



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Expresión de péptidos antigénicos y antivirales
del virus sincicial respiratorio en plantas de
tabaco”**

Tesis que presenta

Benita Ortega Berlanga

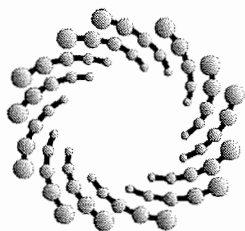
Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., Marzo de 2016



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

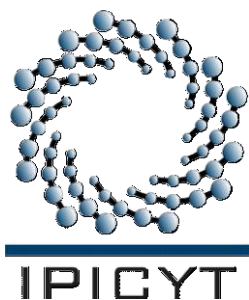
La tesis *“Expresión de péptidos antigénicos y antivirales del virus sincicial respiratorio en plantas de tabaco”* presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Benita Ortega Berlanga** y aprobada el **trece de abril del dos mil dieciséis** por los 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

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Leticia Moreno Fierros
Miembro del Comité Tutorial

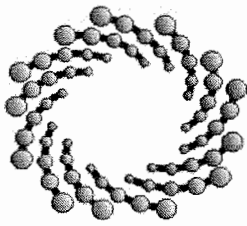
Dr. Daniel Ernesto Noyola Cherpitel
Miembro del Comité Tutorial



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 G. Alpuche Solís.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 233531) y se contó con el apoyo del proyecto de Ciencia Básica CONACYT (No. 154790).



IPICYT

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 085 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de abril del año 2016, se reunió a las 12:10 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dr. Daniel Ernesto Noyola Cherpitel	Sinodal externo	UASLP
Dra. Leticia Moreno Fierros	Sinodal externo	UNAM

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Benita Ortega Berlanga

sobre la Tesis intitulada:

Expresión de péptidos antigénicos y antivirales del virus sincicial respiratorio en plantas de tabaco

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 13:50 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 13 días del mes de abril de 2016.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A DIOS.

A mis Padres Nicolás Ortega y Rosalba Berlanga.

A mi Hermano y su familia.

A toda mi familia.

A todos los que se adelantaron, mis tías: Guadalupe y Lilia. Mis tíos: Juan y Feluel.

Mis abuelitos: Benita y Lupe. A Marco. Por qué sus consejos y amor siguen guiando mi vida.

“La ciencia es respecto del alma lo que es la luz respecto de los ojos y si las raíces son amargas, los frutos son muy dulces”

Aristóteles.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial al Dr. Ángel Alpuche Solís por sus enseñanzas y apoyo para la realización de este trabajo, por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por apoyar mis ideas y por su orientación para seguir superándome.

A mi comité tutorial: Dra. Leticia Moreno, Dr. Rubén López, Dr. Daniel Noyola por sus atinados consejos y sugerencias para mejorar mi trabajo.

Al Dr. Abel Gutiérrez por enseñarme el maravilloso mundo del cultivo celular.

Especialmente al Dr. Vidadi Yusibov, a Yoko Shoji y a Konstantine por brindarme la oportunidad de trabajar con ellos, por todas las enseñanzas, paciencia y apoyo brindado para la finalización de este proyecto.

A mis padres Rosalba Berlanga y Nicolás Ortega por tener siempre la palabra adecuada que me motivo a seguir adelante, por su amor incondicional, por ser mis primeros maestros.

A mi hermano Nicolás Ortega, a mi sobrino Eder y mi cuñada Claudia por ponerle siempre ese toque de alegría a mis días.

A Miguel por su apoyo, su amor, por recorrer este camino conmigo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 1 del IPICYT, amigos y compañeros de Fraunhofer, por hacer este camino más llevadero y divertido aun en los días en los que no salían los experimentos.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por las instalaciones para poder desarrollar mi proyecto.

Al LANBAMA por el apoyo brindado con las secuenciaciones genéticas.

Al CONACYT por la beca otorgada.

Gracias!

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen de grado	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos.....	vi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	3
2.1 Infecciones respiratorias	3
2.2 Virus sincicial respiratorio	3
2.2.1 Epidemiología	4
2.2.2 Biología y estructura	5
2.2.3 Replicación y transcripción	6
2.2.4 Proteínas del virus	7
2.2.5 Inmunología	7
2.2.6 Medidas profilácticas y terapéuticas	8
2.3 Vacunación	9
2.3.1 Principales tipos de vacunas	9
2.3.2 Vacunas recombinantes	10
2.3.3 Plantas usadas como biorreactores.....	13
2.3.4 Vacunas comestibles	14
2.3.5 Vacunas en plantas contra VSR	15
2.4 Estrategias utilizadas para mejorar la producción de proteínas recombinantes en plantas	16
2.5 Transformación genética de plantas	17
2.5.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
2.5.2 Vectores virales	21
2.6 Plantas utilizadas y sus características	22
2.6.1 Tabaco.....	22

2.6.2 Lechuga	22
3. Justificación.....	24
4. Objetivos	25
4.1 Objetivos generales	25
4.2 Objetivos específicos	25
5. Material y equipo	25
5.1. Biológico	25
5.2. Vectores.....	26
5.3. Reactivos	27
5.4 Equipo.....	31
6. Metodología.....	33
6.1 Diseño del gen sintético para los epítomos de las proteínas F y G del VSR. ...	33
6.1.2 Diseño de genes sintéticos con actividad antiviral	34
6.2 Construcciones genéticas	36
6.2.1 Construcción genética para transformación nuclear	36
6.2.2 Construcciones genéticas para transformación transitoria	36
6.3 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con la construcción para transformación nuclear.....	37
6.4 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con las construcciones para transformación transitoria.....	38
6.5 Protocolos de regeneración	39
6.5.1 Tabaco.....	39
6.6 Obtención de los explantes.....	39
6.6.1 Tabaco.....	39
6.7. Ensayos de transformación genética nuclear vía <i>A. tumefaciens</i>	39
6.7.1. Tabaco.....	39
6.9. Transformación genética transitoria de plantas de tabaco.....	40
6.9.1 Obtención de plantas de tabaco	40
6.9.2 Agroinfiltración de plantas de tabaco	40
6.10 Análisis de transformantes.....	40
6.10.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	40

6.10.2 Dot blot	43
6.10.3 Western blot.....	43
6.10.4 Purificación de proteínas recombinantes	44
6.10.5 Ensayo de inhibición de placas líticas de RSV	44
7. Resultados	46
7.1 Transformación nuclear	46
7.1.1 Diseño del gen VSRn.....	46
7.1.2 Construcción genética pBI- VSRn.....	48
7.1.3 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	49
7.2 Proceso general para obtención de plantas transgénicas de tabaco vía <i>A. tumefaciens</i>	49
7.3 Transformación genética nuclear de tabaco vía <i>A. tumefaciens</i> con el plásmido pBI-VSRn	50
7.4 Análisis de transformantes	50
7.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	50
7.2 Transformación transitoria	52
7.3 Análisis de transformantes.....	53
7.3.1 Western blot.....	53
7.3.2 Purificación de proteínas recombinantes	54
7.3.3 Microscopia electrónica de barrido	56
7.3.4 Análisis <i>in vitro</i> de actividad antiviral.....	56
8. Discusión.....	60
9. Conclusiones.....	64
10. Referencias	65
11. Anexo I: Artículos publicados	71
12. Apéndice	73
12.1 Preparación de células competentes y transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico	73
12.2 Preparación de células electrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	73
12.3 Extracción de ADN plasmídico.....	74
12.4 Preparación de soluciones y medios de cultivo.....	74
12.4.1 TAE 50X	74

12.4.2 Agarosa 1%	75
12.4.3 Mezcla basal de sales MS	75
12.4.4 Vitaminas MS.....	76
12.4.5 Vitaminas B5.....	76
12.4.6 Kanamicina	76
12.4.7 Cefotaxima.....	77
12.4.8 Rifampicina	77
12.4.9 Ácido naftalenacético (ANA)	77
12.4.10 Benciladenina (BA)	77
12.4.11 Procedimiento general para la preparación de medios de cultivo	77
12.4.12 Composición de medios de cultivo.....	78
12.4.13 Medio de cultivo YM.....	78
12.4.14 Medio de cultivo LB.....	78
12.4.15 Oligos utilizados.....	78

Lista de tablas

Tabla 1. Principales causas de hospitalización por enfermedades de las vías respiratorias (Noyola y col., 2005).	5
Tabla 2. Principales vacunas experimentales contra VSR.	11
Tabla 3. Material biológico utilizado.	25
Tabla 4. Vectores utilizados.	26
Tabla 5. Reactivos utilizados.	27
Tabla 6. Secuencia de aminoácidos de los epítomos incluidos en el diseño del gen sintético que codifican la proteína antigénica del VSR.	46
Tabla 7. Valores de IC ₅₀ para cada proteína probada.	58
Tabla 8. Concentración de la mezcla basal de sales.	75
Tabla 9. Concentración de vitaminas MS.	76
Tabla 10. Concentración de vitamina B5.	76
Tabla 11. Medios de cultivo.	78

Lista de figuras

Figura 1. Principales agentes etiológicos en los diferentes padecimientos respiratorios.....	3
Figura 2. Estructura del virus sincicial respiratorio.....	6
Figura 3. Comparación de costos en diferentes sistemas de expresión de proteínas heterólogas.....	14
Figura 4. Esquematzación a grandes rasgos de la producción de una vacuna comestible.....	15
Figura 5. Transferencia de genes por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a células vegetales.....	19
Figura 6. Diagrama de la transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> usando vectores binarios.....	20
Figura 7. Representación esquemática del vector lanzadera pBID4.....	21
Figura 8. Gen sintético para transformación nuclear.....	34
Figura 9. Construcciones genéticas correspondientes a la primera estrategia.....	35
Figura 10. Construcciones genéticas correspondientes a las fusiones a liqenasa LicKM.....	35
Figura 11. Construcciones genéticas correspondientes a las fusiones a AIMV CP.....	36
Figura 12. Identidad de las construcciones genéticas.....	37
Figura 13. Construcción genética para transformación nuclear (VSRn).....	47
Figura 14. Plásmido pBI-VSRn usado para la transformación nuclear de tabaco y lechuga.....	48
Figura 15. Digestión de la construcción pBI-VSRn con las enzimas <i>Xba</i> I y <i>Sac</i> I....	48
Figura 16. Representación esquemática de la transformación de plantas de tabaco vía <i>Agrobacterium</i>	49
Figura 17. Formación de brotes de tabaco regenerados a partir de hojas infectadas con el plásmido binario pBI-VSRn.....	50
Figura 18. Productos de PCR.....	51
Figura 19. Productos de PCR de un segmento específico del gen 1 (347 pb).....	51
Figura 20. Dot blot de las plantas de tabaco transformadas nuclearmente.....	51
Figura 21. Representación esquemática de las construcciones evaluadas en el estudio.....	52
Figura 22. Análisis de Western blot.....	53
Figura 23. Purificación de proteínas.....	54
Figura 24. Western blot de la proteína de fusión PR-RhoA2-FL-F-3-HK purificada.....	55
Figura 25. Análisis de Western blot de proteínas de fusión RhoA-CP purificadas.....	55
Figura 26. Análisis de microscopía electrónica de barrido.....	56
Figura 27. Inhibición del crecimiento viral <i>in vitro</i> por las proteínas de fusión.....	57

Resumen

Expresión de péptidos antigénicos y antivirales del virus sincicial respiratorio en plantas de tabaco

El virus sincicial respiratorio (VSR) es una de las principales causas de infecciones del tracto respiratorio bajo (IRB) en el mundo. Las infecciones por VSR causan anualmente cerca de 34 millones de episodios de IRBs agudas, 66,000 muertes y costos por más de 2.4 miles de millones de dólares. A pesar de la importancia del VSR, no existe actualmente una vacuna disponible en el mercado.

En este trabajo se desarrolló una construcción que codifica epítomos antigénicos de las proteínas F, G y M del VSR optimizadas para su expresión estable en el citoplasma de células vegetales. La construcción, denominada pBI-VSR, además codifica para péptidos espaciadores ricos en prolina y una región del virus del sarampión para obtener un balance de respuesta inmune Th1/Th2 que ha sido una limitante en trabajos previos en el desarrollo de vacunas contra VSR. Con pBI-VSR se realizó la transformación genética de plantas de tabaco (*N. benthamiana*) vía *Agrobacterium tumefaciens*, de las cuales se obtuvieron siete líneas transgénicas para la generación T2.

Además se diseñó mediante PCR de fusión un gen que codifica el péptido con actividad antiviral RhoA, el cual fue fusionado a dos moléculas acarreadoras, liquenasa (LicKM) y la proteína de la cápside (CP) del virus del mosaico de la alfalfa para transformar transitoriamente plantas de tabaco, usando un vector de expresión basado en el virus del mosaico del tabaco. Las proteínas de fusión RhoA-LicKM y RhoA2-FL-d25CP fueron expresadas eficientemente e inhibieron la replicación del VSR *in vitro* en un 50% y 80% respectivamente a una menor concentración que el péptido sintético RhoA usado como control.

Estos resultados indican el potencial de sistemas de producción de biofármacos en plantas y, para el caso de transformación transitoria, la producción de un péptido antiviral en un tiempo corto y la ventaja que da utilizar moléculas acarreadoras para incrementar la expresión y eficacia.

PALABRAS CLAVE: RhoA, Expresión transitoria, *Agrobacterium tumefaciens*, Liquenasa, Proteína de la cápside.

Abstract

Expression of antigenic and antiviral peptides of respiratory syncytial virus in tobacco plants

Respiratory Syncytial Virus (RSV) is one of main causes of viral lower respiratory tract illness (LRI) in infants and young children worldwide. RSV causes nearly 34 million episodes of acute LRIs annually, with an estimated 66,000 deaths and costs of more than 2.4 billion dollars per year. Despite the burden of the disease, there is no licensed vaccine against RSV.

In this work we developed a construct encoding plant-optimized sequences of epitopes from the antigenic F, G and M, RSV proteins in the cytoplasm of the plant cells. This genetic construct named pBI-RSV has proline-rich linkers and a measles virus region though to balance the Th1/Th2 immune response, which has been a limiting factor on the development of vaccines against RSV in previous studies. With this construct, the genetic transformation of tobacco (*Nicotiana benthamiana*) via *Agrobacterium tumefaciens* was performed. We obtained seven transgenic lines up to the T2 generation.

We also engineered a synthetic gene encoding the antiviral RhoA peptide fused to carrier polypeptides, either lichenase (LicKM) or the coat protein (CP) of alfalfa mosaic virus. These constructs were introduced into tobacco plants using transient transformation by means of a tobacco mosaic virus-based expression vector and purified the recombinant proteins. The RhoA peptide fusion proteins were efficiently expressed in *N. benthamiana* plants, and two of them, RhoA-LicKM and RhoA2-FL-d25CP inhibited RSV *in vitro* replication by 50% and 80%, respectively, at lower concentrations than the synthetic peptide used as a control.

These data on biological activity indicate the feasibility of expression systems in plants for biopharmaceutical production and transient transformation, the production of an antiviral RhoA peptide in a short time in plants, and the advantage of using carrier molecules to enhance the level of expression and its efficacy.

KEYWORDS: RhoA, Transient expression, *Agrobacterium tumefaciens*, Lichenase, Capside protein.

1. Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 15 millones de personas mueren a causa de enfermedades infecciosas alrededor del mundo, de las cuales 3.1 millones son causadas por infecciones respiratorias (Openshaw y Tregoning, 2005). A pesar de que la vacunación ha logrado erradicar algunas enfermedades infecciosas tales como la viruela, aún existen padecimientos que impactan la salud de la población mundial y para los cuales no se cuenta con una vacuna o tratamiento accesible; un ejemplo de ello son las infecciones respiratorias, las cuales afectan principalmente a niños, ancianos y personas inmunosuprimidas.

En la actualidad gracias a la biotecnología, se han podido desarrollar nuevas estrategias para el diseño de vacunas y proteínas recombinantes; un ejemplo de esto son las técnicas de manipulación de ADN que permiten tomar un gen foráneo e introducirlo a otro organismo.

Durante las dos últimas décadas las plantas han sido usadas intensamente como modelo de investigación para la producción de proteínas de interés terapéutico, así como para la producción de vacunas. Se ha visto que este sistema alternativo para la producción de proteínas recombinantes ofrece varias ventajas sobre los sistemas de expresión tradicionales, tales como: disminución de los costos, producción a gran escala, se evita la transmisión de enfermedades presentes en otros sistemas, las modificaciones post-traduccionales de las proteínas recombinantes permiten la producción de proteínas biológicamente activas lo cual no se da en otros sistemas, además de que el producto de interés se puede producir en tejidos comestibles lo que lleva a la entrega del fármaco sin procesamiento adicional (Lico y col., 2008).

Dado los resultados positivos y los beneficios de producir proteínas biológicamente activas en plantas, el presente trabajo explora la posibilidad de expresar péptidos antigénicos y antivirales en sistemas vegetales que prevengan infecciones causadas por el virus sincicial respiratorio (VSR), uno de los principales

patógenos de las vías respiratorias bajas y para el cual no existe actualmente un tratamiento eficaz y accesible disponible en el mercado.

2. Antecedentes

2.1 Infecciones respiratorias

Para el año 2012 la Organización Mundial de la Salud estimó que 15 millones de personas mueren a causa de enfermedades infecciosas alrededor del mundo, de las cuales 3.1 millones son causadas por infecciones respiratorias; el 95% de las defunciones por infecciones respiratorias se deben a afección del tracto respiratorio bajo (Openshaw y Tregoning, 2005).

Las infecciones respiratorias se presentan principalmente en niños menores de 5 años y en ancianos mayores de 65 años. Los principales agentes etiológicos de las enfermedades respiratorias son los virus, entre los cuales destacan los virus de la influenza, parainfluenza, rinovirus y virus sincicial respiratorio, siendo éste último el principal agente causal de bronquiolitis y neumonía (Rosete y col., 2002)

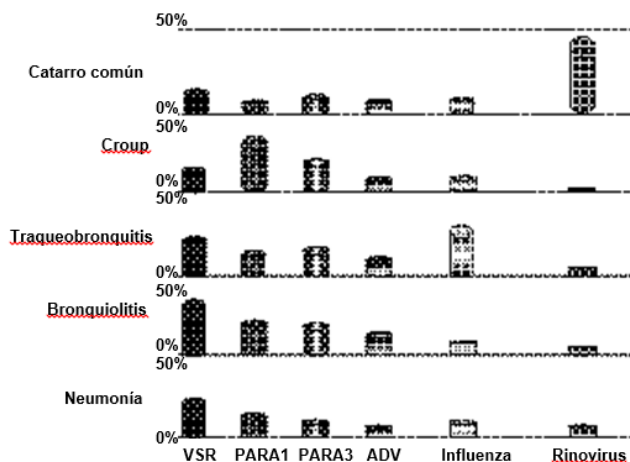


Figura 1. Principales agentes etiológicos en los diferentes padecimientos respiratorios. VSR, virus sincicial respiratorio; PARA1, parainfluenza 1; PARA3, parainfluenza 3; ADV, adenovirus. Tomado de Rosete y col., 2002.

