó anti E7 monoclonal de ratón. A la derecha se indican las posiciones del marcado de peso molecular en kDa. Las flechas señalan las bandas correspondientes a StrE7 y E7 (*) así como a las bandas de StrE7CP y E7CP (**). GUS: control negativo (pBSW 5´utr GUS).

## Análisis comparativo de la expresión de E7 en las plantas transplastómicas

Para analizar comparativamente los niveles de expresión de cada una de las líneas transplastómicas, se realizó un SDS PAGE 12% con extractos proteicos correspondientes a 3 mg de tejido fresco foliar provenientes de líneas representativas de cada una de las 6 construcciones desarrolladas en este trabajo (**figura 3.9)**.

Se observó que la línea #11 correspondiente a E7 no fusionada acumulaba menores niveles de la proteína recombinante que cualquier otra. En el otro extremo se ubicaba StrE7, siendo ésta la línea de mayor capacidad de acumulación para el péptido antigénico. En contraste con lo observado en el estroma, la proteína de fusión StrE7CP mostró niveles de acumulación inferiores a los de StrE7 aunque superiores a los de E7CP estromal. Ambas fusiones a GUS expresaron en el estroma niveles similares de proteína recombinante, intermedios a los de E7 y StrE7.

Finalmente, se realizó una cuantificación relativa de los niveles de expresión de las distintas líneas mediante la técnica de *western blot* **(figura 3.10)**. En este caso se sembró cada calle de un SDS PAGE con extractos correspondientes a distintas cantidades de tejido foliar de forma tal de evitar la saturación de la marca específica. La membrana obtenida fue analizada por densitometría utilizando el programa Image J **(figura 3.11)**. Los resultados se expresan como nivel de expresión por masa de tejido fresco relativizados a la línea #11 (=1). Se observa que la línea #05 (E7CP) expresó 3 veces más que #11, las líneas #31 (StrE7CP), #41 (E7GUS) y #51 (GUSE7) expresaron 30 veces más y StrE7 aproximadamente 80 veces más. En este último caso la estimación se encuentra claramente subestimada ya que la masa de antígeno recombinante que permanece formando agregados de alto peso molecular es por lo menos equivalente a la que permanece como monómero representada en la banda discreta cuantificada tal como se puede observar en la figura 3.9.

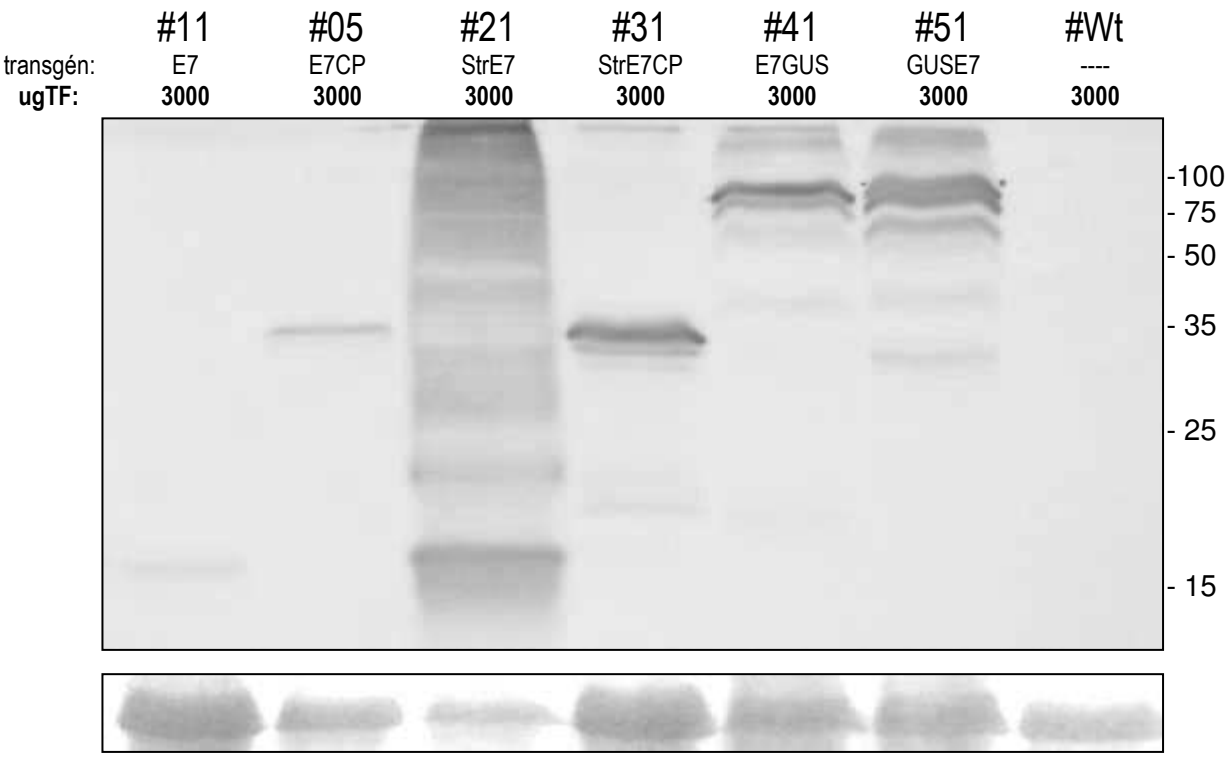



**Figura 3.9: Análisis comparativo de la expresión de E7 en las líneas transplastómicas**

Extractos proteicos totales obtenidos a partir de tejido foliar (3 mg) de las distintas plantas transplastómicas fueron sometidos a SDS-PAGE y analizados por western blot utilizando anticuerpo contra E7 como primer anticuerpo. A la derecha se indica las posiciones del marcador de peso molecular en kDa (BRP, Promega USA).

En el panel inferior se muestra el control de carga (banda correspondiente a la subunidad mayor de la ribulosa bifosfato carboxilasa en el gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie)

ugTF: microgramos de tejido fresco foliar sembrados en cada calle.

.

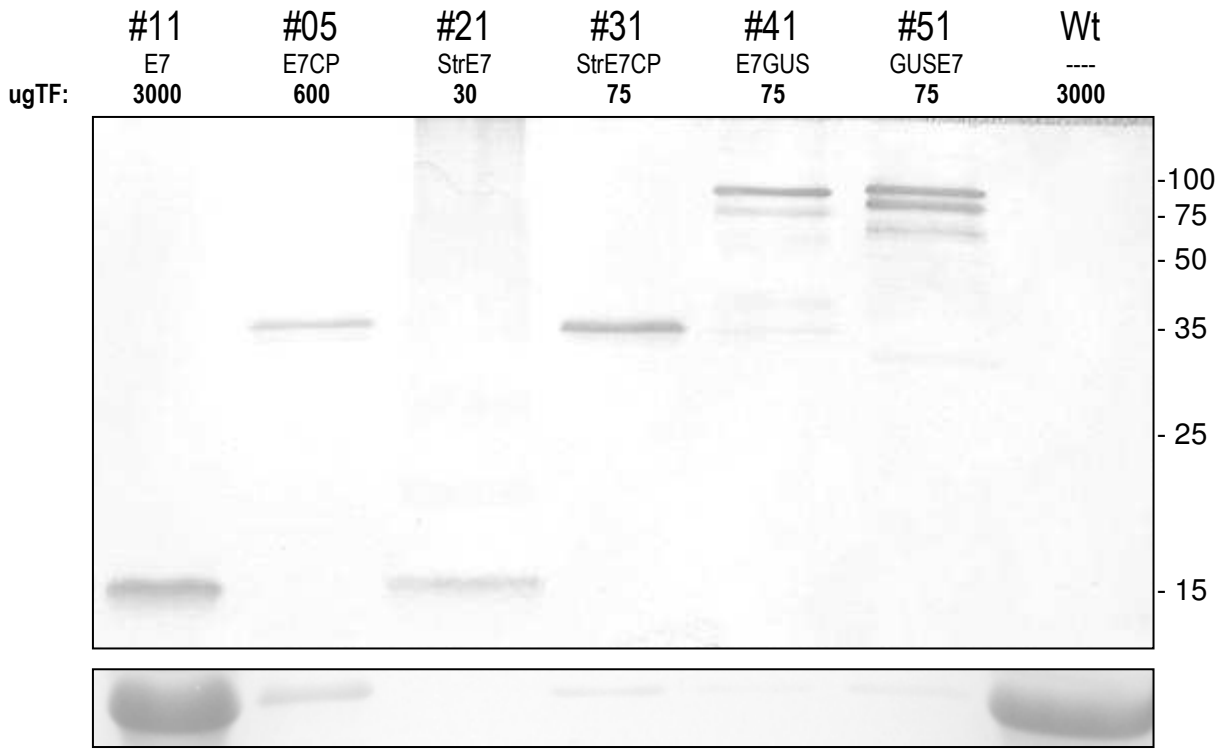



**Figura 3.10: Análisis comparativo de la expresión de E7 en las líneas transplastómicas**

Extractos proteicos totales obtenidos a partir de tejido foliar (cantidades variables) de distintas plantas transplastómicas fueron sometidos a SDS-PAGE y analizados por western blot utilizando anticuerpo contra E7 como primer anticuerpo. A la derecha se muestran los tamaños de las bandas del marcador de peso molecular en kDa (BRP, Promega USA).

En el panel inferior se muestra el control de carga, banda correspondiente a la subunidad mayor de la ribulosa bifosfato carboxilasa en el gel de acrilamida teñido con azul de Coomasie.

ugTF: microgramos de tejido fresco foliar sembrados en cada calle.

.

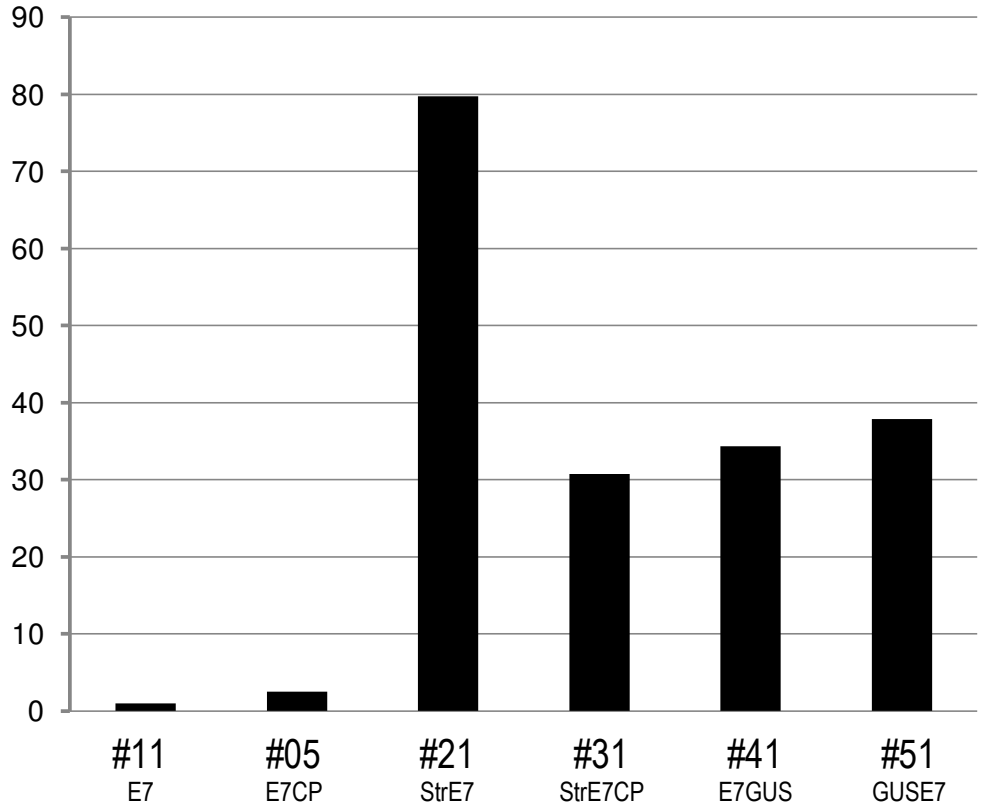



**Figura 3.11: Cuantificación relativa de la expresión de E7 en las líneas transplastómicas**

Determinación de la acumulación de E7 en las distintas líneas transplastómicas por densitometría utilizando el programa Image J (NIH, http://rsbweb.nih.gov/ij). Extractos proteicos totales obtenidos a partir de tejido foliar fueron sometidos a SDS-PAGE y analizados por western blot utilizando anti E7 como primer anticuerpo. Los resultados se expresan como nivel de expresión por masa de tejido fresco relativizados a la línea #11 a la cual se asigno un valor igual a 1.

## Organización tisular y celular de las líneas transplastómicas E7 y StrE7

La organización del tejido foliar de hojas transplastómicas provenientes de líneas E7 (#11) y StrE7 (#21) se comparó a nivel microscópico con la morfología normal de muestras provenientes de hojas no transformadas. La observación mediante microscopía óptica (1000X) de tejido vivo correspondiente a la monocapa de la epidermis inferior no manifestó diferencias apreciables **(figura 3.12 A)**. Las células epidermales y las de la guarda mostraron un fenotipo normal. El número y la morfología de los cloroplastos transformados resultaron indistinguibles de los *wild type.* Por el contrario, la observación con el mismo tipo de microscopía de cortes transversales incluidos en resina SPURR y teñidos con azul de toluidino **(figura 3.12 B)** mostraron diferencias notables respecto de las líneas no transformadas. Ambas líneas transplastómicas presentaron una notoria desorganización de los distintos estratos celulares, particularmente en el mesófilo en empalizada localizado inmediatamente por debajo de la epidermis superior. A nivel celular se observaron formas más irregulares y un número menor de cloroplastos por célula. En el caso de la línea #11, el volumen celular y vacuolar resultó incrementado. Los cloroplastos mostraron alto contenido de almidón con gránulos más numerosos y de mayor tamaño. En el caso de la línea #21, los cloroplastos presentaron como característica distintiva la presencia de áreas más pigmentadas no observadas en los cloroplastos no transformados.

La morfología de los cloroplastos transplastómicos para E7 y StrE7 fue analizada con mayor detalle mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) sobre tejido foliar incluido en resina SPURR y contrastado con acetato de uranilo **(figura 3.13 A)**. La línea #11 mostró, además de los gránulos de almidón antes mencionados, la presencia de un alto número de plastoglóbulos. Tanto las estructuras mencionadas como la de los tilacoides no se diferencian morfológicamente de las observadas en los cloroplastos normales. Por el contrario los cloroplastos de la línea StrE7 mostraron estructuras compactas de origen indeterminado espacialmente asociadas con los tilacoides. Estas estructuras no se corresponden con ninguna conocida para la morfología de un cloroplasto normal.

