



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Diseño de genes que expresen epítomos
relevantes en plantas y péptido antiviral, contra
el metapneumovirus humano”**

Tesis que presenta

Verónica Araceli Márquez Escobar

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2011



Constancia de aprobación de la tesis

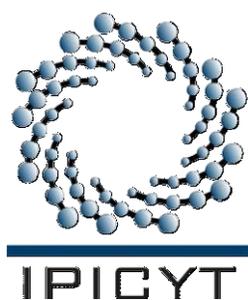
La tesis "**Diseño de genes que expresen epítomos relevantes en plantas y péptido antiviral contra metapneumovirus humano**" presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Verónica Araceli Márquez Escobar** y aprobada el **8 de Julio de 2011** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
(Director de la tesis)

Dra. Irene Castaño Navarro
(Miembro del Comité Tutorial)

Dr. Daniel Ernesto Noyola Cherpitel
(Miembro del Comité Tutorial)

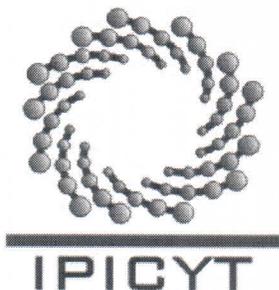
Dr. Abel Gutiérrez Ortega
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 332439) y se contó con el apoyo del proyecto de Ciencia Básica CONACYT 56980.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 081 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 8 días del mes de julio del año 2011, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Presidenta	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dr. Abel Gutiérrez Ortega	Sinodal externo	CIATEJ

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Verónica Araceli Márquez Escobar

sobre la Tesis intitulada:

Diseño de genes que expresan epítomos relevantes en plantas y péptido antiviral, contra el metapneumovirus humano

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 19:10 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los días del mes de de .

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Maicjal Bonilla Marín
Secretario Académico

Dedicatorias

A las personas que más quiero en la vida: mi mami María Virginia Escobar Roque que con su amor y consejos me ha impulsado a alcanzar mis sueños y a mi papi Agustín Márquez Gómez quien siempre me ha brindado su amor y apoyo. Gracias por darme la educación y ejemplo de disciplina que me han convertido en la persona que soy.

A mi hermano Agustín Márquez Escobar que siempre ha sido mi ejemplo a seguir por su apoyo y paciencia.

Y a Dios que siempre ha cuidado de mí.

Agradecimientos

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, por darme la oportunidad de integrarme en su grupo de trabajo, por sus consejos, paciencia y apoyo en la realización de mi trabajo de tesis, así como sus valiosas sugerencias que me han ayudado a madurar personal y académicamente.

A la Dra. Irene Castaño Navarro, el Dr. Abel Gutiérrez Ortega y el Dr. Daniel Ernesto Noyola Cherpitel que se tomaron la molestia de revisar mi tesis y hacerme sugerencias, por sus consejos y aportaciones para mejorar mi trabajo.

A Omar Patiño que ha sido un gran amigo y compañero, que me enseñó el trabajo de laboratorio así como por su ayuda, consejos y lealtad.

A la técnico Q.F.B Rosy Castillo que además de su amistad me brindó su apoyo en el trabajo diario, así como al Dr. Gerardo Argüello y el técnico Salvador Ambriz y Vero Zárate.

A mis compañeros de laboratorio: Marlene, Lucy, Mayra, Benita, Bernardo, Lula, Yahir, Mariana, Karla, Lilia, Elvira y Sra. Rosy.

Contenido

Título	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de tablas	x
Lista de tablas suplementarias	x
Lista de figuras	xi
Lista de figuras suplementarias	xi
Abreviaturas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Resultados	
3.1 Diseño de genes sintéticos para los epítomos relevantes de las proteínas del metapneumovirus humano (transformación nuclear y cloroplasto)	5
3.2 Diseño de un gen que expresa un péptido con actividad profiláctica contra hMPV	8
3.3 Construcción módulo 3'-hMPVn y transformación transitoria de <i>N. tabacum</i> y <i>N. benthamiana</i>	9
3.4 Construcción pBI121-hMPVn y la transformación nuclear de lechuga y <i>N. tabacum</i>	13
3.5 Construcción pBIC-hMPVc y transformación de cloroplastos de <i>N. tabacum</i>	15
3.6 Construcción módulo 3'-HRA y transformación transitoria de <i>N. tabacum</i> y <i>N. benthamiana</i>	17
4. Discusión	20
5. Procedimientos experimentales	
5.1 Diseño y síntesis de genes	25
5.2 Construcciones genéticas	
5.2.1 Construcción módulo 3'-hMPVn	26
5.2.2 Construcción pBI121-hMPVn	26

5.2.3 Construcción pBIC-hMPVc	26
5.3 Transformación transitoria de <i>N. tabacum</i> sin nicotina y <i>N. benthamiana</i>	27
5.4 Extracción de proteína total soluble	27
5.5 Determinación de cantidad de proteína total soluble por el método de Bradford	28
5.6 Transformación nuclear vía <i>A. tumefaciens</i>	28
5.7 Transformación de cloroplastos de <i>N. tabacum</i> sin nicotina con pBIC-hMPVc por biobalística	28
5.8 Cobertura de partículas de oro con el ADN de interés.	29
5.9 Detección de la proteína recombinante por Dot blot	30
6. Agradecimientos	30
7. Referencias	30
8. Anexos	
Metodología suplementaria	
8.1 Preparación de células calcio competentes de <i>E.coli</i>	34
8.2 Manipulación enzimática del ADN	
8.2.1 Digestión de clonas positivas con enzimas de restricción	34
8.2.2 Purificación de fragmentos de ADN	35
8.2.3 Reacciones de ligación	35
8.3 Preparación de soluciones	
8.3.1 TAE 50X	35
8.3.2 Agarosa 1%	35
8.4 Preparación de antibióticos	
8.4.1 Kanamicina	35
8.4.2 Carbenicilina	36
8.4.3 Ampicilina	36
8.4.4 Espectinomicina	36
8.5 Reguladores del crecimiento	
8.5.1 Acido Naftalenacético	36
8.5.2 Benciladenina	36
8.5.3 Cinetina	36
8.5.4 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	36
8.6 Buffers	
8.6.1 Buffer de carbonatos	37
8.6.2 Buffer de fosfatasa alcalina	37
8.6.3 Buffer salino de fosfatos (PBS)	37
8.7 Preparación de medios de cultivo	
8.7.1 Medio de cultivo YM	37
8.7.2 Medio de cultivo LB	37

8.7.3 Medios de cultivo para plantas	38
8.8 Composición de medios de cultivo	38
8.9 Mezcla basal de sales MS	38
8.10 Vitaminas MS	39
8.11 Vitaminas B5	39
8.12 Extracción de proteínas de plantas	39
8.13 Cuantificación de Proteína Total Soluble (PTS)	
8.13.1 Solución A	40
8.13.2 Solución B	40
9. Figuras suplementarias	41
10. Tablas suplementarias	47

Lista de tablas

Título	Página
1. Epítomos utilizados en la construcción para la transformación nuclear y de cloroplasto	6
2. Concentraciones de proteína total soluble en extractos obtenidos por transformación transitoria de <i>N. tabacum</i> y <i>N. benthamiana</i> con la construcción módulo3'-hMPVn	12
3. Concentraciones de proteína total soluble en extractos obtenidos por transformación transitoria de <i>N. tabacum</i> con la construcción módulo3'-HRA	18

Lista de tablas suplementarias

1. Predicción de epítomos de las proteínas del hMPV por SYFPEITHI para el alelo HLA-A*0201	47
2. Predicción de epítomos de las proteínas del hMPV por SYFPEITHI para el alelo H2D ^b	48

Lista de figuras

Título	Página
1. Estructura de los genes sintéticos usados para la transformación de tabaco.	7
2. Representación esquemática del vector módulo 3'-hMPVn para la transformación transitoria	10
3. Dot blot de la proteína recombinante obtenida por Magniffection (construcción módulo3'-hMPVn)	12
4. Representación esquemática del vector pBI121 para la transformación nuclear	14
5. Representación esquemática del vector bicistrónico pBIC para la transformación de cloroplastos de tabaco	16
6. Hojas de tabaco transformadas con construcción pBIC-hMPVc	16
7. Representación esquemática de la construcción módulo 3'-HRA para la transformación transitoria	18
8. Dot blot de la proteína recombinante obtenida por Magniffection (construcción modulo3'-HRA) usando como control extractos de plantas transformadas con el módulo 3'-GFP	19

Lista de figuras suplementarias

1. Perfil de restricción de las clonas positivas para la construcción del módulo 3'-hMPVn	41
2. PCR de las clonas 7 y 8 con oligonucleótidos específicos para la transformación del gen nuclear	41
3. Curva estándar para la determinación de proteínas totales solubles por Bradford en extractos obtenidos por transformación transitoria de <i>N. tabacum</i> y <i>N. benthamiana</i> con la construcción módulo3'-hMPVn	42
4. Análisis de restricción de las clonas pBI121-hMPVn con las enzimas <i>BamH</i> I y <i>EcoR</i> I	42
5. Análisis por PCR de las clonas pBI121-hMPVn	43
6. Análisis por PCR de las clonas 16 y 22 de la construcción pBI121-hMPVn	43
7. Análisis por PCR de las clonas pBIC-hMPVc	43
8. Análisis de restricción de las clonas módulo 3'-HRA con las enzimas <i>Nco</i> I y <i>Sac</i> I	44
9. Curva estándar para la determinación de proteínas totales solubles por Bradford en extractos obtenidos por transformación transitoria de <i>N. tabacum</i> con la construcción módulo3'-HRA	44
10. Análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas del hMPV	

en el software Antheprot	45
11. Ensayo control de la transformación transitoria de <i>N. benthamiana</i> y <i>N. tabacum</i> 7-10 días post infección con el gen reportero GFP	46

Abreviaturas

hMPV	Metapneumovirus humano
PTS	Proteína total soluble
VSR	Virus sincicial respiratorio

Resumen

“Diseño de genes que expresen epítomos relevantes en plantas y péptido antiviral, contra el metapneumovirus humano”

Las infecciones respiratorias son una de las principales causas de consulta médica y hospitalización a nivel mundial. En niños menores de 5 años, las infecciones del tracto respiratorio representan el 20% del total de las muertes. El metapneumovirus humano (hMPV) es un agente etiológico responsable de infecciones respiratorias agudas (IRA), afecta principalmente a niños menores de tres años, ancianos y pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo, actualmente no existe un tratamiento o vacuna disponible contra el hMPV. La producción de una vacuna segura, eficaz y de bajo costo contra este virus es el reto actual. Las plantas ofrecen un sistema de producción de proteínas recombinantes barato de producir y almacenar, fácil de escalar a nivel industrial, sin necesidad de purificar la proteína si esta se produce en un tejido comestible y seguro de administrar. En este trabajo se llevó a cabo el diseño de genes que expresan epítomos relevantes de las proteínas virales basado en las propiedades antigénicas y de reconocimiento por el sistema principal de histocompatibilidad, y se logró producir la proteína recombinante por un sistema de expresión viral transitorio (Magnifection), en plantas de *N. tabacum* y *N. benthamiana*; además se transformó cloroplastos de *N. tabacum*. Por otro lado se diseñó un péptido de actividad antiviral contra el hMPV, el cual se logró expresar de forma transitoria en *N. tabacum*.

PALABRAS CLAVE:

hMPV, vacuna, planta transgénica, péptido antiviral, dominio HRA

Abstract

“Design of genes expressing relevant epitopes in plants and antiviral peptide, against human metapneumovirus”

Human metapneumovirus (hMPV) is an agent responsible for acute respiratory infections (ARI) that mainly affects children under three years, the elderly and immunocompromised patients. In children younger than 5 years, respiratory tract infections account for 20% of total deaths. However, there is currently no treatment or vaccine available against hMPV. The production of a safe, efficient and low cost vaccine against this virus is a current challenge. Plants provide a system for recombinant protein production that costs less, is easier to scale to an industrial level than other platforms; in addition, there is no need for protein purification when it is produce in edible tissues and it is safe to administer. In this work we designed genes expressing relevant epitopes of viral proteins based on their antigenic properties and the recognition by the major histocompatibility complex. We produced the recombinant protein by a viral transient expression system (Magnifection) in *N. tabacum* and *N. benthamiana* plants. In addition, chloroplast transformation of *N. tabacum* was performed successfully. We also designed an antiviral peptide against hMPV that was transiently expressed in *N. tabacum*.