2.2 Virus sincicial respiratorio

En 1956 Morris y col. aislaron un nuevo virus a partir de un grupo de chimpancés que estaban resfriados; a este virus lo llamaron agente de la coriza del chimpancé.

Posteriormente Chanock y col. (1957) lograron aislar este virus en dos niños con enfermedades de las vías respiratorias bajas; a partir de entonces el agente fue llamado VSR haciendo alusión a su principal manifestación histopatológica que es la formación de sincicios (fusión de membranas celulares).

2.2.1 Epidemiología

El VSR es el principal patógeno de las vías respiratorias bajas en niños en todo el mundo. Para la edad de 2 años >90% de los niños se ha infectado con este virus (Tabla 1) (Noyola y col., 2007; Van Drunen y col., 2007). La Organización Mundial de la Salud estima una infección anual y mortalidad de 64 millones y 160,000 respectivamente. Las manifestaciones clínicas de la infección por VSR incluyen rinitis, otitis media, bronquiolitis y neumonía (Ruuskanen, 1989).

Las lesiones patológicas causadas por el VSR incluyen bronquitis, necrosis epitelial bronquiolar, oclusión bronquiolar, inflamación del parénquima pulmonar y exudación alveolar (Stott y Taylor, 1985). A pesar que el VSR afecta a todos los grupos etarios, los lactantes (< 18 meses) y ancianos son los grupos que sufren la forma más severa de la infección (Simoes, 1999). La tasa de mortalidad en niños es de 0.1-2.5% y en ancianos de hasta un 10% (Falsey y Walsh, 2000; Kneyber y col., 2000).

Tabla 1. Principales causas de hospitalización por enfermedades de las vías respiratorias (Noyola y col., 2005)

Virus detectados en niños hospitalizados con infección respiratoria aguda (Hospital Central, SLP, 2002-2004).	
Virus	Porcentaje
VSR	34.6%
Metapneumovirus humano	10.5%
Parainfluenza	2.7%
Influenza	2.3%

2.2.2 Biología y estructura

El VSR se encuentra clasificado como un virus que pertenece al género *Pneumovirus*, familia *Paramixoviridae*. El virión del VSR consiste de una nucleocápside contenida dentro de una envoltura lipídica, su tamaño varía entre 150-300nm. Hay tres proteínas transmembranales que se organizan formando espículas (F, G y SH) y la proteína de matriz (M) que conecta la nucleocápside con la envoltura lipídica (Vergara y col., 2006) (Figura 2a).

Es un virus de ARN de cadena sencilla, no segmentada y de sentido negativo. Su genoma está compuesto por 15,222 nucleótidos y codifica 10 ARN mensajeros. Los 10 genes virales se ordenan con sentido 3´ al 5´de la siguiente manera: NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L (Figura 2b). El ARN mensajero para M2 contiene dos marcos de lectura que codifican dos diferentes proteínas: M2-1 y M2-2 (Vergara y col., 2006).

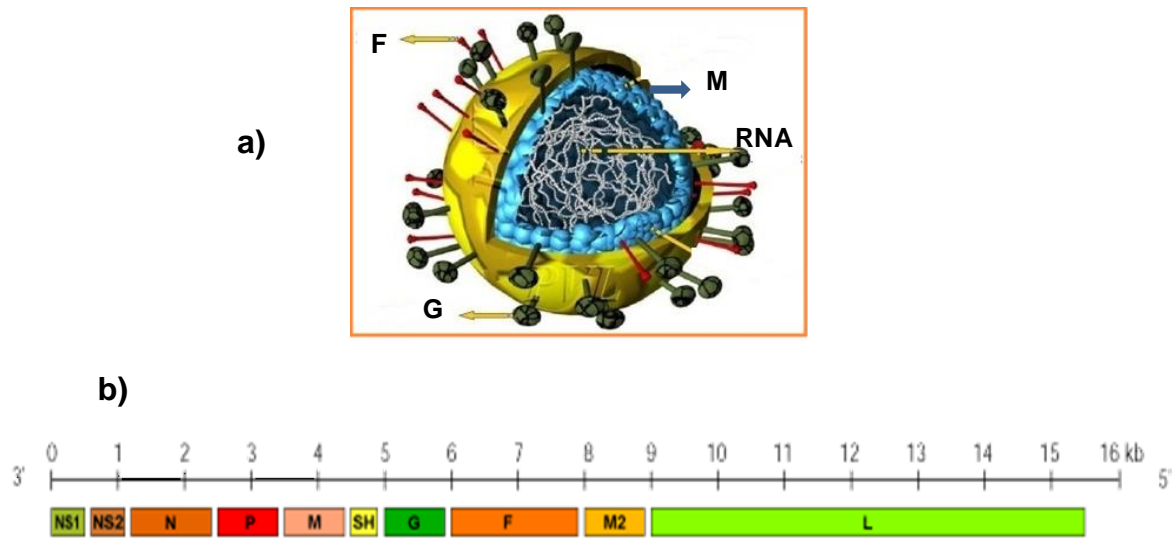


Figura 2. Estructura del virus sincial respiratorio.

a) Estructura del virus mostrando la distribución espacial de las proteínas. b) Organización del genoma. Tomado de Vergara y col., 2006.

2.2.3 Replicación y transcripción

Los eventos de replicación y transcripción de este virus suceden en el citoplasma. Para el evento de la transcripción el genoma del virus contiene secuencias que actúan en cis y que marcan el inicio (GS) y el final de cada gen (GE). La transcripción inicia cuando la ARN polimerasa dependiente de ARN entra en contacto con el promotor ubicado en el extremo 3'; la transcripción de los diferentes genes ocurre de manera secuencial con la asistencia de la proteína M2-1 que ayuda al complejo polimerasa a pasar a través de las regiones intergénicas; los productos proteínicos se acumulan y cuando el factor regulador M2-2 alcanza cierto nivel, el complejo polimerasa cambia del modo transcripcional al modo de replicación. En esta condición el complejo de la polimerasa ignora las señales GE y se sintetiza una copia antígenómica con orientación positiva, la cual sirve como plantilla para generar el genoma del virión (Feans y col., 2002).

2.2.4 Proteínas del virus

El VSR consta de 11 proteínas, las proteínas G y F son las más importantes en la penetración viral, la proteína G es una glicoproteína tipo II con abundantes glicosilaciones N y O. Debido a sus propiedades de mucina, media la mayor parte de la adsorción del virus a la célula huésped. Además contribuye en el sesgo de la respuesta inmune hacia un perfil Th2 (Bourgeois y col., 1998), mientras que la glicoproteína F media la penetración del virus porque facilita la fusión entre la envoltura del virión y la membrana de la célula huésped (Vergara y col., 2006).

La proteína SH es una pequeña proteína hidrofóbica cuya función se desconoce. La proteína de la matriz viral (M) forma una capa que recubre la cara interna de la envoltura viral, además de contribuir al proceso de ensamblaje (Marty y col., 2004).

Las proteínas N, P, M2-1 y L se encuentran asociadas a la nucleocápside y cumplen papeles esenciales en diferentes estadios de los eventos de transcripción y replicación viral (Vergara y col., 2006), mientras que la proteína M2-2 es un factor regulador responsable de cambiar el modo operacional del complejo polimerasa del modo transcripcional al de replicación (Bermingham y Collins, 1999).

Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 parecen servir de antagonistas al sistema del interferón IFN tipo I (Spann y col., 2004).

2.2.5 Inmunología

Las reinfecciones con el VSR son comunes, ya que el virus produce una inmunidad naturalmente adquirida incompleta.

Cuando un organismo es infectado por algún patógeno, el tipo de respuesta inmune depende de los siguientes factores: vía de entrada del patógeno, la naturaleza de éste y el mecanismo de presentación del antígeno.

Hay tres tipos de respuesta inmune de los linfocitos T cooperadores: la respuesta inmune Th1, la Th2 y recientemente descrita Th17. En condiciones normales una infección por VSR es resuelta mediante la respuesta inmune Th1 que

se caracteriza por la producción de interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), interleucina-12 (IL-12), inmunoglobulina G2a (IgG2a) y linfocitos T CD8+; en conjunto todos estos factores llevan a la producción de una respuesta citotóxica contra las células infectadas resolviendo así la enfermedad (Corzo y col., 2013).

Por otro lado, la respuesta inmune Th2 se caracteriza por la producción de interleucinas 4, 5, 6 (IL-4, IL-5, IL-6), inmunoglobulina E (IgE), inmunoglobulina G1 (IgG1) y linfocitos T CD4+. Este tipo de respuesta se ve exacerbada en pacientes de alto riesgo (inmunosuprimidos, menores de 6 meses y ancianos) que presentan la infección por VSR, lo cual conlleva a una enfermedad más severa en la que se presenta eosinofilia y la producción de gran cantidad de moco que taponan las vías respiratorias (Openshaw y Tregoning, 2005).

Estudios en animales han demostrado que la proteína F del VSR genera predominantemente una respuesta inmune Th1 mientras que la proteína G del VSR genera preferencialmente una respuesta Th2, aunque sigue habiendo un debate al respecto (Rosete y col., 2002; Openshaw y Tregoning, 2005).

2.2.6 Medidas profilácticas y terapéuticas

2.2.6.1 Inmunoprofilaxis pasiva

La única medida profiláctica disponible actualmente es la administración de una versión humanizada de un anticuerpo monoclonal contra la proteína F del VSR (Palivizumab), que protege a los individuos en alto riesgo de desarrollar la infección. Desafortunadamente su utilización es costosa (aproximadamente 8,000 pesos/dosis) y su eficacia podría disminuir si hay aparición de nuevas cepas virales resistentes debido a la naturaleza de los virus ARN (Kimpen, 2002).

2.2.6.2 Péptidos antivirales

Se ha reportado que la proteína F del VSR puede interactuar con una pequeña GTPasa intracelular denominada Rho A y que los péptidos derivados de Rho A

pueden inhibir la replicación del VSR y de virus para-influenza *in vitro* (Pastey y col., 2000; Budge y col., 2004).

La secuencia óptima de este péptido antiviral comprende los aminoácidos 80-94 de la proteína Rho A (ILMCFSIDSPDSLEN), tiene una carga neta negativa y requiere la oxidación de un residuo de cisteína que lleva a la formación de dímeros mediante puentes disulfuro para su actividad antiviral (Graham y Budge, 2004). Trabajos previos han demostrado que los péptidos 80-94 y 77-95 de Rho A son capaces de inhibir la replicación del VSR tanto *in vitro* como *in vivo* (Graham y Budge, 2004), basados en esta observación parece que los péptidos derivados de Rho A pueden ser capaces de prevenir o reducir la infección por el VSR cuando se administran intranasalmente como terapia o como una medida profiláctica. Sin embargo, aun cuando los péptidos derivados de Rho A mostraran ser una alternativa segura y efectiva, los costos de la síntesis química del péptido y la purificación deben ser competitivos con las moléculas que se están desarrollando para la misma aplicación.

2.3 Vacunación

La vacunación consiste en la administración de un microorganismo inactivado o atenuado o sus antígenos, con el objeto de producir una respuesta inmunológica similar a la de la infección natural, pero sin peligro para el vacunado. La vacunación ha permitido prevenir ciertas enfermedades e incluso erradicarlas. La primera vacuna fue creada en 1796 por Edward Jenner y permitió la erradicación de la viruela (Stern y Makel, 2005).

Las dos grandes propiedades que deben reunir las vacunas son la eficacia y la inocuidad, esto es que tenga la capacidad para prevenir la enfermedad sin que desencadene reacciones adversas (López y col., 2004).

2.3.1 Principales tipos de vacunas

Hay cuatro tipos tradicionales de vacunas:

Inactivadas: Los microorganismos han sido tratados con productos químicos o calor y han perdido su patogenicidad. La mayoría de estas vacunas suelen inducir

inmunidad incompleta o de duración limitada, por lo que es necesaria más de una toma.

Vivas atenuadas: Los microorganismos han sido cultivados expresamente bajo condiciones en las cuales pierden sus propiedades nocivas. Suelen provocar una respuesta inmunológica más duradera y son utilizadas frecuentemente pero pueden revertir.

Toxoides: Son componentes tóxicos (toxinas) inactivados procedentes de microorganismos, en casos donde esos componentes son los responsables de provocar la enfermedad, en lugar del propio microorganismo.

Subunitarias: Están compuestas por fragmentos proteicos del microorganismo los cuales pueden inducir una respuesta inmunológica.

2.3.2 Vacunas recombinantes

En la actualidad gracias a la biotecnología, se han podido desarrollar nuevas estrategias para el diseño de vacunas. Ejemplo de esto son las técnicas de manipulación de ADN que nos permiten tomar un gen foráneo e introducirlo a otro organismo.

Las vacunas de péptidos recombinantes consisten en tomar del microorganismo patógeno, un gen o fragmentos de ellos que codifican para proteínas antigénicas, o epítomos de éstas e introducirlos en sistemas biológicos tales como bacterias, levaduras o plantas que son usados como biorreactores. Estas vacunas nos ofrecen grandes ventajas, ya que al poder seleccionar los epítomos se abarca un mayor rango de protección y se disminuyen los efectos secundarios.

2.3.2.1 Vacunas contra VSR

Debido a la importancia del VSR como uno de los patógenos principales de las vías respiratorias bajas, desde su descubrimiento se han realizado varios intentos por desarrollar una vacuna segura y eficaz. La Tabla 2 resumen las ventajas y desventajas de los principales tipos de vacunas experimentales que se han desarrollado desde el inicio de los 60's hasta la actualidad.

Tabla 2. Principales vacunas experimentales contra VSR

Tipo de Vacuna	Ventajas	Desventajas	Referencias
Virus inactivado F1-RSV	Bajo costo	Inactivación incompleta Predisposición de agravar la enfermedad	Chanock y col., 1957
Vacunas de subunidades y péptidos F (PFP 1,2,3) G (BBG2Na) FG	Alto nivel de pureza Seguras Estables	Potencial predisposición a agravar la enfermedad (Th2, adyuvante que promueve Th1) Eficacia limitada en presencia de anticuerpos maternos	Prince y col., 2001 Rui-Hong y col., 2005
Vacunas atenuadas cp, ts, cpts RSV	Bajo costo Inducción de respuesta inmune balanceada	Posible reversión a Wt Sobre/baja atenuación	Juhasz y col., 1997
Vectores virales	Anticuerpos neutralizantes	Inmunidad contra el propio vector	Tree y col., 2004
Vacunas en plantas	Bajo costo, bajo riesgo de contaminación	No se ha probado inmunoprotección frente al reto	Sandhu y col., 1999

La primera vacuna contra el VSR fue generada a partir de virus inactivados con formaldehído. Esta vacuna fue administrada en dosis intramusculares a niños de 2 meses a 7 años; sin embargo, no solo falló en proteger sino que se presentó una respuesta exacerbada Th2 que llevó a la muerte de dos niños. Se sugirió que

el formaldehído había alterado selectivamente epítomos protectores localizados dentro de las proteínas F o G (Chanock y col., 1957).

Por lo anterior la estrategia de construir vacunas inactivadas de VSR se ha abandonado y en la actualidad se prefiere experimentar con vacunas construidas a partir de virus vivos atenuados. Sin embargo, su utilidad clínica está en entredicho, la formulación cpts248/404 produjo abundantes secreciones que obstruyeron la nariz de los lactantes de 1-2 meses de edad (los cuales son los más necesitados de protección). Además, las vacunas de VSR atenuados pueden revertir y han mostrado replicación en los niños en presencia de anticuerpos adquiridos de la madre durante el embarazo.

Se han realizado también experimentos con vectores virales tales como los adenovirus, en los cuales se aprovecha su capacidad de replicación y la ventaja de que pueden superar la relativa inmadurez del sistema inmune de neonatos aún con anticuerpos maternos. Se demostró que estos vectores que expresan la proteína F o G indujeron una inmunidad protectora y anticuerpos neutralizantes en ratones y ratas del algodón; sin embargo, cuando se probaron en chimpancés no hubo protección. Una de las desventajas de estos vectores es que no son muy seguros ya que pueden inducir inmunidad contra el vector en sí (Tree y col., 2004).

Por otro lado, se ha experimentado con vacunas de subunidades, las cuales tienen la ventaja de ser seguras, pero es necesario una formulación con adyuvantes y vía de administración adecuada. Las glicoproteínas F y G son los principales blancos para la respuesta inmune contra VSR. Las vacunas PFP-1 y PFP-2 formuladas con hidróxido de aluminio están en fase I, han demostrado ser inmunogénicas y seguras en adultos saludables y en niños mayores de 12 meses; sin embargo, en algunos casos se ha observado un incremento del daño histológico. La vacuna BBG2Na está en fase III y consiste en un dominio central conservado de la proteína G (130-230 a.a.G2Na) fusionado al dominio de unión a albúmina de la proteína G estreptocócica (BB). Esta vacuna induce protección contra el reto en ratón y ratas algodón sin inducción de patología en el pulmón; sin embargo, la

duración de la inmunidad no fue considerada suficiente para prevenir una infección en una estación endémica de VSR (Rui-Hong y col., 2005).

2.3.3 Plantas usadas como biorreactores

La tecnología del ADN recombinante fue inicialmente utilizada para expresar proteínas que fueran difíciles de producir o aislar en sus organismos nativos en grandes cantidades. La mayoría de las proteínas recombinantes han sido producidas por “fábricas” biológicas tradicionales como lo son predominantemente cultivos celulares microbiológicos (bacterias o levaduras) o células de mamífero. Sin embargo, durante las dos últimas décadas las plantas se han usado como modelo de estudio para la producción de proteínas de interés terapéutico así como para la producción de vacunas. Se ha visto que este sistema alternativo para la producción de proteínas recombinantes ofrece varias ventajas sobre los sistemas de expresión tradicionales, como lo son: disminución de los costos, producción a gran escala, se evita la transmisión de enfermedades presentes en otros sistemas, las modificaciones post-traduccionales de las proteínas recombinantes permiten la producción de proteínas biológicamente activas lo cual no se da en algunos sistemas, además de que el producto de interés se puede producir en tejidos comestibles lo que lleva a la entrega del fármaco sin procesamiento adicional como el caso de las vacunas comestibles (Lico y col., 2008) (Fig. 3).

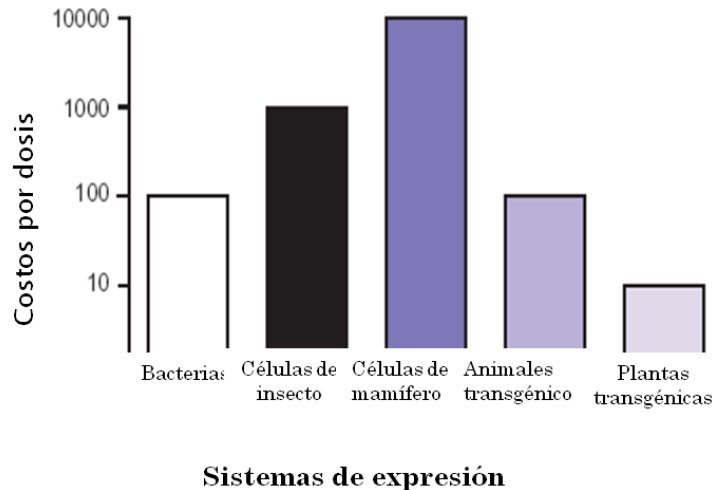


Figura 3. Comparación de costos en diferentes sistemas de expresión de proteínas heterólogas (Streatfiel y col., 2001).