Finalmente se realizó una inmunomicroscopía electrónica sobre tejido foliar incluido en Resina LR White utilizando anti E7 como primer anticuerpo y anti IgG de ratón acoplado a oro como segundo anticuerpo **(figura 3.13 B)**. Únicamente se observaron resultados

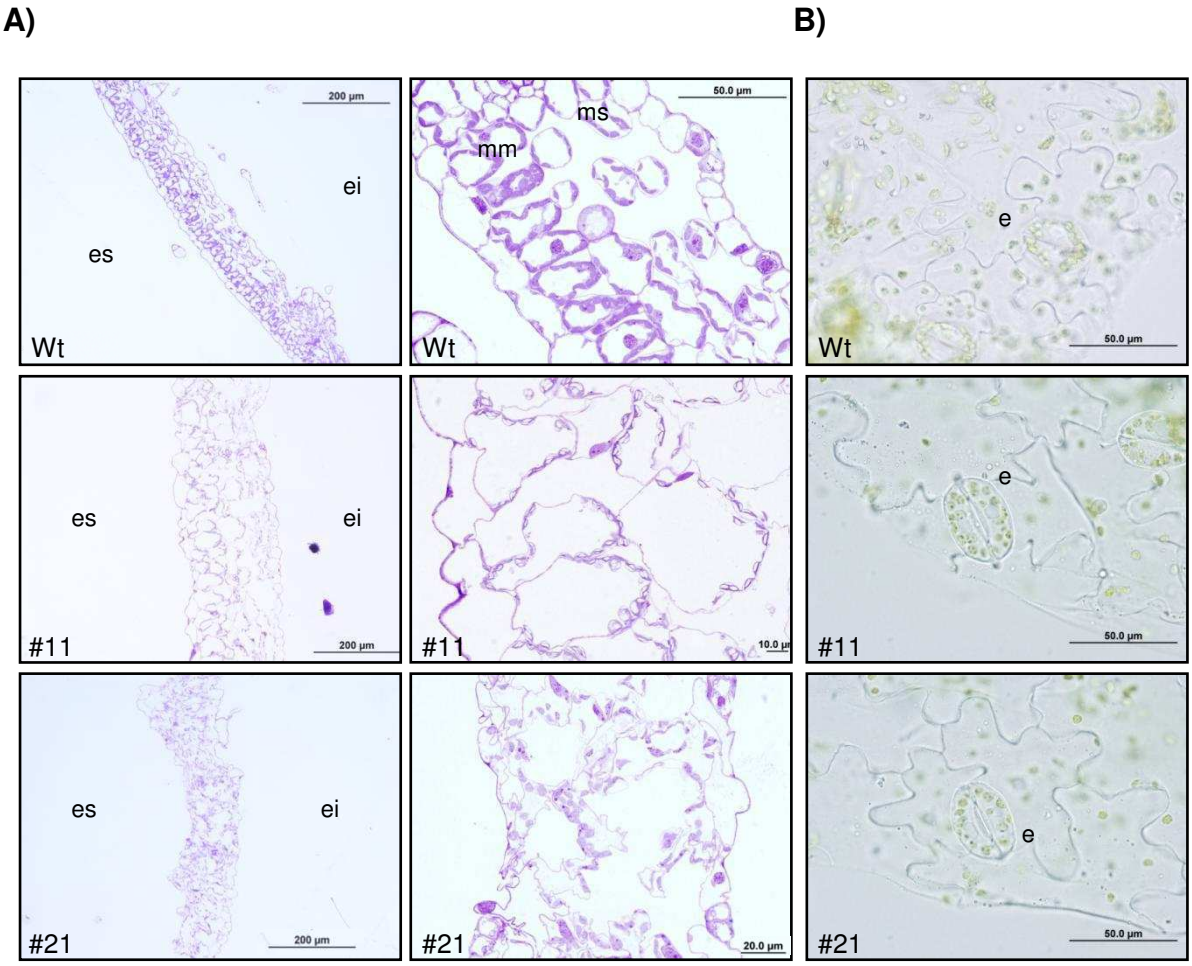



**Figura 3.12: Análisis comparativo de la organización del tejido foliar en líneas transplastómicas para E7 y StrE7 mediante microscopía óptica de campo brillante.**

A) Corte semifino longitudinal de hojas de tabaco fijadas e incluidas en resina SPURR (tinción con azul de toluidino) observado con microscopía de campo brillante

B) Monocapa de células provenientes de la epidermis inferior de hojas de tabaco (sin colorante agregado)

e: células del estoma, es: epidermis superior, mm: mesófilo en empalizada, ms: mesófilo esponjoso, ei: epidermis inferior

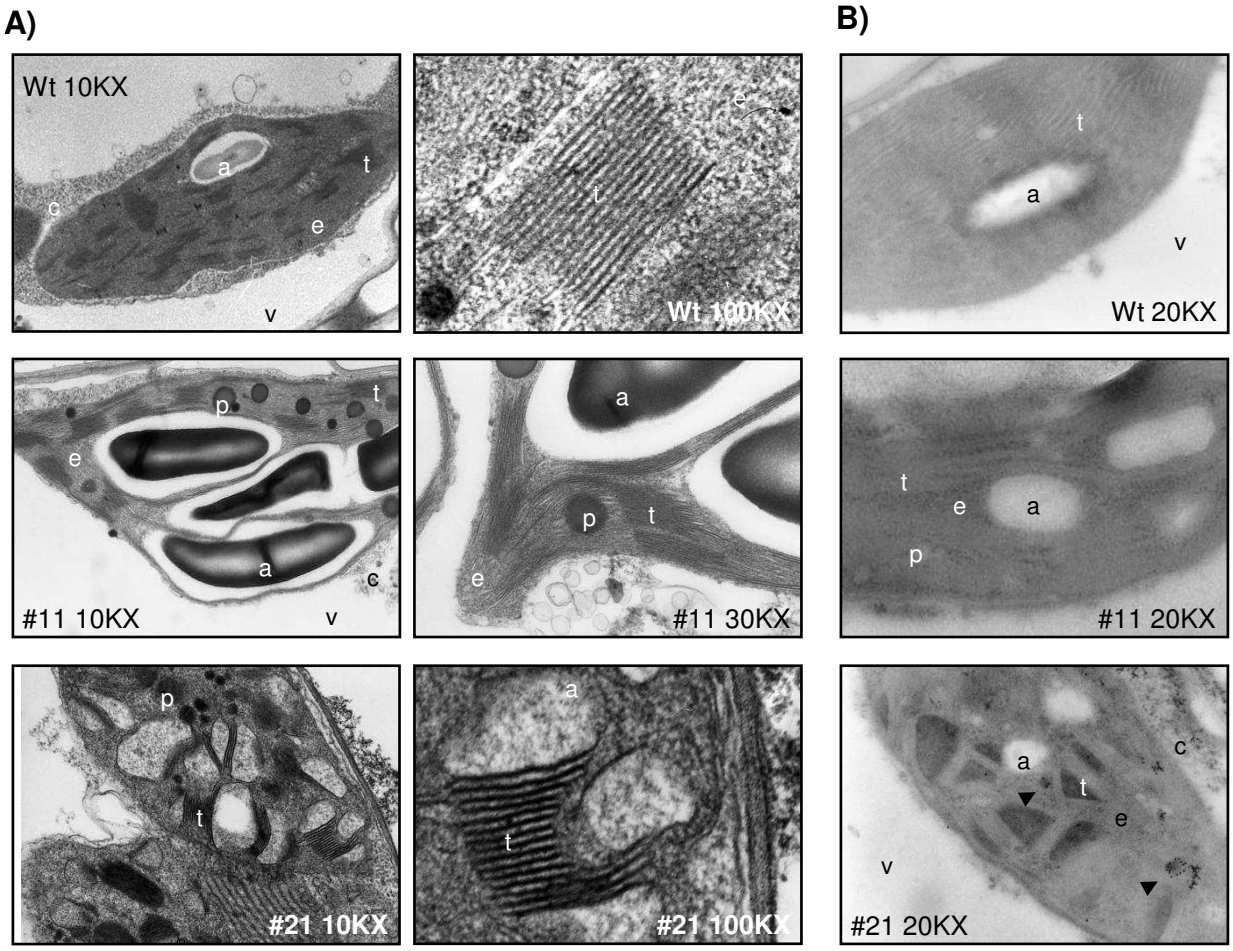



**Figura 3.13: Análisis comparativo de la organización plastídica en líneas transplastómicas para E7 y StrE7 mediante microscopía electrónica de transmisión e inmunolocalización.**

A) Cortes ultrafinos de tejido foliar incluido en resina SPURR fueron contrastados con acetato de uranilo y observados con microscopio de transmisión electrónica.

B) Cortes ultrafinos de tejido foliar incluido en resina LR White fueron incubados sucesivamente con anticuerpo anti E7 y anti-suero de conejo contra IgG de ratón conjugado con partículas de oro coloidal. Luego de contrastar los preparados con acetato de uranilo se observó al microscopio de transmisión electrónica.

Las flechas indican las partículas de oro coloidal asociadas a la inmunodetección de E7.
a: gránulos de almidón. c: citoplasma. e: estroma p: plastoglóbulos. t: tilacoide. v: vacuola

positivos en la línea #21 correspondiente a StrE7. La mayor concentración de marca asociada a E7 se observó en torno a las estructuras particulares observadas por MET. No se observó marca específica ni en las muestras correspondientes a la línea #11 ni en las correspondientes a cloroplastos no transformados.

## Capacidad inmunogénica de extractos de plantas StrE7 y E7GUS

La capacidad de generar respuesta inmune humoral específica de los extractos provenientes de líneas E7 y StrE7 fue analizada. Con este fin se inmunizaron tres grupos de 8 ratones cada uno con extractos proteicos totales provenientes de las líneas #11, #21 y *wild type.* Se inmunizaron los días 0, el 14 y el 28 procediéndose al sangrado a blanco el día 35. Los sueros obtenidos fueron utilizados como primer anticuerpo en un ensayo de *western blot.* Para ello se resolvieron proteínas provenientes de extractos de bacterias capaces de expresar E7 fusionada a GST en un SDS PAGE y luego transferidas a nitrocelulosa. Cinco de los ocho sueros provenientes de ratones inmunizados con extracto #21 fueron capaces de revelar una banda del mismo tamaño a la revelada con anti E7 como primer anticuerpo. Por el contrario ninguno de los sueros provenientes de ratones inmunizados con extractos de la línea #11 o de tabaco *wild type* detectaron la banda específica para la fusión E7GST **(figura 3.14)**.

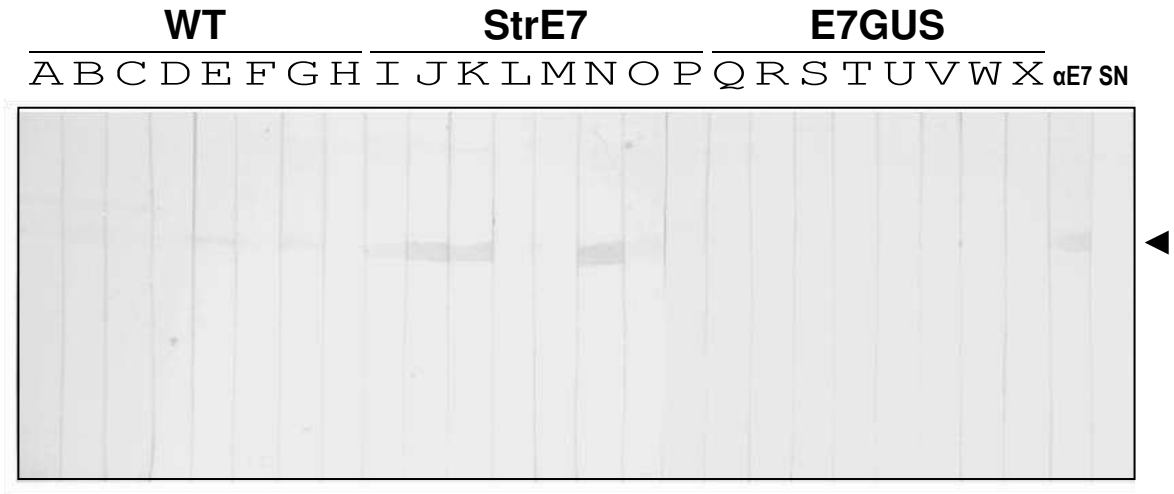



**Figura 3.14: Análisis de la capacidad inmunogénica de extractos de plantas transplastómicas para StrE7 y E7GUS mediante western blot**

Sueros de ratones inmunizados con extractos proteicos totales de plantas transplastómicas de las líneas StrE7 y E7GUS así como con extractos proteicos de plantas no transformadas (WT) fueron utilizados como primer anticuerpo para revelar una membrana de nitrocelulosa a la que previamente se había transferido extractos proteicos totales de bacterias que expresan E7 fusionada a GST. Las letras identifican sueros de distintos ratones inmunizados con: A-H: extracto control no transformado (WT), I-P: extracto línea #21 (StrE7), Q-W: extracto línea #41 (E7GUS). αE7: anticuerpo monoclonal contra E7 como primer anticuerpo (control positivo). SN: suero de ratón normal como primer anticuerpo (control negativo). La flecha indica la posición esperada para la banda correspondiente a E7GST bacteriana.

## *Conclusiones Capítulo III*

En este capítulo se exploró la posibilidad de dirigir la proteína E7 expresada en el estroma de cloroplastos hacia el lumen tilacoidal con el fin de aumentar los niveles de acumulación observados en el estroma. Con este propósito se escogió la señal bipartita amino-terminal del gen de la subunidad de 23kDa del complejo generador de oxígeno (OEC 23) del fotosistema II. Esta señal determina la translocación de OEC23 desde el citoplasma hacia el lumen tilacoidal. Primero atravesando la doble membrana del cloroplasto hacia el estroma y luego la membrana tilacoide hacia el lumen.

La capacidad de la señal Str de dirigir la translocación desde el estroma plastídico hacia el lumen tilacoidal se comprobó al verificarse el correcto procesamiento de la misma con ambas construcciones observándose en las plantas transplastómicas StrE7 y StrE7CP bandas de PM similares a E7 y E7CP. Este procesamiento del precursor no se observó en las bacterias transformadas con la misma construcción dado que la peptidasa específica de la señal existe exclusivamente en el lumen tilacoide.

El incremento de los niveles de acumulación de E7 en el lumen tilacoide de acuerdo con la hipótesis principal de este capítulo se verificó claramente. La expresión del péptido antigénico viral resultó dos órdenes de magnitud mayor en las líneas StrE7 respecto de las líneas E7. Esta diferencia también se observó para la fusión E7CP siendo un orden de magnitud superior para la versión dirigida al lumen. Notablemente con la fusión de CP a E7 en el lumen tilacoide se obtuvieron resultados opuestos a los observados en el estroma plastídico. Mientras que en el estroma la fusión E7CP se acumuló 5 veces más que E7 no fusionada, al direccionar la translocación hacia el lumen la relación se invirtió siendo los niveles de expresión de StrE7, entre dos y tres veces mayores a los de StrE7CP.

Si bien la integración del transgén y la homoplastia se verificó en todos las líneas obtenidas, en la línea #32 correspondiente a StrE7CP se observó a nivel de *Southern blot* una banda específica de PM superior al esperado. Este tipo de fenómenos atribuibles a eventos de recombinación plastídicos presenta antecedentes reportados que los vinculan a las secuencias reguladoras de las transcripción del vector repetidas en el plastoma (Rogalski *et al.*, 2006). Como consecuencia de este evento a nivel del ADN, en la misma línea los resultados de *northern* y *westen blot* también mostraron bandas de PM superior correspondientes al mRNA y al polipéptido derivados.

El análisis de los fenotipos de las líneas StrE7 y StrE7CP mostró diferencias marcadas. Las líneas StrE7 mostraron un crecimiento mucho más lento y una clorosis marcada. Por el contrario el fenotipo de las plantas StrE7CP resultó indistinguible del de las plantas *wild type*. A nivel del tejido foliar las plantas StrE7, mostraron cierta desorganización de los estratos correspondientes al mesófilo y formas más irregulares de las células que lo componen. Mediante microscopía electrónica de transmisión se observaron estructuras vinculadas a los tilacoides con características compatibles con posibles agregados proteicos asociados a la interacción de E7 con otros péptidos. La inmunomicroscopía electrónica permitió observar marca positiva para E7 asociada a las estructuras antes mencionadas.

En definitiva la fusión de la señal bipartita Str a E7 demostró ser capaz de dirigir la translocación del péptido viral expresado en cloroplasto hacia el lumen tilacoidal. La acumulación de E7 lumenal resultó dos órdenes de magnitud mayor a lo observado para la proteína E7 cuando esta se expresó en el estroma. Como contraparte el desarrollo de la planta transplastómica sufrió un perjuicio metabólico importante reflejado en un fenotipo clorótico y un crecimiento más lento.

# *DISCUSIÓN*

La necesidad de desarrollar una vacuna terapéutica contra el cáncer cervical ha encontrado en la proteína E7 del VPH un candidato promisorio ante la imposibilidad de desarrollar una estrategia basada en la inmunización con partículas virales inactivadas. La inoculación de E7 modulada con distintos adyuvantes demostró su capacidad para estimular una respuesta inmune específica y eficaz contra el desarrollo de lesiones oncogénicas asociadas a la infección por VPH. Sin embargo, la producción de grandes cantidades de antígeno recombinante en sistemas de expresión basados en bacterias, levaduras o baculovirus ha tropezado con una dificultad mayor. La vida media particularmente corta del péptido se encuentra asociada a su rápida degradación por parte de la maquinaria celular y al proteasoma (Fernando *et al.*, 1999). En este marco la posibilidad de expresar E7 en plantas surge como una alternativa potencialmente capaz de superar este obstáculo con ventajas desde el punto de vista de la eficacia, seguridad, versatilidad, estabilidad y economía respecto de otros sistemas.

El primer intento reportado para producir E7 en plantas se concretó utilizando un vector viral derivado del virus X de la papa para expresar el antígeno en forma transitoria en plantas de tabaco (Franconi *et al.*, 2002). En esta oportunidad E7 se acumuló en niveles discretos. Aproximadamente 3-4ugE7 por gramo de tejido fresco equivalente al 0,05% de la PST. La inmunización de ratones con extracto foliar crudo conteniendo al péptido recombinante brindó protección contra el desarrollo de tumores capaces de expresar E7 en un modelo murino. Los resultados sugieren que los complejos estables de alto peso molecular formados por la interacción de E7 con proteínas de la célula vegetal son capaces de actuar como adyuvantes potenciando la respuesta inmune tanto humoral como celular. Ante la necesidad de mejorar los bajos niveles de expresión del sistema, los autores ensayaron el direccionamiento de la proteína hacia la vía de secreción con resultados moderadamente alentadores (Franconi *et al.*, 2006).