KEY WORDS:

hMPV, vaccine, transgenic plants, antiviral peptide, HRA domain

“Diseño de genes que expresen epítomos relevantes en plantas y péptido antiviral, contra el metapneumovirus humano”

Verónica Araceli Márquez-Escobar¹, Daniel Ernesto Noyola-Cherpitel², Rosalba Castillo-Collazo¹ y Ángel Gabriel Alpuche-Solís^{1*}

¹ División de Biología Molecular, IPICYT, Camino a la Presa San José 2055, 78216, San Luis Potosí, México

² Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Avenida V. Carranza 2405, Col. Los Filtros, San Luis Potosí, México

*Para correspondencia (fax +52 4448342010; email alpuche@ipicyt.edu.mx)

(1) RESUMEN

Las infecciones respiratorias son una de las principales causas de consulta médica y hospitalización a nivel mundial. En niños menores de 5 años, las infecciones del tracto respiratorio representan el 20% del total de las muertes. El metapneumovirus humano (hMPV) es un agente etiológico responsable de infecciones respiratorias agudas (IRA), afecta principalmente a niños menores de tres años, ancianos y pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo, actualmente no existe un tratamiento o vacuna disponible contra el hMPV. La producción de una vacuna segura, eficaz y de bajo costo contra este virus es el reto actual. Las plantas ofrecen un sistema de producción de proteínas recombinantes barato de producir y almacenar, fácil de escalar a nivel industrial, sin necesidad de purificar la proteína si ésta se produce en un tejido comestible y seguro de administrar. En este trabajo se llevó a cabo el diseño de genes que expresan epítomos relevantes de las proteínas virales basado en las propiedades antigénicas y de reconocimiento por el sistema principal de histocompatibilidad, y se logró producir la proteína recombinante por un sistema de expresión viral transitorio (Magniffection), en plantas de *N. tabacum* y *N. benthamiana*; además se transformó cloroplastos de *N. tabacum*. Por otro lado se diseñó un péptido de actividad antiviral contra el hMPV, el cual se logró expresar de forma transitoria en *N. tabacum*.

PALABRAS CLAVE:

hMPV, vacuna, planta transgénica, péptido antiviral, dominio HRA

(2) INTRODUCCIÓN

Las enfermedades respiratorias son un problema de salud pública a nivel mundial, entre éstas, las infecciones respiratorias agudas (IRA) constituyen el 20% de las muertes en niños menores de 5 años de edad (WHO, 2011). Las IRAs afectan a todos los grupos etarios, aunque los más afectados son los niños, personas de la tercera edad y pacientes inmunocomprometidos (Boivin y col., 2002).

Los agentes etiológicos causantes de las enfermedades respiratorias son principalmente bacterias y virus; estos últimos son responsables del 50–60% de las IRAs (Jofré, 2007). Los virus más comúnmente identificados en las IRAs son el sincicial respiratorio (VSR), parainfluenza, influenza A o B y el metapneumovirus humano (hMPV) (Bharaj y col., 2009).

El hMPV fue descubierto en 2001 por van den Hoogen y col., y pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, a la subfamilia *Pneumoviridae* y al género metapneumovirus (van den Hoogen y col., 2001)

A nivel mundial este virus es responsable del 5-10% de las hospitalizaciones en niños jóvenes (Deffrasnes y col., 2007). En un estudio realizado en San Luis Potosí, en niños menores de 3 años hospitalizados por IRAs, fue posible determinar que el hMPV es el segundo agente más común, después del VSR (Noyola y col., 2005).

El genoma del hMPV es una cadena sencilla de ARN (-) de aproximadamente 13 kb que codifica para 9 proteínas virales: N (nucleocápside), M (matriz), F (fusión), M2 que codifica para 2 proteínas M2-1 (potenciador transcripcional) y M2-2 (factor de regulación para la síntesis de ARN) y utiliza ORFs que se sobrelapan, SH (pequeña hidrofóbica), G (unión), P (fosfoproteína) y L (polimerasa viral). El orden de estos genes del extremo 3' al 5' es: 3-N-M-F-M2-SH-G-L-5 (Broor y col., 2008). Las glicoproteínas F, G y SH se expresan en la superficie del virión, de las cuales F es el mayor determinante antigénico.

La unión a la célula hospedera se lleva a cabo por la glicoproteína G, posteriormente la glicoproteína F debe ser segmentada por proteasas celulares (enzima tipo furina), dando lugar a los componentes F1 y F2; donde F1 posee dominios repetidos de heptadas de aminoácidos llamados HRA y HRB

(Schowalter y col., 2006). La interacción de dichos dominios promueve la fusión entre la membrana celular y la envoltura viral; de esta manera los componentes del virión se introducen en el citoplasma celular donde se lleva a cabo la replicación viral (Miller y col., 2007). Se ha demostrado que la inhibición de esta fusión se puede lograr por competencia en la interacción de los dominios HRA y HRB con un péptido exógeno análogo a HRA o HRB, evitando la fusión virus-célula cuando se administra de manera profiláctica y por tanto es capaz de inhibir la infección por hMPV (Deffrasnes y col., 2008).

El tratamiento de las infecciones causadas por hMPV es predominantemente sintomático. La ribavirina posee actividad antiviral para inhibir la replicación de hMPV (Wyde y col., 2003); además un lípido sialil sulfatado (NMSO3) ha mostrado tener actividad anti-hMPV (Wyde y col., 2004). Sin embargo, no hay estudios que sustenten la administración de antivirales como parte del tratamiento de las infecciones causadas por este virus. Las vacunas que se han desarrollado para prevenir las infecciones por hMPV han mostrado tener efectos no deseados, tales como la exacerbación de la patología y reducida protección en el tracto respiratorio en modelos animales (Herfst y Fouchier, 2008), por lo que es necesario continuar con estudios básicos y aplicados en este contexto.

Actualmente existen diferentes sistemas para la expresión de proteínas recombinantes de uso terapéutico como las bacterias, levaduras, células de mamífero, animales transgénicos y plantas (Hefferon, 2010). El uso de plantas como biorreactores para la producción y entrega de los antígenos por vía oral es un sistema que posee grandes ventajas, como por ejemplo: la capacidad para realizar modificaciones post traduccionales, facilidad de escalar a nivel industrial, el relativamente bajo costo de producción y la eliminación de la purificación de la proteína cuando el tejido de la planta que contiene la proteína recombinante es comestible (Daniell y col., 2009).

En el presente trabajo se llevó a cabo la identificación de epítomos de las proteínas del hMPV evaluados en modelos animales y los epítomos más relevantes basados en sus propiedades antigénicas y propiedades de reconocimiento por el sistema principal de histocompatibilidad. Éstos fueron seleccionados para el diseño de dos

genes (uno para la transformación nuclear y transitoria, y el otro para la transformación del cloroplasto de lechuga y tabaco), con el fin de obtener una proteína terapéutica que pueda ser utilizada en una formulación de vacuna con seguridad y eficacia contra el metapneumovirus humano expresada por un sistema vegetal.

Además se diseñó un gen que expresa un péptido con acción profiláctica contra el hMPV cuya eficacia ha sido probada previamente en líneas celulares y animales (Deffrasnes y col., 2008). En este trabajo expresamos este péptido por medio de la transformación transitoria de *N. tabacum* y *N. benthamiana*.

(3) RESULTADOS

3.1Diseño de genes sintéticos para los epítomos relevantes de las proteínas del metapneumovirus humano (transformación nuclear y cloroplasto).

Para la selección de las proteínas del hMPV con potencial antigénico, se tomaron en cuenta estudios previos donde se reportan secuencias de aminoácidos que resultaron ser epítomos relevantes del hMPV (Tabla 1). Además se incluyó en el diseño una proteína de fusión llamada G1F/M2 que contiene fragmentos de las proteínas G y M2-1 del VSR y de la proteína F del virus del sarampión; esta proteína de fusión induce producción de anticuerpos neutralizantes contra VSR, proliferación de células T y un balance entre la respuesta inmune Th1/Th2, este balance resulta ser importante debido a que la respuesta Th1 induce la producción de citocinas pro-inflamatorias que estimulan la inmunidad mediada por células que fagocitan y destruyen los patógenos mientras que la respuesta Th2 estimula la inmunidad mediada por anticuerpos pero además puede conducir a reacciones alérgicas (Fan y col., 2005; Zeng y col., 2005).

Para la transformación nuclear se diseñó el gen hMPVn, que tiene sitios de restricción para la subclonación en pBI-121 y una secuencia SEKDEL para retención de la proteína en el retículo endoplásmico (RE); la estructura del gen se muestra en la Fig. 1. El gen para la transformación de cloroplastos se denominó hMPVc y se subclonó en el vector bicistrónico pBIC desarrollado previamente por nuestro grupo (Patiño-Rodríguez., 2007), al cual se le añadió un sitio de unión al ribosoma; la estructura se muestra en la Fig. 1.

En ambos genes se añadieron en el extremo 5' seis histidinas para la purificación de la proteína recombinante y un sitio proteasa que permite la eliminación de esta etiqueta una vez purificada la proteína.

Los linkers o separadores ricos en prolina GPGPG (Livingston y col., 2002) proporcionan flexibilidad a la construcción y exponen los epítomos y facilitan la respuesta de los linfocitos T cooperadores (Th).

Tabla 1. Epítopos utilizados en la construcción para la transformación nuclear y de cloroplasto.

EPÍTOPO (aminoácidos)	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
F1 (63-71) F3 (384-392)	Produce altos niveles de INF γ posterior a una infección i.p. secundaria.	Melendi y col., 2007.
F2 (234-338)	Induce producción de anticuerpos que neutralizan a hMPV A1 y B1 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Conservado en todos sublinajes de hMPV.	Ulbrandt y col., 2008.
M2-1(81-89)	Epítipo dominante, reconocido por el complejo principal de histocompatibilidad en ratones BALB/c.	Melendi y col., 2007.
N1 (164-172)	Aumento de la expresión de citocinas tipo Th1: IL-12 (en pulmón) e INF γ (en pulmón y nódulos linfáticos pulmonares). Epítipo conservado en todos los subtipos de hMPV (A1, A2, B1 y B2).	Herd y col., 2006.
N2 (307-315)	Epítipo subdominante, da lugar a respuesta de linfocitos T citotóxicos cuando se reta intranasalmente con el hMPV a ratones BALB/c.	Melendi y col., 2007.
G1F/M2 (G RSV: 125-225) (F Sarampión: 113-131) (M2-1 RSV: 81-95)	Induce producción de anticuerpos neutralizantes, proliferación de células T y balance en respuesta inmune Th1/Th2.	Zeng y col., 2005; Fan y col., 2005.

hMPV: metapneumovirus humano; INF γ : interferón gama; i.p.: intraperitoneal; IL-12: Interleucina 12; Th1 y Th2: linfocitos T cooperadores o "helper"; RSV: virus sincicial respiratorio.

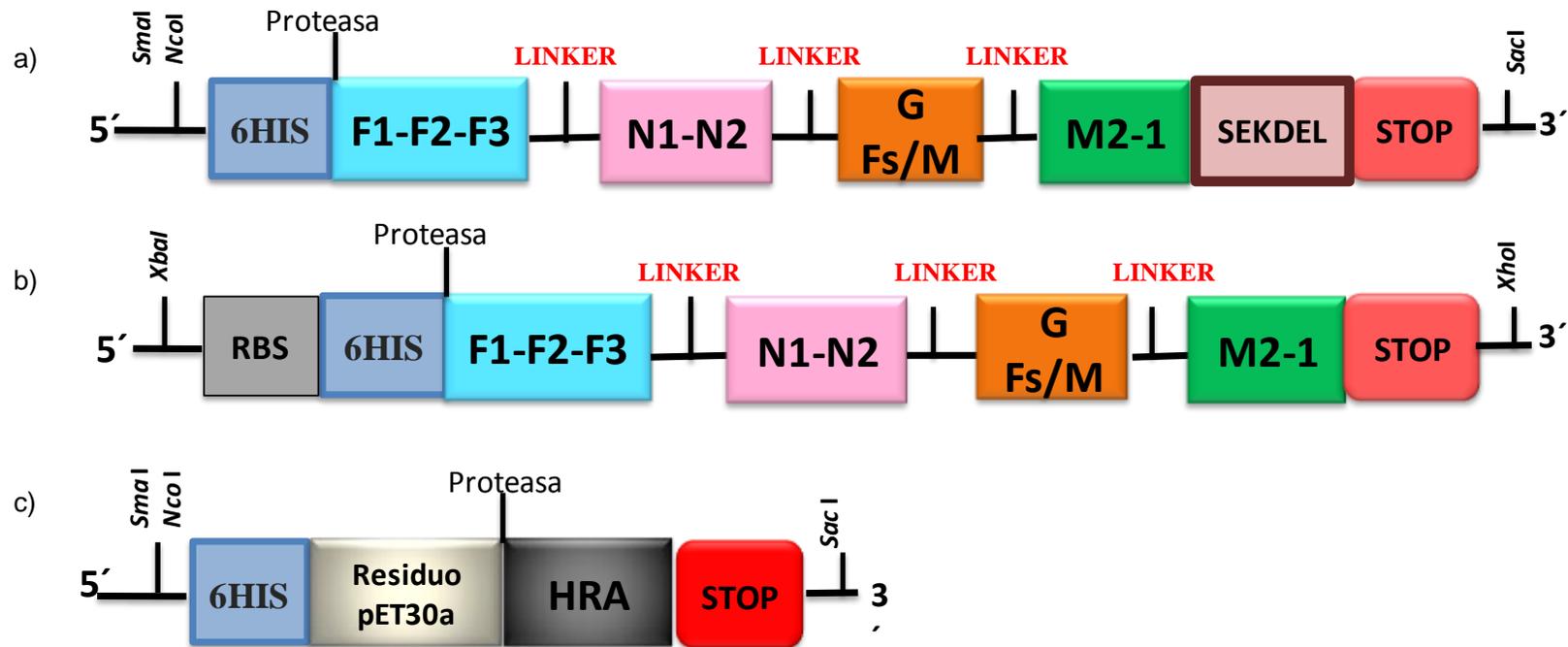


Figura 1. Estructura de los genes sintéticos usados para transformación de tabaco. a) transformación nuclear y transitoria (hMPVn); b) transformación de cloroplastos (hMPVc); c) transformación transitoria del péptido con actividad profiláctica contra hMPV. 6His, etiqueta de histidinas; F1-F2-F3, epítomos del gen F; N1-N2, epítomos del gen N; G Fs/M, proteína de fusión; M2-1, epítomos del gen M2-1. RBS, sitio de unión al ribosoma; SEKDEL, señal de retención al retículo endoplásmico; STOP, codón de paro. Se muestran sitios de restricción.