2.3.4 Vacunas comestibles

La producción de vacunas comestibles involucra la introducción de los genes deseados dentro de las plantas. A grandes rasgos se selecciona el gen de interés a partir del patógeno humano y las proteínas son expresadas con la ayuda de bacterias o virus que naturalmente infectan a la planta (Fig. 4).

Este tipo de vacunas ofrece múltiples ventajas como reducir el costo por producción, purificación, almacenamiento y transporte; además permiten evitar el uso de jeringas estériles (Daniell y col., 2001).

Las vacunas comestibles tienen la capacidad de activar la inmunidad sistémica como la de mucosas al entrar en contacto directo con el tracto digestivo, lo cual provee la primera línea de defensa contra patógenos que invaden las mucosas (Lal y col., 2007).

Idealmente estas vacunas deben producirse en vegetales que se coman crudos, ya que el antígeno expresado en tejidos que requieran cocción podría degradarse parcial o totalmente, además debe tenerse en cuenta que el sistema vegetal a elegir no produzca compuestos tóxicos naturalmente.

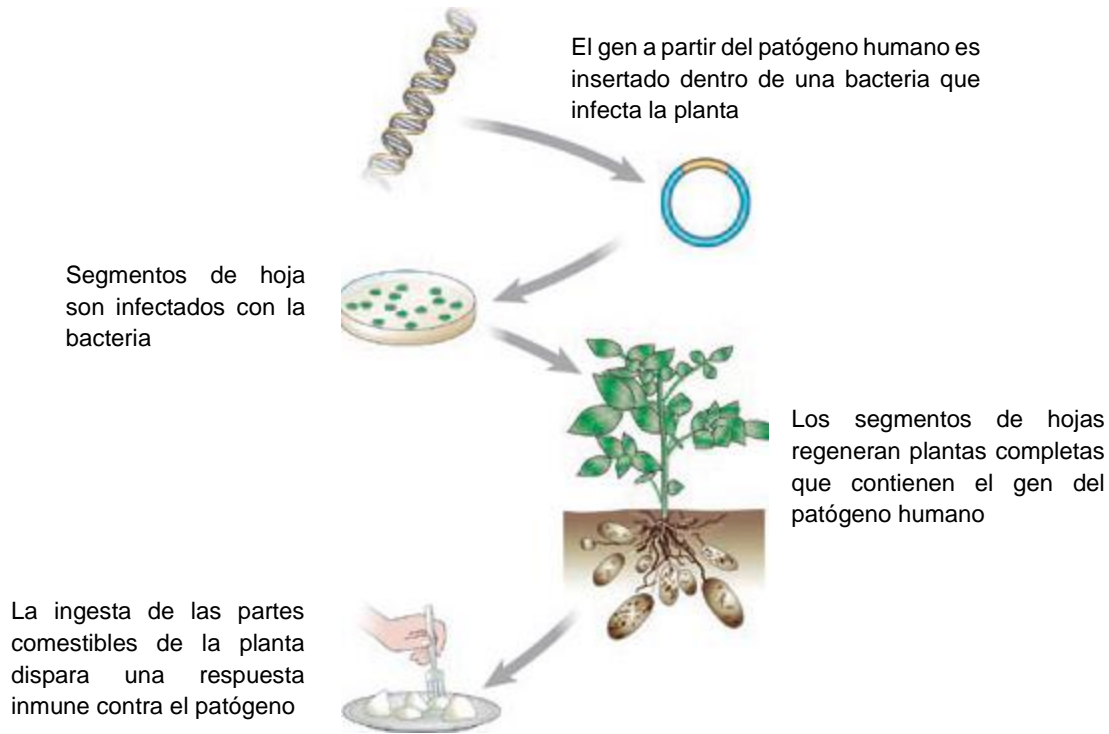


Figura 4. Esquemización a grandes rasgos de la producción de una vacuna comestible. Tomado de Lal y col., 2007.

2.3.5 Vacunas en plantas contra VSR

Dadas las ventajas que ofrecen las plantas como sistema de expresión, se han realizado varios intentos de producción de vacunas contra el VSR. En la mayoría de ellos han sido expresadas las proteínas F o G del virus sin optimizar su uso de codones; los vegetales utilizados para este fin incluyen tabaco, tomate y protoplastos de manzana.

Sandhu y col. (1999; 2000), lograron expresar el gen de la proteína F en protoplastos de hoja de manzana y en jitomate, comprobando la generación de anticuerpos protectores. Por otro lado, Belanger y col. (2000) expresaron el gen de la proteína G en tabaco, el cual demostró ser inmunogénico e inmunoprotector en ratones; sin embargo, no reportaron datos sobre el balance de la respuesta inmunológica Th1/Th2 lo cual es importante conocer dados los antecedentes de la vacuna inactivada.

Considerando los resultados obtenidos en los diferentes intentos de desarrollo de vacunas contra el VSR y las recomendaciones por comunicación personal del Dr. Piedra quien es profesor del Departamento de Virología Molecular y Microbiología del Baylor College of Medicine de Houston Texas, con experiencia en enfermedades respiratorias, se debe tomar en cuenta diferentes epítomos tanto de la proteína F como de la G, por lo que consideramos desarrollar una vacuna de subunidades que contenga dichos epítomos para obtener una vacuna comestible inmunogénica e inmunoprotectora, además de que promueva un adecuado balance entre las respuestas inmunológicas Th1/Th2.

2.4 Estrategias utilizadas para mejorar la producción de proteínas recombinantes en plantas

A pesar de las ventajas que ofrecen las plantas sobre otros sistemas de expresión, una de sus principales limitaciones es la baja cantidad de proteína que se obtiene (0.01%-2% de la proteína soluble total-PST) (Lal y col., 2007).

Para superar esta dificultad algunas de las técnicas que se han utilizado son: la optimización de la secuencia codificante de los genes foráneos (ya sean de bacterias o virus) para que al adecuar el uso de codones de plantas, puedan ser expresados más eficientemente (Lal y col., 2007); la utilización de promotores constitutivos como el 35S del virus del mosaico de la coliflor (Tyagi, 2001); el añadir en el extremo 5' del gen una secuencia UTR con la finalidad de proteger al ARN mensajero de su degradación; y la utilización de una señal de retención para el retículo endoplásmico (SEKDEL) en el extremo 3' que incrementa la acumulación de las proteínas antigénicas en las células vegetales (Rigano y Walmsley, 2005).

Además de lo anterior se han realizado técnicas de expresión de la proteína heteróloga en cloroplastos y la expresión de genes foráneos mediante vectores virales; ambas técnicas han mostrado una mayor producción de PTS (Lal y col., 2007).

Para el desarrollo de proteínas recombinantes efectivas, usualmente los antígenos blanco son fusionados o conjugados a moléculas acarreadoras para incrementar los niveles de expresión, dar estabilidad y/o incrementar la

inmunogenicidad. Por ejemplo para obtener vacunas efectivas contra *Haemophilus influenza B*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae*, los polisacáridos blanco fueron covalentemente unidos a moléculas acarreadoras (Vella y col., 1992; BATTERY y col., 2000; Jacobson y col., 2002).

Un ejemplo de estas moléculas acarreadoras es la liquenasa (LicKM) la cual está basada en la enzima termoestable B-1,3-1,4-glucanasa proveniente de *Clostridium thermocellum*, esta molécula fue desarrollada por la empresa Fraunhofer CMB, USA y permite fusiones con moléculas que varían en tamaño desde pequeños péptidos a proteínas de hasta 100 kDa de longitud (Musiychuk y col., 2007). El uso de LicKM como una molécula portadora contribuye ventajas adicionales, incluyendo el potencial aumento de la expresión y la incorporación de múltiples determinantes de la vacuna (Musiychuk y col., 2007).

Por otra parte la cubierta viral (CP) de algunos virus se ha utilizado también como molécula acarreadora gracias a su potencial de fusionar péptidos a ella, facilitando la producción, purificación y la inmunogenicidad (Yusibov y col., 2002).

2.5 Transformación genética de plantas

2.5.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria natural del suelo, Gram negativa, que tiene la capacidad de infectar principalmente plantas dicotiledóneas y causar un tumor en ellas. Esto es debido a la habilidad de la bacteria para introducir información genética dentro del genoma de la planta; dicha información codifica para la síntesis de auxinas y citocininas necesarias para el crecimiento tumoral (formado por la bacteria) y para la supervivencia de la bacteria. La información transferida (T-DNA) se encuentra dentro de un plásmido denominado Ti (plásmido inductor de tumor) el cual está flanqueado por dos regiones de 25pb, llamados bordes derecho e izquierdo, que son indispensables para su transferencia. Además el plásmido Ti contiene genes de virulencia (genes *vir*) localizados en una región de 35 Kb, los cuales son necesarios para el procesamiento y la transferencia del T-DNA, ya que codifican para funciones de corte, extensión, transferencia e

integración del T-DNA en el genoma de la célula receptora (Argüello-Astorga y Herrera-Estrella; 1994).

Naturalmente el proceso de infección ocurre de la siguiente manera: cuando la planta sufre una herida se generan compuestos fenólicos, principalmente acetosiringona, la cual es percibida por la proteína VirA que se encuentra en la membrana de la bacteria; cuando la acetosiringona se une a VirA se dispara una cascada de señalización que activa a los demás genes *vir* y que da como resultado la transferencia e integración del T-DNA en el genoma de la planta (Zupan y Zambryski, 1995) (Fig. 5).

Para aprovechar la capacidad natural de *Agrobacterium* de introducir material genético dentro del genoma de la planta, se han construido vectores binarios, donde por un lado se tiene un vector pequeño el cual contiene un sitio múltiple de clonación en el cual se puede introducir el ADN de interés, mientras que por otra parte este vector mantiene los bordes derecho e izquierdo necesarios para su transferencia y un marcador de resistencia que permite realizar la selección en *E. coli*. Por otra parte, el plásmido Ti de *Agrobacterium* se modificó, deletándole el T-DNA y se dejaron los genes *vir* necesarios para la transferencia e integración del ADN foráneo (Fig. 6).

Estos vectores binarios ofrecen varias ventajas: están desarmados y por lo tanto no pueden causar tumores en las plantas, son pequeños y fáciles de manejar en el laboratorio y además pueden propagarse fácilmente en *E. coli* (Mary-Dell Chilton., 2001).

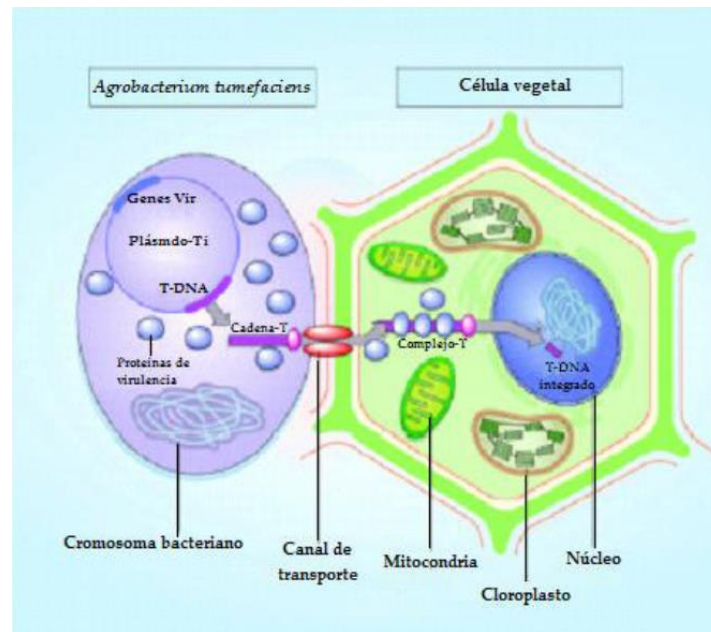
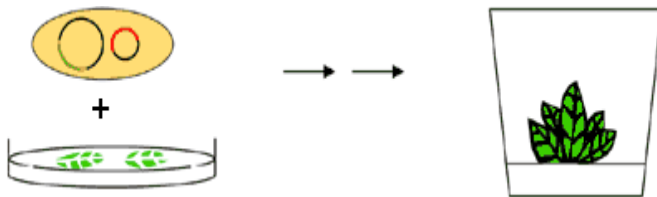


Figura 5. Transferencia de genes por *Agrobacterium tumefaciens* a células vegetales. Tomado de Zupan y Zambryski, 1995.



Primer Paso. El ADN de interés (verde) es clonado dentro del primer vector y propagado en *E. coli*.

Segundo Paso. El plásmido con el ADN de interés es introducido dentro de una cepa de *Agrobacterium* la cual contiene el plásmido Ti con los genes *vir*.



Tercer Paso. Con la cepa de *Agrobacterium* se infectan piezas pequeñas de la hoja de la planta en un medio con reguladores de crecimiento y finalmente mediante distintas rondas de selección en un medio con antibiótico, o algún otro compuesto selectivo, se regenera una planta completa con el transgén de interés.

Figura 6. Diagrama de la transformación mediada por *Agrobacterium* usando vectores binarios.

Las plantas que han sido transformadas con agrobacterias muestran transformación estable, lo cual significa que la nueva información introducida a la planta se hereda en las siguientes generaciones (Kaprowski y Yusibov, 2001).

2.5.2 Vectores virales

A pesar de que el método de transformación con *Agrobacterium* es eficiente y la transformación es estable, la cantidad de proteína heteróloga expresada es baja y se requieren tiempos largos para poder obtener una planta transformada genéticamente.

Un método de transformación que mejora considerablemente este punto, es la transformación mediada por vectores virales, sin embargo, la inestabilidad potencial de estos vectores es una limitante.

Para manejar este punto Musiychuk y col., 2007, desarrollaron un sistema de expresión basado en un “vector lanzadera”, el pBID4 (Fig. 7), el cual consta de dos componentes principales, un plásmido binario, el pBI121 y un vector de expresión viral.

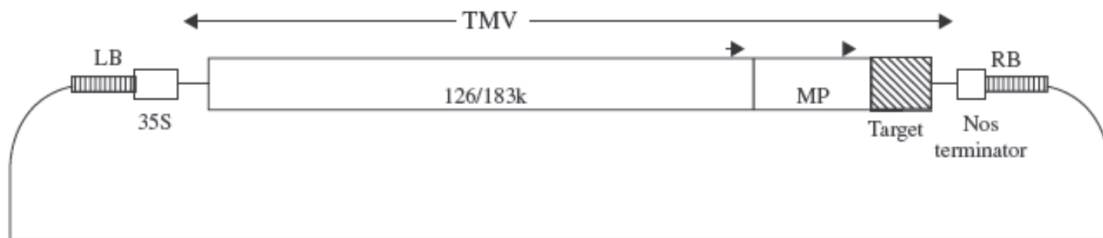


Figura 7. Representación esquemática del vector lanzadera pBID4.

El vector contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador *nos* de la nopalina sintasa. El genoma del virus del mosaico del tabaco (126/183k) contiene genes para la replicación viral, la proteína de movimiento (MP) y el gen blanco clonado en un sitio único de clonación bajo el control transcripcional del promotor subgenómico de la proteína de la cápside (flecha). Las secuencias del borde izquierdo y derecho (LB y RB) del plásmido binario de *Agrobacterium* delimitan la región del vector lanzadera que es transferido dentro de las células de la planta después de la infiltración.

El vector lanzadera es entregado a los espacios intercelulares de los tejidos de la planta por agroinfiltración, seguido de esto, múltiples copias de DNAs de las secuencias del vector viral son entregadas dentro de las células vegetales en cuestión de minutos. Las secuencias virales introducidas que contienen los genes blancos son después amplificadas mediante replicación. La traducción de estos

mRNAs recombinantes típicamente resulta en la acumulación de 100mg de la proteína blanco por kilogramo de tejido de la planta en menos de una semana (Musiychuk y col., 2007).

2.6 Plantas utilizadas y sus características

2.6.1 Tabaco

Nicotiana tabacum es una planta dicotiledónea, pertenece a la familia de las solanáceas las cuales se caracterizan por tener un alto contenido de alcaloides, entre los que destacan la nicotina (Claridades Agropecuarias, 2001).

Las hojas de tabaco son atractivas para expresar proteínas heterólogas, ya que éstas pueden recolectarse antes de la floración lo cual reduce el riesgo potencial de liberar el transgén al medio ambiente a través del polen; además, a diferencia de las semillas o tubérculos; las hojas de tabaco no persisten en el ambiente (Patel y col., 2007)

El tabaco es un buen modelo para la evaluación de proteínas recombinantes, ya que su transformación genética es relativamente fácil y tiene una rápida regeneración *in vitro*; sin embargo, no puede utilizarse como una planta para producir vacunas comestibles, ya que produce algunos compuestos tóxicos como alcaloides (Lal y col., 2007).

Este modelo sirve como prueba de concepto para evaluar la funcionalidad de las proteínas ahí expresadas, antes de realizar las transformaciones estables en las plantas apropiadas que por lo general llevan un proceso lento de regeneración.

2.6.2 Lechuga

Lactuca sativa es una planta dicotiledónea, pertenece a la familia de las compuestas y hay cerca de 100 especies distribuidas alrededor del mundo (Davey y col., 2002). El cultivo de lechuga es comercialmente importante a nivel mundial, en Estados Unidos se le considera el cuarto vegetal más consumido después del tomate, la naranja y la papa (Claridades Agropecuarias, 1999).

Las hojas de la lechuga son consumidas crudas por los humanos, lo cual la hace un excelente modelo para la producción de vacunas comestibles; además es de rápido desarrollo, produce gran biomasa y su transformación genética es relativamente fácil (Lal y col., 2007)

3. Justificación

A pesar de que las vacunas recombinantes surgen como una alternativa promisoría para prevenir la infección por VSR y de que algunos péptidos antivirales como RhoA han demostrado su eficacia *in vivo* como agentes antivirales, el costo en la producción y purificación de estos debe ser competitivo con los anticuerpos monoclonales (mAbs) o con las pequeñas moléculas que están siendo desarrolladas para la misma aplicación.

Una alternativa factible para la producción de proteínas recombinantes, incluyendo vacunas de subunidades, mAbs y proteínas terapéuticas, a bajo costo, es el uso de plantas como sistemas de expresión el cual ha sido adoptado por varias empresas en los últimos años (Ribicky y col., 2010).

En este trabajo nosotros diseñamos una vacuna de subunidades y un péptido antiviral (RhoA) y los expresamos genéticamente en plantas de tabaco, como un primer paso en el desarrollo de biofármacos a un bajo costo contra el vsr.

4. Objetivos

4.1 Objetivos generales

Diseñar y expresar genes sintéticos que codifiquen epítomos antigénicos de proteínas relevantes del VSR en plantas de lechuga y tabaco, para posteriormente analizar el tipo de respuesta inmune producida por éstos.