La hipótesis inicial planteada en este trabajo proponía al sistema de expresión plastídico como una plataforma eficaz para acumular altos niveles de E7 recombinante. Este sistema mantiene las principales ventajas asociadas a las plantas como biorreactores sumando los beneficios del sistema plastídico para la expresión estable. Por un lado la maquinaria de la organela responsable de la regulación de la expresión de proteínas presenta una composición particular, admitiendo la acumulación de proteínas heterólogas en niveles extremadamente altos nunca alcanzados por la expresión estable a nivel nuclear. Más aún, la compartimentalización permite aislar las proteínas plastídicas del proteasoma localizado en el citoplasma y responsable de la degradación de la proteína

viral E7 en el caso de las células infectadas por VPH (Massa *et al*., 2008; Reinstein *et al*., 2000). De hecho la proteólisis de E7 recombinante por parte de esta estructura demostró ser un inconveniente importante en trabajos anteriores (Massa *et al*., 2008). Por otro lado la experiencia previa de nuestro laboratorio con el desarrollo del vector pBSW5´utr nos permitía contar con un sistema de transformación plastídica probado. Resultados anteriores basados en la utilización de este vector mostraron que era posible obtener niveles de expresión de proteína recombinante cercanos al 50% de la PST para la enzima β-glucuronidasa (Segretin *et al*., 2011) y para la proteína antigénica de fusión VP-GUS (Lentz *et al*., 2010).

En el presente trabajo nos propusimos obtener líneas transplastómicas para E7 en tabaco como alternativa capaz de superar las limitaciones observadas en los estudios previos al utilizar plantas de tabaco y vectores de expresión transitoria. Inicialmente además del péptido correspondiente a E7 del VPH16, nos propusimos expresar la proteína de fusión del antígeno a la cápside del virus X de la papa (E7CP) teniendo en cuenta que dicha fusión en vacunas a ADN resultó efectiva para mejorar la respuesta inmune inducida por E7 tanto a nivel humoral como celular (Massa *et al*., 2008). En general los niveles de expresión observados resultaron mayores a los obtenidos con el vector viral , aunque no alcanzaron en ninguno de los casos el 1% de la PST.

De acuerdo a las determinaciones realizadas por ELISA el nivel de expresión del antígeno en las líneas E7 resultó equivalente al 0,1% PST. Inesperadamente las líneas correspondientes a la fusión E7CP expresaron entre 3 y 5 veces más antígeno recombinante que las líneas correspondientes a E7 no fusionada. En general existen diversos factores que pueden afectar la acumulación de proteínas heterólogas en plantas y son múltiples las estrategias para mejorar la eficiencia ante cada uno de ellos (Streatfield, 2007). En la comprensión de este caso particular y teniendo en cuenta las características de la transformación plastídica, podemos descartar de ante mano factores muy comunes en la transformación nuclear como la variabilidad del sitio de inserción del transgén en el genoma o la posibilidad de modulación de la expresión por mecanismos como el silenciamiento génico. El hecho de compartir ambas construcciones el mismo promotor y la misma región 5´ no codificante permite rechazar la posibilidad de una mayor velocidad de transcripción por parte del transgén E7CP. La idea de una menor vida media para el ARNm correspondiente a E7 queda refutada por los resultados de *northern blot* en los que se observó una menor acumulación de ARNm específico para el caso de la construcción correspondiente a la proteína de fusión. En este punto las

posibilidades quedan reducidas a una mayor velocidad de traducción de E7CP o a una mayor velocidad de degradación por parte de E7. La primera alternativa se puede descartar debido a que ambas construcciones no sólo comparten la misma región 5´ no codificante capaz de modular la tasa de inicio de la traducción sino también la primer parte de la secuencia codificante correspondiente a los 98 aminoácidos de E7. Al no existir en E7 codones correspondientes a ARNt infrecuentes que pudieran ralentizar la traducción respecto de E7CP, la única explicación posible a la mayor acumulación de la proteína de fusión es su mayor estabilidad relativa en el entorno plastídico. Asimismo es posible concluir que el factor limitante de la expresión de E7 en cloroplastos es la rápida degradación del antígeno recombinante por parte del la maquinaria plastídica. Estas circunstancias permiten concebir a E7 expresada en cloroplastos como un excelente modelo para estudiar los factores que afectan la degradación de proteínas inestables en el entorno plastídico sin la interferencia de otros factores capaces de modular los niveles de acumulación como los mencionados más arriba.

La proteólisis es esencial para muchos aspectos de la fisiología y el desarrollo de las plantas. No sólo es responsable de la limpieza celular eliminando proteínas anormales y reciclando aminoácidos necesarios para producir nuevas proteínas. También interviene en la maduración de zimógenos y de las hormonas peptídicas, en el control del metabolismo, la homeostasis, y el desarrollo, en la reducción de la abundancia de enzimas y proteínas reguladoras y en la muerte celular programada. La evidencia acumulada indica que la degradación de proteínas en las plantas es un proceso complejo que involucra una multiplicidad de vías proteolíticas (Vierstra, 1996). En cada compartimento celular es posible hallar una o más de estas vías. Muchas presentan homología en bacterias y animales. Los ejemplos incluyen la proteasa ClpAP del cloroplasto, las catepsinas vacuolares, las proteasas KEX2 en la vía de secreción, y el sistema de ubiquitin/26S proteasoma en el núcleo y el citoplasma. Resulta interesante destacar que la proteólisis de E7 ocurre dentro del cloroplasto y por lo tanto en forma independiente a la ubiquitinación y al proteasoma citoplasmáticos. Significa que tanto E7 como E7CP plastídicas se encuentran expuestas a un mecanismo de control de plegamiento anómalo diferente al caracterizado fisiológicamente en el citoplasma. Este mecanismo resultaría determinante siendo el principal limitante de los niveles de acumulación de ambos antígenos recombinantes. Es muy posible que los complejos estables formados por E7 con otras proteínas se encuentren estrechamente relacionados con la activación del mecanismo degradativo. También es factible que la propia E7 presente secuencias capaces *per se* de desencadenar la proteólisis. En cualquier caso

resulta claro que la presencia de CP en la proteína de fusión demostró ser capaz de estabilizar parcialmente a E7 indicando una posible estrategia para mejorar los niveles de expresión del antígeno recombinante.

La estabilidad de cualquier proteína se encuentra determinada por la interacción de sus características intrínsecas (secuencia primaria) con las condiciones físicas y bioquímicas del entorno. Modificando cualquiera de ambos factores es posible modularla. En este sentido la modificación de la secuencia primaria del péptido de interés fusionándolo a una proteína *carrier* capaz de estabilizar la expresión del mismo, es una de las estrategias más utilizadas para aumentar los niveles de acumulación de proteínas heterólogas. Entre los sistemas de expresión donde el abordaje mostró resultados positivos se encuentran las plantas como biorreactores en general (Leelavathi *et al*., 2004; Wirth *et al*., 2006) y los sistemas de expresión plastídicos en particular (Lentz *et al*., 2010; Ortigosa *et al*., 2010; Scotti *et al*., 2011; Staub *et al*., 2000; Ye *et al*., 2001). Durante la segunda parte del trabajo nos propusimos mejorar los niveles de acumulación del antígeno E7 mediante su fusión traduccional a la enzima β-glucuronidasa (GUS) de *E. coli*. Trabajos previos de nuestro laboratorio utilizando el vector pBSW5´utr mostraron el potencial de GUS como *carrier* plastídico. Por un lado la enzima bacteriana mostró su capacidad para alcanzar niveles de acumulación muy altos en cloroplastos de papa y tabaco (Segretin *et al*., 2011). Por otro lado la expresión plastídica del epítope antigénico VP1 del virus de la fiebre aftosa fusionado en su extremo carboxlo-terminal a la enzima bacteriana permitió obtener niveles de expresión superiores al 50% de las PST (Lentz *et al*., 2010). En el caso de nuestro trabajo con E7, además de la fusión E7GUS también desarrollamos y estudiamos las fusión amino-terminal GUSE7. El análisis de la expresión se realizó sobre extractos de hojas sometidos a SDS-PAGE. Ambas construcciones mostraron niveles de expresión superiores respecto de los alcanzados con E7 no fusionada. En el ensayo de *western blot* se observaron, además de las bandas específicas correspondientes a E7GUS y GUSE7, los agregados de mayor PM característicos de E7 aunque en menor proporción. La tinción de los geles con azul de Coomassie, permitió visualizar bandas específicas para ambas fusiones en extractos provenientes de hojas maduras. En su conjunto los resultados permitieron estimar un nivel de acumulación similar para ambas proteínas de fusión, superior al 1-2% de las proteínas totales (Oey *et al*., 2009). Estos niveles resultan un orden de magnitud por encima de los estimados para E7 no fusionada, indicando que la fusión a GUS resultó capaz de estabilizar la expresión del antígeno viral. Existen dos mecanismos posibles para explicar la reducción de la proteólisis de E7GUS. Uno es el favorecimiento de un plegamiento alternativo de E7 con

menor capacidad de desencadenar la degradación por parte de la maquinaria molecular del estroma. Otra posibilidad es el enmascaramiento u ocultamiento de la secuencia o plegamiento anómalo expuesto en la proteína viral no fusionada. En cualquier caso es importante destacar que la capacidad de estabilización de GUS es parcial ya que los niveles de expresión de ambas proteínas de fusión son muy inferiores a los alcanzados previamente en nuestro laboratorio con GUS y VP1GUS. La presencia de agregados de alto PM, con potencial capacidad de gatillar la degradación, indicaría que la estabilidad de E7GUS y GUSE7 continúa siendo el factor crítico limitante de la acumulación de las proteínas heterólogas asociadas a E7. Los resultados obtenidos apoyan la fusión de proteínas a E7 como estrategia válida para mejorar la acumulación del antígeno recombinante expresado en cloroplastos. Estudios complementarios con otras proteínas *carrier* deberán ser realizados para optimizar este abordaje y establecer su verdadero potencial así como sus limitaciones asociadas.

En la tercera y última parte de este trabajo nos propusimos explorar la estabilidad de E7 en un entorno distinto al del estroma . La estrategia propuesta se basa en el redireccionamiento de E7 expresada en cloroplastos desde el estroma hacia el lumen tilacoide, este compartimiento presenta características bioquímicas propias. La exploración de localizaciones alternativas para las proteínas recombinantes es un abordaje común en varios sistemas de expresión entre los que se destaca la transformación del genoma nuclear de plantas (Karg *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009). La base común de este abordaje supone que una proteína en particular puede tener una vida media relativamente corta en un compartimiento específico como el citoplasma y paralelamente una estabilidad mucho mayor cuando se dirige su acumulación a otras localizaciones con entornos bioquímicos diferentes, como puede ser el retículo endoplasmático (Torres *et al.*, 1999) o el apoplasto en la células vegetales (Gils *et al.*, 2005; Wirth *et al.*, 2004). En el caso del lumen tilacoide, hay factores importantes capaces de modular directa o indirectamente los niveles de acumulación de una proteína heteróloga como E7. Indirectamente el pH y el potencial redox del compartimiento lumenal son capaces de condicionar el plegamiento de cualquier polípéptido. En particular el potencial redox genera un interés creciente por su capacidad aún bastante incomprendida de regular procesos metabólicos complejos como la expresión génica (Dietz *et al.*, 2011). Directamente, en el lumen como en cualquier otro compartimiento celular, existe una maquinaria molecular específica capaz de eliminar plegamientos y agregados peptídicos anómalos mediante chaperonas y/o proteasas específicas.

Un desafío adicional al momento de iniciar esta tesis consistía en lograr la translocación de una proteína expresada en el cloroplasto hacia el lumen tilacoidal ya que no existían antecedentes publicados de proteínas endógenas o recombinantes del lumen cuyo origen no sea el genoma nuclear. Esta situación se revirtió durante el desarrollo de este trabajo de Tesis con la publicación de los tres primeros reportes de plastomas transformados capaces de acumular proteínas recombinantes en el lumen tilacoidal (Bally *et al.*, 2008; De Marchis *et al.*, 2011; Tissot *et al.*, 2008). Los tres trabajos utilizaron con éxito secuencias amino-terminales capaces de dirigir la translocación provenientes de especies diferentes al tabaco. En el caso de esta tesis se escogió la señal bipartita amino-terminal de la proteína lumenal de tabaco OEC23, *Str*. Previamente *Str* había demostrado ser capaz de direccionar la expresión del gen reportero EGFP desde el citoplasma al lumen tilacoidal (Marques *et al.*, 2004).

Los resultados mostraron que tanto la proteína StrE7 como la StrE7CP fueron capaces de translocar hacia el lumen tilacoide y sufrir el procesamiento específico por parte de la peptidasa lumenal liberándose así las proteínas maduras E7 y E7CP. Ambas proteínas mostraron niveles de acumulación superiores a los observados en el estroma. Sin embargo en este caso los niveles de expresión resultaron superiores para E7 no fusionada respecto de E7CP demostrando que en el lumen la fusión a la cápside del PVX redundó en un aumento de la degradación de la proteína resultante en contraste con lo observado a nivel estromal. El redireccionamiento producido por la señal bipartita Str hacia el lumen tilacoidal también fue verificado en forma paralela por trabajos de nuestro laboratorio con el antígeno VP8 de rotavirus bovino expresado en cloroplastos (Lentz, 2011). En el caso de StrVP8 se corroboró tanto la acumulación lumenal de VP8 como el procesamiento de la señal bipartita por parte de la peptidasa tilacoidal.

La cuantificación de los niveles de expresión de E7 en las distintas líneas constituyó un desafío importante a lo largo de este trabajo. Si bien no se observaron mayores dificultades para utilizar la técnica de ELISA en las líneas E7 y E7CP, para las líneas E7GUS, GUSE7, StrE7 y StrE7CP los resultados obtenidos mediante esta técnica resultaron inconsistentes y notoriamente subestimados con respecto a los observados por *western blot.* Probablemente esto se deba al enmascaramiento del epítope reconocido por el anticuerpo monoclonal antiE7 en los extractos no desnaturalizados utilizados en la técnica de ELISA. Esto puede ocurrir por la estabilidad de la interacción

con otras proteínas con las que E7 forma agregados (StrE7 y StrE7CP) o por la interacción con las secuencias aminoacídicas fusionadas a E7 en el mismo polipéptido (E7GUSy GUSE7). Para poder comparar los niveles de expresión alcanzados con las distintas construcciones se debió optar por la densitometría de las bandas específicas observadas en el *western blot.* Una limitación que no puede obviarse en este caso es la electrotransferencia diferencial de polípeptidos de distinto PM. Por este motivo las proteínas de mayor tamaño y las que forman agregados resistentes a la desnaturalización por SDS y calor (Garcia-Alai *et al*., 2007), tienden a ser subestimadas. Aún con estas limitaciones fue posible comparar los distintos niveles de expresión de E7, especialmente cuando las diferencias no resultaron sutiles. Se observó que las líneas transformadas con StrE7 mostraron los mayores niveles de expresión por masa de tejido fresco. Siendo estos dos órdenes mayores a los de la versión E7 estromal y al menos tres veces más que la StrE7CP. Esta última construcción presentó niveles de expresión similares a los observados por las fusiones E7GUS y GUSE7, siendo superiores a los de E7 en aproximadamente un orden de magnitud. Es importante destacar que la proporción de antígeno recombinante que permanece formando agregados luego del SDS PAGE para el caso de las líneas StrE7, resulta particularmente alto. Esto significa que los niveles de expresión reales para esta línea pueden resultar un 50-100% superiores a los estimados en base a la densitometría de la banda discreta.