3.2 Diseño de un gen que expresa un péptido con actividad profiláctica contra hMPV

Los péptidos exógenos de HRA y HRB de la proteína F del hMPV pueden competir con péptidos endógenos del mismo virus e inhibir la fusión y por lo tanto, la infección (Miller y col., 2007; Deffrasnes y col., 2008).

El diseño del péptido con acción profiláctica se basó en el estudio de Deffrasnes y col. (2008), en el cual se evaluaron diferentes secuencias de los dominios HRA y HRB de la proteína F como inhibidores potenciales de la infección por hMPV. En dicho estudio se describe un péptido análogo a la secuencia HRA de la proteína F del hMPV que resultó tener actividad inhibitoria de la fusión del virus con la célula hospedera de manera que podría ser utilizado como profiláctico. En la estructura del gen que se describe en la Fig. 1, se utilizó la secuencia del dominio HRA (48aa) de la proteína F del hMPV; además con base en los trabajos de Deffrasnes y col. (2008), se añadió un fragmento del vector pET30a (52aa) con el objetivo de brindarle estabilidad a la estructura y mejorar su actividad. Existe la evidencia de que péptidos basados en los dominios HR deben formar una estructura de hélice fuera de la membrana viral y dichos péptidos deben tener suficiente estabilidad para llegar a formar esas hélices, la cual podría dárselas el fragmento de pET30a (Miller y col., 2007).

En el extremo 5' se agregó una etiqueta de seis histidinas que será útil para la purificación de la proteína recombinante y un sitio proteasa que permite la eliminación tanto de la etiqueta como del fragmento del vector pET30a y de esta manera se pretende probar si la mejor actividad del péptido se observa cuando cuenta con este fragmento.

3.3 Construcción módulo 3'-hMPVn y transformación transitoria de *N. tabacum* y *N. benthamiana*

La técnica de transformación transitoria (Magniffection) utiliza la estrategia de un virus desensamblado (módulos) y se basa en la amplificación transitoria de vectores virales liberados en múltiples partes de la planta por *Agrobacterium* (Marillonnet y col., 2004).

El vector para la transformación transitoria consta de 3 módulos:

1. El módulo 5' contiene la replicasa viral y señales que dirigen a la proteína hacia compartimentos de la célula vegetal, así como la ARN polimerasa dependiente de ARN y el promotor de actina 2 de *Arabidopsis*.
2. El módulo integrasa contiene el gen que codifica para la enzima integrasa que se encarga de ensamblar el módulo 5' con el 3', esto debido al hecho de que dichos módulos poseen sitios de recombinación attP y attB.
3. El módulo 3' contiene sitios de clonación para introducir el gen de interés y el terminador de la transcripción en plantas NOS.

Para la construcción del módulo 3'-hMPVn, el gen hMPVn se subclonó en el módulo 3' que se utiliza para la transformación transitoria (Fig. 2). Se analizaron las clonas transformantes resistentes al agente de selección (ampicilina) por perfil de restricción con enzimas *Nco* I y *Sac* I (Anexos, Fig. S1). Obtuvimos dos clonas positivas (7 y 8) con el perfil esperado de 3 bandas (debido a que la enzima *Sac* I corta dos veces en el gen y *Nco* I solo una vez; fragmentos esperados 890, 563, 327 pb). Las clonas 7 y 8 se analizaron por PCR con oligonucleótidos específicos que se diseñaron para amplificar el gen nuclear, ambas clonas resultaron tener el transgén clonado fragmento esperado 810 pb (Anexos, Fig. S2).

La construcción módulo 3'-hMPVn se usó para la transformación transitoria. El tejido molido se utilizó para extraer proteínas totales solubles y se cuantificaron por el método de Bradford y se realizó una curva estándar para determinar la cantidad de proteínas en los extractos vegetales (Anexos, Fig. S3).

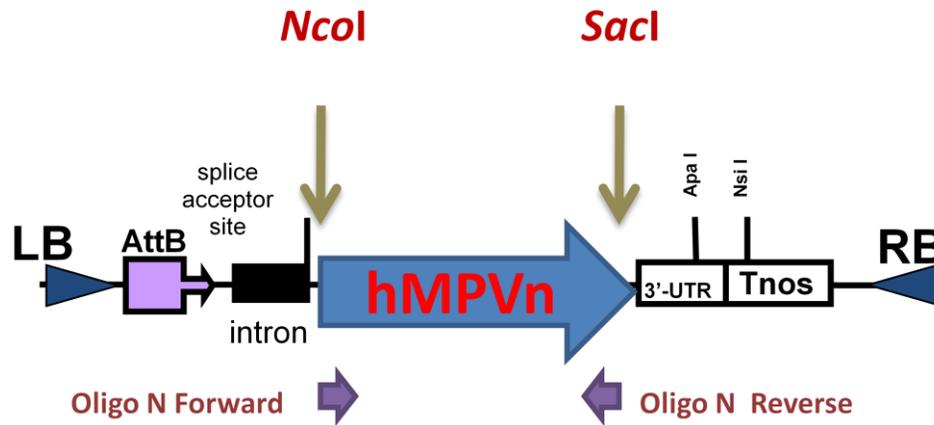


Figura 2. Representación esquemática del vector módulo 3'-hMPVn para la transformación transitoria donde se muestran los sitios de clonación para el gen hMPVn. Se muestra el sitio donde se alinean los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen clonado. LB, borde izquierdo; RB, borde derecho; AttB, sitio de recombinación; Tnos, terminador de la nopalina sintetasa.

En la Tabla 2 se presentan las concentraciones obtenidas de proteína total soluble (PTS) obtenida; para el extracto transgénico de *N. tabacum* se obtuvo $8.99 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ y para *N. benthamiana* $10.31 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$. La relación de PTS de planta transformada respecto a planta no transformada es mayor en la especie *benthamiana* que en *tabacum*, lo que nos sugiere que para este tipo de transformación con este vector viral es más recomendable usar la especie *benthamiana*. La presencia de la proteína recombinante en los extractos transgénicos se confirmó por un dot blot en el que se utilizó un anticuerpo anti-etiqueta de His como anticuerpo primario pues la proteína recombinante posee en el extremo amino terminal una etiqueta de 6 histidinas (Fig. 3).

Tabla 2. Concentraciones de proteína total soluble en extractos obtenidos por transformación transitoria de *N. tabacum* y *N. benthamiana* con la construcción módulo 3'-hMPVn. Wt: extractos de plantas sin transformar.

	<i>N. tabacum</i> ($\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$)	<i>N. benthamiana</i> ($\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$)
Wt	4.28	3.21
Transgénica	8.99	10.31

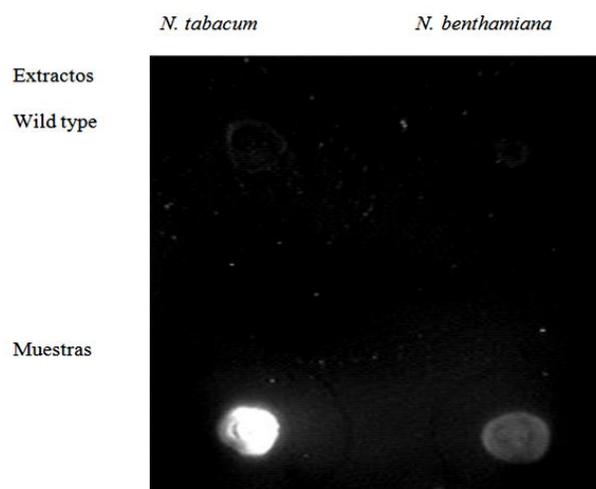


Figura 3. Dot blot de la proteína recombinante obtenida por Magniffection (construcción módulo 3'-hMPVn). Se muestran además los extractos de plantas silvestres (wild type), los cuales no dan señal.

3.4 Construcción pBI121-hMPVn y la transformación nuclear de lechuga y *N. tabacum*

En el caso de la transformación nuclear el vector utilizado fue el vector binario pBI121 el cual posee el gen reportero GUS que puede ser eliminado con enzimas de restricción para insertar en su lugar el gen de interés; la expresión de dicho gen tiene lugar bajo el promotor 35S de virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV) y contiene un gen de resistencia a kanamicina para la selección de las células vegetales transformadas (Fig. 4).

Una vez liberado el cassette de GUS del vector pBI121 se subclonó el gen para la transformación nuclear (hMPVn) en este vector. La presencia del transgén se confirmó mediante perfil de restricción con enzimas *BamHI* y *EcoRI*, que liberó un fragmento de 1,150 pb (Anexos, Fig. S4). Además se realizó PCR con oligonucleótidos que se alinean en el promotor 35SCaMV y en el terminador NOS, obteniendo un producto de 1,300 pb (Anexos, Fig. S5). Finalmente se realizó PCR a las clonas 16 y 22 con oligonucleótidos específicos diseñados para que alineen y amplifiquen dentro del gen nuclear hMPVn dando un producto de 810 pb (Anexos, Fig. S6). Se obtuvo así la construcción pBI121-hMPVn para la transformación nuclear de lechuga y tabaco.

La transformación nuclear de plantas consiste en la integración estable del transgén en el genoma nuclear de la planta. Para ello la construcción pBI121-hMPVn se transfirió a *A. tumefaciens* cepa LBA4404 por electroporación. Se transformaron cotiledones de lechuga y plántulas de 4 semanas de *N. tabacum* sin nicotina. El tejido se cultivó en medio MSJ con 100mg l⁻¹ de kanamicina y 500 mg l⁻¹ cefotaxima hasta la formación de callos para lechuga y para tabaco 200 mg l⁻¹ de kanamicina.

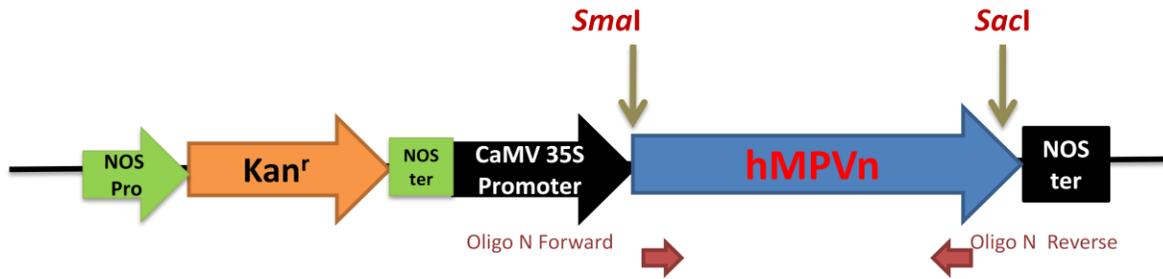


Figura 4. Representación esquemática del vector pBI121 para la transformación nuclear. Se muestra el sitio de clonación del gen hMPVn y el sitio donde se alinean los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen clonado. Esta construcción posee un gen de resistencia a kanamicina para la selección de las clonas transformantes.

3.5 Construcción pBIC-hMPVc y transformación de cloroplastos de *N. tabacum*

Para la transformación de cloroplastos de *N. tabacum* el vector que se utilizó fue el vector bicistrónico pBIC diseñado previamente en nuestro grupo (Patiño-Rodríguez, 2007), el cual posee sitios de recombinación homóloga para tabaco (*trnR-ACG* y *trnN-GUU*) en la región de repetidos invertidos (IR) del genoma del cloroplasto, lo que da lugar a la recombinación en sitios específicos de dicho genoma (Fig. 5). Además, este vector incluye un cassette de expresión del gen *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina en las células vegetales transformadas. La característica de ser bicistrónico se refiere a que la expresión de ambos genes se lleva a cabo por el mismo promotor *Prrn* y el terminador *rbcL3'* (Patiño-Rodríguez, 2007).

Para obtener la construcción pBIC-hMPVc, el vector fue digerido con *Xba* I y *Xho* I; dichos sitios también flanquean el gen diseñado para la expresión en cloroplastos (hMPVc). El pBIC también posee un gen de resistencia a ampicilina para la selección de las clonas transformantes de *E. coli*. El vector digerido se ligó al gen hMPVc y se analizaron las clonas resistentes por PCR con oligonucleótidos que amplifican el gen de cloroplastos (Anexos, Fig. S7).