Diseñar y expresar mediante transformación transitoria el péptido antiviral Rho A en plantas de tabaco y probar su actividad antiviral *in vitro*.

4.2 Objetivos específicos

- Clonar los genes sintéticos antigénicos y antivirales, en los vectores adecuados para la transformación nuclear y transitoria de plantas.
- Sintetizar el péptido Rho A mediante PCR de fusión.
- Transformar nuclearmente plantas de lechuga y tabaco con las construcciones generadas.
- Transformar transitoriamente plantas de tabaco con las construcciones generadas.
- Analizar las transformantes de lechuga y tabaco mediante PCR y Western Blot.
- Evaluar la actividad antiviral *in vitro* del péptido Rho A.

5. Material y equipo

5.1. Biológico

Tabla 3. Material biológico utilizado

Nombre	Proveedor
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa LBA4404	Cepario del Dr. Cress
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa GV3101	Donadas por el Dr. Korban de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, USA. Fraunhofer CMB, Delaware, USA.
<i>Escherichia coli</i> Top 10 F'	Donada por el Dr. Argüello-Astorga del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
Semillas de tabaco (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	Fraunhofer CMB, Delaware, USA.
Semillas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) SR1 variedad Petite Havana	Donadas por el Dr. Korban de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, USA.
Semillas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) sin nicotina	Donadas por la Dra. Menassa de Ontario, Canadá.

5.2. Vectores

Tabla 4. Vectores utilizados

Plásmido	Características	Proveedor
pGEM-T Easy	Vector de clonación	Promega, USA
pGA4	Vector de clonación	Ceparío Laboratorio Dr. Alpuche
pMK	Vector de clonación	Ceparío Laboratorio Dr. Alpuche
pBI-121	Vector binario que incluye un cassette de expresión con el promotor 35S completo del virus del mosaico de la coliflor, fusionado al gen <i>gusA</i> y al terminador NOS	Ceparío del Dr. Cress
pKCZ	Vector para la transformación de cloroplastos de tabaco. Contiene sitios para recombinación entre los genes <i>trnR-ACG</i> y <i>trnN-GUU</i> , en la región de repetidos invertidos (IR), incluye un cassette de expresión del gen <i>aadA</i> bajo el promotor <i>Prrn</i> y el terminador <i>rbcL3'</i> .	Donado por el Dr. Koop del Instituto de Botánica de la Universidad de Munich, Alemania, mediante el Dr. Korban de la Universidad de Illinois en Urbana Champaign, U.S.A.
pGreenD4	Vector para la transformación transitoria de tabaco	Fraunhofer, Delaware, USA.
Magniffection pICH11599 pICH10990 pICH7410 pICH14011	Vectores para la transformación transitoria de plantas de tabaco. Agrupados en tres módulos, el módulo 3' (pICH11599, pICH10990, pICH7410) utilizados para clonar el gen de interés; el módulo 5' (pICH7388, pICH17610, pICH17620) contienen la replicasa viral y señales de	Donados por el Dr. Gleba de la compañía ICON GENETICS

pICH17388	dirección de la proteína; y el módulo de la integrasa (pICH7410) contiene a la enzima integrasa.	
pICH17610		
pICH17620		

5.3. Reactivos

Tabla 5. Reactivos utilizados.

Reactivo	Proveedor
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	Phyto Technology Lab., USA
Ácido bórico	Sigma Chemical Co., USA
Ácido molíbdico	Sigma Chemical Co., USA
Ácido naftalenacético (ANA)	Sigma Chemical Co., USA
Ácido nicotínico	Sigma Chemical Co., USA
Acetato de potasio	Sigma Chemical Co., USA
Ácido clorhídrico	Industrial Kem de León S.A. de C.V., México
Ácido fosfórico	J.T. Baker, USA
Agar grado bacteriológico	Invitrogen, USA
Agar grado micropropagación	Phyto Technology Lab., USA
Agarosa	Promega, USA
Albúmina de suero bovino	Sigma Chemical Co., USA
Alcohol isoamílico	Industrial Kem de León S.A. de C.V., México

Anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina	Sigma Chemical Co., USA
Anticuerpo policlonal anti-FVSR	Serotec, USA
Antígeno purificado VSR	Serotec, USA
Azul de Coomassie	Sigma Chemical Co., USA
Bencilaminopurina	Sigma Chemical Co., USA
Bicarbonato de sodio	J.T. Baker, USA
Bromuro de etidio	Promega, USA
Buffer de reacción para PCR	New England Biolabs, USA
Carbonato de sodio	Sigma Chemical Co., USA
Caseína	Phyto Technology Lab., USA
Cefotaxima	Laboratorios Kendrick, México
Cinetina	Phyto Technology Lab., USA
Cloroformo	Industrial Kem de León S.A. de C.V., México
Cloruro de calcio	Riedel de Haen, USA
Cloruro de cobalto	PhytoTechnology Lab., USA
Cloruro de magnesio	Promega, USA
Cloruro de sodio	J.T. Baker, USA
Desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega, USA
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	USB, USA

EDTA	Phyto Technology Lab., USA
Enzimas de restricción (<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Nco</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Xba</i> I, <i>Xho</i> I)	New England Biolabs, USA
Etanol	Industrial Kem de León S.A. de C.V., México
Extracto de levadura	Fluka, USA
Fenol	Invitrogen, USA
Fosfato de potasio	J.T. Baker, USA
Fosfato de sodio	Sigma Chemical Co., USA
Fosfato monobásico de potasio	J.T. Baker, USA
Glicerol	Sigma Chemical Co., USA
Glicina	Riedel de Haen, USA
HEPES	USB, USA
Hidróxido de sodio	Industrial Kem de León S.A. de C.V., México
Hipoclorito de sodio	Cloralex, México
Isopropanol	Industrial Kem de León S.A. de C.V., México
Kanamicina	GIBCO BRL, USA
Kit para purificación de ADN de fragmentos de agarosa	Qiagen, USA
Kit Pico Green	Sigma Chemical Co., USA

Leche descremada	Svelty, Nestle, USA
Leupeptina	Sigma Chemical Co., USA
Manitol	Sigma Chemical Co., USA
Marcador de ADN de 1 kb	New England Biolabs, USA
Marcador de ADN de 100 pb	New England Biolabs, USA
Microdín	Laboratorio Lacami S.A. de C.V., México
Myoinositol	Phyto Technology Lab., USA
Nitrato de amonio	Sigma Chemical Co., USA
Nitrato de potasio	Riedel de Haen, USA
Oligonucleótidos	Invitrogen, USA
Piridoxina	Sigma Chemical Co., USA
PMSF	Sigma Chemical Co., USA
p-Nitro fenil fosfato	Sigma Chemical Co., USA
RNAsa	Roche, USA
Rifampicina	Mavi Farmacéutica Lab
Sacarosa	Phyto Technology Lab., USA
Sulfato de cobre	Phyto Technology Lab., USA
Sulfato de magnesio	Sigma Chemical Co., USA
Sulfato de manganeso	Sigma Chemical Co., USA
Sulfato de zinc	Phyto Technology Lab., USA
Sulfato ferroso	Sigma Chemical Co., USA

T4 ADN Ligasa	New England Biolabs, USA
Taq ADN Polimerasa casera	Sintetizada en el laboratorio a partir de una cepa de <i>E. coli</i>
Taq ADN Polimerasa (<i>px</i>)	Invitrogen, USA
Terrazole	Uniroyal Chemical Co., USA
Tiamina	Phyto Technology Lab., USA
Sustrato Cosmopeat	COSMOCEL, México
Tris base	Promega, USA
Tween 20	Sigma Chemical Co., USA
Yoduro de potasio	Riedel de Haen, USA

5.4 Equipo

- Agitador orbital de mesa con plataforma Daigger modelo MX2139E
- Autoclave eléctrica Sterilmatic modelo STM-E tipo C
- Balanza analítica eléctrica Scientech modelo SA210D
- Balanza granataria Ohaus modelo 1400
- Baño María digital Fisher Scientific modelo Isotemp 1025
- Bomba de vacío Felisa modelo FE 1402
- Cámara bioclimática Lumistell modelo Mac-510
- Cámara de electroforesis horizontal BIO-RAD modelo minisub-cell GT
- Cámara fotográfica Sony Cyber Shot modelo DSCF717
- Campana de extracción de humos Fisher Alder modelo CS línea 2000
- Campana de flujo laminar Fisher Alder
- Campana de flujo laminar Lumistell modelo L-120
- Campana de flujo laminar Lumistell modelo LP-09
- Centrífuga refrigerada Kendro modelo Hareus Biofuge fresco

- Centrífuga Sorvall modelo RC 5C Plus
- Congelador Nieto modelo CVC15
- Cuarto de incubación de cultivos vegetales Lumistell
- Electroporador BTX modelo ECM 630
- Espectrofotómetro Beckman modelo DU 530
- Fluorómetro TECAN modelo Genios
- Fotodocumentador de geles UVP modelo EpiChemi3 Darkroom
- Fuente de poder Thermo EC modelo EC105
- Homogenizador de tejidos Wheaton modelo 903475
- Horno de microondas LG modelo MS-217XQE
- Incubadora shaker New Brunswick Scientific modelo 12400
- Lector de microplacas BIO-RAD modelo 550
- Microcentrífuga Eppendorff modelo mini Spin
- Micropipetas Gilson
- Pistola de biobalística Bio-Rad PDS-1000/He biolistic
- Placa de calentamiento Corning modelo PC420
- Potenciómetro Orion 3 Star Thermo Electro Corporation
- Refrigerador Torrey modelo R-14
- Tanque de Helio comprimido Praxair
- Termociclador Techne modelo Touchene Gradient
- Termociclador DNA Engine Bio Rad
- Termomezclador R Eppendorff modelo 22331
- Ultracongelador Nuair modelo UN-6613A35
- Vórtex Fischer Scientific modelo Genie – 2

6. Metodología

6.1 Diseño del gen sintético para los epítomos de las proteínas F y G del VSR.

Previamente en el trabajo de maestría (Ortega-Berlanga 2009) se diseñó un gen sintético para transformación genética nuclear, optimizado para el uso de codones en plantas, este gen comprende una fusión de epítomos de las proteínas F, G y M del VSR, (VSRn).

Las regiones seleccionadas fueron las siguientes: de la proteína F del VSR se eligieron las secuencias de aminoácidos 205-223 y 255-278 ya que se tiene reportado que son epítomos de las células T además de ser inmunogénicas (Bourgeois y col., 1998; Hyoung y col., 2006). Por otra parte se eligió la proteína de fusión (G1F/M2). Esta proteína consta de un fragmento de la proteína G del VSR (G:125-225 aminoácidos) fusionado a la proteína quimera (F/M2), que a su vez se conforma por un fragmento de la proteína F del virus de sarampión (F:113-131 aminoácidos) unida a un segmento de la proteína M del VSR (M:81-95 aminoácidos). La fusión G1F/M2 ha demostrado inducir producción de anticuerpos neutralizantes, proliferación de células T y un balance adecuado entre la respuesta inmune Th1/Th2 (Zeng y col., 2006).

Los espaciadores utilizados que exponen epítomos lineales, son los reportados en el artículo de Livingston y col. (2002), que son ricos en glicina y prolina (GPGPG).

A la construcción se le añadió en el extremo 5' una etiqueta de histidinas con la finalidad de permitir la purificación de la proteína recombinante y también se añadió un sitio de proteasa del virus *Tobacco Etch Virus* (TEV) que permite eliminar la etiqueta una vez que se ha sido purificada la proteína.

Por último se añadió una señal de retención al retículo endoplásmico (SEKDEL) y sitios de restricción para su clonación en el vector binario pBI121 (Fig. 8).

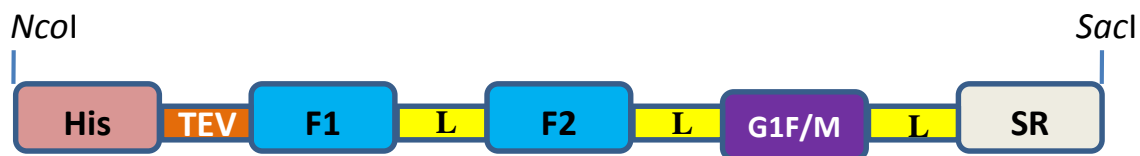


Figura 8. Gen sintético para transformación nuclear.

His, histidinas; TEV, sitio de proteasa; F1 y F2, epítomos del gen F; G1F/M, proteína de fusión; L, espaciador; SR, señal de retención en el retículo endoplásmico. Se muestran sitios de restricción.

6.1.2 Diseño de genes sintéticos con actividad antiviral

El diseño, expresión y evaluación del péptido antiviral Rho A se realizó en Fraunhofer CMB, DE, USA, bajo la supervisión de Yoko Shoji y Konstantine Musiychuk.

La secuencia del péptido antiviral que abarca los aminoácidos 80-94 (ILMCFSIDSPDSLEN) de la proteína RhoA (NP_001655.1) fue optimizada para su expresión en plantas y sintetizada por PCR de fusión. Dado el pequeño tamaño del péptido antiviral y con el fin de facilitar la dimerización del mismo, se siguieron tres estrategias diferentes: en la primera se diseñaron tres construcciones en las cuales se mantuvo al péptido solo (Fig. 9), en la segunda se diseñaron construcciones fusionadas a AIMV CP (Fig. 10), en la tercera las construcciones fueron fusionadas a liquenasa (LicKM) (Fig. 11). Las dos últimas estrategias se siguieron con la finalidad de mejorar la expresión y la eficacia de la purificación, (Musiychuk y col., 2007). El péptido RhoA fue dispuesto en tándem o en tándem con un espaciador flexible (GGGGSGGGGS) para facilitar la dimerización del mismo, ya que su actividad antiviral es dependiente de la formación de puentes disulfuro (Graham y Budge, 2004). Para la fusión LicKM, el péptido RhoA se fusionó al extremo C-terminal de LicKM, y se adicionó un péptido señal de la proteína relacionada con la patogénesis-1a (PR-1a) en el extremo N-terminal, y una señal de retención (KDEL) al retículo endoplásmico (ER) y una etiqueta de histidinas (6xHis) en el extremo C-terminal.

Para la última estrategia se fusionó el péptido RhoA al extremo N-terminal de AIMV CP sin las secuencias de PR-1a, KDEL y 6xHis.



Figura 9. Construcciones genéticas correspondientes a la primera estrategia. PR, péptido señal; His-tag, etiqueta de histidinas; Flag, sitio de corte de enteroquinasa; RhoA, péptido antiviral que comprende los aminoácidos 80-94 de la proteína RhoA; FL, espaciador; KDEL, señal de retención al retículo endoplásmico.



Figura 10. Construcciones genéticas correspondientes a las fusiones a liquenasa LicKM. PR, péptido señal; lichenase, liquenasa; His-tag, etiqueta de histidinas; Flag, sitio de corte de enteroquinasa; RhoA, péptido antiviral que comprende los aminoácidos 80-94 de la proteína RhoA; FL, espaciador; KDEL, señal de retención al retículo endoplásmico.

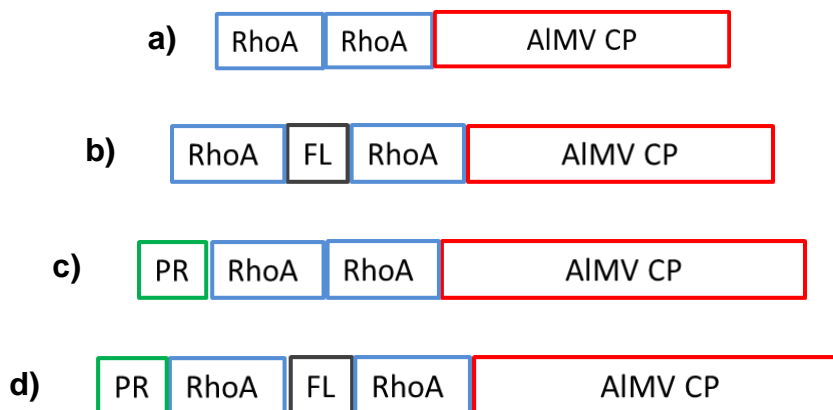


Figura 11. Construcciones genéticas correspondientes a las fusiones a AIMV CP. PR, péptido señal; RhoA, péptido antiviral que comprende los aminoácidos 80-94 de la proteína RhoA; FL, espaciador; AIMV CP, proteína de la cápside del virus del mosaico de la alfalfa.

6.2 Construcciones genéticas

6.2.1 Construcción genética para transformación nuclear

La construcción genética para transformación nuclear fue obtenida durante la maestría, para ello el gen diseñado sintetizado por la compañía GenScript en EUA fue clonado en el vector pBI-121 mediante los sitios de restricción *Nco*I y *Sac*I. La construcción resultante fue llamada pBI-VSRn.

La identidad de cada una de las construcciones genéticas fue comprobada por secuenciación y un stock de cada una de ellas fue almacenado a -80°C .

6.2.2 Construcciones genéticas para transformación transitoria

Todas las construcciones genéticas para transformación transitoria fueron obtenidas mediante PCR de fusión, un par de oligos para cada construcción fue diseñado mediante el programa BioEdit, los cuales tenían como característica principal que se empalmaban entre ellos en un segmento de entre 20-30 nucleótidos, además los sitios de restricción *Pac*I y *Xho*I fueron añadidos con la finalidad de realizar las clonaciones correctas en el vector PGR-D4. La Figura 12 muestra la estrategia y el programa de PCR de fusión utilizado.

Las secuencias resultantes fueron clonadas en el vector de expresión PGR-D4, obteniéndose las siguientes construcciones: PR-HF-RhoA-K, PR-HF-RhoA2-K, PR-HF-RhoA2-FL-K, PR-RhoA2-F-4-HK, PR-RhoA2-FL-F-4-HK, PR-RhoA2-F-3-HK, PR-RhoA2-FL-F-3-HK, RhoA2-d25CP, RhoA2-FL-d25CP, PR-RhoA2-d25CP, PR-RhoA2-FL-d25CP.

La identidad de cada una de las construcciones genéticas fue comprobada por secuenciación y un stock de cada una de ellas fue almacenado a -80°C .

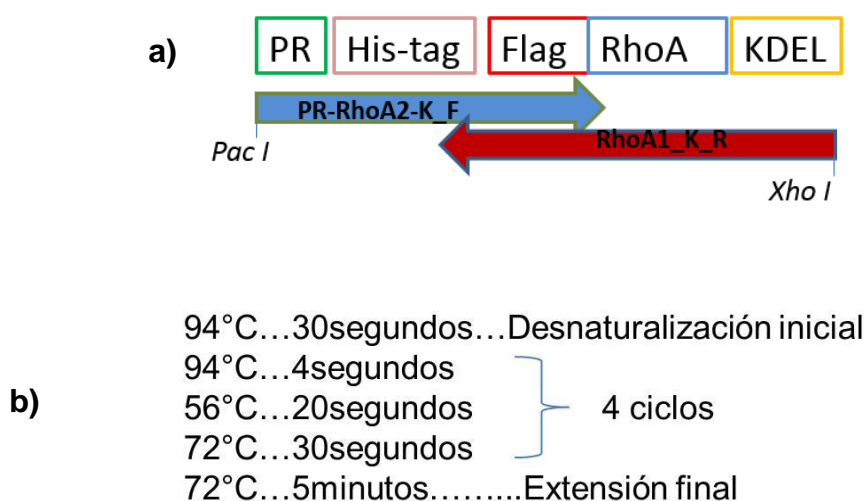


Figura 12. Identidad de las construcciones genéticas.

a) Representación esquemática de los oligos diseñados para la PCR de fusión. b) Programa de PCR de fusión utilizado para el diseño de cada una de las construcciones genéticas de transformación transitoria.