Extractos totales de hojas provenientes de líneas StrE7 demostraron ser capaces de generar una respuesta inmune específica en ratones inoculados con extractos de hojas transplastómicas para E7. Por otro lado las líneas StrE7 fueron las únicas que mostraron un fenotipo anormal con una clorosis marcada y un crecimiento más lento. Este fenotipo se correlacionó con una desorganización parcial del tejido foliar, una morfología irregular de las células de la hoja y la aparición de estructuras particulares en el cloroplasto con características compatibles con los agregados proteicos. Estas estructuras se observaron asociadas con los tilacoides y a la presencia de E7 en los análisis de inmunomicroscopía electrónica. Otra alteración observada únicamente en las plantas StrE7 consistió en la reducción de proteínas totales por masa de tejido observada en los SDS-PAGE teñidos con azul de *Coomassie*. Si bien son necesarios más estudios para poder dilucidar la relación entre la expresión de StrE7 y los cambios fenotípicos y morfológicos observados, existen numerosos antecedentes en los cuales la expresión de proteínas heterólogas generan fenotipos anormales (Chakrabarti *et al*., 2006; Oey *et al*., 2009; Waheed *et al*., 2011). En general las alteraciones fenotípicas de las líneas transplastómicas son

atribuidas a la interferencia de la proteína recombinante con el metabolismo del cloroplasto. En el caso particular del direccionamiento de E7 hacia el lumen tilacoidal, es posible que los agregados de proteínas observados en el lumen interfieran en el funcionamiento y la disponibilidad de otros polipéptidos. Otro mecanismo molecular susceptible de ser afectado es el mismo proceso de translocación. La mejor comprensión de las causas que afectan el fenotipo de las plantas StrE7 permitirá proponer estrategias complementarias para mejorar su crecimiento y desarrollo aumentando la eficiencia del sistema.

Los resultados de este trabajo permiten valorar distintos abordajes para superar las limitaciones asociadas a la expresión de proteínas de interés inestables como la proteína E7 del VPH en cloroplastos de tabaco. En particular la posibilidad de aumentar los niveles de acumulación de E7 dirigiendo su translocación hacia el lumen tilacoidal emerge como estategia promisoria para otras proteínas con características similares.

# *MATERIALES y MÉTODOS*

## Cepas bacterianas

### Condiciones de cultivo.

Se utilizaron las cepas DH5$\alpha$ y DH10B de *Escherichia coli*. Los cultivos líquidos crecieron a 37ºC 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 crecieron en placas de petri a 37ºC en medio LB adicionado con 1,5 % de agar. El medio se suplementó con antibióticos de acuerdo a la resistencia otorgada por cada plásmido y en las siguientes concentraciones: ampicilina 100 mg/L, kanamicina 50 mg/L, espectinomicina 100 mg/L, estreptomicina 100 mg/L.

### Preparación de bacterias termo-competentes.

Se utilizó el método de Hanahan (1985). Una colonia aislada creció toda la noche en 5 ml de medio LB líquido y de este cultivo, 4 ml se inocularon en 100 ml de medio LB líquido fresco y se dejó crecer nuevamente hasta alcanzar una $D.O._{600nm}$ de 0,3. El cultivo se enfrió en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 1.900 g durante 5 minutos a 4ºC. El precipitado de bacterias se resuspendió suavemente en 40 ml de solución TFB I fría, manteniendo siempre en hielo. Se volvió a centrifugar a 1.900 g durante 5 minutos a 4ºC y el precipitado se resuspendió en 4 ml de solución TFB II fría. Se incubó en hielo durante 15 minutos para luego alicuotar y conservar a -70ºC.

**TFB I**

| | |
|---|---|
| Acetato de Potasio | 30 mM |
| $RbCl_2$ o KCl | 100 mM |
| $CaCl_2$ | 10 mM |
| $MnCl_2$ | 50 mM |
| Glicerol | 15 % |

Ajustar a pH 5,8 con 0,2 M de ácido acético

**TFB II**

| | |
|---|---|
| MOPS | 10 mM |
| $RbCl_2$ o KCl | 10 mM |
| $CaCl_2$ | 75 mM |
| Glicerol | 15 % |

Ajustar a pH 6,5 con KOH 1 M

**Transformación de bacterias termo-competentes de E. coli.**

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

**Preparación de bacterias electro-competentes**

A partir de una colonia aislada de la cepa DH10B de *E. coli*, se inició un cultivo en 10 ml de medio LB líquido, y se creció toda la noche en agitación a 37°C. Al día siguiente se diluyó 1:100 en 1L de medio LB fresco, y se creció en agitación a 37°C hasta alacanzar una $DO_{600}$=0,5-1. Los cultivos se mantuvieron en hielo durante 15-30 min. Y luego se centrifugaron 15 min. a 4.000g (4°C). El precipitado se resuspendió con agitación suave, en 1L de agua fría. Luego de centrifugar 15 min. a 4.000g (4°C), el precipitado se resuspendió suavemente en 500 ml de agua fría. Tras una nueva centrifugación durante 15 min. a 4.000g (4°C), el precipitado se resuspendió en 20 ml de glicerol 10% frío. Finalmente, el precipitado obtenido luego de otra centrifugación durante 15 min. a 4.000g (4°C), se resuspendió en 2-3 ml de glicerol 10% frío y se dispensó en tubos *eppendorf* que se conservaron a -70°C hasta su utilización.

**Transformación de bacterias electro-competentes.**

Las células competentes se transformaron mediante electroporación, utilizando para ello el equipo "MicroPulser" (BioRad). Se utilizaron cubetas de electroporación de 2mm de espesor estériles (Molecular BioProducts), que se enfriaron antes de usar. Allí se colocaron 50 μl de bacterias competentes previamente mezcladas con 2 μl del ADN a transformar. Las bacterias se transformaron usando el programa Ec2 del equipo (1 pulso de 2,5kV). Inmediatamente, se agregó a la cubeta 1ml de medio LB, y la suspensión bacteriana se incubó 1h a 37°C para su recuperación. Transcurrido ese tiempo, 100-200μl se sembraron en una placa de LB sólido con los antibióticos correspondientes.

## Líneas de plantas

Se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana para las transformaciones de cloroplastos por biobalística.

## Plásmidos

### Comerciales

i. **pGemT-Easy** (Promega): vector de clonado, especialmente para productos de PCR amplificados con Taq Polimerasa

ii. **pZeRO-2** (Invitrogen Life Technologies): vector de clonado para productos de amplificación por PCR (preferentemente productos romos amplificados por *Pfu*).

iii. **pBlueScript** (Invitrogen Life Technologies): vector de clonado

## Secuencias génicas expresadas

Proteína E7 del VPH (9BD612534CD2C9EB): 297 nucleótidos, 98 aminoácidos, PM: 11KDa

```
1    catatgcacggagatacacctacattgcatgaatatatgttagatttgcaaccagagacaact
1        M* H  G  D  T  P  T  L  H  E  Y  M  L  D  L  Q  P  E  T  T
61       gatctctactgttatgagcaattaaatgacagctcagaggaggaggatgaaatagatggt
21        D  L  Y  C  Y  E  Q  L  N  D  S  S  E  E  E  D  E  I  D  G
121      ccagctggacaagcagaaccggacagagcccattacaatattgtaacctttgttgcaag
41        P  A  G  Q  A  E  P  D  R  A  H  Y  N  I  V  T  F  C  C  K
181      tgtgactctacgcttcggttgtgcgtacaaagcacacacgtagacattcgtactttggaa
61        C  D  S  T  L  R  L  C  V  Q  S  T  H  V  D  I  R  T  L  E
241      gacctgttaatgggcacactaggaattgtgtgccccatctgttctcagaaaccataatcc
81        D  L  L  M  G  T  L  G  I  V  C  P  I  C  S  Q  K  P  -
         cgggatcactaga
```

Proteína de fusión E7CP: 1002 nucleótidos, 334 aminoácidos, PM: 36KDa

```
1    catatgcacggagatacacctacattgcatgaatatatgttagatttgcaaccagagacaact
1        M* H  G  D  T  P  T  L  H  E  Y  M  L  D  L  Q  P  E  T  T
61       gatctctactgttatgagcaattaaatgacagctcagaggaggaggatgaaatagatggt
21        D  L  Y  C  Y  E  Q  L  N  D  S  S  E  E  E  D  E  I  D  G
121      ccagctggacaagcagaaccggacagagcccattacaatattgtaacctttgttgcaag
41        P  A  G  Q  A  E  P  D  R  A  H  Y  N  I  V  T  F  C  C  K
181      tgtgactctacgcttcggttgtgcgtacaaagcacacacgtagacattcgtactttggaa
61        C  D  S  T  L  R  L  C  V  Q  S  T  H  V  D  I  R  T  L  E
241      gacctgttaatgggcacactaggaattgtgtgccccatctgttctcagaaacccgggact
81        D  L  L  M  G  T  L  G  I  V  C  P  I  C  S  Q  K  P  G  T
301      acaccagccaacaccactcaagctgtaggatccaccaaatcaactaccaccaccactgca
101       T  P  A  N  T  T  Q  A  V  G  S  T  K  S  T  T  T  T  T  A
361      ggcgcaactcctgccaatttagggctattcaccataccagatggggacttctttaggacc
121       G  A  T  P  A  N  L  G  L  F  T  I  P  D  G  D  F  F  R  T
421      gcaaaggctgtggtcgctagcaatgccgtggccaccaacgaggatctcgccaaaatacag
141       A  K  A  V  V  A  S  N  A  V  A  T  N  E  D  L  A  K  I  Q
481      gagatctggaaggacatgaaaattccttcagacactatggctcaggcagcttgggactta
161       E  I  W  K  D  M  K  I  P  S  D  T  M  A  Q  A  A  W  D  L
541      gtgagacactgtgccgacgtcgggtcctctgcccaaactgaaatgataggcaccggtcca
```

```
181      V  R  H  C  A  D  V  G  S  S  A  Q  T  E  M  I  G  T  G  P
601     tactccaatggggtcagccgggctagactggcagctgccattaaagaggtgtgcacactg
201      Y  S  N  G  V  S  R  A  R  L  A  A  A  I  K  E  V  C  T  L
661     aggcagttctgcaaaaagtatgccccgtggtctggaactggatgctcacaaacaacagc
221      R  Q  F  C  K  K  Y  A  P  V  V  W  N  W  M  L  T  N  N  S
721     ccaccggccaactggcaggcacaaggcttcaagccggagcacaaattcgcagcctttgac
241      P  P  A  N  W  Q  A  Q  G  F  K  P  E  H  K  F  A  A  F  D
781     ttctttgatggagtcactaatcccgcagctatcactccaaaagaagggctcatgagacct
261      F  F  D  G  V  T  N  P  A  A  I  T  P  K  E  G  L  M  R  P
841     ccgtctgaagcagaaatgaatgccgcccaaactgctgcctttgtgaagatcaccaaggcg
281      P  S  E  A  E  M  N  A  A  Q  T  A  A  F  V  K  I  T  K  A
901     agggcgcaatccaacgactttgccagtctggatgccgcggtcactaggggccgcatcaca
301      R  A  Q  S  N  D  F  A  S  L  D  A  A  V  T  R  G  R  I  T
961     ggaacgactgttgcagaagcagttgtttcactacccccaccataactacgtccacataac
321      G  T  T  V  A  E  A  V  V  S  L  P  P  P  -
        cgacgcgtatcatctgcagaattccagcacactggcggccgttactaga
```

β-Glucuronidasa (E769C8D61A3B9A76): 603 aminoácidos, 1812 nucleótidos, PM: 68Kda

```
1    cat atgttacgtcctgtagaaaccccaacccgtgaaatcaaaaaactcgacggcctgtgggca
1        M* L  R  P  V  E  T  P  T  R  E  I  K  K  L  D  G  L  W  A
61      ttcagtctggatcgcgaaaactgtggaattgatcagcgttggtgggaaagcgcgttacaa
21       F  S  L  D  R  E  N  C  G  I  D  Q  R  W  W  E  S  A  L  Q
121     gaaagccgggcaattgctgtgccaggcagttttaacgatcagttcgccgatgcagatatt
41       E  S  R  A  I  A  V  P  G  S  F  N  D  Q  F  A  D  A  D  I
181     cgtaattatgcgggcaacgtctggtatcagcgcgaagtctttataccgaaaggttgggca
61       R  N  Y  A  G  N  V  W  Y  Q  R  E  V  F  I  P  K  G  W  A
241     ggccagcgtatcgtgctgcgtttcgatgcggtcactcattacggcaaagtgtgggtcaat
81       G  Q  R  I  V  L  R  F  D  A  V  T  H  Y  G  K  V  W  V  N
301     aatcaggaagtgatggagcatcagggcggctatacgccatttgaagccgatgtcacgccg
101      N  Q  E  V  M  E  H  Q  G  G  Y  T  P  F  E  A  D  V  T  P
361     tatgttattgccgggaaaagtgtacgtatcaccgtttgtgtgaacaacgaactgaactgg
121      Y  V  I  A  G  K  S  V  R  I  T  V  C  V  N  N  E  L  N  W
421     cagactatcccgccgggaatggtgattaccgacgaaaacggcaagaaaaagcagtcttac
141      Q  T  I  P  P  G  M  V  I  T  D  E  N  G  K  K  K  Q  S  Y
481     ttccatgatttctttaactatgccggaatccatcgcagcgtaatgctctacaccacgccg
161      F  H  D  F  F  N  Y  A  G  I  H  R  S  V  M  L  Y  T  T  P
541     aacacctgggtggacgatatcaccgtggtgacgcatgtcgcgcaagactgtaaccacgcg
181      N  T  W  V  D  D  I  T  V  V  T  H  V  A  Q  D  C  N  H  A
601     tctgttgactggcaggtggtggccaatggtgatgtcagcgttgaactgcgtgatgcggat
201      S  V  D  W  Q  V  V  A  N  G  D  V  S  V  E  L  R  D  A  D
661     caacaggtggttgcaactggacaaggcactagcgggactttgcaagtggtgaatccgcac
221      Q  Q  V  V  A  T  G  Q  G  T  S  G  T  L  Q  V  V  N  P  H
721     ctctggcaaccgggtgaaggttatctctatgaactgtgcgtcacagccaaaagccagaca
241      L  W  Q  P  G  E  G  Y  L  Y  E  L  C  V  T  A  K  S  Q  T
781     gagtgtgatatctacccgcttcgcgtcggcatccggtcagtggcagtgaagggcgaacag
261      E  C  D  I  Y  P  L  R  V  G  I  R  S  V  A  V  K  G  E  Q
841     ttcctgattaaccacaaaccgttctactttactggctttggtcgtcatgaagatgcggac
281      F  L  I  N  H  K  P  F  Y  F  T  G  F  G  R  H  E  D  A  D
901     ttgcgtggcaaaggattcgataacgtgctgatggtgcacgaccacgcattaatggactgg
301      L  R  G  K  G  F  D  N  V  L  M  V  H  D  H  A  L  M  D  W
961     attggggccaactcctaccgtacctcgcattacccttacgctgaagagatgctcgactgg
321      I  G  A  N  S  Y  R  T  S  H  Y  P  Y  A  E  E  M  L  D  W
1021    gcagatgaacatggcatcgtggtgattgatgaaactgctgctgtcggctttaacctctct
341      A  D  E  H  G  I  V  V  I  D  E  T  A  A  V  G  F  N  L  S
1081    ttaggcattggtttcgaagcgggcaacaagccgaaagaactgtacagcgaagaggcagtc
361      L  G  I  G  F  E  A  G  N  K  P  K  E  L  Y  S  E  E  A  V
```

```
1141   aacggggaaactcagcaagcgcacttacaggcgattaaagagctgatagcgcgtgacaaa
381     N  G  E  T  Q  Q  A  H  L  Q  A  I  K  E  L  I  A  R  D  K
1201   aaccacccaagcgtggtgatgtggagtattgccaacgaaccggatacccgtccgcaaggt
401     N  H  P  S  V  V  M  W  S  I  A  N  E  P  D  T  R  P  Q  G
1261   gcacgggaatatttcgcgccactggcggaagcaacgcgtaaactcgacccgacgcgtccg
421     A  R  E  Y  F  A  P  L  A  E  A  T  R  K  L  D  P  T  R  P
1321   atcacctgcgtcaatgtaatgttctgcgacgctcacaccgataccatcagcgatctcttt
441     I  T  C  V  N  V  M  F  C  D  A  H  T  D  T  I  S  D  L  F
1381   gatgtgctgtgcctgaaccgttattacggatggtatgtccaaagcggcgatttggaaacg
461     D  V  L  C  L  N  R  Y  Y  G  W  Y  V  Q  S  G  D  L  E  T
1441   gcagagaaggtactggaaaaagaacttctggcctggcaggagaaactgcatcagccgatt
481     A  E  K  V  L  E  K  E  L  L  A  W  Q  E  K  L  H  Q  P  I
1501   atcatcaccgaatacggcgtggatacgttagccgggctgcactcaatgtacaccgacatg
501     I  I  T  E  Y  G  V  D  T  L  A  G  L  H  S  M  Y  T  D  M
1561   tggagtgaagagtatcagtgtgcatggctggatatgtatcaccgcgtctttgatcgcgtc
521     W  S  E  E  Y  Q  C  A  W  L  D  M  Y  H  R  V  F  D  R  V
1621   agcgccgtcgtcggtgaacaggtatggaatttcgccgattttgcgacctcgcaaggcata
541     S  A  V  V  G  E  Q  V  W  N  F  A  D  F  A  T  S  Q  G  I
1681   ttgcgcgttggcggtaacaagaaagggatcttcactcgcgaccgcaaaccgaagtcggcg
561     L  R  V  G  G  N  K  K  G  I  F  T  R  D  R  K  P  K  S  A
1741   gcttttctgctgcaaaaacgctggactggcatgaacttcggtgaaaaaccgcagcaggga
581     A  F  L  L  Q  K  R  W  T  G  M  N  F  G  E  K  P  Q  Q  G
1801   ggcaaacaatgaatctaga
601     G  K  Q  -
```