La transformación de cloroplastos de *N. tabacum* se realizó usando hojas de tabaco por biobalística, las hojas transformadas se colocaron en medio de selección RMOP con 500 mg ml⁻¹ de espectinomicina (Fig. 6).

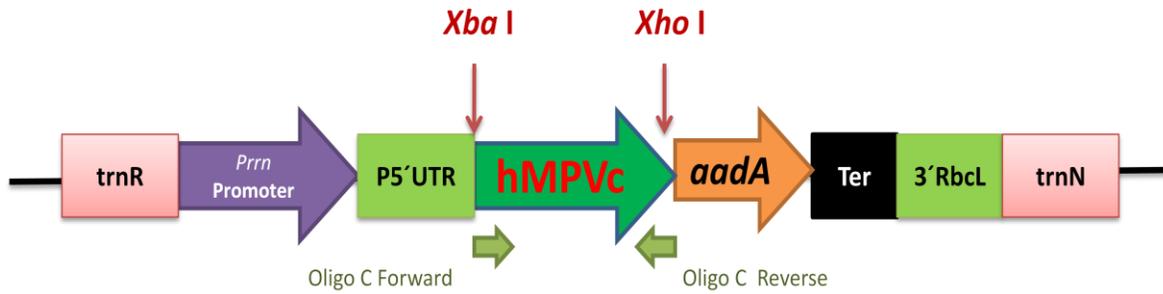


Figura 5. Representación esquemática del vector bicistrónico pBIC para la transformación de cloroplastos de tabaco. Se muestra donde se clonó el gen hMPVc y el sitio donde se alinean los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen clonado. Este vector posee un gen de resistencia a espectinomicina para la selección del tejido vegetal transformado.



Figura 6. Hojas de tabaco transformadas con construcción pBIC-hMPVc. Izquierda: hojas transformadas con la construcción y derecha: hojas no transformadas en medio de selección.

3.6 Construcción módulo 3'-HRA y transformación transitoria de *N. tabacum* y *N. benthamiana*

El gen sintético que expresa el péptido HRA fue ligado al módulo 3' para transformación transitoria (Fig. 7). Las clonas resistentes al agente de selección se analizaron por perfil de restricción con las enzimas *Nco* I y *Sac* I y se obtuvieron 4 clonas con el fragmento esperado de 330 pb (Anexos, Fig. S8).

La construcción módulo 3'-HRA fue electroporada a células competentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101. Se infiltraron por vacío plantas de *N. tabacum* sin nicotina. El tejido molido se utilizó para extraer proteínas totales solubles y se cuantificó la proteína como se describe en la sección 3.3 (Anexos, Fig. S9). Como control se realizó la transformación módulo 3'-GFP.

La Tabla 3 muestra las concentraciones obtenidas de proteína total soluble; para el extracto transgénico de *N. tabacum* se obtuvo $15.89 \mu\text{g ml}^{-1}$ y para el control de $8.98 \mu\text{g ml}^{-1}$. La presencia de la proteína recombinante en los extractos transgénicos se confirmó por un dot blot en el que se utilizó un anticuerpo anti-etiqueta de His como anticuerpo primario pues la proteína recombinante posee en el extremo amino terminal una etiqueta de 6 histidinas (Fig. 8).

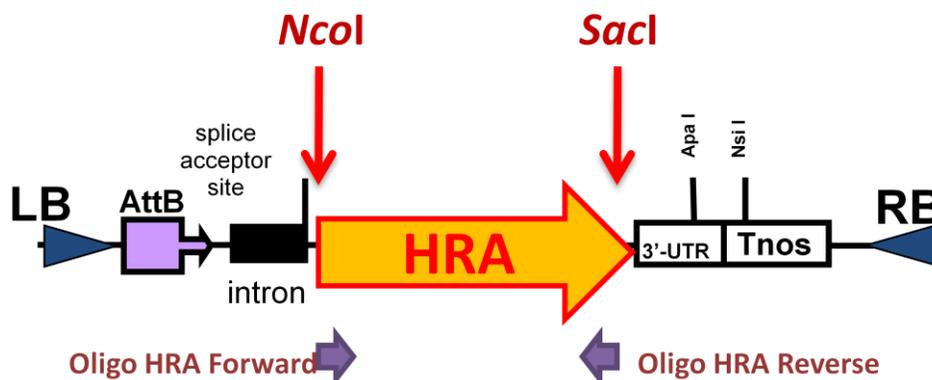


Figura 7. Representación esquemática de la construcción módulo 3'-HRA para la transformación transitoria. Se muestran los sitios de clonación para del gen HRA y el sitio donde se alinean los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen clonado.

Tabla 3. Concentraciones de proteína total soluble en extractos obtenidos por transformación transitoria de *N. tabacum* con la construcción módulo 3'-HRA. Control plantas transformadas con GFP.

		$\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$
Transgénica	HRA2TAB1	15.89
Control Mock	GFPTAB1	8.98

Extractos de *N. tabacum* transformados con:

HRA

GFP

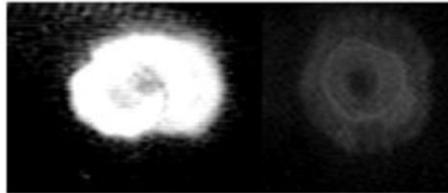


Figura 8. Dot blot de la proteína recombinante obtenida por Magnifection (construcción módulo 3'-HRA) usando como control extractos de plantas transformadas con el módulo 3'-GFP.

(4) DISCUSIÓN

Las plantas son un sistema de expresión ideal para la producción de proteínas recombinantes que pueden ser utilizadas en formulaciones como vacunas contra agentes infecciosos que entran al cuerpo a través de las mucosas (Daniell y col., 2009; Davoodi-Semiromi y col., 2009). Ofrecen un sistema seguro debido a la carencia de contaminación por toxinas microbianas y más económico por la eliminación de bioreactores costosos utilizados por sistemas como las bacterias (Streatfield y Howard, 2003).

La producción de vacunas en plantas comparada con bacterias como *E. coli* es mejor debido a que las plantas son eucariotes y pueden producir proteínas más complejas que se pliegan correctamente y sean capaces de someterse a modificaciones post-traduccionales que no ocurren en bacterias (Álvarez y Cardineau, 2010).

Los antígenos se pueden producir en partes comestibles de la planta y como vacunas orales se pueden administrar directamente como producto alimenticio eliminando el costo de purificación y el uso de jeringas lo cual elimina el riesgo de contaminación y de personal para la administración (Álvarez y col., 2010; Schillberg y col., 2005). Sobre las vacunas parenterales, las vacunas orales ofrecen inmunización de mucosas debido a la presencia de un microambiente único en la mucosa intestinal para generar y secretar la inmunoglobulina A. Esta clase de anticuerpos juegan un papel incomparable en la inmunidad de las mucosas contra agentes infecciosos y se expresan poco o nada en absoluto por cualquier otro medio de vacunación (Davoodi-Semiromi y col., 2009).

La inmunidad protectora que es inducida después de la infección por hMPV es transitoria; por lo tanto, una vacuna contra este virus debería ofrecer idealmente el ser mucho más inmunogénica y protectora que la infección natural. Sin embargo, actualmente no existe una vacuna disponible comercialmente contra este virus (Herfst y Fouchier, 2008).

En este trabajo se llevó a cabo la búsqueda de artículos donde se evaluaron epítomos de las proteínas del hMPV en animales (Tabla 1) y los epítomos más relevantes fueron seleccionados para el diseño de dos genes sintéticos (Fig.1).

Esto se realizó con la finalidad de obtener una proteína recombinante que se pueda utilizar en una formulación farmacéutica como una vacuna de subunidades, que sea capaz de inducir inmunidad contra el hMPV sin efectos adversos expresada por un sistema vegetal.

Varios de los epítomos que se muestran en la Tabla 1 son de un tamaño de 8 y 9 aa y en su totalidad darían un polipéptido pequeño con bajas probabilidades de inmunogenicidad. Por lo tanto, se consideraron regiones adicionales para incrementar el tamaño usándose dos software diferentes: Antheprot que predice antigenicidad de los aminoácidos de acuerdo con características fisicoquímicas como la hidrofobicidad, los aminoácidos menos hidrofóbicos quedarían más expuestos en la estructura terciaria de la proteína recombinante y con el software SYFPEITHI que predice epítomos de acuerdo con la capacidad de los aminoácidos para ser reconocidos por el complejo principal de histocompatibilidad. Se analizaron las proteínas con este programa para el alelo HLA-A*0201 del humano y H2D^b del ratón. En las Tablas S1 y S2 se puede observar que la puntuación obtenida del análisis de los péptidos son puntuaciones altas (cercasas a 15-24), con esto se podría asegurar que los epítomos serán reconocidos y procesados por el complejo principal de histocompatibilidad para ser presentados por las células presentadoras de antígenos.

Por otro lado, la vacunación oral necesita dosis superiores que las utilizadas en la inmunización por otras vías de administración (Álvarez y col., 2010). Se ha demostrado que un aumento en la transcripción del transgén se puede obtener por el uso de elementos regulatorios que optimicen el proceso tales como promotores fuertes, potenciadores transcripcionales 5', señales alternativas de poliadenilación y el uso de genes sintéticos con codones optimizados para la expresión en plantas. En este sentido, los genes diseñados fueron optimizados para la expresión en *Nicotiana tabacum* y *Lactuca sativa* (lechuga).

Desafortunadamente la alta expresión del transgén no necesariamente garantiza la alta acumulación de la proteína en la planta. Existen diversos mecanismos para la degradación de la proteína en las plantas, uno de ellos son las proteasas citoplasmáticas; esta degradación proteolítica puede disminuir si se dirige la

proteína al retículo endoplasmático por una señal de retención en el carboxi-terminal HDEL o KDEL, que es reconocido por un receptor situado en el complejo de Golgi. Por esta razón en el diseño de los genes sintéticos se añadió en el extremo carboxi terminal una señal de retención SEKDEL (Fig. 1). Sin embargo la retención a través de RE es un mecanismo saturable ya que está mediada por el receptor KDEL, por lo que no siempre la adición de KDEL conduce a la acumulación de la proteína (Álvarez y col., 2010).

Adicionalmente, en el diseño se consideró colocar la etiqueta de histidinas en el extremo amino para no comprometer la señal de retención al RE (Fig. 1), ésta servirá para purificar la proteína recombinante de los extractos transgénicos y el sitio proteasa será útil para eliminar la etiqueta una vez purificada la proteína. En el caso del diseño del gen HRA (Fig. 1), el sitio proteasa servirá para eliminar tanto el residuo del pET30a como la etiqueta de histidinas, con esto se probará la capacidad de dicho residuo para brindarle estabilidad al péptido y determinar si es posible mejorar con esto su actividad antiviral.

La construcción módulo 3'-hMPVn (Fig. 2) se utilizó para la transformación transitoria de *N. tabacum* y *N. benthamiana*, por este sistema de expresión se requieren de 10-14 días para obtener el máximo de expresión de proteína recombinante (Marillonnet y col., 2005). Este método de transformación de plantas combina ventajas de tres sistemas biológicos: la eficiencia de los vectores virales y la liberación eficiente de ADN de *Agrobacterium*, la velocidad y nivel de expresión de virus de ARN de plantas, así como la capacidad de hacer modificaciones post-traduccionales y el bajo costo de producción de una planta. La expresión del gen diseñado para la transformación nuclear (hMPVn) por el método transitorio, se confirmó detectando a la proteína recombinante por medio de un dot blot (Fig. 3), utilizando un anticuerpo que reconoce la etiqueta de histidinas que posee la proteína recombinante en el extremo amino terminal, lo cual es un resultado positivo ya que se demuestra que el sistema vegetal puede producir una proteína que no es degradada, al menos en el extremo amino terminal y puede ser reconocida por un anticuerpo faltaría probar la actividad biológica de este péptido para corroborar que la proteína este intacta. Sin embargo, se tuvieron problemas

técnicos al querer cuantificar la proteína por ELISA (datos no mostrados), aun cuando se utilizó el mismo anticuerpo que reconoce la etiqueta de histidinas. Es posible que la proteína recombinante se encuentre dentro de cuerpos de inclusión por lo que el extracto se mezcló con DTT 300 mM, se filtró e hirvió por 10 min, pero tampoco se pudo detectar la proteína, lo que sugiere que el problema es de otra naturaleza.

Por otro lado, el sistema de expresión transitoria (Magniffection) da lugar a cantidades muy altas de proteína recombinante que pueden inhibir el ELISA o bien el antígeno producido no se adhirió a la placa. Unas de las alternativas para resolver el problema de la cuantificación es realizar un Western blot, el cual está en proceso.

Se logró obtener la construcción para la transformación genética del núcleo con la cual se puede realizar tanto la transformación de *N. tabacum* como de lechuga (Fig. 4). En cuanto a la construcción para la transformación de cloroplastos de *N. tabacum* se logró obtener la construcción pBIC-hMPVc (Fig. 5) y además transformar hojas de tabaco por biobalística y los callos se encuentran en medio de selección (Fig.6).