6.3 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción para transformación nuclear.

La construcción para transformación nuclear fue clonada previamente en células *E. coli* mediante choque térmico (Apéndice 8.1). Para transferir la construcción pBI-VSRn a *Agrobacterium tumefaciens*, se empleó la técnica de electroporación. Se prepararon células competentes de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, de acuerdo al protocolo de Cangelosi y col. (1991) (ver Apéndice 8.2). Se agregaron 3.0 μL de ADN a 50 μL de células competentes y después de incubar en hielo por 5 minutos se transfirieron a una cubeta de electroporación Bio-Rad para

aplicar corriente bajo los parámetros establecidos por el proveedor Bio-Rad (25 μ F, 400 Ω , 2.5 kV por 8-9 milisegundos) en un equipo BTX Mod. 630. Inmediatamente se añadió 1.0 mL de medio de cultivo YM (Apéndice 8.4.13), se transfirió la solución a un tubo Eppendorff de 1.5 mL y las células se recuperaron a 28°C por dos horas. Finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos, la pastilla se resuspendió en 200 μ L de medio de cultivo LB (Apéndice 8.4.14) y se inoculó en medio de selección (LB con 50 mg/L de kanamicina) para su cultivo por 2 días a 28°C y 150 rpm. Sólo las bacterias transformadas se desarrollan en el medio de selección, debido a que el plásmido transferido confiere resistencia a kanamicina.

6.4 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones para transformación transitoria

Para transferir las construcciones genéticas (PR-HF-RhoA-K, PR-HF-RhoA2-K, PR-HF-RhoA2-FL-K, PR-RhoA2-F-4-HK, PR-RhoA2-FL-F-4-HK, PR-RhoA2-F-3-HK, PR-RhoA2-FL-F-3-HK, RhoA2-d25CP, RhoA2-FL-d25CP, PR-RhoA2-d25CP, PR-RhoA2-FL-d25CP) se empleó la técnica de electroporación. Se agregaron 3.0 μ L de ADN a 50 μ L de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y después de incubar en hielo por 5 minutos se transfirieron a una cubeta de electroporación Bio-Rad para aplicar corriente bajo los parámetros establecidos por el proveedor Bio-Rad (25 μ F, 400 Ω , 2.5 kV por 8-9 milisegundos) en un equipo BTX Mod. 630. Inmediatamente se añadió 1.0 mL de medio de cultivo YM (Apéndice 8.4.13), se transfirió la solución a un tubo Eppendorff de 1.5 mL y las células se recuperaron a 28°C por dos horas. Finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos, la pastilla se resuspendió en 200 μ L de medio de cultivo LB (Apéndice 8.4.14) y se inoculó en medio de selección (LB con 50 mg/L de kanamicina) para su cultivo por 2 días a 28°C y 150 rpm. Sólo las bacterias transformadas se desarrollan en el medio de selección, debido a que el plásmido transferido confiere resistencia a kanamicina (Apéndice 8.4.6).

6.5 Protocolos de regeneración

6.5.1 Tabaco

El protocolo de regeneración para tabaco está bien establecido en nuestro laboratorio y es el descrito por Daniell y col. (2001), en el cual se utiliza como explante inicial hojas jóvenes y como medio de regeneración RMOP (Apéndice 8.4.12).

6.6 Obtención de los explantes

6.6.1 Tabaco

6.6.1.1 Obtención de hojas jóvenes

Se esterilizaron semillas de tabaco y se colocaron de dos a tres en frascos con medio de cultivo (Apéndice 8.4.11) RMOP (Apéndice 8.4.12), después de 4 semanas se obtuvieron plántulas con suficientes hojas jóvenes las cuales fueron utilizadas para los ensayos de regeneración y transformación genética.

6.7. Ensayos de transformación genética nuclear vía *A. tumefaciens*

6.7.1. Tabaco

Se utilizaron 3 hojas de cuatro semanas, éstas se cortaron en fragmentos de 0.5 x 1.0 cm sobre papel filtro estéril y se colocaron en medio MS0 (Apéndice 8.4.3 y 8.4.12) para evitar deshidratación. Posteriormente se colocaron en una solución de *A. tumefaciens* (DO 0.2) que portaba el plásmido pBI-VSRn durante 10 minutos. Después de eliminar el exceso de bacterias con papel absorbente estéril, se colocaron en medio RMOP sin antibiótico durante dos días. Pasado el periodo de cocultivo, los explantes se transfirieron al medio RMOP adicionado con 200 mg/L de kanamicina y 500 mg/L de cefotaxima (Apéndice 8.4.7). Los tejidos fueron subcultivados cada dos semanas, seleccionando solo los explantes resistentes a la selección. Finalmente los brotes resistentes fueron pasados a medio MS (Apéndice 8.4.12) sin antibióticos para generar raíz y posteriormente transferidos a tierra.

6.9. Transformación genética transitoria de plantas de tabaco

6.9.1 Obtención de plantas de tabaco

Para realizar la agroinfiltración se utilizaron plantas de *N. benthamiana* de 6 semanas de edad, las cuales fueron crecidas hidropónicamente.

6.9.2 Agroinfiltración de plantas de tabaco

Cada cepa de *Agrobacterium* con la construcción genética adecuada se puso a crecer en medio de selección (50 mL de medio LB + carbanicilina 50 mg/L + rifampicina 50 mg/mL, Apéndice 8.4.8) durante 24 horas a 28°C. Posteriormente la suspensión se llevó a una densidad celular de OD₆₀₀=0.5 y las plantas fueron inoculadas con esta suspensión por infiltración al vacío.

6.10 Análisis de transformantes

Para el caso de transformación nuclear las líneas resistentes al agente de selección fueron analizadas por PCR y por Dot Blot, para comprobar la presencia del transgén y la antigenicidad de la proteína.

Para el caso de la transformación transitoria el material vegetal fue analizado mediante Western Blot para detectar la presencia de la proteína de interés, posteriormente se realizó la purificación de las proteínas mediante cromatografía de afinidad utilizando columna de níquel y finalmente se evaluó la actividad antiviral *in vitro* mediante el ensayo de inhibición de placas líticas.

Para las construcciones genéticas acopladas a AIMV CP se evaluó la formación de partículas virales (VLPs) mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), este procedimiento fue realizado en el Centro de Bio-Imaging en Delaware Biotechnology Institute (Universidad de Delaware, Newark, DE).

6.10.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

6.10.1.1 Extracción de ADN genómico

El ADN genómico se aisló de tejido vegetal siguiendo el protocolo de Michiels y col. (2003) (Apéndice 8.3). Se congelaron 50 mg de tejido vegetal en nitrógeno líquido, se trituraron en un tubo Eppendorff con un pistilo de plástico y se adicionaron 750

μL de buffer de extracción a 60°C [Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, β -mercaptoetanol 0.2%, (PVP 2%, CTAB 2% inmediatamente antes de usarse)].

Se incubó a 65°C por 60 minutos con mezclado ocasional para evitar agregaciones en el homogenizado, se añadió 750 μl de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) sobre el extracto, se agitó con vórtex, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos, se transfirió la fase superior a otro tubo y se repitió la extracción hasta limpiar la fase acuosa; ésta se mezcló con 500 μl de isopropanol y se incubó a 25°C por toda la noche, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos. La pastilla obtenida se resuspendió en 750 μL de solución de lavado (acetato de amonio 10mM, etanol 70%) y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, se centrifugó por 5 minutos y se repitió el lavado, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla al aire, se resuspendió en 50 μL de agua milli "Q" con RNasa en una concentración final de 10 g/mL, se incubó a 37°C por 30 minutos.

Posteriormente se añadió un volumen de fenol- cloroformo -alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó para formar una emulsión, se centrifugó por 5 minutos, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se repitió la extracción con cloroformo alcohol isoamílico (24:1). Se añadió NH_4Ac 7.5 M, pH 7.7 en una concentración final de 2.5 M y dos volúmenes de etanol frío, se mezcló e incubó a -20°C por 30 minutos, se precipitó por centrifugación a 13,000 rpm por 10 minutos. Se lavó la pastilla dos veces con etanol al 70%, se secó a 37°C y se resuspendió en 30 μL de agua milli Q; el ADN se almacenó a -20°C .

Para la cuantificación de ADN se empleó un fluorómetro Tecan modelo Genios, empleando el kit Pico Green. Se preparó una dilución de Pico Green 1:400 en TE 1X y se colocaron 198 μL de esta solución en placas de 96 pozos. Se añadieron 2 μL de la solución problema y se realizó la medición de fluorescencia (a 485nm excitación/535nm emisión). Para la curva de calibración se emplearon estándares de 1, 10 y 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y los datos fueron analizados en el software Magellan 4. El rendimiento promedio de ADN fue de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

6.10.1.2 Protocolos de PCR

Se analizó mediante PCR el ADN extraído de los tabacos transformados nuclearmente con la construcción pBI-VSRn, los oligonucleótidos que se utilizaron fueron para amplificar el gen de resistencia a kanamicina (NPT II), el cual tiene un tamaño de banda esperado de 600 pb aproximadamente. A continuación se muestra el programa utilizado para dicho caso:

Desnaturalización inicial----5min a 94°C

30 ciclos {

- Desnaturalización----30s a 94°C
- Alineamiento-----30s a 57°C
- Extensión-----1min a 72°C

Extensión final----7min a 72°C

A la par también se realizó una segunda PCR que amplificaba específicamente 347 pb correspondientes al gen VSRn. El programa utilizado para este caso fue igual al descrito anteriormente con la única diferencia de la temperatura de alineamiento, que fue de 52°C.

En todos los casos la mezcla maestra de reacción (25 μ L) contenía ADN genómico (20 ng), buffer de Taq polimerasa (1X), MgCl₂ (1.5 mM), dNTPs (0.2 mM), oligonucleótidos (10 μ M) y Taq polimerasa (1U). La secuencia de los oligos utilizados tanto para NPT II y VSRn se muestra en la sección de Apéndice 8.4.15.

La amplificación se llevó a cabo en un equipo de Techne, después de la amplificación, las muestras se analizaron en geles de agarosa al 1% (Apéndice 8.4.2), corridos en TAE (Apéndice 8.4.1) 1X a 70 V, los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV en un fotodocumentador Chemisystem (UVP) empleando el software Labworks 4.0.0.8.

6.10.2 Dot blot

Se realizó la extracción de proteínas, mediante sonicación de 100 mg de tejido vegetal liofilizado en 500 μ L de buffer de extracción (Tris-HCl pH 8.0, PMSF 0.1% y leupeptina 10 μ g/mL). El homogenado se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante, 5 μ L de este sobrenadante se colocaron en una membrana de nitrocelulosa para realizar el procedimiento como sigue:

- Se realizó el bloqueo con PBS – BSA al 3% durante 45 min.
- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS – Tween.
- Se añadió el anticuerpo primario (Anti-His) 1:5,000 e incubó por 1 hora.
- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS – Tween.
- Se incubó con el anticuerpo secundario (Anti-IgG acoplado a peroxidasa de rábano) por 45min.
- El revelado se realizó agregando el reactivo (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce, IL).

6.10.3 Western blot

Extractos totales de proteínas de cada transformación genética así como de las proteínas purificadas correspondientes a transformación transitoria se separaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10%, se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (Millipore, Billerica, MA) y se bloquearon con 0,5% I-block (Applied Biosystems, CA). Extractos de proteínas de tejido vegetal silvestre fueron utilizados como control negativo. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente para cada caso (anti-4xHis, anti-liquenasa, anti-RhoA o anti-AIMV CP) por 1 hora seguido de una incubación por 45 minutos con el anticuerpo secundario anti- IgG acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc., PA). Las bandas específicas correspondientes a las proteínas recombinantes se visualizaron utilizando el reactivo SuperSignal West Pico Substrato quimioluminiscente (Pierce, IL) y la imagen fue tomada usando el software GeneSnap para después realizar la cuantificación usando el software Gene Tools (Syngene Bioimaging, MD).

6.10.4 Purificación de proteínas recombinantes

A los 4, 5, 6 y 7 días después de la infiltración (dpi), se recolectó tejido a partir de las hojas de las plantas infiltradas y se homogenizaron mecánicamente con el fin de analizar la expresión de la proteína recombinante. Las dos construcciones genéticas fusionadas a CP (RhoA2-d25CP y RhoA2-FL-d25CP) fueron después centrifugadas y filtradas a través de un prefiltro 2.5 μm seguida de una segunda filtración 0.8/0.2 μm . Las partículas recombinantes se precipitaron utilizando polietilenglicol (PEG) y se re suspendieron en buffer de fosfatos (fosfato de Na 95 mM, y pirrofosfato de Na 5%, pH 7,4).

Por otro lado, la proteína fusionada a LicKM (PR-RhoA2-FL-F-3-HK) fue homogeneizada mecánicamente y se incubó con 0.5% Triton X-100. El extracto bruto se clarificó por centrifugación (78,000 g durante 30 min). Después de la clarificación, el extracto se purificó usando cromatografía de afinidad (columnas preempacadas HP Ni, GE Healthcare, NJ) las fracciones de la proteína recombinante fueron eluidas con imidazol 100, 300 o 500 mM.

6.10.5 Ensayo de inhibición de placas líticas de RSV

Las proteínas purificadas correspondientes a las siguientes construcciones: RhoA2-d25CP, RhoA2-FL-d25CP y PR-RhoA2-FL-F-3-HK se ensayaron para determinar la actividad anti-RSV *in vitro* utilizando células HEp-2 (CCL-23 TM, ATCC®, Manassas, VA) y la cepa viral RSV A2 (VR-1540 TM, ATCC®). Las células HEp-2 se sembraron en una densidad de 4×10^5 células / pocillo en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos (Corning / Costar) y se incubaron durante 18-20 horas a 37 ° C en una atmósfera de 5% de CO₂ hasta que alcanzaran aproximadamente el 90-100% de confluencia. Se realizó una serie de diluciones de cada proteína de fusión RhoA y se mezcló con una cantidad igual de VSR que contiene aproximadamente 50 unidades formadoras de placas (UFP), la mezcla se añadió a las células HEp-2 sembradas. Los pocillos de control contenían medio de cultivo y sólo virus (50 PFU / pocillo). Después de una incubación de 2 horas a 36 ° C, se retiró el medio y se añadió 1 ml / pocillo de medio de recubrimiento (2% de carboximetil celulosa en medio de Eagle modificado por Dulbecco [DMEM] con suero bovino fetal al 2% [FBS]). Las placas se incubaron a 36 ° C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 4

días. Después se retiró el medio de recubrimiento y las células se fijaron con 60% de acetona y 40% de metanol en hielo durante 15 minutos y secado al aire. Las células se bloquearon entonces con 1 ml / pocillo de I-Block durante 1 hora y se incubaron con anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína F 'anti-VSR F mAb' (Millipore, Billerica MA) durante 2 horas a temperatura ambiente seguido por incubación con anticuerpo IgG policlonal anti-ratón conjugado a HRP. Las placas virales se visualizaron con el sustrato Diaminobencidina IMMFACT (DAB) y fueron contabilizadas. El porcentaje de inhibición se calculó como la reducción porcentual del número de placas en comparación con el número de placas en los pocillos de los grupos control.

7. Resultados

7.1 Transformación nuclear

7.1.1 Diseño del gen VSRn

Durante la maestría se realizó una revisión de literatura donde se seleccionaron los epítomos de las proteínas F y G del VSR que se incluyeron en el diseño del gen sintético. De la proteína F del VSR se eligieron las secuencias de aminoácidos 205-223 y 255-278 ya que se ha reportado que son epítomos de las células T además de ser inmunogénicas (Bourgeois y col., 1998; Hyoung y col., 2006). Como se mencionó con anterioridad, se ha sugerido que la proteína G induce un sesgo hacia la respuesta inmune Th2, sin embargo, Rui-Hong y col. (2005), demostraron que la secuencia de aminoácidos 125-225 de la proteína G del VSR unida a la proteína quimera (F/M) que a su vez está compuesta por un fragmento de la proteína F del virus de sarampión (F:113-131 aminoácidos) y un segmento de la proteína M del VSR (M:81-95 aminoácidos), es capaz de inducir producción de anticuerpos neutralizantes y un adecuado balance entre la respuesta inmune Th1/Th2, por lo cual se consideró esta construcción en el diseño del gen sintético. La secuencia de aminoácidos de cada epítomo seleccionado para el diseño del gen para transformación nuclear se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Secuencia de aminoácidos de los epítomos incluidos en el diseño del gen sintético que codifican la proteína antigénica del VSR

Descripción	Aminoácidos	Secuencia
Epítomo 1F	205-223	PIVNKQSCSISNIETVIEF
Epítomo 2F	255-278	SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV
Epítomo 1G	125-225	TLQSTTVKTKNTTTTKIQPSKPTTKQRQNKPPNKPNN DFHFEVFNFVPCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGKKT TKPTKKPTIKTTKKDLKPQTTKPKEV
Epítomo 4F*	113-131	FAGVVLAGAALGVAAAAQI
Epítomo 1M	81-95	ESYIGSINNITKQSA
Señal de retención en ER	-----	SEKDEL

*Fragmento de la proteína de fusión del virus del sarampión.

La inmunogenicidad del gen diseñado fue analizada *in silico* mediante el programa Antheprot y una secuencia SEKDEL para la retención en el retículo endoplásmico y sitios de restricción fueron añadidos para su clonación en el vector binario pBI-121 al cual se le eliminó el gen GUS.