Proteína de fusión E7GUS: 2100 nucleótidos, 700 aminoácidos, PM: 79KDa

```
1    cat atgcacggagatacacctacattgcatgaatatatgttagatttgcaaccagagacaact
1       M* H  G  D  T  P  T  L  H  E  Y  M  L  D  L  Q  P  E  T  T
61     gatctctactgttatgagcaattaaatgacagctcagaggaggaggatgaaatagatggt
21      D  L  Y  C  Y  E  Q  L  N  D  S  S  E  E  E  D  E  I  D  G
121    ccagctggacaagcagaaccggacagagcccattacaatattgtaacctttttgttgcaag
41      P  A  G  Q  A  E  P  D  R  A  H  Y  N  I  V  T  F  C  C  K
181    tgtgactctacgcttcggttgtgcgtacaaagcacacacgtagacattcgtactttggaa
61      C  D  S  T  L  R  L  C  V  Q  S  T  H  V  D  I  R  T  L  E
241    gacctgttaatgggcacactaggaattgtgtgccccatctgttctcagaaagctttacgt
81      D  L  L  M  G  T  L  G  I  V  C  P  I  C  S  Q  K  A  L  R
301    cctgtagaaaccccaacccgtgaaatcaaaaaactcgacggcctgtgggcattcagtctg
101     P  V  E  T  P  T  R  E  I  K  K  L  D  G  L  W  A  F  S  L
361    gatcgcgaaaactgtggaattgatcagcgttggtgggaaagcgcgttacaagaaagccgg
121     D  R  E  N  C  G  I  D  Q  R  W  W  E  S  A  L  Q  E  S  R
421    gcaattgctgtgccaggcagttttaacgatcagttcgccgatgcagatattcgtaattat
141     A  I  A  V  P  G  S  F  N  D  Q  F  A  D  A  D  I  R  N  Y
481    gcgggcaacgtctggtatcagcgcgaagtctttataccgaaaggttgggcaggccagcgt
161     A  G  N  V  W  Y  Q  R  E  V  F  I  P  K  G  W  A  G  Q  R
541    atcgtgctgcgtttcgatgcggtcactcattacggcaaagtgtgggtcaataatcaggaa
181     I  V  L  R  F  D  A  V  T  H  Y  G  K  V  W  V  N  N  Q  E
601    gtgatggagcatcagggcggctatacgccatttgaagccgatgtcacgccgtatgttatt
201     V  M  E  H  Q  G  G  Y  T  P  F  E  A  D  V  T  P  Y  V  I
661    gccgggaaaagtgtacgtatcaccgtttgtgtgaacaacgaactgaactggcagactatc
221     A  G  K  S  V  R  I  T  V  C  V  N  N  E  L  N  W  Q  T  I
721    ccgccgggaatggtgattaccgacgaaaacggcaagaaaaagcagtcttacttccatgat
241     P  P  G  M  V  I  T  D  E  N  G  K  K  K  Q  S  Y  F  H  D
781    ttctttaactatgccggaatccatcgcagcgtaatgctctacaccacgccgaacacctgg
261     F  F  N  Y  A  G  I  H  R  S  V  M  L  Y  T  T  P  N  T  W
841    gtggacgatatcaccgtggtgacgcatgtcgcgcaagactgtaaccacgcgtctgttgac
281     V  D  D  I  T  V  V  T  H  V  A  Q  D  C  N  H  A  S  V  D
901    tggcaggtggtggccaatggtgatgtcagcgttgaactgcgtgatgcggatcaacaggtg
301     W  Q  V  V  A  N  G  D  V  S  V  E  L  R  D  A  D  Q  Q  V
```

```
961     gttgcaactggacaaggcactagcgggactttgcaagtggtgaatccgcacctctggcaa
321      V  A  T  G  Q  G  T  S  G  T  L  Q  V  V  N  P  H  L  W  Q
1021    ccgggtgaaggttatctctatgaactgtgcgtcacagccaaaagccagacagagtgtgat
341      P  G  E  G  Y  L  Y  E  L  C  V  T  A  K  S  Q  T  E  C  D
1081    atctacccgcttcgcgtcggcatccggtcagtggcagtgaagggcgaacagttcctgatt
361      I  Y  P  L  R  V  G  I  R  S  V  A  V  K  G  E  Q  F  L  I
1141    aaccacaaaccgttctactttactggctttggtcgtcatgaagatgcggacttgcgtggc
381      N  H  K  P  F  Y  F  T  G  F  G  R  H  E  D  A  D  L  R  G
1201    aaaggattcgataacgtgctgatggtgcacgaccacgcattaatggactggattggggcc
401      K  G  F  D  N  V  L  M  V  H  D  H  A  L  M  D  W  I  G  A
1261    aactcctaccgtacctcgcattacccttacgctgaagagatgctcgactgggcagatgaa
421      N  S  Y  R  T  S  H  Y  P  Y  A  E  E  M  L  D  W  A  D  E
1321    catggcatcgtggtgattgatgaaactgctgctgtcggctttaacctctctttaggcatt
441      H  G  I  V  V  I  D  E  T  A  A  V  G  F  N  L  S  L  G  I
1381    ggtttcgaagcgggcaacaagccgaaagaactgtacagcgaagaggcagtcaacggggaa
461      G  F  E  A  G  N  K  P  K  E  L  Y  S  E  E  A  V  N  G  E
1441    actcagcaagcgcacttacaggcgattaaagagctgatagcgcgtgacaaaaaccaccca
481      T  Q  Q  A  H  L  Q  A  I  K  E  L  I  A  R  D  K  N  H  P
1501    agcgtggtgatgtggagtattgccaacgaaccggatacccgtccgcaaggtgcacgggaa
501      S  V  V  M  W  S  I  A  N  E  P  D  T  R  P  Q  G  A  R  E
1561    tatttcgcgccactggcggaagcaacgcgtaaactcgacccgacgcgtccgatcacctgc
521      Y  F  A  P  L  A  E  A  T  R  K  L  D  P  T  R  P  I  T  C
1621    gtcaatgtaatgttctgcgacgctcacaccgataccatcagcgatctctttgatgtgctg
541      V  N  V  M  F  C  D  A  H  T  D  T  I  S  D  L  F  D  V  L
1681    tgcctgaaccgttattacggatggtatgtccaaagcggcgatttggaaacggcagagaag
561      C  L  N  R  Y  Y  G  W  Y  V  Q  S  G  D  L  E  T  A  E  K
1741    gtactggaaaaagaacttctggcctggcaggagaaactgcatcagccgattatcatcacc
581      V  L  E  K  E  L  L  A  W  Q  E  K  L  H  Q  P  I  I  I  T
1801    gaatacggcgtggatacgttagccgggctgcactcaatgtacaccgacatgtggagtgaa
601      E  Y  G  V  D  T  L  A  G  L  H  S  M  Y  T  D  M  W  S  E
1861    gagtatcagtgtgcatggctggatatgtatcaccgcgtctttgatcgcgtcagcgccgtc
621      E  Y  Q  C  A  W  L  D  M  Y  H  R  V  F  D  R  V  S  A  V
1921    gtcggtgaacaggtatggaatttcgccgattttgcgacctcgcaaggcatattgcgcgtt
641      V  G  E  Q  V  W  N  F  A  D  F  A  T  S  Q  G  I  L  R  V
1981    ggcggtaacaagaaagggatcttcactcgcgaccgcaaaccgaagtcggcggcttttctg
661      G  G  N  K  K  G  I  F  T  R  D  R  K  P  K  S  A  A  F  L
2041    ctgcaaaaacgctggactggcatgaacttcggtgaaaaaccgcagcagggaggcaaacaa
681      L  Q  K  R  W  T  G  M  N  F  G  E  K  P  Q  Q  G  G  K  Q
2101    tgaatctagac
         -
```

Proteína de fusión GUSE7: 2106 nucleótidos, 702 aminoácidos, PM: 79,5KDa

```
1    cat atgttacgtcctgtagaaaccccaacccgtgaaatcaaaaaactcgacggcctgtgggca
1        M* L  R  P  V  E  T  P  T  R  E  I  K  K  L  D  G  L  W  A
61      ttcagtctggatcgcgaaaactgtggaattgatcagcgttggtgggaaagcgcgttacaa
21       F  S  L  D  R  E  N  C  G  I  D  Q  R  W  W  E  S  A  L  Q
121     gaaagccgggcaattgctgtgccaggcagttttaacgatcagttcgccgatgcagatatt
41       E  S  R  A  I  A  V  P  G  S  F  N  D  Q  F  A  D  A  D  I
181     cgtaattatgcgggcaacgtctggtatcagcgcgaagtctttataccgaaaggttgggca
61       R  N  Y  A  G  N  V  W  Y  Q  R  E  V  F  I  P  K  G  W  A
241     ggccagcgtatcgtgctgcgtttcgatgcggtcactcattacggcaaagtgtgggtcaat
81       G  Q  R  I  V  L  R  F  D  A  V  T  H  Y  G  K  V  W  V  N
301     aatcaggaagtgatggagcatcagggcggctatacgccatttgaagccgatgtcacgccg
101      N  Q  E  V  M  E  H  Q  G  G  Y  T  P  F  E  A  D  V  T  P
361     tatgttattgccgggaaaagtgtacgtatcaccgtttgtgtgaacaacgaactgaactgg
121      Y  V  I  A  G  K  S  V  R  I  T  V  C  V  N  N  E  L  N  W
421     cagactatcccgccgggaatggtgattaccgacgaaaacggcaagaaaaagcagtcttac
141      Q  T  I  P  P  G  M  V  I  T  D  E  N  G  K  K  K  Q  S  Y
```

```
481     ttccatgatttctttaactatgccggaatccatcgcagcgtaatgctctacaccacgccg
161      F  H  D  F  F  N  Y  A  G  I  H  R  S  V  M  L  Y  T  T  P
541     aacacctgggtggacgatatcaccgtggtgacgcatgtcgcgcaagactgtaaccacgcg
181      N  T  W  V  D  D  I  T  V  V  T  H  V  A  Q  D  C  N  H  A
601     tctgttgactggcaggtggtggccaatggtgatgtcagcgttgaactgcgtgatgcggat
201      S  V  D  W  Q  V  V  A  N  G  D  V  S  V  E  L  R  D  A  D
661     caacaggtggttgcaactggacaaggcactagcgggactttgcaagtggtgaatccgcac
221      Q  Q  V  V  A  T  G  Q  G  T  S  G  T  L  Q  V  V  N  P  H
721     ctctggcaaccgggtgaaggttatctctatgaactgtgcgtcacagccaaaagccagaca
241      L  W  Q  P  G  E  G  Y  L  Y  E  L  C  V  T  A  K  S  Q  T
781     gagtgtgatatctacccgcttcgcgtcggcatccggtcagtggcagtgaagggcgaacag
261      E  C  D  I  Y  P  L  R  V  G  I  R  S  V  A  V  K  G  E  Q
841     ttcctgattaaccacaaaccgttctactttactggctttggtcgtcatgaagatgcggac
281      F  L  I  N  H  K  P  F  Y  F  T  G  F  G  R  H  E  D  A  D
901     ttgcgtggcaaaggattcgataacgtgctgatggtgcacgaccacgcattaatggactgg
301      L  R  G  K  G  F  D  N  V  L  M  V  H  D  H  A  L  M  D  W
961     attggggccaactcctaccgtacctcgcattacccttacgctgaagagatgctcgactgg
321      I  G  A  N  S  Y  R  T  S  H  Y  P  Y  A  E  E  M  L  D  W
1021    gcagatgaacatggcatcgtggtgattgatgaaactgctgctgtcggctttaacctctct
341      A  D  E  H  G  I  V  V  I  D  E  T  A  A  V  G  F  N  L  S
1081    ttaggcattggtttcgaagcgggcaacaagccgaaagaactgtacagcgaagaggcagtc
361      L  G  I  G  F  E  A  G  N  K  P  K  E  L  Y  S  E  E  A  V
1141    aacggggaaactcagcaagcgcacttacaggcgattaaagagctgatagcgcgtgacaaa
381      N  G  E  T  Q  Q  A  H  L  Q  A  I  K  E  L  I  A  R  D  K
1201    aaccacccaagcgtggtgatgtggagtattgccaacgaaccggatacccgtccgcaaggt
401      N  H  P  S  V  V  M  W  S  I  A  N  E  P  D  T  R  P  Q  G
1261    gcacgggaatatttcgcgccactggcggaagcaacgcgtaaactcgacccgacgcgtccg
421      A  R  E  Y  F  A  P  L  A  E  A  T  R  K  L  D  P  T  R  P
1321    atcacctgcgtcaatgtaatgttctgcgacgctcacaccgataccatcagcgatctctttt
441      I  T  C  V  N  V  M  F  C  D  A  H  T  D  T  I  S  D  L  F
1381    gatgtgctgtgcctgaaccgttattacggatggtatgtccaaagcggcgatttggaaacg
461      D  V  L  C  L  N  R  Y  Y  G  W  Y  V  Q  S  G  D  L  E  T
1441    gcagagaaggtactggaaaaagaacttctggcctggcaggagaaactgcatcagccgatt
481      A  E  K  V  L  E  K  E  L  L  A  W  Q  E  K  L  H  Q  P  I
1501    atcatcaccgaatacggcgtggatacgttagccgggctgcactcaatgtacaccgacatg
501      I  I  T  E  Y  G  V  D  T  L  A  G  L  H  S  M  Y  T  D  M
1561    tggagtgaagagtatcagtgtgcatggctggatatgtatcaccgcgtctttgatcgcgtc
521      W  S  E  E  Y  Q  C  A  W  L  D  M  Y  H  R  V  F  D  R  V
1621    agcgccgtcgtcggtgaacaggtatggaatttcgccgattttgcgacctcgcaaggcata
541      S  A  V  V  G  E  Q  V  W  N  F  A  D  F  A  T  S  Q  G  I
1681    ttgcgcgttggcggtaacaagaaagggatcttcactcgcgaccgcaaaccgaagtcggcg
561      L  R  V  G  G  N  K  K  G  I  F  T  R  D  R  K  P  K  S  A
1741    gcttttctgctgcaaaaacgctggactggcatgaacttcggtgaaaaaccgcagcaggga
581      A  F  L  L  Q  K  R  W  T  G  M  N  F  G  E  K  P  Q  Q  G
1801    ggcaaacaagcttgcacggagatacacctacattgcatgaatatatgttagatttgcaa
601      G  K  Q  A  L  H  G  D  T  P  T  L  H  E  Y  M  L  D  L  Q
1861    ccagagacaactgatctctactgttatgagcaattaaatgacagctcagaggaggaggat
621      P  E  T  T  D  L  Y  C  Y  E  Q  L  N  D  S  S  E  E  E  D
2221    gaaatagatggtccagctggacaagcagaaccggacagagcccattacaatattgtaacc
641      E  I  D  G  P  A  G  Q  A  E  P  D  R  A  H  Y  N  I  V  T
2281    ttttgttgcaagtgtgactctacgcttcggttgtgcgtacaaagcacacacgtagacatt
661      F  C  C  K  C  D  S  T  L  R  L  C  V  Q  S  T  H  V  D  I
2341    cgtactttggaagacctgttaatgggcacactaggaattgtgtgccccatctgttctcag
681      R  T  L  E  D  L  L  M  G  T  L  G  I  V  C  P  I  C  S  Q
2401    aaaccataatcccgggatcactagtgaattcgcggccgcctgcaggtcgaccatatggga
701      K  P  -
        gagctcccaacgcgttggatgcatagcttgagtattctatagtgtcacctaaatatccat
        cacactggcggccgctcgagcatgcatctaga
```