Por otro lado, la producción de péptidos antivirales es una alternativa en la terapia preventiva contra el hMPV. En este trabajo se diseñó un gen que expresa un péptido con acción profiláctica basado en la secuencia del dominio HRA de la proteína F del hMPV. En su diseño se incluye un fragmento de 52aa del vector pET30a el cual fue incluido para evaluar si éste es el responsable de proporcionarle estabilidad a la estructura HRA2- α hélice y contribuya para tener una conformación activa como se discute en el trabajo de Deffrasnes y col. (2008); por esta razón, se incluyó un sitio proteasa para eliminar el residuo pET30a.

Se obtuvo la construcción módulo 3'-HRA que expresa el péptido profiláctico (Fig. 7); se logró transformar de forma transitoria *N. tabacum* sin nicotina y se realizó la extracción de la proteína total soluble de la cual por dot blot se determinó la presencia de la proteína recombinante por la etiqueta de histidinas (Fig. 8). Además se realizó un ELISA para cuantificar el péptido, sin embargo no se pudo detectar como en el caso de los extractos de la construcción módulo3'-hMPVn

(datos no mostrados). Este péptido podría ser utilizado para prevenir una epidemia evitando se propague el virus en escuelas o familias (Deffrasnes y col., 2008).

Este es el primer reporte donde se utilizan plantas como un bioreactor para la producción de proteínas recombinantes antigénicas que podrían ser utilizadas en el tratamiento profiláctico contra hMPV para el cual no existe tratamiento disponible, además de un péptido antiviral. Sin embargo, aún hace falta purificar las proteínas recombinantes, realizar ensayos de inmunogenicidad retos para la proteína antigénica, así como la inhibición de la formación de sincicios en líneas celulares (pruebas *in vitro*) y estudiar la patología en modelos animales post administración de la proteína (pruebas *in vivo*) y para el péptido antiviral y con esto caracterizar la dosis y esquema de administración.

(5) PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

5.1 Diseño y síntesis de genes. Alguno de los epítomos de la Tabla 1 tienen un tamaño de 8 aa y 9 aa y en su totalidad no constituyen un polipéptido con un tamaño lo suficientemente grande para garantizar inmunogenicidad, por lo que para aumentar el tamaño se hizo coincidir estos epítomos con los picos de antigenicidad que resultan del análisis de la proteína completa en el software *Antheprot* (<http://antheprot-pbil.ibcp.fr>). Este software predice regiones antigénicas basado en las características fisicoquímicas (hidrofobicidad) de los aminoácidos por el método de Parker (1986). De este análisis se tomaron en cuenta aminoácidos adyacentes a los epítomos (Anexos, Fig. S10). En la Figura S10 c) se puede observar que análisis de la proteína N para el epítomo N1, no coincide con un pico de antigenicidad, pero se tomó en cuenta debido a que el análisis con otro software (SYFPEITHI) si dio buenos resultados. Este último software toma en consideración los aminoácidos que se unen o anclan al complejo principal de histocompatibilidad clase I, o bien los que son posiciones auxiliares del ancla así como otros aminoácidos frecuentes y cuenta con una base de datos de epítomos publicados (ligandos naturales). En el caso de los epítomos seleccionados de las proteínas del hMPV, se buscó la predicción de epítomos para los alelos H2D^b (de ratón) (Anexos, Tabla S1) y HLA-A*0201 (de humano) (Anexos, Tabla S2). Las Tablas S1 y S2 muestran la secuencia de la proteína analizada que recibe la puntuación indicada, esta puntuación indica un valor numérico que resulta de la contribución independiente de cada aminoácido en el péptido a la unión a la molécula clase I. Una vez estructurados los genes sintéticos (Fig.1), la secuencia en aminoácidos se mandó sintetizar a la compañía GeneScript que optimizó dicha secuencia para la expresión en lechuga (*Lactuca sativa*) y tabaco.

En cuanto al gen que expresa el péptido HRA con acción profiláctica contra el hMPV (Fig. 1), éste se diseñó en base al artículo de Deffrasnes y col. (2008). La secuencia en aminoácidos se mandó sintetizar a la compañía GeneScript que optimizó dicha secuencia para la expresión en lechuga (*Lactuca sativa*) y *N. tabacum*.

5.2 Construcciones genéticas.

5.2.1 Construcción módulo 3'-hMPVn. El gen hMPVn fue digerido con *Nco* I y *Hind* III sitios de restricción que flanquean el gen sintético. El vector módulo 3' (pICH11599) también posee estos sitios. Los productos de la digestión se analizaron en un gel de agarosa al 1% y la banda de 890 pb correspondiente al gen hMPVn se purificó del gel de agarosa con el kit Promega. Para la ligación se empleó T4 ADN ligasa y esta ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* por choque térmico y se seleccionaron las colonias resistentes a ampicilina.

Posteriormente se analizaron las clonas por análisis de restricción y se mandó secuenciar para confirmar la construcción al CINVESTAV, Irapuato.

5.2.2 Construcción pBI121-hMPVn. El vector pBI121 fue digerido con las enzimas *Sma* I y *Sac* I para la eliminación del gen reportero GUS, al mismo tiempo se llevó a cabo la digestión del gen hMPVn con las mismas enzimas. Cabe mencionar que se realizaron digestiones parciales en el gen hMPVn debido a que este tiene un sitio *Sac* I interno. Los productos de la digestión se analizaron en un gel de agarosa al 1% y la banda de 890 pb correspondiente al gen, se purificó con el kit Promega y el vector pBI121 de 12 kb digerido también se purificó. Posteriormente se procedió a la ligación empleando T4 ADN ligasa y con este producto de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* y se seleccionaron las colonias resistentes a kanamicina. Las clonas obtenidas se analizaron por PCR con oligonucleótidos específicos que amplifican dentro del gen nuclear; así mismo dicha construcción fue enviada a secuenciar al CINVESTAV, Irapuato.

5.2.3 Construcción pBIC-hMPVc. El vector para la transformación de cloroplastos de *N. tabacum* es el pBIC; éste fue digerido con *Xba* I y *Xho* I, dichos sitios también flanquean el gen diseñado para la expresión en cloroplastos (hMPVc). El pBIC posee gen de resistencia a ampicilina para la selección de las clonas transformantes. El vector pBIC digerido fue ligado al gen hMPVc y con la ligación se transformaron células competentes de *E. coli*. Se analizaron las clonas resistentes al agente de selección (ampicilina) por perfil de restricción con *Xba* I y

Xho I; además se confirmó la construcción por PCR con oligonucleótidos que amplifican el gen de cloroplastos y por secuenciación realizada en el CINVESTAV, Irapuato.

5.3 Transformación transitoria de *N. tabacum* sin nicotina y *N. benthamiana*.

La construcción módulo 3'-hMPVn fue electroporada a células competentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101 (25 μ F, 400 Ω por 2.5kv, 8-9 ms). La construcción en *A. tumefaciens* cepa GV3101 del módulo 3'-hMPVn se creció en 50 ml de medio LB líquido con ampicilina y rifampicina durante dos días a 28°C y 150 rpm. Al mismo tiempo por separado se cultivaron los preinóculos del módulo 5' y el módulo integrasa así como el módulo 3' que tiene GFP (como ensayo control para probar la eficiencia del sistema de expresión) y se observó la producción de GFP, como un control de la transformación transitoria en *N. tabacum* y *N. benthamiana* (Anexos, Fig. S11). Se centrifugaron cada uno de los cultivos que contienen cada módulo a 4,000 rpm por 10 min y se obtuvo una pastilla que se resuspendió en 5 ml del buffer de infiltración. Posteriormente las suspensiones de bacteria se diluyeron de 1:10 hasta 1:1000 en 2-3 l de buffer de infiltración. Se utilizaron plantas crecidas en tierra de *N. tabacum* sin nicotina y *N. benthamiana* de 4-6 semanas de edad que fueron cuidadosamente arrancadas de la tierra y se lavaron las raíces con agua destilada para eliminar el exceso de tierra; inmediatamente fueron colocadas en el matraz que contenía los 3 módulos resuspendidos en el buffer de infiltración (MES-NaOH10mM, pH 5.5 y MgSO₄ 10mM) y se les aplicó vacío por 30-45 s; posteriormente se liberó lentamente el vacío. La cosecha del tejido (hojas) se realizó entre 7-14 días post infiltración. El tejido se almacenó a -20°C, luego se liofilizó y molió.

5.4 Extracción de proteína total soluble. Se congelaron 100 mg de tejido vegetal, se agregaron de 500-1000 μ l de buffer de extracción de proteínas vegetales adicionado con un coctel de inhibidores de proteasas y se homogenizó la mezcla. El homogenado se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C, la fase superior que es la que contiene las proteínas totales solubles se pasó a un tubo nuevo y se almacenó a -80°C.

5.5 Determinación de cantidad de proteína total soluble por el método de Bradford. Se colocó 1 µl de la solución problema en una placa para ELISA, se añadió 199 µl del reactivo de Bradford y se midió la absorbancia a 595 nm en el fluorómetro TECAN modelo Genios. Se empleó albúmina de suero de bovino para realizar la curva estándar.

5.6 Transformación nuclear vía *A. tumefaciens*. 300 cotiledones de lechuga y de 3 a 5 hojas de tabaco de cuatro semanas de edad obtenidos del cultivo *in vitro* fueron heridos con un bisturí por la cara abaxial, éstos fueron colocados en el medio MSO líquido para evitar deshidratación. Posteriormente se colocaron en una solución de *A. tumefaciens* que portaba el plásmido de interés con una carga bacteriana medida en DO_{600nm} de 0.2. Después de eliminar el exceso de bacterias con papel absorbente estéril, se colocaron en el medio de cocultivo UM. Pasado el periodo de cocultivo de 2 días, los explantes se transfirieron al medio de selección MSJ (100 mg l⁻¹ o 200 mg l⁻¹ de kanamicina para lechuga y tabaco respectivamente, adicionado con 500 mg l⁻¹ de cefotaxima para eliminar a la Agrobacteria). Los tejidos fueron subcultivados cada dos semanas, seleccionando sólo los explantes resistentes a la selección.

5.7 Transformación de cloroplastos de *N. tabacum* sin nicotina con pBIC-hMPVc por biobalística. Se utilizaron hojas de tabaco sin nicotina de cuatro semanas de edad, dichas semillas se esterilizaron y germinaron *in vitro*. Se colocaron en medio RMOP con la cara abaxial hacia arriba. Las partículas de oro que se usan para el bombardeo deben ser preparadas con un día de anticipación. Se pesaron 50 mg de partículas de oro 0.6µ (Bio-Rad) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Para preparar las partículas de oro se agregó 1 ml de etanol al 100% y se mezclaron en vórtex durante 3 minutos, se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol grado reactivo al 70% y se mezcló con vórtex durante 2 minutos. Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, agitando cada 5 minutos, se centrifugó por 3 minutos a 13, 000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de agua estéril y se mezcló con vórtex durante 1 minuto, hasta que las partículas estuvieron resuspendidas completamente. Se dejó a temperatura ambiente

durante 1 minuto para permitir que las partículas se fueran hacia el fondo. Se centrifugó durante 2 minutos a 13, 000 rpm y se descartó el sobrenadante. Estos lavados se repitieron cinco veces; finalmente, se agregaron 850 μl de glicerol al 50%. La suspensión partículas de oro preparadas se almacenaron a -20°C hasta al momento de usarlas.

5.8 Cobertura de partículas de oro con el ADN de interés. La suspensión de partículas de oro previamente preparadas se mezcló en vórtex hasta estar completamente resuspendidas, se tomaron 50 μl de estas partículas y en estricto orden se agregaron: 10 μl de ADN plasmídico de concentración $1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$, 50 μl de CaCl_2 2.5M recién preparado, 20 μl de espermidina 0.1M. Después de añadir cada solución se agitó con vórtex durante 5 segundos, posteriormente se mezcló con vórtex durante 20 min a 4°C ; se agregaron 200 μl de etanol absoluto a temperatura ambiente y mezcló en vórtex, durante 5 segundos. La mezcla se centrifugó durante 30 segundos a 13,000rpm. Se desechó el sobrenadante y se repitieron los lavados con etanol por lo menos 5 veces, hasta que las partículas de oro eran fácilmente resuspendidas. El paso final fue resuspender las partículas en 35 μl de etanol al 100% y se dejaron en hielo hasta su uso. Este material se utilizó para 6 bombardeos. Se utilizaron discos de ruptura de 1,100 psi, por lo cual la presión del manómetro de salida se ajustó a 1,400 psi. Se encendió la bomba de vacío BIORAD y la cámara de vacío para realizar los disparos. Se colocaron 6 μl de la suspensión de micropartículas con ADN en los macroacarreadores previamente esterilizados con etanol, se colocó la caja petri con la hoja, a 9 cm de distancia y se cerró la cámara de vacío. Se generó vacío hasta que el indicador marcó 15 Hg (mm de mercurio). Se mantuvo el vacío y se realizó el disparo de las micropartículas con el ADN. Las hojas bombardeadas se incubaron durante 48h a 25°C en la oscuridad. Después de este periodo, cada hoja se cortó en fragmentos de alrededor de 5mm^2 y se colocaron en medio RMOP con espectinomicina 500mg l^{-1} para inducir la selección de las plantas transplastómicas.