La construcción además también cuenta con una etiqueta de histidinas para permitir la purificación de la proteína recombinante, así como con un sitio de proteasa (TEV) que permite eliminar la etiqueta de histidina una vez que la proteína ha sido purificada (Fig. 13).

a)

Nco I

```
CCATGGGACATCATCATCATCATCATGAAAATCTTTACTTCCAAGGACCAATCGTTAACAAGCA
TCTTGTTCTATCTCTAACATTGAAACAGTTATTGAATTTGGACCAGGACCAGGATCTGAACTTCT
TTCTCTTATTAATGATATGCCAATCACAAACGATCAAAGAACTTATGTCTAATAACGTTGGAC
CAGGACCAGGAACACTTCAATCTACAACAGTTAAAACAAGAACAACAACAACAAGATCCA
ACCATCTAAGCCAACAACAAGCAAAGACAAAACAAGCCACCAACAAGCCAAATAACGATTTTC
CATTTCGAAGTTTTTAATTTTCGTTCCATGTTCTATCTGTTCTAATAACCCAACATGTTGGGCAATT
GTAAGAGAATTCAAAACAAGAAACCAGGAAAGAAAACAACACTACAAAGCCAACAAGAAACAAA
ATTAAAACAACAAGAAAGATCTTAAGCCACAAACAACAAGCCAAAGGAAGTTTTTGCAGGAG
TGTTCTTGCAGGAGCAGCACTTGGAGTTGCAGCAGCAGCACAATTGAATCTTATATTGGATCT
ATCAATAACATTACAAAACAATCTGCAGGTCCTGGACCAGGATCTGAAAAAGATGAACTTTGAT
AGAGCTC.
```

Sac I

b)

```
LDREGH Met HHHHHHENLYFQGPIV NKQSCSISNIETVIEFGPGPGSELLSLIND
Met PITNDQKKLMet SNNVGP GPGTLQSTTVKTKNTTTTKIQPSKPTTKQRQNK
PPNKPNDFHFEVFNFP CSICSNPTCWAICKRIPNKKPGKTTTTKPTKKPTI
KTTKKDLKPQTTKPKVEVFAGVVLAGAALGVAAAQIESYIGSINNITKQSA Stop
Stop LE
```

Figura 13. Construcción genética para transformación nuclear (VSRn).

a) Secuencia nucleotídica del gen VSRn optimizada para su expresión en plantas por la compañía GeneScript. b) Secuencia de aminoácidos correspondiente al gen VSRn. Longitud del gen: 656 pb. En verde se muestran los sitios de restricción (*Nco* I y *Sac* I).

7.1.2 Construcción genética pBI- VSRn

El gen VSRn fue clonado en el vector pBI-121 para transformación nuclear dando como resultado la construcción resultante denominada pBI-VSRn (Fig. 14), dicha construcción fue verificada mediante secuenciación y análisis de restricción (Fig. 15).

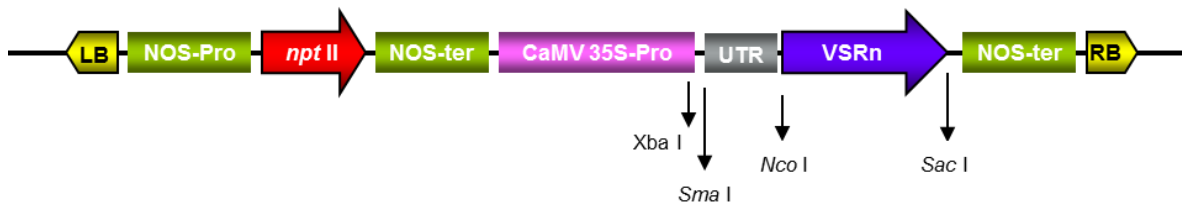


Figura 14. Plásmido pBI-VSRn usado para la transformación nuclear de tabaco y lechuga. En amarillo se indican los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del T-DNA, el gen VSRn (en azul) flanqueado por sitios de restricción. En rosa se muestra el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S-Pro) y en rojo el gen de selección (*nptII*).

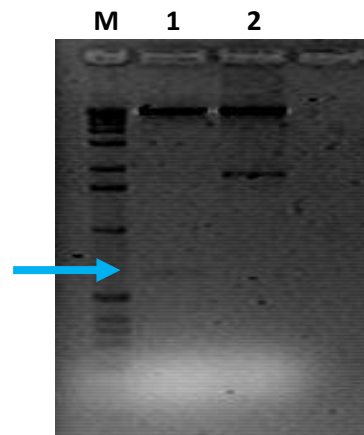


Figura 15. Digestión de la construcción pBI-VSRn con las enzimas *Xba* I y *Sac* I. 1, Construcción genética pBI-VSRn digerida; 2, Control (vector completo pBI-121 si digerir). Se muestra la liberación del fragmento de 776 pb correspondiente a la construcción clonada (120 pb del 5'UTR + 656 pb del Gen VSRn).

7.1.3 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

El vector binario fue transferido a *A. tumefaciens* mediante electroporación. Después de dos días de cultivo en medio selectivo se presentó desarrollo bacteriano, lo cual indicó que la transformación fue exitosa. La presencia del plásmido fue confirmada realizando su extracción y análisis en un gel de agarosa, en el que se visualizó el plásmido en todos los casos (resultados no mostrados).

7.2 Proceso general para obtención de plantas transgénicas de tabaco vía *A. tumefaciens*

La estandarización de la regeneración de plantas de tabaco fue realizada en el laboratorio con anterioridad por Martínez-González (2005), dicho proceso toma aproximadamente 5 meses (Fig. 16).

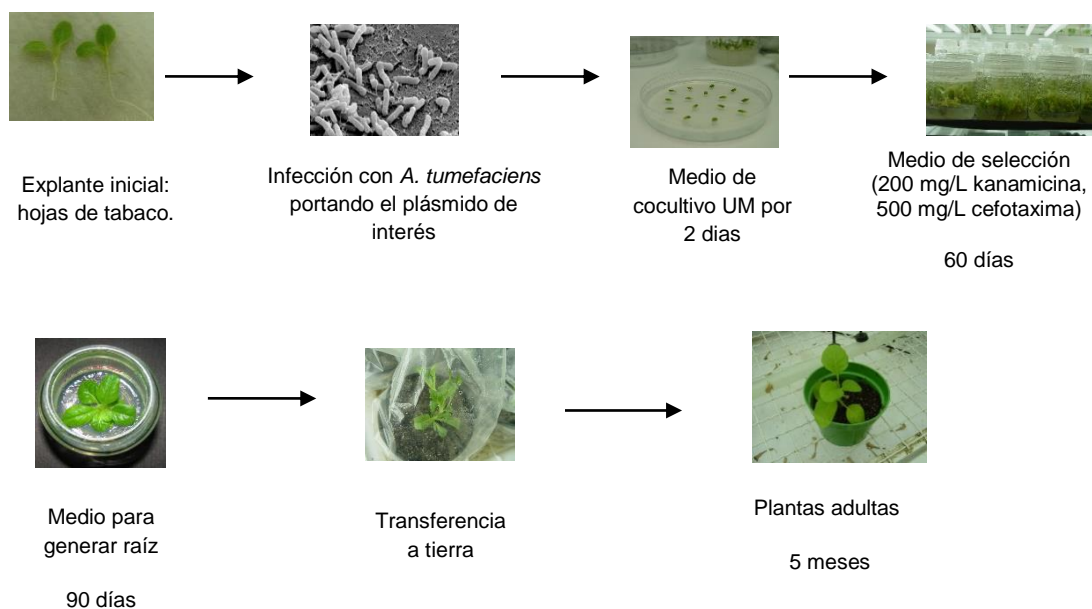


Figura 16. Representación esquemática de la transformación de plantas de tabaco vía *Agrobacterium*. Se muestra el tiempo acumulado para llegar a cada una de las etapas.

7.3 Transformación genética nuclear de tabaco vía *A. tumefaciens* con el plásmido pBI-VSRn

La infección de hojas de tabaco con el plásmido binario pBI-VSRn se realizó como se describió anteriormente. Las hojas de tabaco infectadas con el plásmido pBI-VSRn se colocaron en medio de selección (RMOP + 200 mg/L kanamicina + 500 mg/L) hasta la formación de callo y brotes organogénicos (Fig.17).

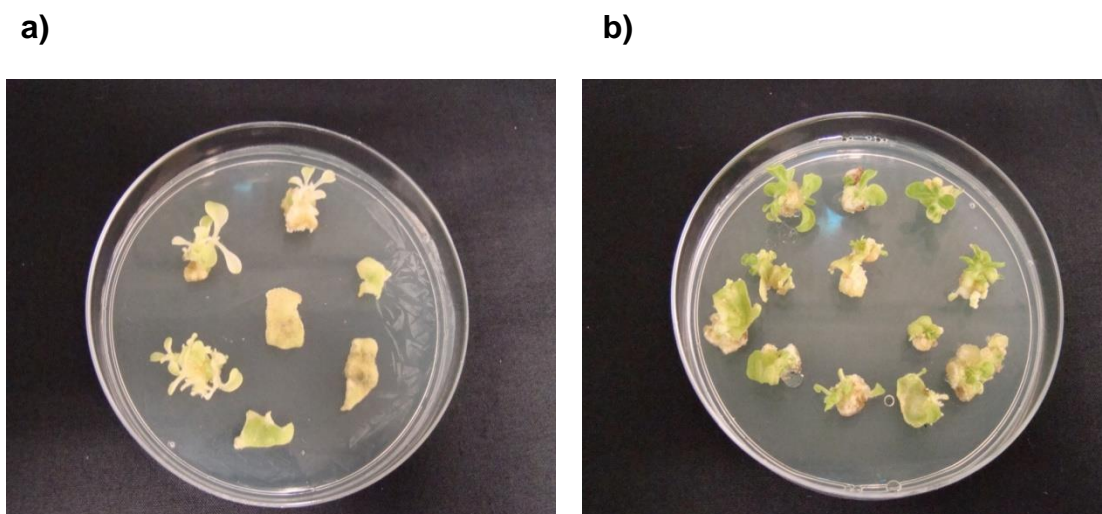


Figura 17. Formación de brotes de tabaco regenerados a partir de hojas infectadas con el plásmido binario pBI-VSRn.

a) Control negativo (hojas sin infectar).en medio de selección b) Hojas de tabaco infectadas con el plásmido pBI-VSRn. Fotos tomadas a las 6 semanas.

7.4 Análisis de transformantes

7.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para comprobar la presencia del transgén VSRn, se realizó un análisis por PCR a 9 plantas que se transfirieron a tierra que fueron resistentes al agente de selección (kanamicina), 7 de estas plantas fueron positivas por PCR (Fig. 18).

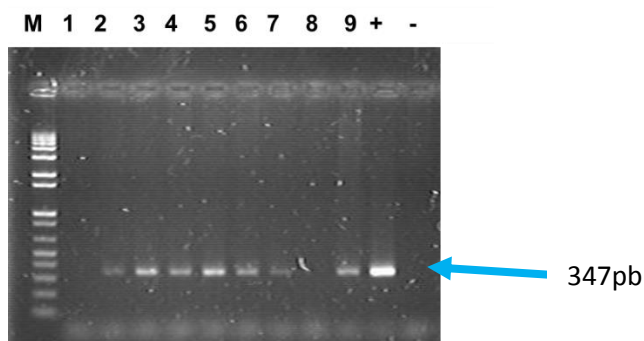


Figura 18. Productos de PCR.

Se muestra la amplificación de un segmento específico del gen VSRn (347 pb) en las plantas de tabaco en tierra que fueron resistentes a la selección. 1-9, muestras; (+), control positivo (plásmido pBI -VSRn); (-), control negativo (wt); M, marcador de peso molecular de 100 pb.

Posterior a esto, se obtuvo la generación de plantas T2, y se realizó el análisis de PCR para ver la presencia del transgén así como análisis de Dot blot para verificar la presencia de la proteína (Fig. 19 y 20).

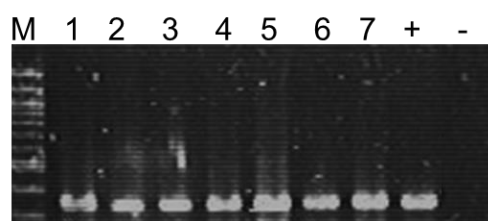


Figura 19. Productos de PCR de un segmento específico del gen 1 (347 pb).

Carriles 1-7, muestras; (+), control positivo (plásmido pBI -VSRn); (-), control negativo (wt) y M, marcador de peso molecular de 1Kb.

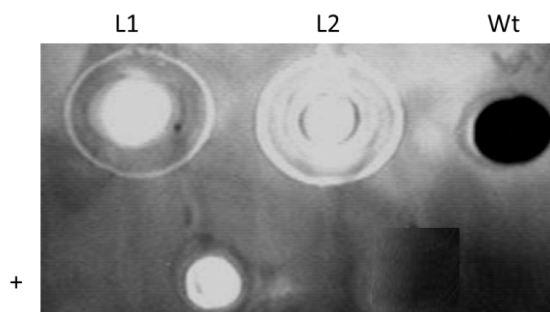


Figura 20. Dot blot de las plantas de tabaco transformadas nuclearmente.

L, líneas transgénicas; (+), control positivo; Wt, control negativo. Se utilizó como anticuerpo primario Anti-His.

7.2 Transformación transitoria

Para la expresión del péptido recombinante RhoA, 11 construcciones genéticas fueron diseñadas (como se describe en la sección de metodología), de las cuales 3 fueron expresadas exitosamente mediante transformación transitoria en una estancia realizada en CMB Fraunhofer, USA (Fig. 21).

Dichas construcciones se clonaron en el vector viral de expresión pGR-D4, transformadas en *A. tumefaciens* y posteriormente cada construcción genética fue introducida en plantas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración.

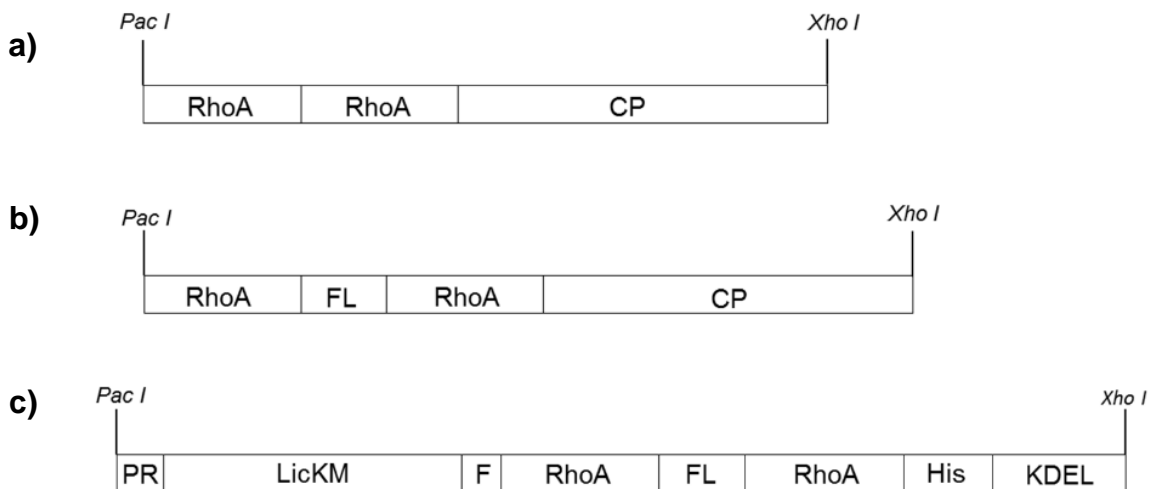


Figura 21. Representación esquemática de las construcciones evaluadas en el estudio. a), PGR-D4-RhoA2-d25CP péptido antiviral en tandem fusionado a la proteína de la cápside del virus del mosaico de la alfalfa ; b), PGR-D4-RhoA2-FL-d25CP péptido antiviral en tandem separado por un espaciador y fusionado a la proteína de la cápside del virus del mosaico de la alfalfa; c), PGR-D4-PR-RhoA2-FL-F-3-HK péptido antiviral en tandem separado por un espaciador y fusionado a la proteína de liqenasa de *Clostridium thermocellum* ; PR, péptido señal; RhoA, secuencia del péptido antiviral; FL, espaciador flexible; CP, proteína de la cápside del virus del mosaico de la alfalfa; F, sitio de proteasa flag; His, etiqueta de histidinas; KDEL,- secuencia de retención al retículo endoplásmico, LicKM, liqenasa; *Pac I* y *Xho I*, sitios de restricción. Todos los genes fueron optimizados para la expresión en plantas y se clonaron en el vector PGR-D4. Las secuencias finales se confirmaron por secuenciación.

7.3 Análisis de transformantes

7.3.1 Western blot

A los 4, 5, 6 y 7 días post infiltración (dpi), se recolectó tejido de las plantas transformadas y se evaluó la presencia de la proteína de interés y sus niveles de expresión mediante análisis de Western blot. Se observaron niveles máximos de expresión a los 6 dpi para PR-RhoA2-FL-F-3-HK (59 mg/ kg) y al séptimo dpi para RhoA2-d25CP y RhoA2-FL-d25CP (13 y 75 mg/ kg, respectivamente). Además, el análisis de Western blot confirmó el tamaño molecular predicho de 32 kDa para PR-RhoA2-FL-F-3-HK, utilizando anticuerpos anti-LickM, anti-4xHis y anti-RhoA, y un tamaño molecular de 25 kDa y 26 kDa para RhoA2-d25CP y RhoA2-FL-d25CP respectivamente, esto último utilizando anticuerpos anti- AIMV-CP y anti-RhoA (Fig. 22, se muestran resultados con uno de los anticuerpos).

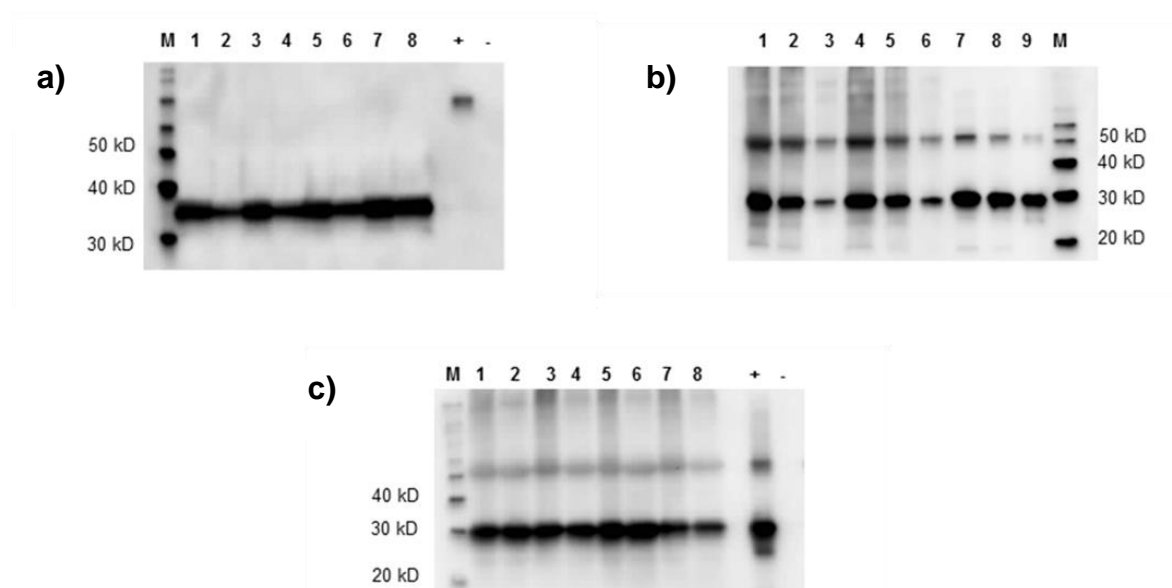


Figura 22. Análisis de Western blot.

a) Detección de la proteína de fusión PR-RhoA2-FL-F-3-HK utilizando anti-4xHis como anticuerpo primario. b) Detección de las proteínas de fusión RhoA2-d25CP. c), RhoA2-FL-d25CP utilizando anti-CP como anticuerpo primario. M, marcador de peso molecular (Magic Mark); 1-8, proteína soluble total a los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 dpi respectivamente; (+), control positivo correspondiente a una proteína irrelevante con tag de His (a) o la proteína CP (b y c); (-), control negativo correspondiente a proteína soluble total de una planta silvestre.