Proteína de fusión StrE7: 543 nucleótidos, 181 aminoácidos, PM: 19,5KDa

```
1   cata atggcttcaacacaatgtttcttgcaccaacatgcactttctagctctgcagctagaaca
1         M  A  S  T  Q  C  F  L  H  Q  H  A  L  S  S  S  A  A  R  T
61      acatcctcagtgtcatcacagaggtacgtttcatcccttaagcctaaccaactggtttgc
21       T  S  S  V  S  S  Q  R  Y  V  S  S  L  K  P  N  Q  L  V  C
121     cgtgcccaaaaacagtcctcggctcaagaagatgatggcaacagcgtcgccgtctctcga
41       R  A  Q  K  Q  S  S  A  Q  E  D  D  G  N  S  V  A  V  S  R
181     cgattggctctcactgtcctcattggtgctgctgccgttggttccaaagtttcccctgca
61       R  L  A  L  T  V  L  I  G  A  A  A  V  G  S  K  V  S  P  A
241     gatgctcatatgcacggagatacacctacattgcatgaatatatgttagatttgcaacca
81       D  A  H  M  H  G  D  T  P  T  L  H  E  Y  M  L  D  L  Q  P
301     gagacaactgatctctactgttatgagcaattaaatgacagctcagaggaggaggatgaa
101      E  T  T  D  L  Y  C  Y  E  Q  L  N  D  S  S  E  E  E  D  E
361     atagatggtccagctggacaagcagaaccggacagagcccattacaatattgtaaccttt
121      I  D  G  P  A  G  Q  A  E  P  D  R  A  H  Y  N  I  V  T  F
421     tgttgcaagtgtgactctacgcttcggttgtgcgtacaaagcacacacgtagacattcgt
141      C  C  K  C  D  S  T  L  R  L  C  V  Q  S  T  H  V  D  I  R
481     actttggaagacctgttaatgggcacactaggaattgtgtgccccatctgttctcagaaa
161      T  L  E  D  L  L  M  G  T  L  G  I  V  C  P  I  C  S  Q  K
541     ccataatcccgggatcactaga
181      P  -
```

Proteína de fusión StrE7CP: 1251 nucleótidos, 417 aminoácidos, PM: 44,5KDa

```
1   cata atggcttcaacacaatgtttcttgcaccaacatgcactttctagctctgcagctagaaca
1         M  A  S  T  Q  C  F  L  H  Q  H  A  L  S  S  S  A  A  R  T
61      acatcctcagtgtcatcacagaggtacgtttcatcccttaagcctaaccaactggtttgc
21       T  S  S  V  S  S  Q  R  Y  V  S  S  L  K  P  N  Q  L  V  C
121     cgtgcccaaaaacagtcctcggctcaagaagatgatggcaacagcgtcgccgtctctcga
41       R  A  Q  K  Q  S  S  A  Q  E  D  D  G  N  S  V  A  V  S  R
181     cgattggctctcactgtcctcattggtgctgctgccgttggttccaaagtttcccctgca
61       R  L  A  L  T  V  L  I  G  A  A  A  V  G  S  K  V  S  P  A
241     gatgctcatatgcacggagatacacctacattgcatgaatatatgttagatttgcaacca
81       D  A  H  M  H  G  D  T  P  T  L  H  E  Y  M  L  D  L  Q  P
301     gagacaactgatctctactgttatgagcaattaaatgacagctcagaggaggaggatgaa
101      E  T  T  D  L  Y  C  Y  E  Q  L  N  D  S  S  E  E  E  D  E
361     atagatggtccagctggacaagcagaaccggacagagcccattacaatattgtaaccttt
121      I  D  G  P  A  G  Q  A  E  P  D  R  A  H  Y  N  I  V  T  F
421     tgttgcaagtgtgactctacgcttcggttgtgcgtacaaagcacacacgtagacattcgt
141      C  C  K  C  D  S  T  L  R  L  C  V  Q  S  T  H  V  D  I  R
481     actttggaagacctgttaatgggcacactaggaattgtgtgccccatctgttctcagaaa
161      T  L  E  D  L  L  M  G  T  L  G  I  V  C  P  I  C  S  Q  K
541     cccgggactacaccagccaacaccactcaagctgtaggatccaccaaatcaactaccacc
181      P  G  T  T  P  A  N  T  T  Q  A  V  G  S  T  K  S  T  T  T
601     accactgcaggcgcaactcctgccaatttagggctattcaccataccagatggggacttc
201      T  T  A  G  A  T  P  A  N  L  G  L  F  T  I  P  D  G  D  F
661     tttaggaccgcaaaggctgtggtcgctagcaatgccgtggccaccaacgaggatctcgcc
221      F  R  T  A  K  A  V  V  A  S  N  A  V  A  T  N  E  D  L  A
721     aaaatacaggagatctggaaggacatgaaaattccttcagacactatggctcaggcagct
241      K  I  Q  E  I  W  K  D  M  K  I  P  S  D  T  M  A  Q  A  A
781     tgggacttagtgagacactgtgccgacgtcgggtcctctgcccaaactgaaatgataggc
261      W  D  L  V  R  H  C  A  D  V  G  S  S  A  Q  T  E  M  I  G
841     accggtccatactccaatggggtcagccgggctagactggcagctgccattaaagaggtg
281      T  G  P  Y  S  N  G  V  S  R  A  R  L  A  A  A  I  K  E  V
901     tgcacactgaggcagttctgcaaaaagtatgcccccgtggtctggaactggatgctcaca
301      C  T  L  R  Q  F  C  K  K  Y  A  P  V  V  W  N  W  M  L  T
961     aacaacagcccaccggccaactggcaggcacaaggcttcaagccggagcacaaattcgca
```

```
321      N  N  S  P  P  A  N  W  Q  A  Q  G  F  K  P  E  H  K  F  A
1021   gcctttgacttctttgatggagtcactaatcccgcagctatcactccaaaagaagggctc
341      A  F  D  F  F  D  G  V  T  N  P  A  A  I  T  P  K  E  G  L
1081   atgagacctccgtctgaagcagaaatgaatgccgcccaaactgctgcctttgtgaagatc
361      M  R  P  P  S  E  A  E  M  N  A  A  Q  T  A  A  F  V  K  I
1141   accaaggcgagggcgcaatccaacgactttgccagtctggatgccgcggtcactaggggc
381      T  K  A  R  A  Q  S  N  D  F  A  S  L  D  A  A  V  T  R  G
1201   cgcatcacaggaacgactgttgcagaagcagttgtttcactacccccaccataactacgt
401      R  I  T  G  T  T  V  A  E  A  V  V  S  L  P  P  P  -
       ccacataaccgacgcgtatcatctgcagaattccagcacactggcggccgttactaga
```

## Oligonucleótidos iniciadores

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

| **Nombre** | **Secuencia 5' – 3'** | **Sitios** |
|---|---|---|
| **5' E7 Nde** | GACATATGCACGGAGATAC | Nde I/Metionina |
| **5' E7 Hind** | TAAGCTTTGCACGGAGATAC | Hind III |
| **3´E7 Sma** | CCCGGGATTATGGTTTCTGAGAACA | Sma I |
| **3´ E7 Hind** | GGATTAAGCTTTCTGAGAAC | Hind III |
| **3' CP Mlu** | GATACGCGTCGGTTATGTG | Mlu I |
| **5´GUS Nde** | GGAGCTCCGGGAGGTCAGTCCCATATGT | Sac I/RBS/Nde I |
| **5´GUS Hind** | CAAGCTTTACGTCCTGTAG | Hind III |
| **3´GUS Xba** | GGAGAGTTCTAGATTCATTG | Xba I |
| **3´GUS Hind** | CCAGATCTAGCTAAGCTTGTTTGCCTCCCTGCTG | HindIIII |
| **5´StrSpe/Ase** | TAACTAGTATTAATGGCTTCAACAC | SpeI/AseI |
| **3´Str Xba/Nde** | TCTAGACATATGAGCATCTGCAGGG | XbaI/NdeI |
| **SP6** | GATTTAGGTGACACTATAG | |
| **T7** | TAATACGACTCACTATAGGG | |
| **Fw** | GTATCTGGGGAATAAGCATCGG | |
| **Rv** | CGATGACGCCAACTACCTCTG | |

## Metodología del ADN recombinante

### Preparación de ADN plasmídico: 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 37ºC. Se cosecharon por centrifugación entre 1,5 y 4,5 ml de cultivo y se resuspendieron en 300 µl de solución 1 (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, ribonucleasa A 100 µg/ml). Se agregaron 300 µl de solución 2 (NaOH 200 mM, SDS 1 %), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos. Se agregaron luego, 300 µl de solución 3 (acetato de potasio 3 M, pH 5,5), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Transcurrida la incubación se centrifugaron las muestras a 15.700 g durante 10 minutos a 4ºC. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, al cual se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol. Se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente 15700 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70 %, se secó y se resuspendió en 30 µl de $H_2O$ bidestilada.

### Purificación de ADN plasmídico utilizando matrices comerciales de fibra de vidrio

Las preparaciones de ADN plasmídico para secuenciación se hicieron utilizando los sistemas de purificación *Wizard plus SV minipreps DNA Purification System* (Promega) y *GFx Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham Biosciences), siguiendo los protocolos suministrados con los mismos. Ambos sistemas consisten en una modificación del método de lisis alcalina, en la que el paso de precipitación del ADN con isopropanol, se reemplazó por el pasaje a través de una columna conteniendo una matriz de fibra de vidrio. El ADN unido diferencialmente a la columna se eluyó con 50 a 100 µl de $H_2O$ de acuerdo a la concentración final de ADN deseada.

### Preparación del ADN plasmídico a gran escala

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

## Preparación de plásmidos e insertos

### Amplificación de insertos por PCR

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

### Corte con enzimas de restricción

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

### Desfosforilación de extremos compatibles

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

**Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de Agarosa.**

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

**Extracción fenólica.**

Se agregó a la mezcla de reacción a purificar, 1 volumen de fenol equilibrado con Tris-HCl 1 M pH 8. Se mezcló agitando vigorosamente y se centrifugó a 15.000 g durante 3 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se transvasó a un nuevo tubo y se extrajo con un volumen de cloroformo. Se centrifugó nuevamente y se precipitó el ADN de la fase acuosa con 0,5 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M y 3 volúmenes de etanol absoluto frío, incubando a -70ºC durante 15 minutos o a -20ºC durante 30 minutos. Se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos a 4ºC. El precipitado se lavó con etanol 70 %, se dejó secar y se resuspendió en $H_2O$ bidestilada.

**Reacciones de ligación**

Las reacciones de ligación de plásmidos e insertos se hicieron utilizando la ADN ligasa del fago T4 (Gibco BRL; Invitrogen Life Technologies). Se usaron entre 25 y 50 ng de plásmido y relaciones molares de extremos plásmido:inserto variables entre 1:1 y 1:10. En cada caso se utilizó el *buffer* suministrado junto con la enzima en un volumen final de 20 μl de reacción. La cantidad de T4 ADN ligasa utilizada varió de acuerdo a las características de los extremos a ligar. Se utilizaron 0,1 y 1 unidad de enzima por reacción cuando se intentaban ligar extremos cohesivos o romos respectivamente y 0,5 unidades cuando ambos tipos de extremos estaban presentes. Las reacciones se incubaron a 16ºC entre 4 y 16 horas.

**Condiciones especiales de ligada. Productos de PCR**

Los productos de amplificación con *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies) se ligaron al vector pGEM-T-Easy (Promega) utilizando la ADN ligasa y el *buffer* de ligación rápida suministrados junto con el vector de clonado. La reacción se incubó 1 hora a temperatura ambiente.

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

## Transformación de cloroplastos de tabaco por biobalística.

**Preparación de los microtransportadores (micropartículas de oro) de 0,6 m.**

Se mezclaron 50 mg de partículas de oro de 0,6 μm de diámetro (0,6 μm *Gold Microcarriers* Bio-Rad), por agitación con *vortex* durante 2 minutos en 1 ml de etanol absoluto y se centrifugaron a 15.000 g durante 2 a 5 minutos a 4ºC. Se descartó el sobrenadante y se agregó al precipitado 1 ml de etanol 70 %, resuspendiendo con agitación durante 1 y 2 minutos. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, agitando cada 3 minutos y se volvió a centrifugar a 15.000 g durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con 1 ml de agua estéril, resuspendiendo con *vortex* y centrifugando a 15.000 g durante 2 minutos cada vez. Finalmente, las partículas se resuspendieron en 1 ml de glicerol 50 % estéril y se conservaron a -20ºC.

**Recubrimiento de los microtransportadores de oro de 0,6μm con el ADN.**

Se tomaron 50 μl de la preparación de partículas de oro resuspendidas con la ayuda de un *vortex* y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga. Se agregaron en orden secuencial y agitando con *vortex* cada vez, 10 μg del plásmido para transformar, a una concentración de 1 μg/μl, 5 μl de $CaCl_2$ 2,5 M y 20 μl de espermidina 0,1 M. La mezcla se incubó con agitación a 4ºC durante 20 minutos. Luego se agregaron 200 μl de etanol

absoluto, se agitó con *vortex* y se centrifugó a 800 g durante 1 minuto a 4ºC. Se descartó el sobrenadante con pipeta y con cuidado de no remover el precipitado. Las partículas se lavaron de esta misma forma 5 veces con 200 µl de etanol absoluto, resuspendiendo muy bien entre cada centrifugación. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 45 µl de etanol absoluto, conservándose en hielo un máximo de 2 horas hasta su utilización.

**Bombardeo de hojas de tabaco.**

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

El bombardeo se hizo utilizando el dispositivo para biobalística *PDS-1000/He Particle Delivery System* (Bio-Rad). Los discos de ruptura (1.100 psi *Rupture Disks,* Bio-Rad) se esterilizaron con etanol 100 % y se dejaron secar en el flujo laminar. Un disco de ruptura por disparo se sumergió en isopropanol, e inmediatamente retirado del mismo se ensambló en la rosca soporte (*Rupture Disk Retaining Cap*) sellando la cámara de alta presión de helio. Se colocaron una malla de detención (*Stopping Screen*, Bio-Rad) y el macrotransportador cargado con la mezcla de partículas de oro y ADN, en la bandeja de detención (*Stopping Plate*). La distancia entre el disco de ruptura y la cubierta del macrotransportador (*Macrocarrier Cover Lid*) fue de 0,625 cm (1/4 de pulgada) y la distancia entre el macrotransportador y la malla de retención de 11 mm. La bandeja con la placa de petri conteniendo la hoja a bombardear se colocó a una distancia de 9 cm de la bandeja de detención. Se cerró la cámara y se hizo vacío hasta alcanzar una presión de 28 mmHg. A continuación se permitió el ingreso de helio con una presión de 1350 psi hasta que se produjo el disparo. Se liberó el vacío y las hojas bombardeadas se

incubaron en oscuridad a 26ºC durante 48 horas. Como control el primer disparo siempre se hizo utilizando un macrotransportador no cargado con partículas.

Transcurrida la incubación y luego de eliminar la nervadura central, cada hoja se cortó en fragmentos de 2 a 4 $cm^2$, que se transfirieron a medio RMOP suplementado con espectinomicina 500 mg/L. La mitad de los discos de la hoja sometida al primer disparo sin partículas se transfirieron a medio RMOP suplementado con espectinomicina (control de selección) y la otra mitad a medio RMOP sin agente selectivo (control de regeneración). Los discos se incubaron a 26ºC con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad. Al cabo de un mes comenzaron a aparecer los primeros brotes que se transfirieron a medio MS con sacarosa 3%, sin hormonas, y suplementado con espectinomicina 500 mg/L. De las plantas que desarrollaron raíces en medio selectivo se cortaron discos de hoja y se volvieron a cultivar en medio RMOP y espectinomicina (segunda ronda de regeneración). Las plantas transformadas se sometieron al menos a dos rondas de regeneración en medio selectivo antes de ser transferidas a tierra.

## Rusticación

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

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

Se sumergieron las semillas en etanol 70 % y luego se traspasó a una solución 1:10 de lavandina comercial, en la que se incubaron durante 3 minutos. A continuación se hicieron cinco pasajes sucesivos por agua estéril para eliminar los restos de lavandina, se secaron y sometieron a un período de vernalización (48hs a 4°C en oscuridad). Posteriormente se sembraron en medio MS sólido para germinar, a 26ºC con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

## Análisis de ADN por PCR

### Preparación de ADN total de tabaco para PCR.

Se molieron en un tubo de microcentrífuga 50 mg de hoja con la ayuda de un vástago plástico de punta cónica y se agregaron 350 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 65ºC durante 10 minutos. Luego se agregaron 150 μl de acetato de potasio 3 M, pH 5,5 frío, agitando por inversión e incubando en hielo durante 20 minutos. Transcurrida la incubación se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos a 4ºC y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregó 1 μl de ribonucleasa A 100 μg/ml y se incubó a 37°C durante 30 minutos. El ADN se precipitó con 1 volumen de isopropanol y se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se lavó con etanol 80 %, se dejó secar y finalmente se resuspendió en 25 μl de $H_2O$ bidestilada.