Los explantes se cambiaron a medio nuevo cada dos semanas y se seleccionaron los explantes resistentes al antibiótico.

5.9 Detección de la proteína recombinante por Dot blot

En una membrana de nitrocelulosa se dibujó un círculo donde se colocó un volumen de extracto de proteína (0.1µg de proteína total soluble). Se llevó la membrana a secar, luego se bloquearon los sitios inespecíficos con un lavado en 5% BSA en TBS-T (1h/ temperatura ambiente). Se incubó con el anticuerpo primario diluido 1:10,000 en BSA-TBS-T (30min/ temperatura ambiente), se lavó 3 veces con TBS-T (3 lavados de 5min). Se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a HRP diluido 1:4,000 (30 min/ temperatura ambiente). Se lavó 3 veces con TBS-T (15 min el primer lavado, 5 min los siguientes). Se incubó con el reactivo de revelado por 1 min y se tomó la foto por quimioluminiscencia.

(6) AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento del proyecto Ciencia Básica de CONACYT 56980 y a la beca número 332439 otorgada por el CONACYT a Márquez-Escobar.

(7) REFERENCIAS

Álvarez M.L y Cardineau G.A. (2010) Prevention of bubonic and pneumonic plague using plant-derived vaccines. *Biotech Adv.* **28**, 184–196.

Álvarez M.L., Topal E., Martin F. y Cardineau G.A. (2010) Higher accumulation of F1-V fusion recombinant protein in plants after induction of protein body formation. *Plant Mol Biol.* **72**, 75–89.

Bharaj P., Sullender W., Kabra S., Mani K., Cherian J., Tyagi V., Chahar H.S., Kaushik S., Dar L. y Broor S. (2009) Respiratory viral infections detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infections seen at an urban hospital in Delhi from 2005 to 2007. *J Virol.* **6**, 89.

Boivin G., Abed Y., Pelletier G., Ruel L., Moisan D., Cote S., Peret T.C., Erdman D.D., y Anderson L.J. (2002) Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis.* **186**, 1330–1334.

- Bradford M.M.** (1979) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248:254.
- Broor S., Bharaj P. y Chahar H.S.** (2008) Human metapneumovirus: a new respiratory pathogen. *J Biosci.* **33**, 483–493.
- Daniell H., Singh N.D., Mason H. y Streatfield S.J.** (2009) Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci.* **14**, 669-679.
- Davoodi-Semiromi A., Samson N. y Daniell H.** (2009) The green vaccine: A global strategy to combat infectious and autoimmune diseases. *Hum Vaccin.* **7**, 488–493.
- Deffrasnes C., Hamelin M.E., y Boivin G.** (2007) Human metapneumovirus. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **28**, 213–221.
- Deffrasnes C., Hamelin M.E., Prince G.A, y Boivin G.** (2008) Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus. *Antimicro Agents Chemother.* **52**, 279-287.
- Fan C.H., Zeng R.H., Sun C.Y., Mei X.G., Wang Y.F. y LiuY.** (2005) Fusion of DsbA to the N-terminus of CTL chimeric epitope, F/M2:81-95, of respiratory syncytial virus prolongs protein- and virus-specific CTL responses in Balb/c mice. *Vaccine* **23**, 2869–2875.
- Hefferon K.L.** (2010) Biopharmaceuticals in Plants: Toward the Next Century of Medicine. *CRC Press Taylor and Francis Group.* 117-143.
- Herd K.A., Mahalingam S., Mackay I.M., Nissen M., Sloots T.P., y Tindle R.W.** (2005) Cytotoxic T-Lymphocyte epitope vaccination protects against human metapneumovirus infection and disease in mice. *J Virol.* **80**, 2034–2044.
- Herfst S. y Fouchier R.A.M.** (2008) Vaccination approaches to combat human metapneumovirus lower respiratory tract infections. *J Clin Virol.* **41**, 49-52.
- Jofré L.** (2007) Virus respiratorios emergentes. *Rev Neumología Pediátrica.* **3**, 122-176.
- Livingston B., Crimi C., Newman M., Higashimoto Y., Appella E., Sidney J. y Sette A.** (2002) A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *J Immunol.* **168**, 5499–5506.

- Marillonnet S., Giritch A, Gils M., Kandzia R., Klimyuk V. y Gleba Y.** (2004) In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *PNAS*. **101**, 6852-6857.
- Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V. y Gleba Y.** (2005) Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol*. **23**, 718-723.
- Melendi G.A., Zavala F., Buchholz U.J. y Boivin G.** (2007) Mapping and characterization of the primary and anamnestic H-2d-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in mice against human metapneumovirus. *J Virol*. **81**, 11461–11467.
- Miller, S.A., S. Tollefson, J. E. Crowe, Jr., Williams J. V., y Wright D. W.** (2007) Examination of a fusogenic hexameric core from human metapneumovirus and identification of a potent synthetic peptide inhibitor from the heptad repeat 1 region. *J Virol*. **81**, 141–149.
- Noyola D.E., Alpuche-Solís A.G., Herrera-Díaz A., Soria-Guerra R.E., Sánchez-Alvarado J. y López-Revilla R.** (2005) Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics. *J Med Microbiol*. **54**, 969–974
- Parker, J.M.R., Guo, D. y Hodges, R.S.** (1986) New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: Correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*. **25**, 5425-5432
- Patiño-Rodríguez O.** (2007) Transformación de cloroplastos de lechuga con tres genes sintéticos de protegrinas con actividad antimicrobiana. *Tesis de maestría. IPICYT*.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schillberg S., Twyman R.M. y Fischera R.** (2005) Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants—technology assessment. *Vaccine*. **23**, 1764–1769.

Schowalter R.M., Smith S.E., y Dutch R.E. (2006) Characterization of Human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH. *J Virol.* **80**, 10931–10941.

Streatfield S.J. y Howard J.A. (2003) Plants production systems for vaccines *Expert Rev. Vaccines.* **6**, 763-775.

Ulbrandt N.D., Ji H., Patel N.K., Barnes A.S., Wilson S., Kiener P.A., Suzich J.A. y McCarthy M.P. (2008) Identification of antibody neutralization epitopes on the fusion protein of human metapneumovirus. *J Gen Virol.* **89**, 3113–3118.

van den Hoogen, B.G., de Jong J.C., Groen J., Kuiken T., de Groot R., Fouchier R.A. y Osterhaus A. D. (2001) A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.* **7**, 719–724.

WHO (2011) http://www.who.int/fch/depts/cah/resp_infections/en/

Wyde P.R., Chetty S.N., Jewell A.M., Boivin G. y Piedra P.A. (2003) Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin *in vitro*. *Antiviral Res.* **60**, 51–59.

Wyde P.R., Moylett E.H., Chetty E.H., Jewell A.M., Bowlin T.L. y Piedra P.A. (2004) Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue culture assays. *Antiviral Res.* **63**, 51–59.

Zeng R.H, Gong W., Fan C.F, Wang Y.F y Mei X.G. (2005) Induction of balanced immunity in BALB/c mice by vaccination with a recombinant fusion protein containing a respiratory syncytial virus G protein fragment and a CTL epitope. *Vaccine.* **24**, 941–947.

(8) ANEXOS

8.1 Extracción de ADN plasmídico (método de lisis alcalina)

Basado en el método de Sambrook y col., 1989. Se tomó 5 ml de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 12 horas y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos, se eliminó parte del sobrenadante, se resuspendió la pastilla con vórtex y se añadió 200 μ l de la solución I de Birnboim y Doly (BD) (Tris 0.25 M, pH 8, EDTA 10 mM, Glucosa 10 mM), se mezcló en vórtex y se agregaron 300 μ l de la solución II de BD (NaOH 0.2M, SDS 1%) recién preparada, se agitó por inversión 5 veces, se añadieron 400 μ l de la solución III de BD (Acetato de sodio 3M, pH 4.8), se mezcló por inversión y se colocaron los tubos por 5 minutos en hielo; se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos, se recuperó la fase acuosa, se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló suavemente y se centrifugó 5 minutos a 10,000 rpm; se recuperó el sobrenadante y se adicionó un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 7 y un volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión, se precipitó a -20°C por 30 minutos, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 μ l de etanol al 70 %; se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm, se agregó RNAsa (10mg ml⁻¹) y se incubó a 37°C por una hora; nuevamente se agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó el ADN con acetato de sodio e isopropanol frío, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se centrifugó 5 minutos a 12,000 rpm y se secó la pastilla a 50-60 °C; finalmente, se resuspendió en 20 μ l de agua milli "Q".

8.2 Manipulación enzimática del ADN

8.2.1 Digestión de clonas positivas con enzimas de restricción

Mediante la digestión con enzimas de restricción, se utilizaron aproximadamente 2 μ g de ADN plasmídico, el buffer de reacción 10X sugerido por el fabricante, en un volumen de reacción de 20 μ l, con 0.2 U de enzima de restricción. La mezcla de reacción se dejó incubando durante 2 h a 37°C o a la temperatura sugerida por el fabricante.

8.2.2 Purificación de fragmentos de ADN

Se realizaron digestiones utilizando aproximadamente de 1 a 5 µg de ADN, con la enzima de restricción deseada en presencia del Buffer de reacción recomendado por la compañía y agua estéril en un volumen total de 50 µl de reacción. Se incubaron las digestiones a la temperatura adecuada por espacio de 4 horas o durante toda la noche según lo sugerido por el proveedor. Posteriormente, el producto de la digestión fue separado en geles de agarosa del 1-2% dependiendo del tamaño de la banda de interés, la cual fue cortada utilizando un bisturí limpio y observada brevemente con intensidad baja de luz UV, finalmente se utilizó el QIAquick® Gel Extraction kit de Qiagen o bien el kit Promega y siguiendo las instrucciones del proveedor, se purificó el ADN.

8.2.3 Reacciones de ligación

Siguiendo las instrucciones del fabricante, usando un rango molar 1:1 o 5:1 inserto-vector. Se agregó T4 DNA ligasa comercial (Promega®) y se agregó el Buffer de reacción 10X, en un volumen total de 20 µl de reacción.

8.3 Preparación de soluciones

8.3.1 TAE 50X

Para preparar un litro se mezclaron 98.8 g de Tris base, 22.84 ml de ácido acético, 40 ml de EDTA 0.5 M pH 8, se aforó con agua destilada, se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente.

8.3.2 Agarosa 1%

Para preparar 100 ml se añadió 1 gramo de agarosa a 100 ml de TAE 1X, se calentó hasta disolver en el microondas y se almacenó a temperatura ambiente.

8.4 Preparación de antibióticos

8.4.1 Kanamicina (Stock de 50 mg ml⁻¹)

Se disolvieron 5 gramos de sulfato de kanamicina en agua desionizada. Se aforó a 100 ml, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 µm) y se almacenó a -20 °C.

8.4.2 Carbenicilina (Stock de 50 mg ml⁻¹)

Se disolvieron 5 gramos de carbenicilina en agua desionizada. Se aforó a 100 ml, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 mm) y se almacenó a -20 °C.

8.4.3 Ampicilina (Stock de 50 mg ml⁻¹)

Se disolvieron 5 gramos de ampicilina en agua desionizada. Se aforó a 100 ml, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 mm) y se almacenó a -20 °C.

8.4.4 Espectinomicina (Stock de 50 mg ml⁻¹)

Se disolvieron 5 gramos de dihidrocloruro de espectinomicina en agua desionizada. Se aforó a 100 ml, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 mm) y se almacenó a -20 °C.

8.5 Reguladores del crecimiento

8.5.1 Ácido Naftalenacético (ANA; Stock de 1.5 mg ml⁻¹)

Se disolvieron 150 mg de ANA en 1.0 ml de hidróxido de sodio. Se aforó a 100 ml con agua desionizada y se almacenó a -20 °C.

8.5.2 Benciladenina (BA; Stock de 0.6 mg ml⁻¹)

Se pesaron 60 mg de BA y se disolvieron en 1.0 ml de ácido clorhídrico 1 N, se aforó a 100 ml con agua desionizada y se almacenó a -20 °C.

8.5.3 Cinetina (Cin; Stock de 1.0 mg ml⁻¹)

Se pesaron 100 mg de cinetina y se disolvieron en 1.0 ml de ácido clorhídrico 1 N, se aforó a 100 ml con agua desionizada y se almacenó a -20 °C.

8.5.4 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; Stock de 1.0 mg ml⁻¹)

Se pesaron 100 mg de 2,4-D y se disolvieron en 1.0 ml de hidróxido de sodio 1 N, se aforó a 100 ml con agua desionizada y se almacenó a -20 °C.

8.6 Buffers

8.6.1 Buffer de carbonatos

Para preparar 100 ml se pesaron 159 mg de carbonato de sodio, 294 mg de bicarbonato de sodio, se disolvieron en agua destilada estéril, se ajustó el pH a 9.6 con ácido clorhídrico 1 N y se aforó.