7.3.2 Purificación de proteínas recombinantes

Para la construcción -PR-RhoA2-FL-F-3-HK, tejido de las plantas transformadas fue recolectado a los 7dpi y la proteína recombinante fue purificada utilizando cromatografía de afinidad (columna de Níquel), la elución se realizó con concentraciones de imidazol de 100, 300 o 500 mM. La mayor eficiencia de elución PR-RhoA2-FL-F-3-HK se observó con imidazol 300 mM con un rendimiento de 1.41 mg (Fig. 22).

Por otro lado, las proteínas de fusión RhoA2-d25CP y RhoA2-FL-d25CP se purificaron mediante precipitación con polietilenglicol 5% (PEG 8,000) seguido de una ultracentrifugación (Fig. 23).

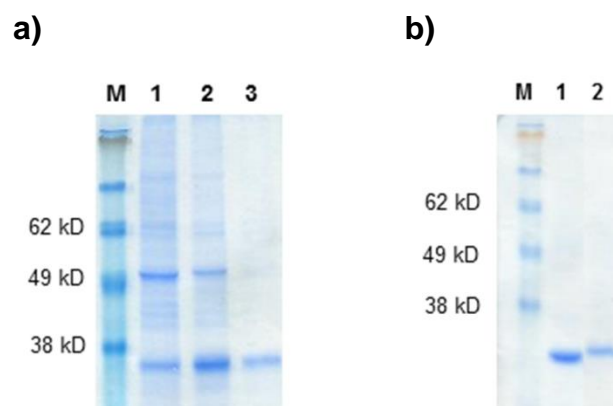


Figura 23. Purificación de proteínas.

a) Gel de Coomassie de la fusión a LickM; M, marcador de peso molecular (see azul); 1, Fracción de elución de imidazol 100 mM; 2, Fracción de elución de imidazol 300 mM; 3, Fracción de elución de imidazol 500 mM. b) Gel de Coomassie de las fusiones a CP. M, marcador de peso molecular (see azul); 1, construcción genética RhoA-d25CP; 2, construcción genética RhoA-FL-d25CP.

Se realizaron análisis de Western blot de las proteínas recombinantes, correspondientes a las 3 construcciones genéticas. Para el caso de la construcción RhoA2-FL-F-3-HK se utilizaron como anticuerpos primarios anti-LickM y anti-RhoA (Fig. 24).

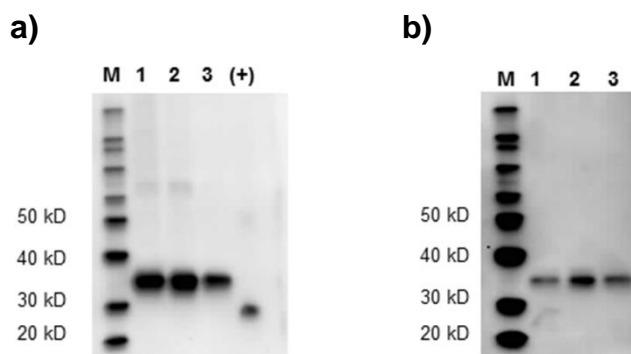


Figura 24. Western blot de la proteína de fusión PR-RhoA2-FL-F-3-HK purificada. a) Detección con anti-LicKM como anticuerpo primario. b) Detección con anti-RhoA como anticuerpo primario. M, marcador de peso molecular (Magic Mark); 1, Fracción de elución 100 mM de imidazol; 2, Fracción de elución 300 mM de imidazol; 3, Fracción de elución 500 mM de imidazol; (+), control positivo (20 ng de proteína LicKM purificada).

Análisis de Western blot para las proteínas de fusión a CP también fueron realizados, utilizando como anticuerpos primarios anti-CP o anti-RhoA (Fig. 25), en todos los casos se observó el tamaño molecular predicho para cada una de las proteínas.

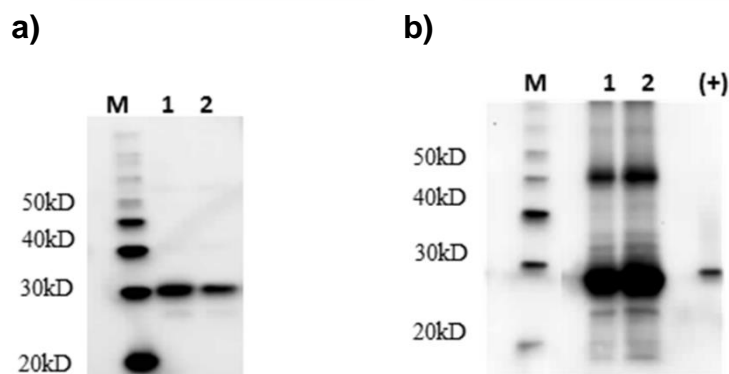


Figura 25. Análisis de Western blot de proteínas de fusión RhoA-CP purificadas. a) Construcción RhoA2-FL-d25CP detectada por anti-RhoA como anticuerpo primario. b) Construcción RhoA2-d25CP detectada por anti-CP como anticuerpo primario. M, marcador de peso molecular (Magic Mark); 1, 2.5 μ L de la proteína purificada; 2, 5 μ L de la proteína purificada; (+), 15 ng control positivo (proteína CP purificada).

7.3.3 Microscopia electrónica de barrido

Análisis de microscopia electrónica de barrido fueron realizados a las construcciones fusionadas a CP (RhoA2-FL-d25CP, RhoA2-d25CP), en ambos casos se observaron partículas esféricas parecidas a VLPs (virus like particles) (Fig. 26).

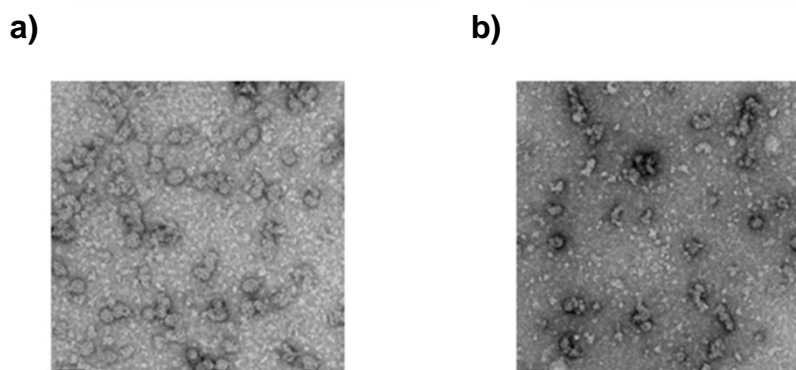


Figura 26. Análisis de microscopía electrónica de barrido. a) RhoA2-d25CP VLP. b) VLP RhoA2-FL-d25CP.

7.3.4 Análisis *in vitro* de actividad antiviral

Todas las proteínas purificadas (tanto las fusiones RhoA-CP como la fusión RhoA-LickM) fueron analizadas para probar la actividad antiviral anti-RSV *in vitro*, utilizando células HEp 2 y la cepa viral VSR A2. Los resultados demostraron la inhibición del crecimiento del VSR en cultivo celular por dos de las construcciones genéticas probadas, RhoA2-FL-d25CP (Fig. 27A) tuvo una concentración inhibitoria (IC₅₀) de 0.32 μ M, mientras que la IC₅₀ del péptido RhoA sintetizado (control positivo) fue de 4.77 μ M y CP por sí solo (control negativo) no mostró ninguna inhibición del crecimiento viral en cualquiera de las concentraciones ensayadas. En contraste, la inhibición del crecimiento viral no fue observada con RhoA2-d25CP en ninguna de las concentraciones probadas o que muestra la importancia del espaciador entre las dos moléculas de RhoA. La construcción genética fusionada a LickM, PR-RhoA2-FL-F-3-HK inhibió el crecimiento de VSR con una IC₅₀ de 3.72 μ M, mientras que LickM (control negativo) por sí sola no mostró ninguna inhibición a cualquiera de las concentraciones ensayadas (Fig. 27B). La Tabla 7 resume los valores de IC₅₀ para cada proteína probada.

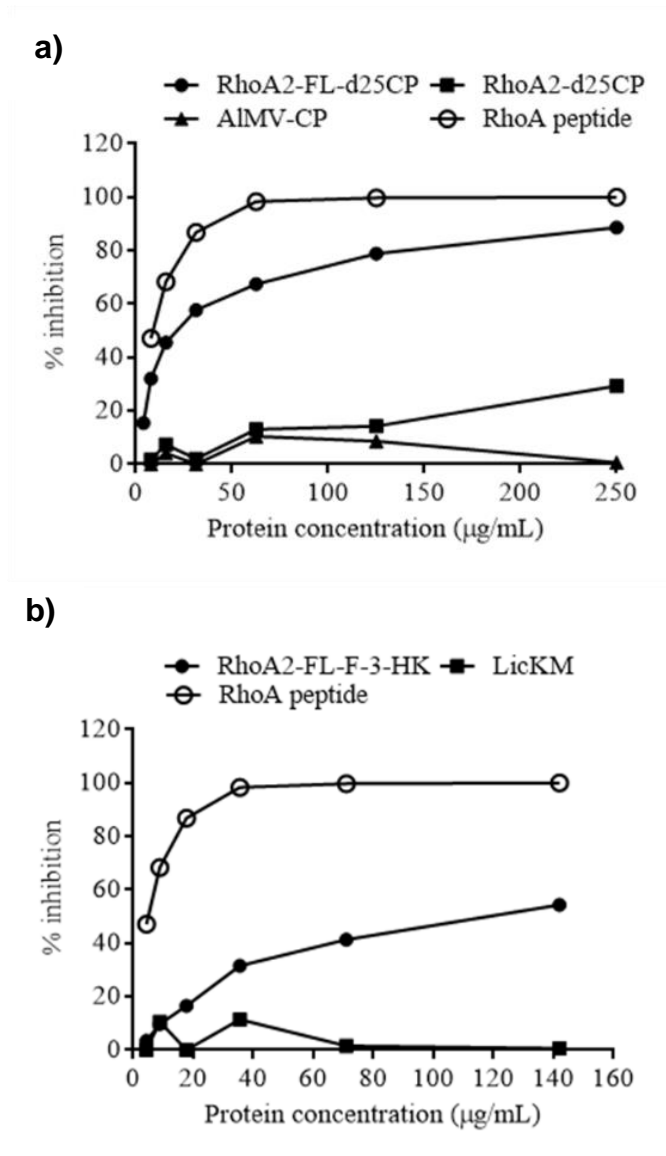


Figura 27. Inhibición del crecimiento viral *in vitro* por las proteínas de fusión. a) RhoA-CP. b) RhoA-LickM

Tabla 7. Valores de IC₅₀ para cada proteína probada.

Proteínas probadas <i>in vitro</i>	μM
PR-RhoA2-FL-F-3-HK	3.72
RhoA2-FL-d25CP	0.32
RhoA2-d25CP	> 10
Péptido Rho sintetizado	4.77
LickM	> 9.3
CP	>10

8. Discusión

El VSR es uno de los principales agentes etiológicos en padecimientos que afectan al tracto respiratorio bajo; para la edad de 2 años el 90% de los niños ha sufrido una infección por este virus (Van Drunen y col., 2007). Con una alta tasa de morbilidad y costos que ascienden a millones de dólares en países desarrollados, la infección por este virus se ha convertido en un problema de salud serio, por lo cual desde 1960 se han realizado diversos esfuerzos para producir una vacuna segura y eficaz contra el VSR; sin embargo el tipo de respuesta inmunológica desencadenada por el virus ha complicado esta tarea.

En la actualidad se ha experimentado con vacunas recombinantes de subunidades que tienen epítomos relevantes, ya que tienen las ventajas de que al no usar todo el organismo atenuado o inactivado, y solo seleccionar ciertos epítomos se disminuyen los efectos secundarios y se pueden seleccionar de diferentes proteínas teniendo un mayor rango de protección al generar diferentes anticuerpos en los organismos inmunizados con estos antígenos. Por lo tanto en este trabajo se decidió diseñar un gen sintético que incluye tanto epítomos de la proteína F como de la proteína G y M, con el fin de obtener una mayor protección y un balance adecuado entre la respuesta inmune Th1/Th2.

Como segunda opción se diseñaron construcciones genéticas que codifican para un péptido antiviral (RhoA), en estudios previos Pastey y col. (2000) demostraron que una interacción entre la proteína F del VSR y RhoA, una pequeña GTPasa transmembranal, facilita la formación del sincicio inducido por el virus. Además, los autores mostraron que un péptido sintético derivado de RhoA inhibió el crecimiento viral y la formación de sincicios inducidos por VSR tanto *in vitro* como *in vivo*. Aunque el mecanismo de inhibición viral no está claro los autores han sugerido que la inhibición de la entrada viral por el péptido RhoA está asociado con las propiedades polianiónicas y la dimerización de RhoA (Budge y col., 2004).

Las dos estrategias mencionadas anteriormente parecen prometedoras, y el uso de una plataforma de producción rentable es necesaria para cubrir la demanda de terapéuticos anti-VSR.

Durante las dos últimas décadas las plantas han emergido como fábricas para la producción de proteínas recombinantes, dado que ofrecen varias ventajas sobre otros sistemas de producción, como lo son: producción de grandes volúmenes de biomasa que contiene proteínas recombinantes, escalabilidad, bajos costos de producción, modificaciones post-traduccionales similares a la de los mamíferos y ausencia de patógenos que afectan a humanos Yusibov y col. (2002). Dadas las ventajas que ofrecen las plantas como sistemas de expresión, en este trabajo las construcciones diseñadas fueron optimizadas para su expresión en plantas.

Tres métodos son comúnmente utilizados para la expresión de proteínas heterólogas en plantas: transformación estable del genoma nuclear, transformación estable del genoma de cloroplastos y transformación viral transitoria.

En este estudio utilizamos la transformación estable del genoma nuclear para expresar la construcción genética VSRn de la proteína antigénica y la transformación viral transitoria para expresar las construcciones que codifican para el péptido antiviral RhoA.

Para el caso del gen VSRn se lograron transformar plantas de tabaco con la construcción pBI-VSRn, obteniéndose siete líneas correspondientes a la generación T2. Los análisis de PCR mostraron la presencia del transgén en cada una de ellas, y el análisis de dot blot fue positivo para tres de las plantas analizadas lo cual sugiere la presencia de la proteína recombinante. Sin embargo, se requieren análisis de Western blot para verificar la identidad de la proteína y después análisis *in vivo* para revelar la funcionalidad de la misma en ratones Balb/c.

La transformación nuclear ofrece como principal ventaja que es una transformación estable, lo cual significa que la nueva información introducida a la planta se hereda en las siguientes generaciones (Kaprowski y Yusibov, 2001). Sin embargo la cantidad de proteína que se obtiene es baja (0.01%-2% de la proteína

soluble total-PST), a pesar de haberse optimizado el gen para su óptima expresión en plantas.

Para el caso de las tres construcciones genéticas que codifican para el péptido antiviral, plantas de tabaco fueron transformadas transitoriamente, esta transformación ofrece como principales ventajas altos niveles de expresión de la proteína recombinante en un periodo de tiempo corto, sin embargo, se requiere un proceso de purificación adicional.

Dado el pequeño tamaño del péptido antiviral, este fue fusionado a dos proteínas acarreadoras (CP y LickM) con la finalidad de facilitar los procesos de purificación y de poder desplegar varias moléculas sobre una sola partícula acarreadora. Este tipo de procedimientos abarata los procesos de purificación los cuales son un factor importante en la industria.

Las tres construcciones fueron eficientemente expresadas en plantas de *N. benthamiana* y el rendimiento final fue alrededor de 10mg/kg de biomasa. Las diferencias en los niveles de expresión entre las construcciones pueden deberse a la naturaleza misma de cada construcción o al tipo de molécula acarreadora.

RhoA2-FL-d25CP y PR-RhoA2-FL-F-3-HK fueron capaces de inhibir la replicación de VSR en cultivos celulares, lo cual no fue observado con la construcción RhoA2-d25CP que carece de un espaciador entre las dos moléculas de RhoA. Estos resultados sugieren que el espaciador puede facilitar la dimerización del péptido RhoA y así contribuir a su actividad antiviral.

Sorprendentemente, la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de RhoA2-FL-d25CP fue 10 veces menor que la del péptido RhoA sintético (control), lo cual indica que producir este péptido en plantas es una mejor alternativa que por síntesis química. Sin embargo, el mecanismo de inhibición por RhoA2-FL-d25CP necesita ser investigado.

La fusión de RhoA a las moléculas acarreadoras incrementó los niveles de expresión en plantas, y la molécula de CP fue más eficiente en la inhibición de la replicación de VSR que el control (péptido RhoA sintetizado).

Una evaluación adicional en un modelo adecuado de animales es necesaria antes de seleccionar cualquiera de estas proteínas de fusión para el desarrollo de un fármaco para uso en humanos.

Los resultados obtenidos en este trabajo abren la posibilidad para la producción a gran escala del péptido RhoA como un posible agente terapéutico contra VSR.

9. Conclusiones

Los resultados del presente trabajo demuestran que:

1. Tres de las 11 construcciones (RhoA2-FL-F-3-HK, RhoA2-d25CP, RhoA2-FL-d25CP) se expresan eficientemente en forma transitoria en plantas de *N. benthamiana*.
2. RhoA2-FL-d25CP y PR-RhoA2-FL-F-3-HK inhiben la replicación de VSR, lo cual no se observa con la construcción RhoA2-d25CP.
3. Las fusiones de RhoA a las moléculas acarreadoras aumentan los niveles de expresión en plantas.
4. El valor de IC_{50} de la construcción genética RhoA2-FL-d25CP indica que es 10 veces más potente que el péptido sintético RhoA utilizado como control.
5. Es posible transformar nuclearmente plantas de tabaco con la construcción pBI-VSRn.

10. Referencias

- Argüello-Astorga GR y Herrera-Estrella LR (1994). Métodos de transformación y vectores de expresión en plantas, En: Avances en Ingeniería Genética, 2ª edición, M Vicente (Ed.), Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Pp. 41-70.
- Belanger H, Fleysh N, Cox S, Bartman G, Deka D, Trudel M, Koprowski H y Yusivob V (2000). Human respiratory syncytial virus vaccine antigen produced in plants. *FASEB J.* 14: 2323.
- Bermingham A y Collins PL (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:11259.
- Bourgeois C, Bour JB, Lindholt K, Gauthay C y Pothier P (1998). Heparin-like structures on respiratory syncytial virus are involved in infectivity *in vitro*. *J. Virol.* 72: 7221.
- Budge PJ, Yequiang Li, Beeler JA, Graham BS (2004). RhoA derived peptides dimers share mechanistic properties with other polyanionic inhibitors of respiratory syncytial virus (rsv), including disruption of viral attachment and dependence on rsv g. *J. Virol.* 5015-5022.
- Cangelosi GA, Best EA, Martinetti G y Nestei EW (1991). Genetic analysis of *Agrobacterium*. *Meth Enzymol.* 204: 384-397.
- Chanock R y Finberg L (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg.* 66:291-300.
- Chanock R, Roizman B y Myers R (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg.* 66:281-290.