## PCR para chequeo de plantas transplastómicas.

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

En todos los casos, 2,5 ng del ADN extraído, se llevaron a 25 μl con $H_2O$ y se desnaturalizaron a 95ºC durante 5 minutos. Transcurrida la incubación se colocaron los tubos en hielo y se agregaron a cada uno, 25 μl de la mezcla de reacción para PCR conteniendo 150 ng de cada oligonucleótido iniciador, 1,25 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies), 0,4 mM de una mezcla de los cuatro dNTPs y 3 mM $MgCl_2$, en el *buffer* suministrado con la enzima. Se realizaron 30 ciclos de 1 minuto a 95ºC, 1 minuto a 55ºC y 1 minuto 30 segundos a 72ºC en un termociclador *Mastercycler* (Eppendorf), con una incubación previa a 95ºC durante 2 minutos y una final a 72ºC durante 10 minutos, para completar la polimerización.

## Ensayo de Southern blot.

### Preparación de ADN total para *Southern blot*.

Se utilizó una modificación del protocolo de purificación de ADN desarrollado por Dellaporta (Dellaporta y col.,1983). Se molió 1 gramo de tejido vegetal fresco con nitrógeno líquido en un mortero hasta formar un polvo fino. Se agregaron 5 ml de *buffer* CTAB (CTAB, bromuro de hexadecil trimemil amonio, Sigma Chemical) 2 %, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA disódico 20 mM pH 8 y 2-mercaptoetanol 0,2 %) pre-calentado a 65ºC y se incubó a esa misma temperatura en un tubo de polipropileno entre 30 minutos y 1 hora agitando cada 10 minutos. Posteriormente, se agregó un volumen de cloroformo y se agitó con *vortex*. Luego de centrifugar a 5.000 g durante 10 minutos a 4ºC, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se repitió la extracción con cloroformo. Se adicionó ribonucleasa A, a una concentración final de 100 μg/ml y se incubó a 37ºC durante 30 minutos. Luego de la incubación se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol frío y se mezcló suavemente por inversión. Cuando se formó el ovillo de ADN, este se tomó con un ansa y se transfirió a un tubo de microcentrífuga conteniendo 1 ml de etanol 70 %. Cuando el ovillo no se formó, se centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos y el precipitado se lavó con etanol 70 %. En ambos casos el precipitado se secó y se resuspendió a 4ºC toda la noche, con agitación suave, en 1 ml de $H_2O$ bidestilada.

La integración del transgen y homoplastía en las plantas transplastómicas se evaluaron en ensayos de *Southern blot*. Extracciones de ADN total (2 μg) de las plantas transplastómicas, se cortaron con 20 unidades de Nco I (New England Biolabs), en el *buffer* sugerido por la empresa, a 37ºC durante toda la noche, con el agregado de espermidina 1 mM final luego de la primer hora de incubación. Como controles se utilizaron extracciones de ADN total de *N. tabacum* cv Petit Havana sin transformar, cortado con la misma enzima.

### Electroforesis y transferencia del ADN a membranas de nylon.

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

**Hibridación y lavados.**

Las membranas conteniendo el ADN se incubaron en 15 ml de solución de hibridación *Church* (SDS 7 %, BSA 1 %, buffer sodio fosfato 1 M pH 7,2, 0,2 % y EDTA-$Na_2$ 1 mM, pH 8) durante 2 horas a 65ºC en un horno de hibridación rotatorio. Luego de esta pre-hibridación, se reemplazó la solución por una fresca, a la cuál se agregó la sonda desnaturalizada (por incubación a 100°C durante 5 min.); se incubó toda la noche a 65ºC. Al otro día, se descartó la solución con la sonda y se hizo un enjuague con SSC 2X, SDS 0,1 % seguido de tres lavados sucesivos de 15 minutos cada uno con 1): SSC 2X, SDS 0,1 % a temperatura ambiente, 2): SSC 2X, SDS 0,1 % a 65ºC y 3): SSC 0,2X, SDS 0,1 % a 65ºC. (20X SSC: Citrato de Sodio 300 mM pH 7, NaCl 3 M). Las membranas se expusieron a placas radiográficas (*Kodak X-Omat*, Kodak) a -70ºC por períodos de tiempo variables. En todos los casos se utilizó una pantalla amplificadora de la señal. Cuando fue necesario rehibridizar una membrana, la sonda se eliminó de la membrana sumergiéndola en una solución de SDS 0,1 %, precalentada a 100ºC y se incubó hasta que ésta alcanzó la temperatura ambiente.

## Preparación de los moldes para las sondas.

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

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

**Molde para la sonda E7.**

El fragmento molde para la sonda E7, se obtuvo por amplificación del fragmento correspondiente a E7 (309pb) utilizando los *primers* 5´E7 Nde y 3´E7 Xba como iniciadores y al plásmido pGem E7 como molde.

**Marcado radiactivo de las sondas.**

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

**Purificación de las sondas marcadas.**

Se utilizaron columnas *microSpin HR200* (Amersham Biosciences) siguiendo los protocolos sugeridos por los fabricantes. Todo el trabajo con material radiactivo se hizo en un cuarto aislado destinado a tal fin y de acuerdo a las normativas establecidas por el Ente Regulador de la Energía Atómica.

## Ensayo de northern blot.

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

Se congelaron 200 mg de hojas de tabaco en $N_2$ líquido y se molieron en un mortero previamente lavado con una solución de SDS 1 %. Se agregó 1ml de TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Sigma-Aldrich) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos un tubo de microcentrífuga. Se agregaron 0,2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Luego se centrifugó a 15.000 g durante 15 minutos a 4ºC y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. El ARN se precipitó agregando 0,5 ml de isopropanol e incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguidos de una centrifugación a 15000 g durante 10 minutos a 4ºC. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 75 %, se dejó secar y se resuspendió en 50 μl de $H_2O$ incubando a 60ºC durante 10 minutos.

**Electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes.**

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

**Transferencia a membranas de nylon.**

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

**Hibridación y marcación de sondas.**

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

## Extracción de proteínas.

**Extracción de proteínas totales de hojas de tabaco.**

Entre 10 y 50 mg de hojas de tabaco se molieron con $N_2$ líquido y se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X pH 7,2 (NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, $Na_2HPO_4$ 14,4 g/l, $KH_2PO_4$ 2 g/l) con o sin el agregado de inhibidores de proteasas (PMSF 1mM). Estos homogenatos se usaron directamente para medir proteínas totales. Para los ensayos de *Western blot*, se agregó *buffer* de siembra 1X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2 %, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 0,2 %, azul de bromofenol 0,02 mg/ml) a las extracciones en PBS, directamente al tejido

vegetal molido, o a las muestras preparadas para los ensayos fluorométricos según se indica en la sección correspondiente.

Para los ensayos de SDS-PAGE y posterior tinción con *coomassie*, las muestras (de hojas y tubérculos) se procesaron según se indica en la sección de ensayos fluorométicos para detección de actividad glucuronidasa, con el agregado de *buffer* de siembra 1X.

### Extracción de proteínas totales de *E. coli.*

Se cosecharon por centrifugación entre 1 y 2 ml de cultivo bacteriano crecido durante toda la noche a 37ºC. El sedimento de bacterias se resuspendió en 500 µl de *buffer* de extracción (Tris-HCl pH 6,8 50 mM, EDTA-$Na_2$ 10 mM, PMSF 1 mM), se congeló a –70ºC durante 15 minutos y se sonicó en 3 ciclos de 30 segundos cada uno. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 15000 g durante 30 minutos a 4ºC.

### Cuantificación de proteínas totales.

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

### Cuantificación de E7 por ELISA.

La cuantificación de E7 se realizó mediante el método de ELISA utilizando anticuerpos comerciales y siguiendo los protocolos sugeridos por la empresa proveedora (R&D Systems). Microplacas de 96 pocillos (*Falcon 3913 Micro Test III*, Falcon) se cubrieron con 100 µl por pocillo de extracto proteico a cuantificar diluido en PBS 1X. Se incubaron en una cámara húmeda durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación las placas se lavaron tres veces con PBST (PBS 1X pH 7,4, Tween 20 0,05 % v/v) y se bloquearon entre una y dos horas a temperatura ambiente con 200 µl por pocillo de PBS conteniendo seroalbúmina bovina 1 % y sacarosa 5 %. Pasado este tiempo, las placas se lavaron nuevamente tres veces con PBST y se sembraron 100 µl por pocillo del primer anticuerpo (antiE7, SC-6981) incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó entonces tres veces con PBST y se incubó durante 2 horas con 100 µl por pocillo del

segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón acoplado a peroxidas. Se realizaron tres lavados con PBST y se agregaron a cada pocillo 100 μl de la solución conteniendo el sustrato cromogénico: 100 μl de TMB (3,3´, 5,5´ tetrametilbenzamidina, Sigma Chemical) 10 mg/ml en DMSO y 2 μl de $H_2O_2$ por cada 10 ml de *buffer* citrato-fosfato 0,05 M pH 5 (25,7 ml de $Na_2HPO_4$ 0,2 M y 24,3 ml de ácido cítrico 0,1 M). La reacción se detuvo por agregando 50 μl de $H_2SO_4$ 1 M a cada pocillo y se leyó a 450 nm.

## Electroforesis de proteínas.

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

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

### Tinción con Coomasie Brillant Blue.

Los geles se incubaron a temperatura ambiente durante toda a noche en solución de tinción (*Coomasie Brillant Blue* R250 0,05 %, metanol 40 %, ácido acético 10 %). Luego ésta solución se reemplazó por solución de lavado (metanol 50 %, ácido acético 10 %) y se incubó a temperatura ambiente.

## Ensayo de western blot.

### Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.

Se utilizó el sistema de transferencia *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad) y membranas de nitrocelulosa *Hybond C* (Amersham Biosciences). La transferencia se llevó a cabo a 80V constantes, durante 45 minutos para la cápside de PVY, AP24 y Glucanasa. Como *buffer* de transferencia se utilizó Tris-HCl 50 mM pH 7,5, glicina 196 mM, metanol 20 %.

**Inmunodetección de las proteínas electrotransferidas.**

Luego de la transferencia, se incubaron las membranas en solución de bloqueo (4 % de leche descremada en polvo en *buffer* TTBS: Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1 % v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente (o toda la noche a 4ºC) y con agitación suave. Transcurrida la incubación, se agregó a la solución el primer anticuerpo anti-E7 (SC-6981), diluido en TTBS con 4% de leche, y se incubó una hora más a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno con TTBS y se agregó una solución de leche 4 % en TTBS conteniendo el segundo anticuerpo según corresponda: anti-IgG de ratón 1/1000 (Gibco BRL) o anti-IgG de conejo 1/5000 (Gibco BRL) conjugados a fosfatasa alcalina. Se incubó durante una hora y se hicieron luego otros dos lavados de 5 minutos cada uno con TTBS y un lavado de 5 minutos con TBS (TTBS sin el agregado de Tween).

**Revelado con NBT/BCIP.**

Los anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina se revelaron utilizando como sustrato cromogénico una mezcla de NBT (Nitroblue tetrazolium, Sigma Chemical) y BCIP (5 bromo-4 cloro-3 indoil fosfato, Sigma Chemical). Luego del último lavado con TTBS se hizo una incubación durante 10 minutos en *buffer* fosfatasa (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM). Transcurrida la incubación, cada membrana se reveló en oscuridad, con 10 ml de *buffer* fosfatasa conteniendo 30 μl de BCIP (30 mg/ml en dimetilformamida 100 %) y 30 μl de NBT (50 mg/ml, en dimetilformamida 70 %). La cuantificación de las bandas reveladas se realizó mediante el programa *Image J* (NIH, http://rsbweb.nih.gov/ij.)

## Ensayo histoquímico para detectar actividad β-glucuronidasa

La actividad β-glucuronidasa fue evaluada cualitativamente utilizando un sustrato cuyo producto es coloreado (X-Gluc).

**Solución de revelado GUS** (100ml): 1,38g de $Na_2HPO_4$, 372mg de $Na_2EDTA.2H_2O$, 1ml de tritón X-100 y 200ml de una solución de ferricianuro/ferrocianuro; completar volúmen con agua. El sustrato (X-Gluc, USB) se prepara disolviendo 50mg en 1 ml de DMSO (stock 100X, conservar a -20°C), que se mezcla con la solución de revelado al momento de usarse.

**Preparación de muestras a partir de cultivos bacterianos**

Aproximadamente 1ml de un cultivo crecido toda la noche a 37ºC se centrifugó, y el precipitado se resuspendió en 500µl de *buffer* de extracción GUS. La suspención se sonicó en tres intervalos de 30seg. cada uno en hielo; los restos celulares se separaron centrifugando a máxima velocidad por 30 min a 4ºC. Al sobrenadante se agregó 0,1V de solución de revelado10X con X-Gluc. Las muestras se incubaron a 37°C durante una noche y al día siguiente se observó la presencia de color azul.

**Ensayos de detección en hojas de tabaco**

Muestras tomadas de hojas de plantas transplastómicas o controles se sumergieron en solución de revelado con X-Gluc (en algunos para la tinción casos se aplicó un vacío leve para facilitar la entrada del sustrato). Las muestras se incubaron a 37°C durante una noche, y al día siguiente se decoloraron con etanol 80% para extraer los pigmentos y así facilitar la observación de color azul.

**Microscopía**

Las muestras para la caracterización ultraestructural del tejido foliar de plantas *wild type* y líneas transplastómicas fueron fijadas *overnight* a 4ºC en solución de glutaraldheido 2,5% en *buffer* fosfato 0,1M (pH 7,2). Luego se incubó durante 2 horas a 4ºC en $OsO_4$ 1% (p/v) y se deshidrató el tejido sumergiéndolo sucesivamente en diluciones crecientes de etanol-acetona. Finalmente las muestras fueron incluidas en resina Spurr. Mediante ultramicrótomo se obtuvieron secciones transversales. Las secciones semifinas para microscopía óptica fueron teñidas con azul de Toluidino 1% (p/v). Esta microscopía también fue utilizada para observar tejido vivo correspondiente a la monocapa de células de la epidermis inferior. Los cortes ultrafinos para microscopia electrónica fueron teñidos con colorante Reynolds y contrastados con acetato de uranilo 2% (p/v). Para los estudios de microscopía electrónica se utilizó el microscopio de transmisión electrónica Zeiss EM 10 C (Zeiss, Oberkochen, Germany).

**Inmunomicroscopía electrónica**

Secciones de tejido foliar de 2mm fueron cortados de hojas de plantas *wild type* y líneas transplastómicas fueron fijadas con paraformaldheido 3% en *buffer* fosfato 0,1M (pH 7,2). Luego se incubó durante 2 horas a 4ºC en $OsO_4$ 1% (p/v) y se deshidrató el tejido sumergiéndolo sucesivamente en diluciones crecientes de etanol-acetona. Finalmente las muestras fueron incluidas en resina LR White (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA). Las secciones transversales fueron cortadas y cubiertas con gelatinas. La

inmunodetección de E7 se realizó utilizando anticuerpo monoclonal anti-E7 (SC-6981) mediante el kit Silver Enhancer (Sigma-Aldrich Co., USA) siguiendo las instrucciones de la empresa.

**Ensayo de inmunización de ratones**

Tres grupos de 8 ratones hembras BALB/C fueron inmunizados con extractos totales de hojas de tabaco. En cada caso se inocularon tres dosis sucesivas con extracto equivalente a 100ug de PST en *buffer* de Extracción (50 mM Tris–HCl pH 8, 30 mM NaCl) emulsionado con extracto oleoso. Las inyecciones se realizaron en forma intraperitoneal los días 0, 14 y 28. El día 35 se procedió al sangrado a blanco obteniéndose los sueros correspondientes.

Los sueros obtenidos fueron utilizados como primer anticuerpo en un ensayo de *western blot* contra una membrana de nitrocelulosa electrotransferida luego de un SDS PAGE 12% de extractos de bacteria capaces de expresar E7 fusionada a GST. Previamente la membrana fue bloqueada con TBS leche 5% y extracto de bacteria StrGUS 10%. Anti IgG de ratón fue utilizado como segundo anticuerpo.