8.6.2 Buffer de fosfatasa alcalina

Para preparar 100 ml se pesaron 1.017 g de cloruro de magnesio, 1.211 g de Tris base y 584.4 mg de cloruro de sodio, se disolvieron en agua destilada estéril, se ajustó el pH a 9.5 con ácido clorhídrico 1 N/hidróxido de sodio 1.0 N, y se aforó.

8.6.3 Buffer salino de fosfatos (PBS)

Para preparar 1 l se pesaron 1.42 g de fosfato de sodio, 408 mg de fosfato de monobásico de potasio y 5.85 g de cloruro de sodio, se disolvieron en agua destilada estéril, se ajustó el pH a 7.4 con ácido clorhídrico 1N/hidróxido de sodio 1.0 N, se aforó a un litro con agua desionizada.

8.7 Preparación de medios de cultivo

8.7.1 Medio de cultivo YM

Para preparar 1 l de medio YM se pesaron 400 mg de extracto de levadura, 10 g de manitol, 100 mg de cloruro de sodio, 200 mg de sulfato de magnesio y 500 mg de fosfato de potasio. Se disolvieron en agua destilada, el pH se ajustó a 7.0 con hidróxido de sodio 1.0 N, se aforó con agua destilada y se esterilizó.

8.7.2 Medio de cultivo LB

Para preparar 1 l de medio LB se pesaron 10 g de cloruro de sodio, 5g de extracto de levadura y 10g de bacto triptona se disolvieron, se aforó con agua destilada y se esterilizó. Cuando fue necesario se agregaron 10 g de agar grado bacteriológico.

8.7.3 Medios de cultivo para plantas

Estrategia general para la preparación

Para preparar 1 l de medio de cultivo, se añadieron 10 ml de cada solución MS (MS I – MS V) a 700 ml de agua desionizada. Se adicionaron 30 gramos de sacarosa y, después de añadir reguladores de crecimiento y vitaminas apropiados, el pH fue ajustado a 5.7 con hidróxido de sodio 1 N / ácido clorhídrico 1 N y se aforó con agua destilada estéril. Para los medios semisólidos se añadieron 7 gramos de agar. Los medios se esterilizaron a 15 lb pulgada⁻² por 15 minutos.

Cuando fue necesario, se añadió el antibiótico previamente esterilizado al medio después de esterilizar una vez que su temperatura bajó hasta aproximadamente 50 °C.

8.8 Composición de medios de cultivo

Medio	Vitaminas	ANA (mg l ⁻¹)	BA (mg l ⁻¹)	Cinetina (mg l ⁻¹)	2,4-D (mg l ⁻¹)	Caseína (g l ⁻¹)
MS	MS					
MSO	B5	-	-	-	-	-
MS104	B5	0.05	0.02	-	-	-
MSJ	MS	1.0	0.5	-	-	-
UM	MS	-	-	0.25	2.0	2.0
RMOP	B5	1.0	0.1	-	-	-

8.9 Mezcla basal de sales MS

Solución	Compuesto	Concentración final (mg l ⁻¹)	Concentración del stock 100 X (g l ⁻¹)
MS I	Nitrato de amonio	1650.0	165.0
	Nitrato de potasio	1900.0	190.0
MS II	Sulfato de magnesio	342.5	34.25
	Sulfato de manganeso	16.9	1.69
	Sulfato de zinc	8.6	0.86
	Sulfato de cobre	0.025	0.0025
MS III	Cloruro de calcio	440.0	44.0
	Yoduro de potasio	0.83	0.083
	Cloruro de cobalto	0.025	0.0025
MS IV	Fosfato de potasio monobásico	70.0	7.0
	Ácido bórico	6.2	0.62
	Molibdato de sodio dihidratado	0.25	0.025
MS V	Sulfato ferroso heptahidratado	27.8	2.78
	EDTA dihidratado	37.3	3.73

Los compuestos se disolvieron en agua destilada estéril y se almacenaron en alícuotas de 250 ml a 4°C.

8.10 Vitaminas MS

Compuesto	Concentración final (mg l ⁻¹)	Concentración del Stock 1000 X (mg ml ⁻¹)
Mioinositol	100.0	100.0
Tiamina	10.0	10.0
Ácido nicotínico	1.0	1.0
Piridoxina	1.0	1.0

Los compuestos se disolvieron en agua destilada estéril y se almacenaron en alícuotas de 25 ml a -20 °C.

8.11 Vitaminas B5

Compuesto	Concentración (mg l ⁻¹)	Concentración del Stock 1000 X (mg ml ⁻¹)
Mioinositol	100	100
Tiamina	0.1	0.1
Ácido nicotínico	0.5	0.5
Piridoxina	0.5	0.5
Glicina	2.0	2.0

Los compuestos se disolvieron en agua destilada estéril y se almacenaron en alícuotas de 25 ml a -70 °C.

8.12 Extracción de proteínas de plantas

Se congelaron 100 mg de tejido vegetal utilizando nitrógeno líquido, se agregaron 500 µl de buffer de extracción de proteínas vegetales y se homogenizó la mezcla. El homogenado se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C, y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de proteína se determinó mediante el método de Bradford (1968). Se colocaron 10 µl de la solución problema en tubos de ensayo, se añadió 1 ml del reactivo de Bradford y se midió la absorbancia a 595 nm. Se empleó albúmina de suero de bovino como estándar (5-20 ng µl⁻¹).

8.13 Cuantificación de proteína total soluble (PTS)

Soluciones Bradford

8.13.1 Solución A

Se mezclaron 25 ml de etanol al 95%, 50 ml de ácido fosfórico al 85% y 87.5 mg de azul de Coomassie, se agitó hasta disolver completamente, se filtró con papel filtro y se almacenó a 4°C.

8.13.2 Solución B

Se preparó mezclando 7.5 ml de etanol al 95%, 15 ml de ácido fosfórico y 15 ml de la solución A. Se aforó a 250 ml con agua destilada estéril y se almacenó a 4 °C.

(9) FIGURAS SUPLEMENTARIAS

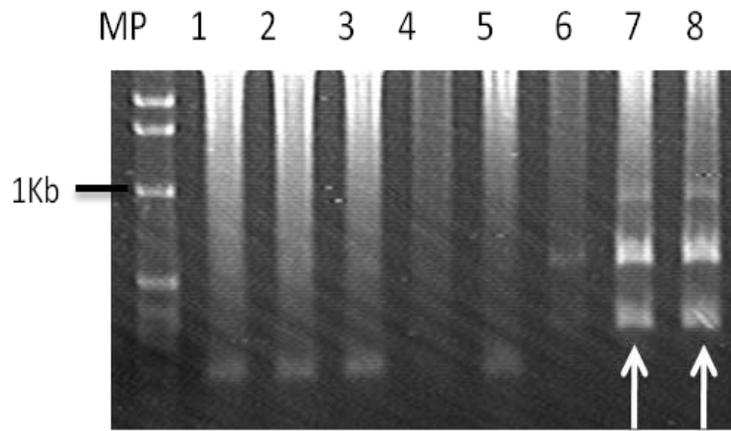


Figura S1. Perfil de restricción de las clonas positivas para la construcción del módulo 3'-hMPVn. Digestión con *Nco* I y *Sac* I; Las clonas 7 y 8 resultaron positivas con fragmentos esperados de 890, 563, 327 pb. MP: marcador de peso molecular 1kb.

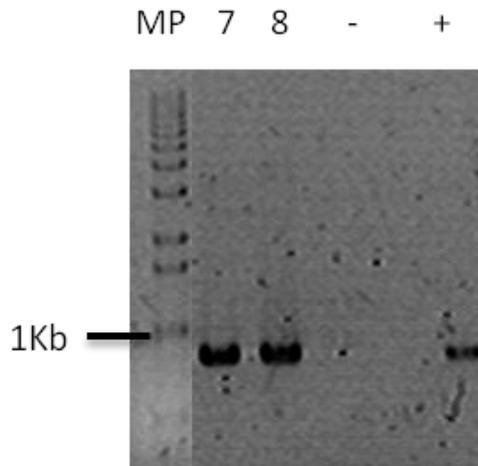


Figura S2. PCR de las clonas 7 y 8 con oligonucleótidos específicos para la transformación del gen nuclear. Se observa el fragmento esperado de 810 pb. MP: marcador de peso molecular 1kb. Controles (-) negativo, (+) positivo.

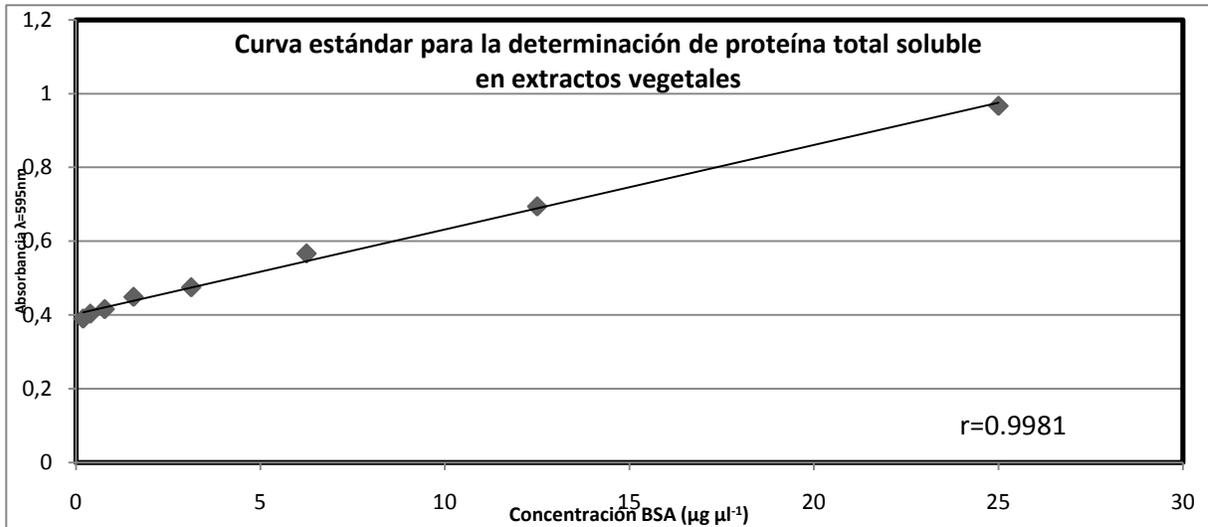


Figura S3. Curva estándar para la determinación de proteínas totales solubles por Bradford en extractos obtenidos por transformación transitoria de *N. tabacum* y *N. benthamiana* con la construcción módulo3'-hMPVn. Absorbancia medida a $\lambda=595\text{nm}$.

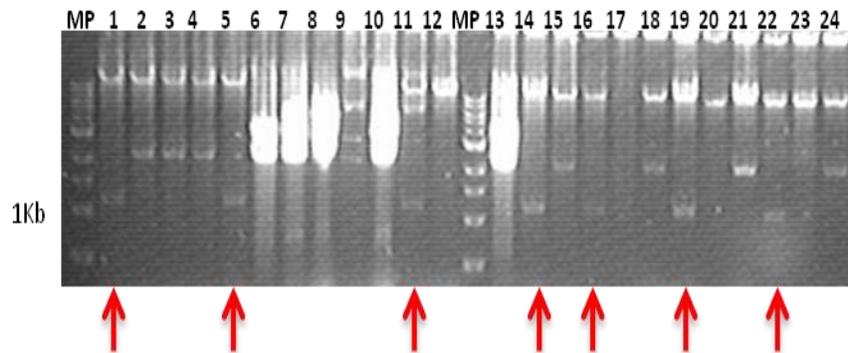


Figura S4. Análisis de restricción de las clonas pBI121-hMPVn con las enzimas *BamH* I y *EcoR* I. Se señalan con flechas rojas las clonas que muestran el fragmento esperado de 1,150 pb. MP: Marcador de peso molecular 1kb.

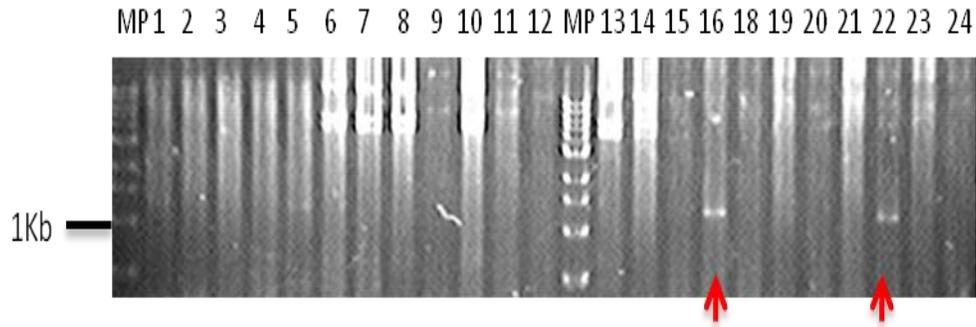


Figura S5. Análisis por PCR de las clonas pBI121-hMPVn. Se muestran con flechas rojas las clonas con el fragmento esperado de 1,300 pb. MP: Marcador de peso molecular 1kb.