- Corzo LM y Valdez RO (2013). El virus sincitial respiratorio humano: una panorámica. *CENIC*. 44:2.
- Daniell H, Streatfield SJ y Wycoff K (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci*. 6: 219-226.
- Davey MR, McCabe MS, Mohapatra U y Power JB (2002). Genetic manipulation of lettuce. En: *Transgenic Plants*. YH Hui, G Khachatourians, D Lydiate, A McHughen, WK Nip y R Scorza (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, 613-635.
- Falsey AR y Walsh EE (2000). Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev*. 13:371-384.
- Feans R, Pepples ME y Collins PL (2002). Mapping the transcription and replication promoters of respiratory syncytial virus. *J. Virol*. 76:1663.
- Graham B.S y Budge P.J (2004). Inhibition of respiratory syncytial virus by RhoA-derived peptides: implications for the development of improved antiviral agents targeting heparin-binding viruses. *JAC Antiviral*. 54:299-302.
- Hyoung JK, Jung-Kwon K, Sang BS, Hoan JL y Hong-Jin K (2006). Intranasal vaccination with peptides and cholera toxin subunit B as adjuvant to enhance mucosal and systemic immunity to respiratory syncytial virus. *Arch Pharm Res*. 30: 366-371.
- Juhasz K, Whitehead SS, Bui PT, Biggs JM, Crowe JE, Boulanger CA, Collins PL y Murphy BR (1997). The temperature-sensitive (ts) phenotype of a cold-passaged (cp) live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate, designated cpts530, results from a single amino acid substitution in the L protein. *J Virol*. 71(8): 5814–5819.
- Kaprowski H y Yusibov V (2001). The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 19 (17-19): 2735-2741.

- Kneyber MCJ, Moll HA y Groot R (2000). Treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection. *Eur J Pediatr.* 159: 399-411.
- Kimpen JL (2002). Prevention and treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis and postbronchiolitic wheezing. *Respir Res.* 3:S40.
- Lal P, Ramachandran VG, y Goyal R (2007). Edible vaccines: current status and future. *Indian J. of Medical Microbiology.* 25 : 93-102.
- Lico, Chen y Santi (2008). Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J Cell Physiol.* 216: 366-377.
- 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. of Immunol.* 168: 5499–5506.
- López M, Mallorquín Pardo R y Vega M (2004). Vacunas humanas de nueva generación. GENOMA España CIBT/FGUAM.
- Martínez-González L (2005). Transformación genética de lechuga (*Lactuca sativa* L) con un gen sintético de la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*. Tesis de licenciatura UASLP.
- Marty A, Meanger J, Mills J, Shields B y Ghildyal R (2004). Association of matrix protein of respiratory syncytial virus with the host cell membrane of infected cells. *Arch Virol.* 149:199.
- Michiels A, Van den Ende W, Tucker M, Riet LV y Laere AV (2003). Extraction of high quality genomic DNA from latex-containing plants. *Anal Biochem.* 1(315): 85-89.
- Morris JA, Blount RE y Savage RE (1956). Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med.* 92:544-549.
- Musiychuk K, Stephenson N, Bi H, Farrance CE, Orozovic G, Brodelius M, Brodelius P, Horsey A, Ugulava N, Shamloul AM, Mett V, Rabindran S, Streatfield SJ,

- Yusibov V (2007). A launch vector for the production of vaccine antigens in plants. *Influenza Other Respir Viruses*. 1: 19–25.
- Noyola DE, Alpuche-Solís AG, Herrera-Díaz A, Soria-Guerra RE, Sánchez-Alvarado J y López-Revilla R (2005). Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics. *J Med Microbiol*. 54: 969-974.
- Noyola DE, Zuviri-González A, Castro-García J y Ochoa-Zavala JR (2007). Impact of respiratory syncytial virus on hospital admissions in children younger than 3 years of age. *J Infect*. 54:180-184.
- Openshaw PJM y Tregoning JS (2005). Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin Microbiol Rev*.18:541-545.
- Pastey MK, Gower TL, Spearman PW, Crowe JE Jr y Graham BS (2000). A RhoA derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. *Nat Med*. 6: 35-40
- Patel J, Zhu H, Menassa R, Gyenis L, Richman A y Brandle J. (2007). Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves. *Transgenic Res*.16:239-249.
- Prince GA, Capiou C, Deschamps M, Fabry L, Garçon N, Gheysen D, Prieels J-P, Thiry G, Van Opstal O y Porter DD (2001). Efficacy and safety studies of a recombinant chimeric respiratory syncytial virus FG glycoprotein vaccine in cotton rats. *J Virol*. 74: 10287-10292.
- Rigano MM y Walmsley AM (2005). Expression system and developments in plant-made vaccine. *Immunol Cell Biol*. 83:271-277.
- Riu-Hong, Gong Wei, Fang Xue-Ping, Zhang Zhen-Ya, Mei Xing-Guo (2005). Plasmid construction, expression, immunogenicity and protective efficacy of recombinant protein candidate vaccine of respiratory syncytial virus. *Chin J Biotech*. 21(4):534-9.

- Rosete DP, Archundia FJ, Cabello C y Mankares ME (2002). Patogenia de las infecciones respiratorias por virus. *Rev Inst Nal Enf Resp México*. 15:239-254.
- Ruuskanen O, Arola M, Putto-Laurilla A, Mertsola J, Meurman O, Viljanen MK y Halonen P. (1989). Acute otitis media and respiratory virus infections. *Pediatr Infect Dis J*. 8: 94-99.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandhu JS, Krasnyanski SF, Domier L, Korban SS, Osadjan MD y Buetow DE (2000). Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Trans Res*. 9: 127-135.
- Sandhu JS, Osadjan MD, Krasnyanski SF, Domier LL, Korban SS y Buetow DE (1999). Enhanced expression of the human respiratory syncytial virus-F gene in apple leaf protoplasts. *Plant Cell Rep*. 18: 394-397.
- Simoës EA (1999). Respiratory syncytial virus infection. *Lancet*. 354:847-852.
- Spann KM, Tran KC, Chi B, Rabin RL y Collins PL (2004). Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J Virol*. 78:4363.
- Stern y Makel (2005). The history of vaccines and immunization: Familiar patterns, new challenges. *Health Affairs* 3: 611-621.
- Stott EJ y Taylor G (1985). Respiratory syncytial virus: brief review. *Archives of Virology* 84: 1-52.
- Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, Turner DD, Bailey MR, Mayor JM, Woodard SL, Beifuss KK, Horn ME, Delaney DE, Tizard IR, Howard JA (2001). Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine*. 21:17-19.

- Tyagi AK (2001). Plant genes and their expression. *Curr Sci.* 80:161-169.
- Vergara HSJ, Gutierrez MA y Mohapatra SS (2006). Biología molecular del virus sincicial respiratorio y desarrollo de estrategias profilácticas. *Revisiones Básicas.* 22: 135-153.
- Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, Fleysh N, Kean RB, Mikheeva T, Deka D, Karasev A, Cox S, Randall J y Koprowski H (2002). Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 20: 3155–3164.
- Zeng R-H, Gong W, Fang XP; Zhang Z-Y y Mei X-G (2005). Plasmid construction, expression, immunogenicity and protective efficacy of recombinant protein candidate vaccine of respiratory syncytial virus. *Chinese Journal of Biotechnology.* 21(4):534-9.
- Zeng R-H, Gong W, Fan C-F, Wang Y-F, Mei X-G (2006). 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.
- Zupan y Zambryski (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the *Cell Plant Physiol.* 107: 1041-1047.

11. Anexo I: Artículos publicados

Este artículo puede ser consultado en la siguiente liga:

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00425-015-2416-z>

Planta
DOI 10.1007/s00425-015-2416-z



ORIGINAL ARTICLE

Engineering and expression of a RhoA peptide against respiratory syncytial virus infection in plants

Benita Ortega-Berlanga¹ · Konstantin Musyichuk² · Yoko Shoji² · Jessica A. Chichester² · Vidadi Yusibov² · Omar Patiño-Rodríguez¹ · Daniel E. Noyola³ · Ángel G. Alpuche-Solís¹

Abstract

Main conclusion A RhoA-derived peptide fused to carrier molecules from plants showed enhanced biological activity of *in vitro* assays against respiratory syncytial virus compared to the RhoA peptide alone or the synthetic RhoA peptide.

A RhoA-derived peptide has been reported for over a decade as a potential inhibitor of respiratory syncytial virus (RSV) infection both *in vitro* and *in vivo* and is anticipated to be a promising alternative to monoclonal antibody-based therapy against RSV infection. However, there are several challenges to furthering development of this antiviral peptide, including improvement in the peptide's bioavailability, development of an efficient delivery system and identification of a cost-effective production platform. In this study, we have engineered a RhoA peptide as a genetic fusion to two carrier molecules, either lichenase (LicKM) or the coat protein (CP) of Alfalfa mosaic virus. These constructs were introduced into *Nicotiana benthamiana* plants using a tobacco mosaic virus-based expression

vector and targets purified. The results demonstrated that the RhoA peptide fusion proteins were efficiently expressed in *N. benthamiana* plants, and that two of the resulting fusion proteins, RhoA-LicKM and RhoA2-FL-d25CP, inhibited RSV growth *in vitro* by 50 and 80 %, respectively. These data indicate the feasibility of transient expression of this biologically active antiviral RhoA peptide in plants and the advantage of using a carrier molecule to enhance target expression and efficacy.

Keywords Respiratory syncytial virus · RhoA · Antiviral peptide · Carrier molecule · Lichenase · Virus-like particle · Transient expression

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00425-015-2416-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.


✉ Ángel G. Alpuche-Solís
alpuche@ipicyt.edu.mx

¹ División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José 2055, 78216 San Luis Potosí, Mexico

² Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology, 9 Innovation Way, Suite 200, Newark, DE 19711, USA

³ Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Avenida V. Carranza 2405, Col. Los Filtros, San Luis Potosí, Mexico

Published online: 16 October 2015

 Springer

Este artículo puede ser consultado en la siguiente liga:

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11240-013-0344-9>

Plant Cell Tiss Organ Cult (2013) 115:99–106
DOI 10.1007/s11240-013-0344-9

ORIGINAL PAPER

Transient expression and characterization of the antimicrobial peptide protegrin-1 in *Nicotiana tabacum* for control of bacterial and fungal mammalian pathogens

Omar Patiño-Rodríguez · Benita Ortega-Berlanga · Yessica Y. Llamas-González · Mario A. Flores-Valdez · Arelí Herrera-Díaz · Roberto Montes-de-Oca-Luna · Schuyler S. Korban · Ángel G. Alpuche-Solís

Received: 22 February 2013 / Accepted: 15 June 2013 / Published online: 25 June 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Mammalian infectious diseases are widespread, and some are becoming difficult to control due to inappropriate use of antibiotics. This has contributed to incidence of bacterial strains with resistance to commonly used antibiotics. Thus, effective alternative antibiotics are essential for treatment of infectious diseases. Antimicrobial peptides are viable alternatives to address this problem. Among those, protegrin-1 (PG-1) is a broad-spectrum

antimicrobial peptide. In this study, a magnICON was used to express the PG-1 peptide in *Nicotiana tabacum*, using a transient expression system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* transfection. Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Northern blot analyses of transformed *N. tabacum* were employed to detect viral replicons, 290 bp and 6.1 kb. SDS/PAGE revealed presence of a band corresponding to the molecular weight of PG-1 (2.1 kDa), which was absent in wild-type *N. tabacum*. Antimicrobial/antifungal assays of protein extracts from transiently transformed *N. tabacum* were performed, and these demonstrated that PG-1 peptide activity in these plant tissues was viable and contributed to inhibition of 53.2 % of *Klebsiella pneumoniae*, 70.2 % of *Staphylococcus aureus*, 56.6 % of *Escherichia coli*, 72 % of *Mycobacterium bovis* BCG, and 70 % of *Candida albicans* cultures. No inhibition of any of these fungal and bacterial pathogens was detected when wild-type *N. tabacum* extracts were used. Therefore, PG-1 produced in plant cells of infiltrated tobacco was active and controlled growth of several bacterial and fungal human pathogens.

O. Patiño-Rodríguez · B. Ortega-Berlanga · A. Herrera-Díaz · Ángel G. Alpuche-Solís (✉)
División de Biología Molecular, IPICYT/Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., Camino a la Presa de San José 2055, 78216 San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico
e-mail: alpuche@ipicyt.edu.mx

Y. Y. Llamas-González · M. A. Flores-Valdez
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) A.C., Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, 44270 Guadalajara, Jalisco, Mexico

Present Address:
A. Herrera-Díaz
Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, GmbH, Ingolstädter Landstraße 1, 85764 Oberschleißheim-Neuherberg, Germany

R. Montes-de-Oca-Luna
Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, NL, Mexico

S. S. Korban
Department of Natural Resources and Environmental Sciences, University of Illinois, 310 ERML, 1201 W. Gregory Drive, Urbana, IL 61821, USA

Keywords magnICON · Alternative antibiotics · TMV · Tobacco · Protegrin-1

Abbreviations

AMPs	Antimicrobial peptides
TMV	Tobacco mosaic virus
GFP	Green fluorescent protein
PG1	Protegrin-1
PCR	Polymerase chain reaction
RT-PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction
TSP	Total soluble protein
Rs-ASP2	Signal peptide of the <i>Raphanus</i> antifungal protein 2
CFU	Colony-forming unit

12. Apéndice

12.1 Preparación de células competentes y transformación de *E. coli* por choque térmico

Se prepararon células competentes a partir de un cultivo de *E. coli* Top 10 F' de 24 horas, crecido en caldo LB a 37 °C. De este preinóculo se tomaron 250 µL y se añadieron a 25 mL de caldo LB, se incubó por 90 minutos a 37°C y agitación de 150 rpm. El cultivo se enfrió en baño de hielo y se centrifugó 35 segundos a 12,000 rpm. La pastilla se lavó con 4 mL de cloruro de calcio 0.1M y glicerol al 15%, y se volvió a empacar por centrifugación. Finalmente las células se resuspendieron en 630 µl de cloruro de calcio 0.1 M + 15% glicerol y se almacenaron a -70 °C en alícuotas de 30 µL.

Para realizar la transformación, las células competentes se descongelaron sobre hielo y se añadió 3.0µL del ADN de interés, se mezcló y se incubaron en hielo por 15 minutos. Los tubos se llevaron a un baño a 43°C por 1 minuto y se regresaron inmediatamente al hielo por 10 minutos. Se añadió 1 mL de medio de cultivo LB y se incubó 40 minutos a 37°C y 150 rpm. Después, 100 µL del cultivo se inocularon en agar LB con 100 mg/L de kanamicina o ampicilina, según el caso.

11.2 Preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Se prepararon de acuerdo al protocolo de Cangelosi y col. (1991). La cepa LBA4404 se inoculó en medio de cultivo YM por dos días, de este cultivo (DO 0.04-0.08 a 600nm), se tomaron 5 mL y se les agregó medio YM hasta 100 mL y se incubó a 28 °C hasta obtener una densidad óptica de 0.5 (aproximadamente 4 h), se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la bacteria en 40 mL de buffer HEPES 1mM pH 7, se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la bacteria en 40 mL de buffer HEPES 1mM pH 7 y 10% de glicerol. Se centrifugó y se resuspendió la bacteria en 2 mL de buffer HEPES 1 mM pH 7 y 10% de glicerol y finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C, se resuspendió la pastilla en 400 µL de buffer HEPES y 10% de glicerol, se tomaron alícuotas de 50 µL y se almacenaron a -80°C. La misma metodología fue

utilizada para preparar células electrocompetentes de la cepa de *Agrobacterium* GV3101 utilizada en los ensayos de transformación transitoria de tabaco.

12.3 Extracción de ADN plasmídico

Se basó en el método de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989). Se tomó 1.5 mL de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 12 horas y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos, se eliminó parte del sobrenadante, se resuspendió la pastilla con vórtex y se añadió 150 μ L de la solución I de Birnboim (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 225 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 300 μ L de etanol al 70 %, se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm, se agregó RNAsa 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, se re suspendió en 20 μ L de agua milli Q y se almacenó a -20 °C.

12.4 Preparación de soluciones y medios de cultivo

12.4.1 TAE 50X

Para preparar un litro 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.

12.4.2 Agarosa 1%

Para preparar 100 mL se añadió un gramo de agarosa a 100 mL de TAE 1X, se calentó hasta disolver y se almacenó a temperatura ambiente.

12.4.3 Mezcla basal de sales MS

Tabla 8. Concentración de la mezcla basal de sales.

Solución	Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del stock 100 X (g/L)
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.

12.4.4 Vitaminas MS

Tabla 9. Concentración de vitaminas MS.

Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del Stock 1000 X (mg/mL)
Myoinositol	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.

12.4.5 Vitaminas B5

Tabla 10. Concentración de vitamina B5.

Compuesto	Concentración (mg/L)	Concentración del Stock 1000 X (mg/mL)
Myoinositol	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.

12.4.6 Kanamicina

Para preparar un stock de 50 mg/mL, 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 μ m) y se almacenó a -20 °C.

12.4.7 Cefotaxima

Para preparar un stock de 500 mg/mL, se disolvieron 2 gramos de cefotaxima en agua desionizada. Se aforó a 4 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μ m) y se almacenó a -20 °C

12.4.8 Rifampicina

Para preparar un stock de 50 mg/mL, se disolvieron 5 gramos de rifampicina en agua desionizada. Se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μ m) y se almacenó a -20 °C.

12.4.9 Ácido naftalenacético (ANA)

Para preparar un stock de 1.5 mg/mL, 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.

12.4.10 Benciladenina (BA)

Para preparar un stock de 0.6 mg/mL, 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.

12.4.11 Procedimiento general para la preparación de medios de cultivo

Para preparar un litro 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 esterizaron a 15 lb/pulgada² por 15 minutos.

Cuando fue necesario, la kanamicina previamente esterilizada (stock 50 mg/mL), se añadió al medio después de esterilizar una vez que su temperatura bajó hasta aproximadamente 50 °C.

12.4.12 Composición de medios de cultivo

Tabla 11. Medios de cultivo.

Medio	Vitaminas	ANA (mg/L)	BA (mg/L)	Cinetina (mg/L)	2,4-D (mg/L)	Caseína (g/L)	pH
MS	MS						5.7
MS0	B5	-	-	-	-	-	5.7
RMOP	B5	1.0	0.1	-	-	-	5.8

12.4.13 Medio de cultivo YM

Para preparar un litro 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.

12.4.14 Medio de cultivo LB

Para preparar un litro de medio LB se pesaron 20 g de base para medio de cultivo LB, se disolvió, se aforó con agua destilada y se esterilizó. Cuando fue necesario se agregaron 10 g de agar grado bacteriológico.

12.4.15 Oligos utilizados

Oligo VSR1- F

5'- GTGAACAAGCAAAGCTGTAGCATAT

Oligo VSR1-R

5'-ATCCTATGTA ACTCTCTATCTGAGC