# *REFERENCIAS*

- **Albiniak A. M., Baglieri J. and Robinson C. (2012)** "Targeting of lumenal proteins across the thylakoid membrane" J Exp Bot

- **Alonso L. G., Garcia-Alai M. M., Smal C., Centeno J. M., Iacono R., Castano E., Gualfetti P. and de Prat-Gay G. (2004)** "The HPV16 E7 viral oncoprotein self-assembles into defined spherical oligomers" Biochemistry vol43: 12 pag3310-3317

- **Armstrong D. J. and Roman A. (1993)** "The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues" Biochem Biophys Res Commun vol192: 3 pag1380-1387

- **Bally J., Paget E., Droux M., Job C., Job D. and Dubald M. (2008)** "Both the stroma and thylakoid lumen of tobacco chloroplasts are competent for the formation of disulphide bonds in recombinant proteins" Plant Biotechnol J vol6: 1 pag46-61

- **Benchabane M., Goulet C., Rivard D., Faye L., Gomord V. and Michaud D. (2008)** "Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories" Plant Biotechnol J vol6: 7 pag633-648

- **Bock R. and Warzecha H. (2010)** "Solar-powered factories for new vaccines and antibiotics" Trends Biotechnol

- **Boynton J. E., Gillham N. W., Harris E. H., Hosler J. P., Johnson A. M., Jones A. R., Randolph-Anderson B. L., Robertson D., Klein T. M., Shark K. B. and et al. (1988)** "Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity microprojectiles" Science vol240: 4858 pag1534-1538

- **Cid-Arregui A. (2009)** "Therapeutic vaccines against human papillomavirus and cervical cancer" Open Virol J vol3: pag67-83

- **Chaddock A. M., Mant A., Karnauchov I., Brink S., Herrmann R. G., Klosgen R. B. and Robinson C. (1995)** "A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase" EMBO J vol14: 12 pag2715-2722

- **Chakrabarti S. K., Lutz K. A., Lertwiriyawong B., Svab Z. and Maliga P. (2006)** "Expression of the cry9Aa2 B.t. gene in tobacco chloroplasts confers resistance to potato tuber moth" Transgenic Res vol15: 4 pag481-488

- **Chen L. P., Thomas E. K., Hu S. L., Hellstrom I. and Hellstrom K. E. (1991)** "Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen" Proc Natl Acad Sci U S A vol88: 1 pag110-114

- **Daniell H. (2006)** "Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome" Biotechnol J vol1: 10 pag1071-1079

- **Daniell H., Ruiz G., Denes B., Sandberg L. and Langridge W. (2009)** "Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth

factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function" BMC Biotechnol vol9: pag33

- **De Marchis F., Pompa A., Mannucci R., Morosinotto T. and Bellucci M. (2011)** "A plant secretory signal peptide targets plastome-encoded recombinant proteins to the thylakoid membrane" Plant Mol Biol vol76: 3-5 pag427-441

- **Deng X. W. and Gruissem W. (1987)** "Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation" Cell vol49: 3 pag379-387

- **Dietz K. J. and Pfannschmidt T. (2011)** "Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression" Plant Physiol vol155: 4 pag1477-1485

- **Doorbar J. (2005)** "The papillomavirus life cycle" J Clin Virol vol32 Suppl 1: pagS7-15

- **Fernando G. J., Murray B., Zhou J. and Frazer I. H. (1999)** "Expression, purification and immunological characterization of the transforming protein E7, from cervical cancer-associated human papillomavirus type 16" Clin Exp Immunol vol115: 3 pag397-403

- **Franconi R., Di Bonito P., Dibello F., Accardi L., Muller A., Cirilli A., Simeone P., Dona M. G., Venuti A. and Giorgi C. (2002)** "Plant-derived human papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection" Cancer Res vol62: 13 pag3654-3658

- **Franconi R., Massa S., Illiano E., Mullar A., Cirilli A., Accardi L., Di Bonito P., Giorgi C. and Venuti A. (2006)** "Exploiting the plant secretory pathway to improve the anticancer activity of a plant-derived HPV16 E7 vaccine" Int J Immunopathol Pharmacol vol19: 1 pag187-197

- **Garcia-Alai M. M., Alonso L. G. and de Prat-Gay G. (2007)** "The N-terminal module of HPV16 E7 is an intrinsically disordered domain that confers conformational and recognition plasticity to the oncoprotein" Biochemistry vol46: 37 pag10405-10412

- **Ghittoni R., Accardi R., Hasan U., Gheit T., Sylla B. and Tommasino M. (2010)** "The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses" Virus Genes vol40: 1 pag1-13

- **Gils M., Kandzia R., Marillonnet S., Klimyuk V. and Gleba Y. (2005)** "High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system" Plant Biotechnol J vol3: 6 pag613-620

- **Glenz K., Bouchon B., Stehle T., Wallich R., Simon M. M. and Warzecha H. (2006)** "Production of a recombinant bacterial lipoprotein in higher plant chloroplasts" Nat Biotechnol vol24: 1 pag76-77

- **Gray B. N., Ahner B. A. and Hanson M. R. (2009)** "High-level bacterial cellulase accumulation in chloroplast-transformed tobacco mediated by downstream box fusions" Biotechnol Bioeng vol102: 4 pag1045-1054

- **Grevich J. J. and Daniell H. (2005)** "Chloroplast Genetic Engineering: Recent Advances and Future Perspectives" Critical Reviews in Plant Sciences vol24: 2 pag83-107

- **Gutensohn M., Fan E., Frielingsdorf S., Hanner P., Hou B., Hust B. and Klosgen R. B. (2006)** "Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts" J Plant Physiol vol163: 3 pag333-347

- **Hildesheim A., Herrero R., Wacholder S., Rodriguez A. C., Solomon D., Bratti M. C., Schiller J. T., Gonzalez P., Dubin G., Porras C., Jimenez S. E. and Lowy D. R. (2007)** "Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial" JAMA vol298: 7 pag743-753

- **Hondred D., Walker J. M., Mathews D. E. and Vierstra R. D. (1999)** "Use of ubiquitin fusions to augment protein expression in transgenic plants" Plant Physiol vol119: 2 pag713-724

- **Karg S. R. and Kallio P. T. (2009)** "The production of biopharmaceuticals in plant systems" Biotechnol Adv vol27: 6 pag879-894

- **Kreimer A. R., Clifford G. M., Boyle P. and Franceschi S. (2005)** "Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev vol14: 2 pag467-475

- **Kusnadi A. R., Nikolov Z. L. and Howard J. A. (1997)** "Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations" Biotechnol Bioeng vol56: 5 pag473-484

- **Leelavathi S., Sunnichan V. G., Kumria R., Vijaykanth G. P., Bhatnagar R. K. and Reddy V. S. (2004)** "A simple and rapid Agrobacterium-mediated transformation protocol for cotton (Gossypium hirsutum L.): embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants" Plant Cell Rep vol22: 7 pag465-470

- **Leidhold C. and Voos W. (2007)** "Chaperones and proteases--guardians of protein integrity in eukaryotic organelles" Ann N Y Acad Sci vol1113: pag72-86

- **Lentz E. M. (2011)** "Producción de antígenos y anticuerpos de interés veterinario en plantas transplastómicas de tabaco." Tesis Doctoral, Facutad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

- **Lentz E. M., Segretin M. E., Morgenfeld M. M., Wirth S. A., Dus Santos M. J., Mozgovoj M. V., Wigdorovitz A. and Bravo-Almonacid F. F. (2010)** "High expression level of a foot and mouth disease virus epitope in tobacco transplastomic plants" Planta vol231: 2 pag387-395

- **Liu X., Clements A., Zhao K. and Marmorstein R. (2006)** "Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor" J Biol Chem vol281: 1 pag578-586

- **Maliga P. (2004)** "Plastid transformation in higher plants" Annu Rev Plant Biol vol55: pag289-313

- **Maliga P. and Bock R. (2011)** "Plastid biotechnology: food, fuel and medicine for the 21st century" Plant Physiol

- **Marques J. P., Dudeck I. and Klosgen R. B. (2003)** "Targeting of EGFP chimeras within chloroplasts" Mol Genet Genomics vol269: 3 pag381-387

- **Marques J. P., Schattat M. H., Hause G., Dudeck I. and Klosgen R. B. (2004)** "In vivo transport of folded EGFP by the DeltapH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of Arabidopsis thaliana" J Exp Bot vol55: 403 pag1697-1706

- **Massa S., Franconi R., Brandi R., Muller A., Mett V., Yusibov V. and Venuti A. (2007)** "Anti-cancer activity of plant-produced HPV16 E7 vaccine" Vaccine vol25: 16 pag3018-3021

- **Massa S., Simeone P., Muller A., Benvenuto E., Venuti A. and Franconi R. (2008)** "Antitumor activity of DNA vaccines based on the human papillomavirus-16 E7 protein genetically fused to a plant virus coat protein" Hum Gene Ther vol19: 4 pag354-364

- **Meinnel T., Serero A. and Giglione C. (2006)** "Impact of the N-terminal amino acid on targeted protein degradation" Biol Chem vol387: 7 pag839-851

- **Munger K., Werness B. A., Dyson N., Phelps W. C., Harlow E. and Howley P. M. (1989)** "Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product" EMBO J vol8: 13 pag4099-4105

- **Muto M., Henry R. E. and Mayfield S. P. (2009)** "Accumulation and processing of a recombinant protein designed as a cleavable fusion to the endogenous Rubisco LSU protein in Chlamydomonas chloroplast" BMC Biotechnol vol9: pag26

- **Noris E., Poli A., Cojoca R., Ritta M., Cavallo F., Vaglio S., Matic S. and Landolfo S. (2011)** "A human papillomavirus 8 E7 protein produced in plants is able to trigger the mouse immune system and delay the development of skin lesions" Arch Virol

- **Obembe O. O., Popoola J. O., Leelavathi S. and Reddy S. V. (2011)** "Advances in plant molecular farming" Biotechnol Adv vol29: 2 pag210-222

- **Oey M., Lohse M., Kreikemeyer B. and Bock R. (2009)** "Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic" Plant J vol57: 3 pag436-445

- **Ortigosa S. M., Fernandez-San Millan A. and Veramendi J. (2010)** "Stable production of peptide antigens in transgenic tobacco chloroplasts by fusion to the p53 tetramerisation domain" Transgenic Res vol19: 4 pag703-709

- **Park D. S., Selvey L. A., Kelsall S. R. and Frazer I. H. (1993)** "Human papillomavirus type 16 E6, E7 and L1 and type 18 E7 proteins produced by recombinant baculoviruses" J Virol Methods vol45: 3 pag303-318

- **Patel J., Zhu H., Menassa R., Gyenis L., Richman A. and Brandle J. (2007)** "Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves" Transgenic Res vol16: 2 pag239-249

- **Peltier J. B., Friso G., Kalume D. E., Roepstorff P., Nilsson F., Adamska I. and van Wijk K. J. (2000)** "Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins" Plant Cell vol12: 3 pag319-341

- **Reinstein E., Scheffner M., Oren M., Ciechanover A. and Schwartz A. (2000)** "Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue" Oncogene vol19: 51 pag5944-5950

- **Rogalski M., Ruf S. and Bock R. (2006)** "Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival" Nucleic Acids Res vol34: 16 pag4537-4545

- **Rybicki E. P. (2010)** "Plant-made vaccines for humans and animals" Plant Biotechnol J

- **Sakamoto W. (2006)** "Protein degradation machineries in plastids" Annu Rev Plant Biol vol57: pag599-621

- **Sanz-Barrio R., Millan A. F., Corral-Martinez P., Segui-Simarro J. M. and Farran I. (2011)** "Tobacco plastidial thioredoxins as modulators of recombinant protein production in transgenic chloroplasts" Plant Biotechnol J vol9: 6 pag639-650

- **Scotti N., Rigano M. M. and Cardi T. (2011)** "Production of foreign proteins using plastid transformation" Biotechnol Adv

- **Schroda M. (2004)** "The Chlamydomonas genome reveals its secrets: chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast" Photosynth Res vol82: 3 pag221-240

- **Segretin M. E., Lentz E. M., Wirth S. A., Morgenfeld M. M. and Bravo-Almonacid F. F. (2011)** "Transformation of Solanum tuberosum plastids allows high expression levels of beta-glucuronidase both in leaves and microtubers developed in vitro" Planta

- **Settles A. M. and Martienssen R. (1998)** "Old and new pathways of protein export in chloroplasts and bacteria" Trends Cell Biol vol8: 12 pag494-501

- **Sharma A. K. and Sharma M. K. (2009)** "Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities" Biotechnol Adv vol27: 6 pag811-832

- **Shaver J. M., Oldenburg D. J. and Bendich A. J. (2006)** "Changes in chloroplast DNA during development in tobacco, Medicago truncatula, pea, and maize" Planta vol224: 1 pag72-82

- **Smotkin D. and Wettstein F. O. (1987)** "The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein" J Virol vol61: 5 pag1686-1689

- **Staub J. M., Garcia B., Graves J., Hajdukiewicz P. T., Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schlittler M., Carroll J. A., Spatola L., Ward D., Ye G. and Russell D. A. (2000)** "High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts" Nat Biotechnol vol18: 3 pag333-338

- **Streatfield S. J. (2007)** "Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants" Plant Biotechnol J vol5: 1 pag2-15

- **Su J. H., Wu A., Scotney E., Ma B., Monie A., Hung C. F. and Wu T. C. (2010)** "Immunotherapy for cervical cancer: Research status and clinical potential" BioDrugs vol24: 2 pag109-129

- **Svab Z., Hajdukiewicz P. and Maliga P. (1990)** "Stable transformation of plastids in higher plants" Proc Natl Acad Sci U S A vol87: 21 pag8526-8530

- **Tissot G., Canard H., Nadai M., Martone A., Botterman J. and Dubald M. (2008)** "Translocation of aprotinin, a therapeutic protease inhibitor, into the thylakoid lumen of genetically engineered tobacco chloroplasts" Plant Biotechnol J vol6: 3 pag309-320

- **Torres E., Vaquero C., Nicholson L., Sack M., Stoger E., Drossard J., Christou P., Fischer R. and Perrin Y. (1999)** "Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies" Transgenic Res vol8: 6 pag441-449

- **Tremblay R., Wang D., Jevnikar A. M. and Ma S. (2010)** "Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins" Biotechnol Adv vol28: pag214-221

- **van Rooijen G. J. and Moloney M. M. (1995)** "Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins" Biotechnology (N Y) vol13: 1 pag72-77

- **Verma D. and Daniell H. (2007)** "Chloroplast vector systems for biotechnology applications" Plant Physiol vol145: 4 pag1129-1143

- **Vierstra R. D. (1996)** "Proteolysis in plants: mechanisms and functions" Plant Mol Biol vol32: 1-2 pag275-302

- **Waheed M. T., Thones N., Muller M., Hassan S. W., Gottschamel J., Lossl E., Kaul H. P. and Lossl A. G. (2011)** "Plastid expression of a double-pentameric vaccine candidate containing human papillomavirus-16 L1 antigen fused with LTB as adjuvant: transplastomic plants show pleiotropic phenotypes" Plant Biotechnol J vol9: 6 pag651-660

- **Whitney S. M., Houtz R. L. and Alonso H. (2011)** "Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO2-sequestering enzyme, Rubisco" Plant Physiol vol155: 1 pag27-35

- **Willmund F., Dorn K. V., Schulz-Raffelt M. and Schroda M. (2008)** "The chloroplast DnaJ homolog CDJ1 of Chlamydomonas reinhardtii is part of a multichaperone complex containing HSP70B, CGE1, and HSP90C" Plant Physiol vol148: 4 pag2070-2082

- **Wirth, S., Calamante, G., Mentaberry, A., Bussmann, L., Lattanzi, M., Bara˜nao, L., Bravo-Almonacid, F., (2004) .**"Expression of activehuman epidermal growth factor (hEGF) in tobacco plants by integrative and non-integrative systems." Mol. Breed. 13 pag23–35.

- **Wirth S., Segretin M. E., Mentaberry A. and Bravo-Almonacid F. (2006)** "Accumulation of hEGF and hEGF-fusion proteins in chloroplast-transformed tobacco plants is higher in the dark than in the light" J Biotechnol vol125: 2 pag159-172

- **Ye G. N., Hajdukiewicz P. T., Broyles D., Rodriguez D., Xu C. W., Nehra N. and Staub J. M. (2001)** "Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco" Plant J vol25: 3 pag261-270