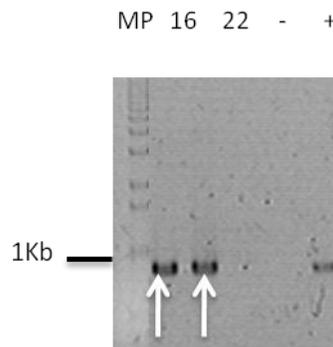


Figura S6. Análisis por PCR de las clonas 16 y 22 de la construcción pBI121-hMPVn. Se observa el fragmento esperado de 810 pb. MP: Marcador de peso molecular 1kb. Controles positivo (+) y negativo (-)

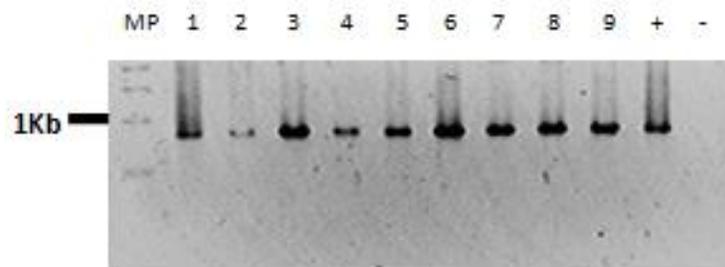


Figura S7. Análisis por PCR de las clonas pBIC-hMPVc. Se observa un fragmento esperado de 795 pb. MP: Marcador de peso molecular 1kb, Controles positivo (+) y negativo (-)

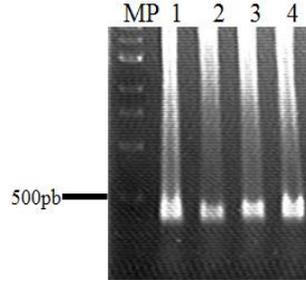


Figura S8. Análisis de restricción de las clonas módulo 3'-HRA con las enzimas *Nco* I y *Sac* I. Se muestra el fragmento esperado de 330 pb. MP: Marcador de peso molecular 1kb.

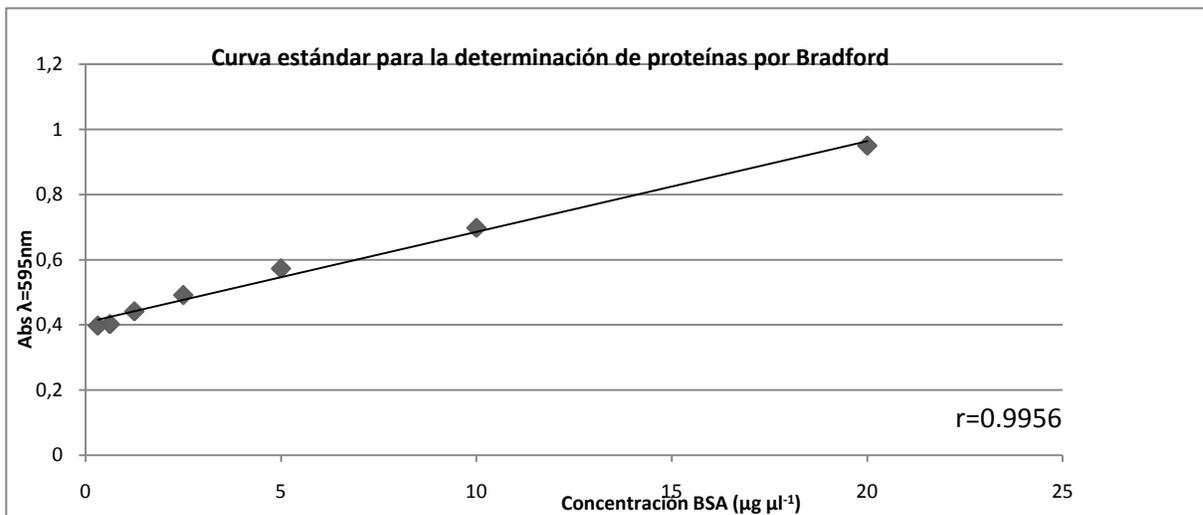


Figura S9. Curva estándar para la determinación de proteínas totales solubles por Bradford en extractos obtenidos por transformación transitoria de *N. tabacum* con la construcción módulo3'-HRA. Absorbancia medida a $\lambda=595\text{nm}$.

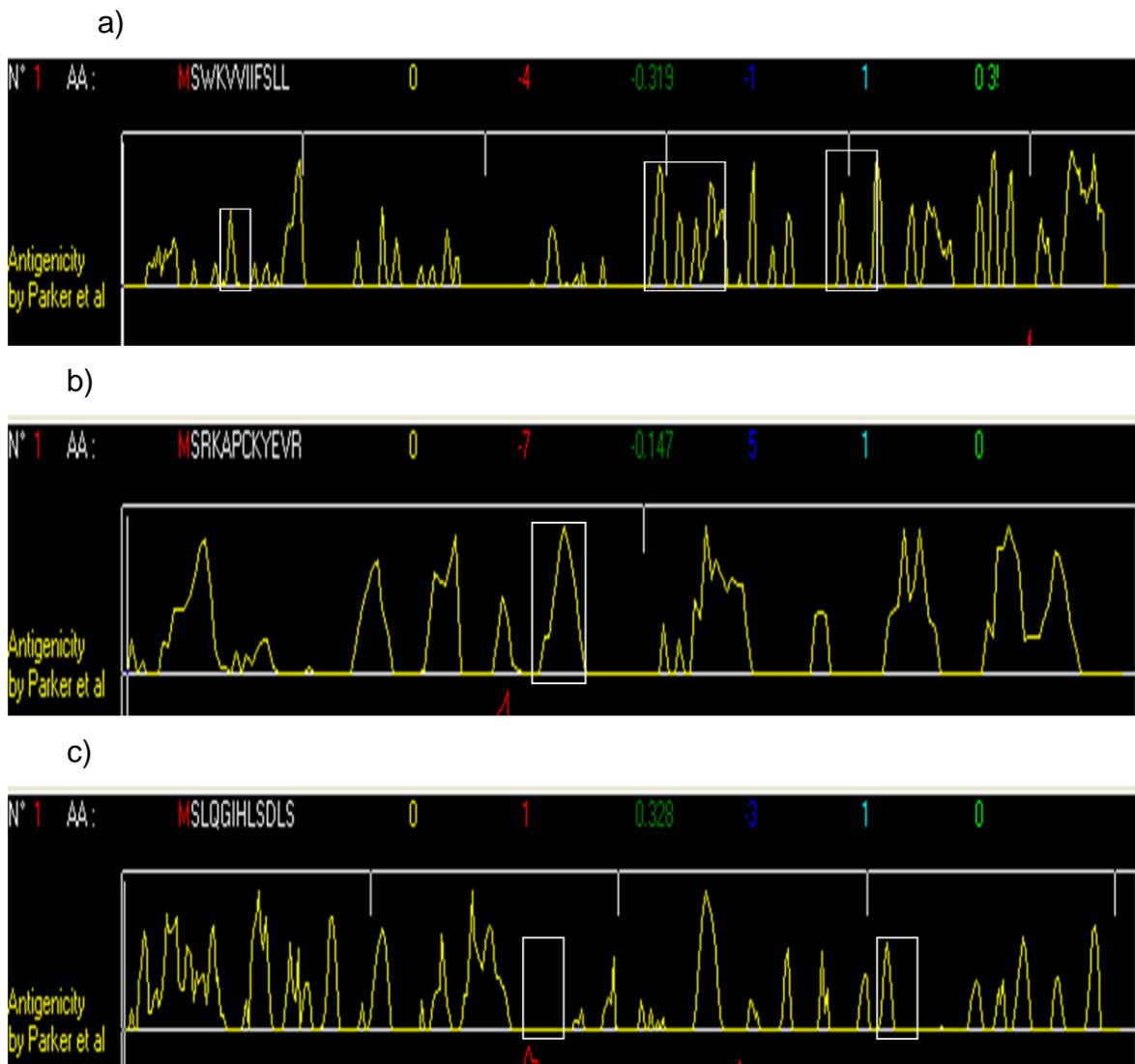
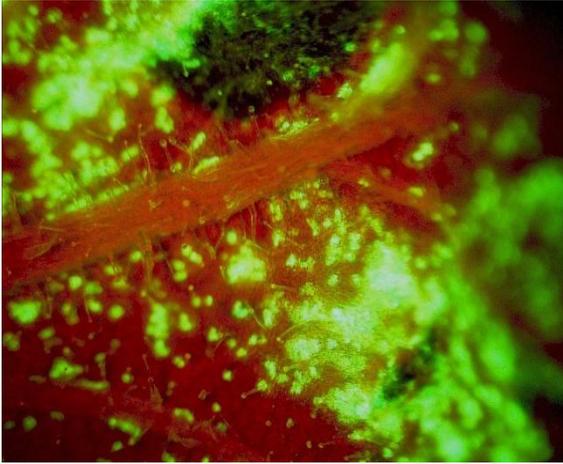
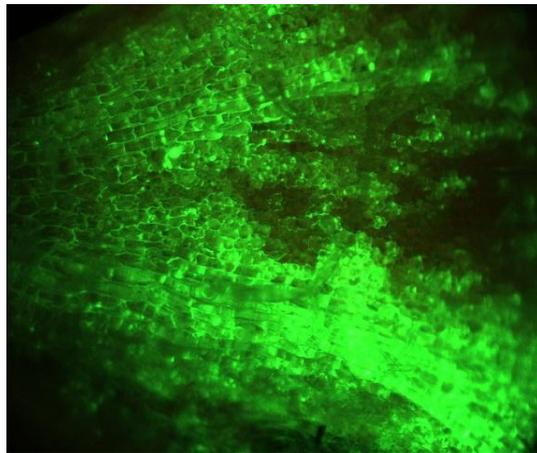
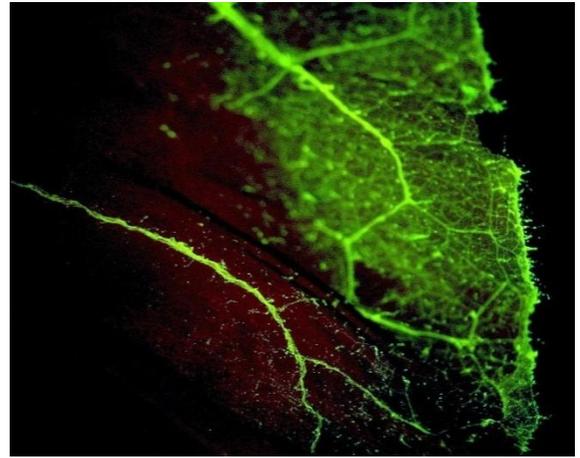


Figura S10. Análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas del hMPV en el software Antheprot. a) Proteína F; b) Proteína M2-1; c) Proteína N; cada pico representa antigenicidad; en recuadros se muestran las secuencias que se eligieron.



a) *N. benthamiana*



b) *N. tabacum*

Figura S11. Ensayo control de la transformación transitoria de *N. benthamiana* y *N. tabacum* 7-10 días post infección con el gen reportero GFP. a) *N. benthamiana*; b) *N. tabacum*.

(10) TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S1. Predicción de epítomos de las proteínas del hMPV por SYFPEITHI para el alelo HLA-A*0201.

EPÍTOPO	AA	SECUENCIA EN AA	POSICIÓN	SECUENCIA	PUNTUACIÓN
F1	58-71	NLTCSGPSLIKTEL	1	N L T C S <u>G</u> P S L	22
F2	286- 328	KAAPSCSGKKGNYAC LLREDQGWYQCQNAGS TVYYPNEKDCET	8	G K K G N <u>Y</u> A C L	14
			16	L L R E D <u>Q</u> G W Y	14
			24	Y C Q N A <u>G</u> S T V	14
F3	388- 413	CYKGVSCSIGSNRVGII KQLNKGCSYIT	8	S I G S N <u>R</u> V G I	21
			19	Q L N K G <u>C</u> S Y I	21
M2-1	78-89	MSKGYIDDNQSI	4	G Y I D D <u>N</u> Q S I	14
N1	164- 172	VGALIFTKL	1	V <u>G</u> A L I <u>F</u> T K L	15
N2	307- 315	LHLRQSPKAGLLSL	6	S P K A G <u>L</u> L S L	20

Tabla S2. Predicción de epítomos de las proteínas del hMPV por SYFPEITHI para el alelo H2D^b

EPÍTOPO	AA	SECUENCIA EN AA	POSICIÓN	SECUENCIA	PUNTUACIÓN
F1	58-71	NLTCSGPSLIKTEL	6	G P S L I K T E L	14
F2	286- 328	KAAPSCSGKKGN YACLL REDQGWYCQNAGSTVY YPNEKDCET	8	G K K G N Y A C L	19
F3	388- 413	CYKGVSCSIGSNRVGIK QLNKGCSYIT	8	S I G S N R V G I	24
M2-1	78-89	MSKGYIDDNQSI	4	G Y I D D N Q S I	15
N1	164- 172	VGALIFTKL	1	V G A L I F T K L	16
N2	307- 315	LHLRQSPKAGLLSL	6	S P K A G L L S L	14